

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

Facultad de Ciencias y Tecnología

Departamento de Biología



**OPTIMIZACIÓN DE MICROSATÉLITES EN *Pinus spp.* EN EL
LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR UNAN- LEÓN**

Trabajo monográfico previo a optar al título de licenciado en Biología

AUTOR:

Br. Eduardo Noel Mendoza Ramírez

Tutora: PhD. Verónica Díaz

León, Nicaragua

25 de Octubre de 2013

DEDICATORIA

A María Consuelo Centeno. †

A mis padres, esposa e hijos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a quienes en algún momento colaboraron tanto en recolecta de semillas, análisis de laboratorio como en revisión del documento, destacando el gran esfuerzo y dedicación de la profesora Verónica Díaz, dada su comprometida tarea de estudiar las poblaciones forestales de Nicaragua a nivel molecular. Sin olvidar a los destacados profesores que guiaron mi carrera universitaria, compartieron su conocimiento y fueron un ejemplo a seguir.

“Strange is our situation here upon earth. Each of us comes for a short visit, not knowing why, but sometimes seeming to divine a purpose. From the standpoint of daily life, however, there is one thing we do know, that we are here for the sake of others—above all for those upon whose smile and well-being our own happiness depends, but also for the countless unknown souls with whose fate we are attached by a bond of sympathy. Many times a day I realize how much my own outer and inner life is built upon the efforts of my fellows—men, both living and dead, and how earnestly I must exert myself in order to give in return as much as I have received.”

Albert Einstein

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico	H-W: Hardy weinberg
ADNcp: ADN del cloroplasto	IAM: Modelo de alelos infinitos
ADNmt: ADN Mitocondrial	IPGRI: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos
AFLPs: Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados	kb: kilopares de bases
ARN: Ácido ribonucleico	KCl: Cloruro de Potasio
ARNasa: Enzima para degradar ARN	LINES: Elementos nucleares largos intercalados
BSA: Albúmina de suero bovino	LTR: Repeticiones terminales largas
cm: centímetro	M: Molar
CTAB: Bromuro trimetil amonio de cetilo	MAS: Selección asistida por marcadores
DIRs: Elementos trasponibles de Dictyostelium	Mb: Mega base
dsDNA: ADN de doble cadena	Mg: Magnesio
DMSO: Dimetil Sulfóxido	Mg²⁺: Ion magnesio
dNTP: 2'-deoxinucleósido 5'trifosfato	MgCl₂: Cloruro de Magnesio
D_{sw}: Distancia genética	min: Minutos
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	mm: Milímetros
H: Heterocigosidad	mM: Milimolar
H_E: Heterocigosidad esperada	msnm: metros sobre el nivel del mar
HLA: Antígenos leucocitarios humanos	NaCl: Cloruro de Sodio
H_O: Heterocigosidad observada	ng: Nanogramo
HRM: alta resolución de la temperatura de anillamiento	°C: Grados Celsius
	PAGE: Electroforesis de geles de acrilamida
	pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Equidad parental

pg: picograma

pH: Porcentaje de hidrogeno

PIC: Contenido de información polimórfica

PLE: Penelope-like Elements

PM: Peso molecular

Primer F: Cebador Forward

Primer R: Cebador Reverse

QTL: Quantitative Trait Loci

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar

RFLPs: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecilsulfato sódico

SINEs: Elementos nucleares cortos intercalados

SMM: Stepwise Mutation Model

SSR: Repeticiones de secuencias simples

STRs: Repeticiones cortas en tandem

TAE: Tris Hidroximetil amino metano

TAMU: Texas A&M University

Taq: Thermus aquaticus

TBE: Buffer Tris-Borate EDTA

TE: Tris EDTA

TEMED: Tetramethylene diamine

TPM: Modelo de dos fases

U: Unidades de enzima

UV: Ultravioleta

VNTRs: Repeticiones en tandem de número variable

$\delta\mu^2$: Delta mu cuadrado

μ l: Microlitro

%T: Concentración total

RESUMEN

Los microsatélites son marcadores moleculares codominantes cuyos resultados son reproducibles entre diferentes laboratorios, dos características muy importantes en las que supera a la técnica RAPD, la cual ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios de caracterización genética. Estos marcadores han demostrado ser herramientas eficaces en muchas aplicaciones en genética de poblaciones y actualmente es la herramienta más utilizada en estudios de especies forestales. La optimización de condiciones de PCR es uno de los aspectos más importantes a tomar en cuenta antes de amplificar y analizar correctamente los microsatélites, ya que parámetros no optimizados de PCR pueden ocasionar productos no específicos. En este trabajo se logró amplificar microsatélites para 19 plántulas de *Pinus spp.*, con los siguientes parámetros: Concentración de ADN: 1.6 ng, MgCl₂: 1.5 mM; Taq polimerasa: 0.5 U/μl, dNTPs 200 μM, primers: 0.2 μM y temperatura de anillamiento: 56°C, en un volumen final de 12 μl. Con dichos parámetros optimizados se logró amplificar 3 de 6 regiones microsatélites probadas para *Pinus spp.* Los amplicones obtenidos fueron corridos en geles de acrilamida al 4%, lográndose la separación de 3 alelos para la región microsatélite PtTX2123 y 2 alelos tanto para PtTX3030 como para PtTX3025, por lo que se concluye que estos primers presentan transespecificidad para *Pinus spp.* Con esta técnica se aportará mayor información en los estudios de estimación de diversidad genética en poblaciones nicaragüenses de *Pinus spp.* con estos primers, y en otras especies adquiriendo los primers apropiados.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	V
ÍNDICE	IV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. MARCO TEÓRICO	4
3.1. COMPOSICIÓN DEL GENOMA EUCARIOTA	4
3.2. POLIMORFISMO DEL ADN	11
3.3. MICROSATÉLITES	13
3.3.1. <i>Importancia</i>	15
3.3.2. <i>Clasificación</i>	16
3.3.3. <i>Ventajas y desventajas</i>	17
3.3.4. <i>APLICACIONES</i>	19
3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	21
3.4.1. <i>Buffer de PCR</i>	22
3.4.2. <i>Primers</i>	22
3.4.3. <i>Desoxinucleósidos trifosfatos</i>	23
3.4.4. <i>Taq-polimerasa</i>	23
3.4.5. <i>ADN molde o "template"</i>	24
3.4.6. <i>Ayudantes de la PCR</i>	25
3.4.7. <i>Ventajas de la PCR</i>	25
3.5. ELECTROFORESIS.....	26
3.6. DETECCIÓN DE MICROSATÉLITES	28
3.6.1. <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	28
3.6.2. <i>Electroforesis capilar (secuenciación automática)</i>	28
3.6.3. <i>Detección por hrm (temperatura de anillamiento de alta resolución)</i>	28
3.6.4. <i>electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	29
3.7. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN ALÉLICA.....	35
IV. METODOLOGÍA	37
4.1. MATERIAL VEGETAL Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS	37
4.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	37
4.3. CHEQUEO Y CUANTIFICACION DE ADN.....	39
4.4. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES POR PCR	40
4.5. ELECTROFORESIS Y TINCIÓN DE ADN MICROSATÉLITES.....	42
V.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1. EXTRACCIÓN DE ADN.....	52
5.2. EFECTO DE CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.....	54
5.3. ANÁLISIS DE BANDAS	57
VI. CONCLUSIONES	60

VII. RECOMENDACIONES.....	61
VIII.BIBLIOGRAFIA	62
ANEXOS	83

I. INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares denominados microsatélites SSRs (Secuencias simples repetidas) por sus siglas en inglés, son secuencias cortas de ADN de 1 a 6 nucleótidos (Schlötterer, 1998). Estas secuencias son altamente abundantes en todo el genoma y el polimorfismo de estas regiones refleja variación en el número de unidades de repetición (Varshney *et al.*, 2004).

Actualmente existen una cantidad considerable de marcadores moleculares, uno de los más ampliamente utilizados han sido los RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), los cuales tienen ciertas limitaciones, como: baja reproducibilidad y dominancia. Los microsatélites son marcadores codominantes y altamente reproducibles por lo que poseen una serie de cualidades que los hacen útiles para; estimar variación genética útiles en colecciones de germoplasma, programas de mejora, detectar y mapear genes (QTL), selección asistida por marcadores (MAS), analizar pedigríes, controlar pureza, detectar diversidad genética, determinar relaciones entre especies y razas, estudio de estructura de poblaciones, estimar relaciones taxonómicas y filogenéticas (Kantartzi, 2013), así como para análisis de paternidad, tipificación de individuos, entre otras características que hacen que esta técnica se esté imponiendo como marcadores de alta calidad, en desarrollo constante y en auge (Aranzana *et al.*, 2001; Morera *et al.*, 1999).

Desde finales de los 90s en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León, se han realizado investigaciones, en las que se utiliza la técnica RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) para detectar y estimar variabilidad genética en poblaciones naturales de *Jatropha curcas* (Williams *et al.*, 2000), *Sabal mexicana* (Guido & Díaz, 2006), *Bombacopsis quinata* (Dolmus *et al.*, 2006), *Pinus tecunumanii*. (Cerdeira, 2007), *Cedrela odorata* (Tijerino, 2009) y *Calycophyllum candidissimum* (Olivares & Gonzales, 2012). Sin embargo, los RAPDs, por ser marcadores dominantes, no logran diferenciar homocigotos de los heterocigotos, subestimando la cantidad de diversidad existente.

Además, la baja reproducibilidad de resultados implica utilizar mayor número de primers, para generar un buen número de marcadores RAPDs, lo que resulta en un laborioso trabajo y mayor gasto de recursos.

Con el presente estudio se pretende optimizar la técnica microsatélite en las condiciones del Laboratorio de Genética Molecular. Dicha técnica brinda fidelidad en la lectura de bandas, propicia el ahorro de recursos, reduce el tiempo de obtención de datos moleculares y brinda mayor información sobre cantidad y distribución de la diversidad genética de las poblaciones a estudiar en las investigaciones de caracterización de variabilidad genética.

Con este primer estudio de regiones microsatélites desarrollado en Nicaragua utilizando *Pinus spp.*, para el Laboratorio de Genética Molecular se abren una serie de probables investigaciones con diversos enfoques, tanto en especies vegetales como animales.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer la técnica microsatélites en las condiciones del laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León.

2.2 .OBJETIVO ESPECÍFICO

- Optimizar condiciones de extracción, amplificación, electroforesis y tinción de ADN, para la detección de microsatélites.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. COMPOSICIÓN DEL GENOMA EUCARIOTA

El conjunto de la información presente en las células se denomina genoma y según su localización, podemos identificar un genoma complejo nuclear, también se encuentran cantidades pequeñas de ADN en el citoplasma, fuera del núcleo: en los cloroplastos (ADNcp) y en las mitocondrias (ADNmt), entre otras secuencias transgénicas y de origen viral (Figura 1). Tanto los cloroplastos como las mitocondrias tienen su propio ADN, del cual hay varias copias (Dushek & Tobin, 2005). Sus genes codifican para la traducción y la transcripción de los componentes de estos organelos, y tienen funciones altamente especializadas en la expresión del fenotipo del organismo a que pertenecen (Cooper & Sunderland, 2000; Alberts *et al.*, 2008).

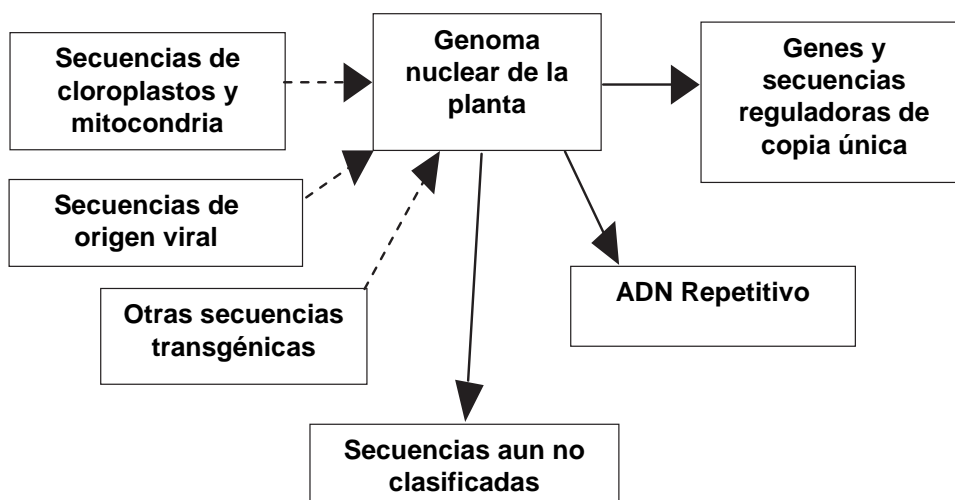


Figura 1. Composición del genoma eucariota (Heslop-Harrison & Schmidt, 2007)

Por otro lado, en el genoma eucariota existen 2 tipos de ADN, de acuerdo a la función biológica que desempeñan:

A. ADN codificante

Este tipo de ADN tiene una función conocida, como por ejemplo la expresión de un gen cuyo producto final es una proteína. Soporta gran presión selectiva, lo que se traduce en pocas mutaciones (Reveles *et al.*, 2008).

B. ADN no codificante

Comprende secuencias de ADN transcripcionalmente inactivas de funciones diversas (como por ejemplo, promotores de genes, reguladores de la expresión génica, etc.) y en otros muchos casos de función desconocida o sin función aparente. Este tipo de ADN por ser altamente polimórfico, tiene un gran interés de cara a la identificación de individuos. Según Rober (2008), se clasifican en ADN de copia única y ADN de copia múltiple:

a. ADN de copia única

El ADN de copia única constituye al menos la mitad del ADN del genoma pero su función sigue siendo un misterio, porque las secuencias que realmente codifican proteínas son una pequeña porción de todo el ADN de copia única. La mayor parte del ADN de copia única se encuentra en ciertos tramos entremezclados con varias familias de ADN repetitivo.

b. ADN de copia múltiple

Las secuencias de este tipo de ADN también denominado ADN Repetitivo, pueden ser altamente repetitivas, moderadamente o poco repetitivas.

Se clasifican en base a sus dos características más importantes: su disposición a lo largo del genoma y el tamaño de la unidad de repetición.

De acuerdo a Brown (2002), se pueden reconocer dos grupos principales ADN repetido en tandem y ADN repetido disperso:

i. ADN repetido en Tándem

Se compone de bloques de secuencias repetitivas agrupadas unas tras otras. Según el tamaño de la unidad de repetición, se subdivide en: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite (Flores & Garrido, 2012).

El **ADN repetido** en tándem se denomina **ADN satélite** por que los fragmentos de ADN que contienen secuencias repetidas en tándem, se separan del resto de ADN genómico cuando el ADN se somete a centrifugación en gradiente de densidad de Plata-Sulfato de Cesio, obteniéndose 2 bandas, la de menor densidad corresponde al ADN satélite.

Los distintos componentes de este tipo de ADN repetitivo adoptan un patrón de distribución cromosómica diferente: el **ADN satélite** se sitúa en la región centromérica, el **ADN minisatélite** en los telómeros o en sus proximidades, y el **ADN microsatélite** aparece disperso por todo el cromosoma.

Otra distribución del ADN repetido en tándem según Vogt (1990) se da de dos maneras:

- **Tipo I**

Grandes bloques formados por repeticiones de distintas unidades de longitud variable.

- **Tipo II**

Pequeños bloques distribuidos a lo largo de todo el genoma, con un número variable de unidades de repetición de secuencia similar. Pertenecen a este tipo los minisatélites y los microsatélites.

Para Flores y Garrido (2012) resulta adecuado incluir en esta clasificación los genes parálogos y ADN de telómeros (Figura 2).

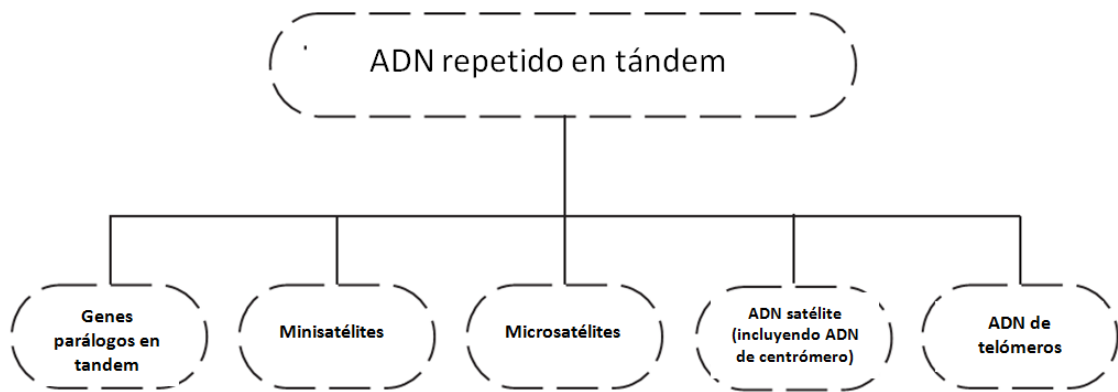


Figura 2. Clasificación del ADN repetido en tándem (Flores & Garrido 2012)

- **ADN satélite**

Cal (2001) cita a varios autores los cuales afirman que las secuencias repetitivas se disponen en grandes bloques de diversas unidades de complejidad variable, con una longitud desde 100 kb a varias Mb.

Para separar el ADN satélite del resto del ADN genómico se somete a centrifugación en gradiente de densidad de Plata-Sulfato de Cesio, obteniéndose dos bandas, la de menor densidad corresponde al ADN satélite.

Existen 4 tipos de ADN satélite (I,II,III,IV) los cuales se distinguen según el mayor o menor contenido de GC (Singer, 1982). Representan en conjunto del 2 al 6% del genoma y tienen una secuencia consenso de 5 a 170 pb (Waye & Willard, 1987). Algunos satélites poseen una unidad de repetición de tamaño pequeño, como los satélites II y III, que consisten en la repetición en tándem de la secuencia ATTCC.

Existen otros tipos de ADN satélite que no son distinguibles ya que su densidad es similar al de los satélites I y III, compartiendo una secuencia consenso de aproximadamente 171 pb, con variaciones individuales (Choo *et al.*, 1991).

- **ADN Minisatélite**

Jeffreys *et al.* (1985) utilizó el término minisatélite para designar loci de ADN repetitivo de un tamaño menor que el de los satélites clásicos. Los bloques de secuencias de este ADN poseen un tamaño aproximado entre 0.1 y 40 kb y la unidad de repetición es de 10-100 pb. Tienen un alto grado de variabilidad, tanto en el número de repeticiones en tándem como en la secuencia de la unidad de repetición, por lo que ante tamaños idénticos podemos estar frente a alelos diferentes.

Los loci VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) fueron nombrados por Nakamura *et al.* (1987) aludiendo a la variación en el número de unidades de repetición. Tomado en sentido estricto, este término podría aplicarse a cualquier tipo de ADN repetitivo, haciendo referencia sólo al número de repeticiones y no exclusivamente al minisatélite (Armour *et al.*, 1989).

- **ADN Microsatélite**

Los microsatélites llamados así por su pequeño tamaño, hasta unos 400 pb, lo que los hace idóneos para técnicas de PCR. También se conocen como STRs (Repeticiones cortas en tandem) pues la unidad de repetición oscila entre 2 y 7 pb (Edwards *et al.*, 1991). Se encuentran ampliamente repartidos por todo el genoma (Litt & Luty, 1989).

ii. ADN repetitivo disperso

Está representado por dos familias que se diferencian en el número de nucleótidos que constituyen la unidad de repetición (Singer, 1982). Algunos componentes de estas familias pueden ser considerados como transposones (elementos genéticos móviles), que son fragmentos inestables de ADN con capacidad migratoria (Koremborg & Rykowski, 1988). Según Flores y Garrido (2012) se clasifican en: Retrotransposones (Tipo I), Transposones (Tipo II), genes dispersos parálogos, retrogenes y retropseudogenes (Figura 3).

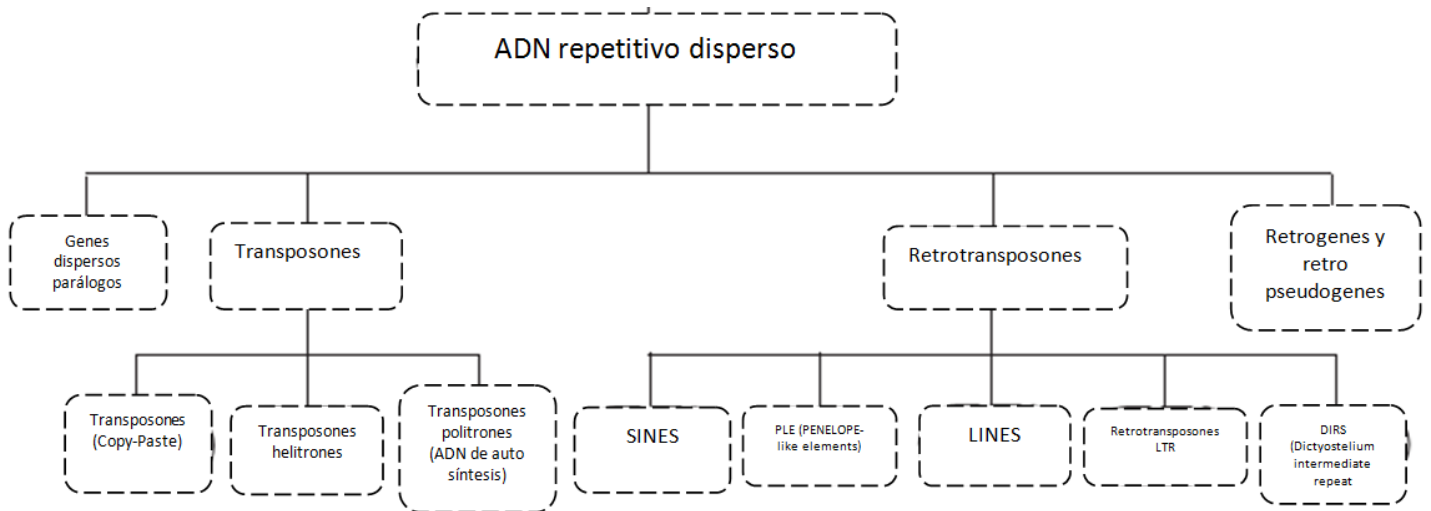


Figura 3. Clasificación del ADN repetitivo disperso (Flores & Garrido 2012)

- **Retrotransposones (Tipo I)**

Los retrotransposones son elementos en el genoma que pueden amplificarse ellos mismos, estos se encuentran en casi todos los organismos eucariotas, son los componentes principales del ADN nuclear, siendo particularmente abundantes en plantas (San Miguel & Bennetzen, 1998).

-Retrotransposones LTR (Repeticiones terminales largas) Son elementos que se amplifican ellos mismos en el genoma, estas regiones están presentes en muchos organismos eucariotas. Son abundantes en plantas y son el componente principal del ADN nuclear, por ejemplo: en maíz representan el 49-78% (San Miguel *et al.*, 1998).

-PLE (Elements como penelope) El único representante trasponible activo de este linaje ha sido aislado de *Drosophila viridis*. Este elemento (Penelope) es responsable por el síndrome de disgenesia en híbridos caracterizado por la movilización simultánea de familias de elementos trasponibles no relacionadas (Evgen'ev, 2005).

-SINEs (Elementos nucleares dispersos cortos) Los constituyen repeticiones menores de 500 pb. La familia más representativa y mejor estudiada es la ALU, así llamada por presentar un lugar de reconocimiento para la enzima de restricción Alu I (Slagel *et al.*, 1987).

-LINEs (Elementos nucleares dispersos largos) Están constituidos por secuencias repetitivas mayores de 500 pb.

-DIRs (Elementos trasponibles de Dictyostelium) Probablemente evolucionaron de Retrotransposones LTR (Repetición terminal larga), estos poseen algunas características particulares como contener un dominio de enzima recombinante tirosina en vez de Integrasa y contienen LTRs, algunos DIRS retienen Intrones en ORFs (Marco de lectura abierto).

- **Transposones (Tipo II)**

Los elementos trasponibles son secuencias de ADN que se mueven de una posición a otra en el cromosoma. Están presentes en todos los reinos de los organismos vivos. Solamente genomas de microsporidios y Apicomplexos parásitos han eliminado los TEs.

-Transposones “Copia y Pega” La trasposición de los elementos no involucra un ARN intermediario y las trasposiciones son catalizadas por varias enzimas transposasas (Feschotte, 2007).

-Helitrones Este tipo de transposón ha sido encontrado en genomas eucariotas y se replica a través del mecanismo Rolling-circle.

-Politrones Los genomas de los peces han mantenido o han sido colonizados por elementos adicionales de ADN. Politrón es un transposón que ha sido encontrado en protistas, Hydra, nemátodos, erizos de mar, peces y lagartijas. Algunos de estos elementos se han conservado en peces. Estos elementos todavía

no han sido retenidos en el genoma de mamíferos. Los politrones aparentemente han evolucionado de plásmidos (Villarreal, 2009).

3.2. POLIMORFISMO DEL ADN

El término polimorfismo fue empleado por Ford (1940) como la presencia en una población de dos o más formas alélicas discretas, de las que la de menor frecuencia no puede mantenerse solo por mutación recurrente. En términos generales se asume que un locus es polimórfico cuando el alelo más común para este locus tiene una frecuencia inferior al 95 ó 99% (Cruz, 2003).

En el ADN codificante existe poca variabilidad individual, exceptuando la región HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos). El margen de variación permitido es muy bajo y los polimorfismos suelen acompañarse de modificaciones fenotípicas. Por ejemplo, si se producen diferentes formas de una proteína se puede condicionar su función o actividad, bien intrínsecamente o bien por influencia ambiental. El ADN no codificante por el contrario al no estar sujeto a presión selectiva intensa, puede soportar generalmente grandes niveles de variabilidad sin que se produzca repercusión fenotípica (Alcoceba, 2010).

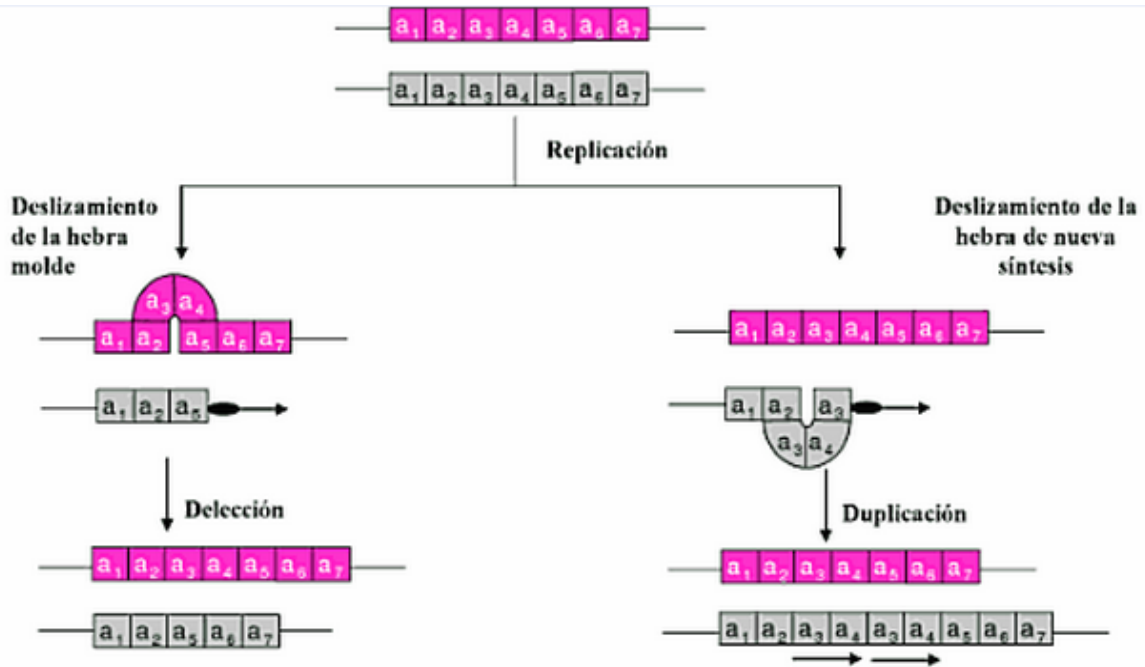
Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición. Según Callisaya (2007), pueden dividirse en 2 tipos:

A. Polimorfismos de secuencia. Se producen por el cambio de uno (mutación puntual) o más nucleótidos en una secuencia de ADN. Suelen ser poco polimórficos y son típicos del ADN codificante.

B. Polimorfismos de longitud. Se producen por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos. Este tipo es el más abundante en ADN repetitivo, sobre todo en el ADN minisatélite y microsatélite.

Los loci minisatélites y microsatélites están formados, por repeticiones en tándem de secuencias similares que varían en longitud, pudiéndose acompañar simultáneamente de polimorfismos de secuencia (Cal, 2001). La causa de la

variación se supone distinta en ambos casos. En el caso de los minisatélites se debe a un mecanismo de conversión génica, frecuentemente inducida por regiones de flaqueo. Por otra parte en los microsatélites, según Armour (1996), la causa principal parece debida a un deslizamiento (Slippage) de



unidades de repetición durante la replicación (Figura 4), aunque Jeffreys *et al.* (1997) postulan que también la conversión genética muchas veces inducida por regiones de flaqueo, puede ser un mecanismo preferente de variabilidad.

Figura 4. Slippage como generador de variabilidad en una secuencia repetida en tándem (Barros, 2008)

El lanzamiento de los microsatélites se da a finales de los 80's por Alec J. Jeffrey, el cual justificó que los microsatélites a diferencia de los minisatélites, proveen loci variables, son fácilmente amplificables y son más resistentes a la degradación (Fernández, 2008).

3.3. MICROSATÉLITES

Los microsatélites (SSRs) son secuencias cortas de ADN las cuales pueden variar de 1 a 6 pb (Schlötterer, 1998), 1 a 10 pb (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos [IPGRI] & Cornell University, 2003), y 1 a 4 pb, (Baginsky, 2005) y se repiten cierto número de veces (Figura 5). Los microsatélites se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.*, 2002). Estas repeticiones se pueden ubicar dentro de genes, pero la mayoría se encuentra fuera de ellos (Russell, 1992) y es posible que desempeñen un papel en la regulación genética (Frendri, 2008) o actúen como señales en los procesos de conversión genética y recombinación (López, 2003).

Cuando las regiones microsatélites son individualmente amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de los diferentes números de las unidades de repetición (Morgante & Olivieri, 1993)(Ver Figura 5). El origen de tal polimorfismo está en debate, aunque previsiblemente se deba al evento de “resbalón” o slipage durante la replicación del ADN (Schlötterer & Tautz 1992; Zane *et al.*, 2002). En el cual ya sea la cadena nueva o la de patrón se desliza sobre la otra en al menos un motivo, resultando en un mal apareamiento de las mismas (Jovera *et al.*, 2003). Otras posibles causas para la generación de polimorfismo se deben a otros tipos de mutaciones, como las deleciones e inserciones, ya sean en el microsatélite en sí o en las regiones que lo flanquean alterando el tamaño de la región microsatélite. La duplicación de una secuencia de microsatélite en otra región del genoma da lugar a la generación de marcadores microsatélites multilocus. (Jarne *et al.*, 1996; Villamón, 2000).

Los microsatélites fueron descubiertos inicialmente en humanos, y luego en otros mamíferos como el ratón y el cerdo. Su potencial como marcadores útiles para los estudios en plantas fue rápidamente reconocido, resultando en su aislamiento y aplicación en muchas especies (Brede *et al.*, 2001; Wieczorek *et*

al., 2002; Julian *et al.*, 2003; Chan, 2007). Es así, que los principales cultivos en la actualidad cuentan con una base de datos con apreciable cantidad de microsatélites como es el caso de la papa (Milbourne *et al.*, 1998) y cebada (Dávila *et al.*, 1999), solo para citar algunos ejemplos.

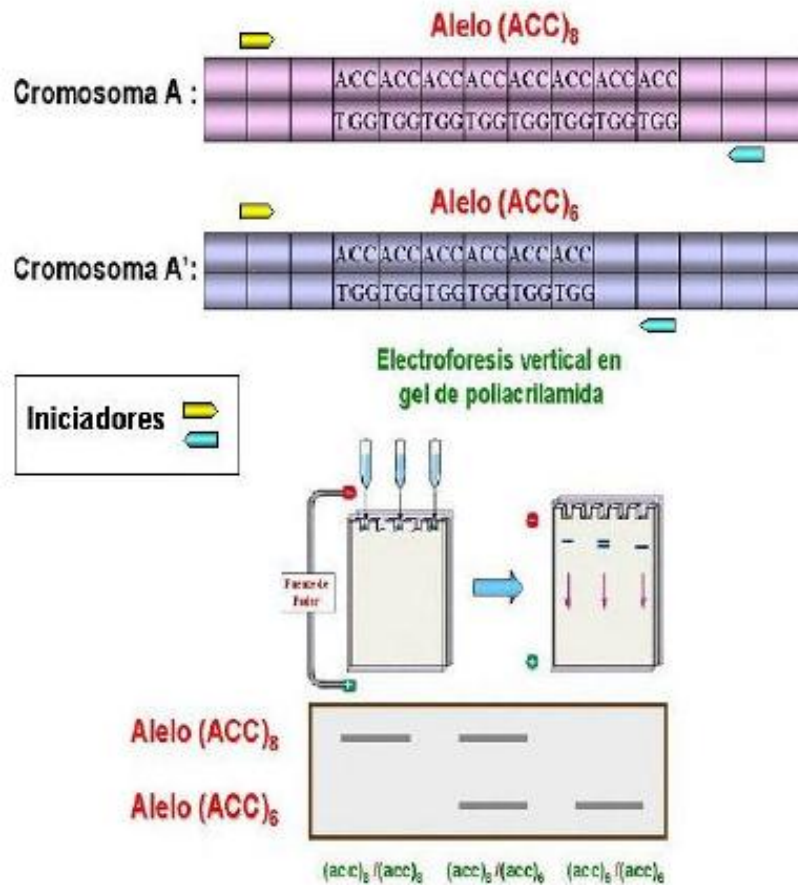


Figura 5. Polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias de su longitud. En un individuo diploide, el cromosoma A¹ en el locus homólogo presenta el alelo (ACC)₆ y el cromosoma A representa el alelo (ACC)₈ (Yañez, 2002).

3.3.1. IMPORTANCIA

Rentería en 2007 cita varios autores, quienes afirman que los microsatélites de ADN nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales. Los cuales, han sido utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica (Wright,1994), análisis de linajes (Queller *et al.*,1993) y de sistemas reproductivos (Martínez, 2007). Adicionalmente, se han encontrado microsatélites en algunos organelos citoplasmáticos, como el SSR cloroplastico (Powell *et al.*, 1995; Vendramin *et al.*,1996) y el SSR mitocondrial (Soranzo *et al.*,1998) lo que ha enriquecido la fuente de estudios evolutivos. Los organelos son heredados uniparentalmente y no están sujetos a recombinación, por lo que los cambios acumulados que observamos en las poblaciones se deben solo a los procesos de mutación y demográficos (Echt *et al.*, 1998). Esto permite contestar preguntas evolutivas muy puntuales relacionadas con el monitoreo del flujo genético, introgresión (Vendramin *et al.*, 1998) y el análisis de paternidad (McCracken *et al.*, 1999). En 2007, Rentería también citó a Goldstein *et al.* (1996) destacando las utilidades de los microsatélites, para hacer inferencias de parámetros demográficos y para determinar patrones evolutivos de los procesos históricos del origen de especies, formas o razas.

En 2013, Páiz-Mazariegos retoma la cita de Vendramin *et al.* (1996), quienes afirman que los microsatélites han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, debido a que tienen el más alto grado de polimorfismo, segregan de manera mendeliana y son codominantes. Asimismo, la presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara, fácil de interpretar y son selectivamente neutros.

Goldstein *et al.* en 1996 exponen que para trabajar con SSR es necesario conocer la secuencia de la región a analizar para contar con primers específicos que amplifiquen la región repetitiva (el microsatélite) responsable de la variación observada, que además es homóloga para diferentes especies o incluso géneros. Es decir, los microsatélites son específicos para ciertos

grupos de especies y homólogos entre sí (Vendramin *et al.*, 1996), lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo.

3.3.2. CLASIFICACIÓN

Basándose en la longitud de la unidad de repetición y el número de veces que ésta se repite, junto con las posibles variaciones en su secuencia, Urquhart *et al.* (1994) los clasifica en:

A. STRs simples o de baja microvariación

Están formados por dos o más unidades de repetición contigua e idéntica, tanto en longitud como en secuencia. La diferencia en tamaño entre los distintos alelos es de una repetición. La presencia de alelos intermedios es excepcional. Son de fácil tipaje, pero tienen el inconveniente de su baja heterocigosidad.

B. STRs compuestos o de microvariación intermedia

Estos microsatélites comprenden dos o más unidades de repetición contiguas diferentes, que varían tanto en secuencia como en longitud.

C. STRs Complejos o de alta microvariación

Pueden contener varios bloques de unidades de repetición de longitud y secuencias intermedias variables. En éstas, son frecuentes los alelos intermedios y las sustituciones simples de bases en algunas unidades. Lo que ocasiona importantes variaciones tanto estructurales como en tamaño, produciéndose problemas de designación de alelos. Son los STRs más difíciles de tipar y se acompañan también de una tasa de mutación más alta.

Actualmente los microsatélites más simples, presentan algún grado de variabilidad interna en su estructura, por lo que la clasificación anterior sería cuestionable. Existen STRs relativamente simples y extremadamente variables

al mismo tiempo, como D12S391 (Lareu *et al.*, 1996), en el que la asociación directa entre variabilidad y complejidad no es sostenible.

Chambers y MacAvoy (2000) proponen que los términos **puro** (perfecto), **compuesto** y **complejo** se utilice para especificar uno, dos o más tipos de motivos, respectivamente. Estos se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite y que el término interrumpido (o imperfecto) como descriptor jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de microsatélites modificado de Jürgens Imke (2009).

Tipo de Microsatélite	Ejemplos
SSR Puro	(ACC) ₉
SSR Interrumpido puro	(ACC) ₆ TG (ACC) ₇
SSR Compuesto	(ACC) ₅ (TTG) ₉
SSR Interrumpido compuesto	(ACC) ₈ TG(ACC) ₅ GA (TTA) ₆
SSR complejo	(ACC) ₈ TG (GA) ₁₂ (TTA) ₅ GC (TTA) _{4 +3}

3.3.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS

A. Ventajas

La razón principal del incremento del uso de los SSRs como una herramienta molecular es que proveen la más alta incidencia de polimorfismo o PIC (Contenido de información polimórfica) en comparación con otras técnicas, como RFLPs y RAPDs (Powell *et al.*, 1996) entre otras de sus características (Tabla 2, en Anexos). Según Yáñez A. (2002) los microsatélites poseen además, atributos muy valorables que incluyen:

- a. Ser altamente polimórficos. Generan polimorfismo con valores superiores al 90 % (Coltman *et al.*,1996; Gupta *et al.*,1996)
- b. Son altamente informativos. presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.

- c. Son analíticamente simples. los datos son producidos de forma confiable y altamente reproducibles.
- d. Son muy abundantes. los microsatélites están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 Kb.
- e. Son ampliamente aplicables. los loci son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros.
- f. Dado que el ADN adyacente al microsatélite tiene mayor probabilidad de ser conservado, los cebadores derivados de microsatélites se pueden usar a menudo con muchas variedades e incluso con otras especies.
- g. Son de fácil intercambio de datos entre laboratorios. la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin la necesidad de la transferencia física de los iniciadores. Una vez que las secuencias de los iniciadores son diseñadas y publicadas, el análisis de los loci microsatélites será práctico para cualquier laboratorio capaz de realizar las técnicas de PCR y electroforesis.
- h. Locus único. Se pueden diseñar primers específicos para estudiar un locus de interés (Fisher *et al.*, 1996).
- i. Requieren muy poco ADN (1ng de ADN total) y este no necesariamente de alta calidad, cuando se parte de ADN altamente degradado (Hagelberg *et al.*, 1991; Jeffreys *et al.*, 1992), el tipaje con otros marcadores suele ser negativo, mientras que la amplificación de STRs proporciona generalmente resultados satisfactorios. El uso de marcadores microsatélites de pequeño peso molecular aumenta las probabilidades de obtener resultados positivos de amplificación cuando el ADN se encuentra degradado, cabe recordar que los indicios biológicos que han estado sometidos a diversos factores (calor y humedad), favorecen el crecimiento bacteriano y la degradación del ADN (Entrala, 2000).

B. Desventajas de los microsatélites

- a. El procedimiento de descubrimiento de la secuencia microsatélite es complejo.

- b.** El costo del diseño de cebadores es elevado. (Matsuoka *et al.*, 2002) se requiere de una inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica para la clonación y secuenciación de los SSR.
- c.** Mutaciones ocurridas en el sitio de apareamiento de los iniciadores, tendrían como resultado alelos nulos.
- d.** Presencia de bandas “tartamudas”. Estas se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de ADN repetitivo como es el caso de los microsatélites. Las bandas tartamudas son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos (Figura 6), complicando el análisis genotípico. Sin embargo estas consideraciones no han desalentado a muchos investigadores quienes han convertido a los microsatélites en una herramienta muy popular (Chambers & Macavoy, 2000).

3.3.4. APLICACIONES

A. Diversidad genética. Según IPGRI & Cornell University (2003), la diversidad o variabilidad genética se puede definir como «la capacidad genética para variar», y por ende, la capacidad a responder tanto a variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección. Es así, como la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau *et al.*, 2000).

En los últimos años se han realizado muchos estudios utilizando los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que con un buen número de loci analizados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una buena aproximación de la filogenia (Aranguren *et al.*, 2001; Farid *et al.*, 2000).

En los estudios de genética de poblaciones, los marcadores microsatélites permiten la identificación de cada alelo por locus, la obtención de datos

poblacionales, y el cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (Bowcock *et al.*, 1994; Ponsuksili *et al.*, 1999), así como también realizar análisis filogenéticos y de estructura de la población.

B. Identificación Individual y Pruebas de Paternidad. El principio de las pruebas de paternidad utilizando marcadores genéticos consiste en la comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia con el de sus progenitores.

El elevado polimorfismo que presentan los marcadores microsatélites y la posibilidad de poder detectar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales y comparaciones padre-hijo, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos al azar presenten los mismos alelos (Aranguren, 2005).

C. Mapas Genéticos y Genómica Comparativa. Otra aplicación, de los microsatélites es la construcción de mapas de ligamiento más completos y detallados; así como la identificación de genes de interés (QTL's), un mapa genético bien surtido de marcadores se convierte en una herramienta muy útil para identificar genes responsables de caracteres de interés. Se trata de buscar asociación entre varios alelos, en cualquiera de los marcadores, segregando en poblaciones que presentan el carácter de interés, para identificar regiones del genoma donde es más probable que se encuentre el gen responsable de ese carácter (Cheng & Crittenden , 1994).

D. Asignación de Individuos a Raza. Diferentes procedimientos han sido informados para este propósito, indicando una gran variedad de aplicaciones y de metodologías para la correcta identificación de la fuente poblacional (Cornuet *et al.*, 1999; Paetkau *et al.*, 1995; Rannala & Mountain, 1997).

Los dos métodos más utilizados para asignar individuos a poblaciones o razas son: basados en probabilidades y basados en distancias genéticas. En los primeros, los individuos son asignados a aquella población en la que su genotipo presenta una mayor probabilidad de pertenencia; mientras que, en los

segundos, los individuos son asignados a la población que genéticamente sea más cercana (Aranguren, 2005).

Otras aplicaciones de los microsatélites según IPGRI y Cornell University (2003):

E. Cartografía de genomas (Kissinger & DeBarry, 2011)

F. Estudios evolutivos. Inferencias de parámetros demográficos y para determinar patrones evolutivos de los procesos históricos del origen de especies, formas o razas (Goldstein *et al.*, 1996)

G. Análisis de linajes. Posibilitan el análisis de las fluctuaciones de heterocigosidad a lo largo de la vida productiva de razas (Queller *et al.*, 1993) y sistemas productivos (Awadalla *et al.*, 1997).

Otros autores mencionan las siguientes aplicaciones: Investigación del cáncer (Ziegle *et al.*, 1993), Botánica forense (Kathleen, 2006) y Variación genética intra e interespecífica (Edwards *et al.*, 1991; Armour *et al.*, 1993; Dervey *et al.*, 1996; Queller *et al.*, 1993 ; Wright & Bentzen, 1994).

3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En 1987 Kary Mullis y Faloona diseñaron un método para amplificar regiones específicas de un genoma. Este método es ampliamente conocido por sus siglas en inglés como (PCR) y en español como reacción en cadena de la polimerasa. Dicho método consiste básicamente en la repetición de ciclos de temperaturas (termociclado), en los cuales una región del genoma es seleccionada a través de primers específicos y amplificada por una enzima termo estable (Taq polimerasa). Los ciclos inician con la disociación de las dos hebras de ADN a una temperatura de 94°C, seguido de una temperatura de anillamiento (entre 40-65 °C) en la cual los primers se adhieren a la región del genoma a amplificar. Finalmente, para elongar el fragmento amplificado se aplica una temperatura de 72 °C (Freeland, 2005).

Para lograr la amplificación a través de la PCR, son fundamentales los siguientes componentes: Buffers de PCR, Oligonucleotidos (Primers), Desoxinucleósido trifosfatos (dNTPs), Taq polimerasa y el ADN molde (McPherson & Møller, 2006).

3.4.1. BUFFER DE PCR

El Buffer de PCR estabiliza la reacción de PCR manteniendo un pH, iones y cofactores en proporciones estables para permitir la acción de la Taq polimerasa (Murray lab., 2011).

Los buffers de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl₂. El MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg²⁺ son necesarios para la actividad de la Taq polimerasa, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa (McPherson & Møller, 2006).

La concentración óptima de MgCl₂ está en torno a 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg⁺⁺, un exceso Mg⁺⁺ origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

3.4.2. PRIMERS

Los primers son nucleótidos sintetizados a través de procesos químicos, esenciales para el éxito de la reacción en cadena de la polimerasa ya que estos son los iniciadores del fragmento a amplificar (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A. Características de una buena pareja de primers.

- a. Longitud de cada primers entre 18 y 24 bases, ya que se ha comprobado que primers de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los primers cortos carecen de suficiente especificidad.

- b. Ambos primers deben tener una temperatura de anillamiento similar (como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de 5°C).
- c. La relación bases púricas: bases pirimidínicas debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%).
- d. La secuencia de los primers debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas.
- e. Comprobar que los primers no contengan secuencias complementarias entre si, para evitar la formación de dímeros de primers es necesario (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Según Entrala (2000), los dímeros de primers son fragmentos de doble cadena, cuya longitud es muy próxima a la suma de los primers, y se producen cuando un primer es extendido a continuación del otro. Los primers con los extremos 3' complementarios favorecen la formación de dímeros, lo que sugiere que el paso inicial se debe a interacciones transitorias que aproximan los extremos complementarios.

3.4.3. DESOXINUCLEÓSIDOS TRIFOSFATOS

Las concentraciones de dNTPs son usadas frecuentemente en torno a 200 μM para cada uno de ellos. En un volumen de reacción de 25 μl con esta concentración de dNTPs se sintetizarían entre 6-6.5 μg de ADN. La concentración de dNTPs y de MgCl_2 van relacionadas ya que el Mg^{++} se une a los dNTPs. A concentraciones elevadas de dNTPs se inhibiría la reacción de PCR, al no tener la Taq polimerasa suficiente Mg^{++} , como para incorporar dNTPs.

3.4.4. TAQ-POLIMERASA

La enzima Taq polimerasa obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, fue descrita por Brock & Freeze en 1969. Esta enzima posee dos actividades catalíticas: actividad polimerasa 5'→3' y actividad exonucleasa 5'→3' (Freeland, 2005).

Las cantidades óptimas de Taq polimerasa necesarias para la síntesis de ADN, están alrededor de 2 U en 25 µl de volumen final de la reacción. La actividad de esta enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg²⁺ y de algunos iones monovalentes, dado que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad (Salazar, 2004).

Según Entrala (2000), pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la Taq en un 50-60%, con un máximo aparente cuando su concentración es de 50 mM. Existen algunos datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la Taq. Por ejemplo, concentraciones 1M de urea estimulan la actividad enzimática, y el SDS a bajas concentraciones inhibe la actividad al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol.

3.4.5. ADN MOLDE O "TEMPLATE"

Es el ADN que la Taq polimerasa utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas, es decir el ADN que interesa duplicar. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende básicamente de dos factores:

Del marcador que se va a utilizar. Hay marcadores cuyos primers son más específicos o bien cuyas condiciones de amplificación están mejor optimizadas que las de otros. Por esta razón puede darse el caso, que cierta cantidad de ADN (sobre todo cuando jugamos con cantidades mínimas) amplifique para unos marcadores pero no para otros. Por ello, cuando en laboratorio se va a utilizar un nuevo marcador, es necesario hacer un estudio de validación que incluya un estudio de sensibilidad. En el cual se puede determinar la cantidad de ADN que amplifica en condiciones estándar. De manera general, para casi todos los microsatélites utilizados en Genética, la cantidad óptima de ADN que asegura un rendimiento adecuado está en torno a los 5 ng/µl (Entrala, 2000).

Calidad del ADN. Cuando se trabaja con ADN de calidad óptima, no suele haber problemas en la amplificación y las cantidades por encima o por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado, o porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. Si el ADN está degradado por la acción de enzimas de restricción el resultado de la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido cortado o no. En el caso en que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR (Poddar,1998).

3.4.6. ADYUVANTES DE LA PCR

Los adyuvantes de la PCR son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la reacción. Aunque algunos autores han recomendado el uso de DMSO (Dimetil Sulfóxido) y del glicerol, el ayudante más extendido y utilizado es el BSA (Albumina de suero bovino). A concentraciones por encima de 0.8 µg/µl el BSA incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa (Ortiz, 2011).

3.4.7. VENTAJAS DE LA PCR

Según Entrala (2000), la PCR ofrece una serie de ventajas, frente al uso de las técnicas de análisis genético utilizadas con anterioridad, como son:

- A.** Su capacidad para obtener resultados en casos en los que la cantidad de ADN es mínima o en que parcialmente este degradado.
- B.** Genera en un espacio corto de tiempo, un elevado número de copias de la secuencia de ADN, lo cual permite utilizar técnicas de visualización más sencillas y rápidas que el uso de sondas marcadas radioactivamente.

C. Permite la determinación y agrupación alélica en clases discretas, lo que facilita la elaboración de bases de datos. La estandarización inmediata posibilita la aplicación de métodos bioestadísticos y programas elaborados.

D. Una de las grandes ventajas de la PCR es su elevada sensibilidad, la cual puede en ocasiones, convertirse en un gran problema al coamplificar un ADN extraño o ajeno al que nos interesa (Mifflin, 1997).

3.5. ELECTROFORESIS

La separación de moléculas a través de un campo eléctrico o electroforesis, es una técnica en la cual moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada, por su relación carga:masa. Según Lodish (2000), si dos moléculas tienen masa y formas iguales, la de mayor carga neta se desplazara más rápido hacia el electrodo.

Es ampliamente conocido que existen variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación. Estas son según Westermeier (2001):

- A.** Electroforesis capilar.
- B.** Electroforesis en papel.
- C.** Electroforesis en gel de agarosa.
- D.** Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- E.** Isoelectroenfoque.
- F.** Electroforesis bidimensional.

Según Sambrook y Russell (2001), los soportes de elección para la electroforesis de proteínas son los geles de poliacrilamida (PAGE, Electroforesis en gel de poliacrilamida) debido a su buena resolución y gran versatilidad. Algunas de las ventajas de los geles de acrilamida se relacionan a que son químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica y fácil de generar mediante la polimerización de acrilamida. En la mayoría de los casos, el gel se dispone entre dos receptáculos independientes y separados, que contienen tampón de electroforesis y los

electrodos positivo y negativo, de forma que la conexión eléctrica entre ambos receptáculos sólo es posible a través del gel. Una vez que la electroforesis ha tenido lugar, el gel de poliacrilamida se puede teñir, documentar o incluso se puede purificar la molécula de interés cortando literalmente el fragmento del gel.

Maldonado y Jorrín (2006) afirman que el entramado de los geles de poliacrilamida se genera mediante la polimerización, a través de radicales libres, de monómeros de acrilamida en presencia de pequeñas cantidades de “bis-acrilamida” (N,N,N',N'-metilen-bis-acrilamida). Se forman enlaces cruzados entre los dos polímeros de acrilamida, de manera que se generan geles con tamaño de poro determinado tanto por la concentración total (%T) como por la concentración relativa de acrilamida y de bisacrilamida. El tamaño del poro puede ser ajustado para optimizar la separación de la muestra de interés. Así, geles con un porcentaje alto de acrilamida (10-15%T) son óptimos para la separación de moléculas de pequeño tamaño (menores de 50 kDa), mientras que geles de porcentajes menores (<10%T) son los indicados para la separación de moléculas mayores. Generalmente la relación utilizada entre acrilamida y bisacrilamida es 37 5:1.

La reacción de polimerización se inicia por un sistema redox de catálisis. El TEMED (Diamino tetrametil etileno) cataliza la formación de radicales libres que dirigen la reacción a partir del ión persulfato que se añade en forma de APS (Persulfato de amonio) y que actúa como iniciador (González, 1995).

3.6. DETECCIÓN DE MICROSATÉLITES

Actualmente se pueden utilizar diversas metodologías de visualización y de interpretación de resultados en datos microsatélites.

3.6.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Cuando los alelos microsatélites tienen un tamaño suficientemente diferente, estos se pueden correr en MetaPhor agarosa del 2 - 4 % y eventualmente ser teñidos con bromuro de etidio (Manikanda, 2013).

3.6.2. ELECTROFORESIS CAPILAR (SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA)

El reciente desarrollo de la detección automatizada de microsatélites durante la electroforesis ha permitido la detección de productos marcados con tinte fluorescente (incorporados durante PCR) o utilizando primers marcados radioactivamente. Cuando se activa la luz del secuenciador automático, el láser emite fluorescencia, con la cual se detecta el producto de PCR marcado. Los primers marcados con fluorocromos permiten la detección de la emisión de fluorescencia pudiéndose visualizar varios marcadores a la vez (Multiplex) (Hayden *et al.*, 2008).

3.6.3. DETECCIÓN POR HRM (TEMPERATURA DE ANILLAMIENTO DE ALTA RESOLUCIÓN)

En el método HRM la secuencia objetivo es amplificada mediante PCR en la presencia de un tinte fluorescente saturado (por ejemplo, Light Cyler 480 Reso Light Dye). El tinte HRM muestra niveles altos de fluorescencia cuando se adhiere al ADN de doble hebra (dsDNA).

Después de la PCR, los amplicones son desnaturalizados y luego reanillados. Si la muestra es heterocigota las cadenas híbridas se acoplan perfectamente (Homoduplex) de lo contrario las cadenas híbridas no se acoplan

correctamente (Heteroduplex). Cuando la temperatura es aumentada, poco a poco se separan las dos hebras de ADN y la señal fluorescente de un ADN heterocigoto muestra una disminución a dos temperaturas características debido a los diferente ratios de separación en Heteroduplex y Homoduplex. Las curvas obtenidas para muestras homocigotas y heterocigotas son significativamente diferentes (Roche, 2008).

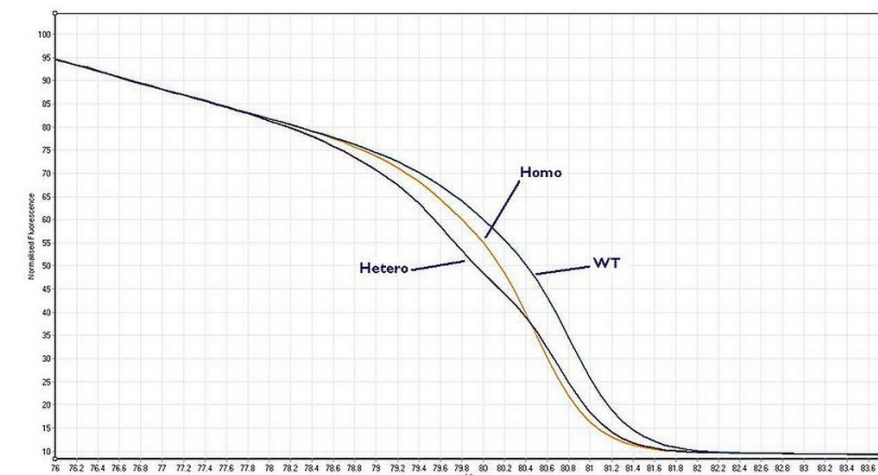


Figura 8. Diferencias en las curvas de fusión contrastando temperatura y fluorescencia normalizada, donde podemos observar heterocigotos (Hetero) homocigotos (Homo) y tipo silvestre (WT).

3.6.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Dado que los geles de poliacrilamida poseen más resolución cuando el tamaño de los alelos es muy cercano, se pueden correr en PAGE (Geles desnaturizantes de Poliacrilamida). Los resultados se pueden detectar con sales de nitrato de plata, también se pueden incorporar nucleótidos marcados, el marcaje de uno de los primers en uso (primers de etiquetado terminal) marcados con P^{32} o bien con fluoróforos IRD-700 e IRD-800, y eventualmente se visualizan los resultados en un analizador de fragmentos (Picó & Gómez, 2012).

A. Tinción con nitrato de plata

La detección radioactiva o por fluorescencia de ADN, es cara, consume tiempo, y requiere facilidades especiales que lo convierten en un método impracticable en la mayoría de los países en vías de desarrollo, donde se carecen de infraestructuras sofisticadas (Benbouza, 2006). La tinción con nitrato de plata es relativamente una técnica rápida y barata. Esta metodología fue descrita originalmente para detección ultrasensitiva de polipéptidos separados en geles de poliacrilamida (Merill *et al.*,1981). Después fue modificada para la detección de ácidos nucleicos, aumentando la sensibilidad de la técnica de acuerdo a varias pequeñas adaptaciones al método de tinción con nitrato de plata original (Sommerville & Wang , 1981; Goldman & Merrill, 1982; Blum *et al.*,1987; Bassam *et al.*,1991; Sanguinetti *et al.*,1994).

Los últimos métodos de detección de ácidos nucleicos usando nitrato de plata pueden ser considerados tan sensitivos como las técnicas de marcación autoradiográfica y fluorescente (Christensen *et al.*,1999). Comparado con el procedimiento fotoquímico desarrollado por Merill *et al.* (1981) se aumentó la sensibilidad a $1\text{pg}\cdot\text{mm}^{-2}$, al incluir la preexposición con formaldehído durante la impregnación de nitrato de plata y disminuyendo la concentración de nitrato de plata. El fondo oscuro fue reducido por la inclusión de tiosulfato de sodio y la eliminación de un tratamiento preoxidativo con dicromato de potasio y ácido nítrico. Este método de tinción es muy sensitivo y es considerado un estándar para la detección de ADN no radioactiva. Los problemas más relevantes que presenta esta técnica son: su largo procedimiento, un contraste de bandas relativamente pobre, la necesidad de mantener la temperatura a 10°C para las soluciones de revelado y solución de parada de la reacción y el bajo rango de reutilización de soluciones de tinción (Benbouza *et al.*, 2004).

Ácidos nucleicos separados en geles de poliacrilamida pueden ser detectados consistentemente al nivel de picogramos, usando una tinción ácida muy simple. El procedimiento es rápido, tiene relativamente pocos pasos y reactivos, y produce un menor número de artefactos de tinción (Bassam *et al.*,1991).

La tinción con nitrato de plata puede realizarse a través de dos métodos; el primero usa diamina o nitrato amoniacal para la impregnación del gel en

soluciones de ácido diluido y formaldehído para el desarrollo de la imagen. El otro método consiste en la impregnación de nitrato de plata en medios de ácidos débiles y el uso de formaldehído para reducir el nitrato en condiciones alcalinas. El método en el cual se utiliza diamina en condiciones alcalinas, es menos sensitivo pero mejor adaptado a geles gruesos, mientras el método ácido es rápido y trabaja mejor con geles delgados (Merril, 1990).

De los procedimientos de tinción con nitrato de plata existentes, algunos proveen bastante sensibilidad y reproducibilidad. Durante el desarrollo de la imagen (revelado), casi todos los procedimientos de tinción reducen el nitrato a nitrato metálico, el cual se deposita en la inmediata vecindad del sustrato en tinción. Para un contraste óptimo de la imagen, el nivel de nitrato reducido en la matriz de poliacrilamida debe ser mantenido al mínimo. Usualmente mediante la impregnación de aniones a la plata o mejorando los pre-tratamientos de la matriz del gel que preceden la impregnación con nitrato de plata. Esto se logra a través de una apropiada modulación de la velocidad del proceso de reducción, lo que depende principalmente del pH, las concentraciones absolutas y relativas del nitrato, del agente reductor y la velocidad constante en la reacción. Por ejemplo, los complejos formados por los iones de nitrato de plata, decrecen tanto la concentración de nitrato, como la velocidad constante, permitiendo una selectiva observación de bandas separadas con nitrato metálico. Hay que notar que este proceso no es manejado termodinámicamente, pero esto depende de la cinética de la reducción de nitrato (Bassam *et al.*, 1991).

Originalmente la tinción con nitrato de plata fue utilizada para la detección de pequeñas cantidades de proteínas, pero luego, la demanda de aplicaciones como los análisis de perfiles de ADN complejo (Generados en la amplificación de huella genética y la secuenciación de ADN), fueron resueltos en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata, dado que la tinción con nitrato de plata utiliza protocolos más versátiles. Mezclas de ácidos nucleicos complejos usualmente son resueltos en geles de poliacrilamida muy delgados, produciendo bandas que deben ser detectadas con alta sensibilidad (Stockinger Lab., 2005).

Los reactivos deben ser altamente puros, de grado analítico y las soluciones deben ser preparadas con agua desionizada. Tinciones con baja calidad se deben usualmente a la baja calidad de los reactivos, o a que los reactivos son demasiado viejos. La solución de fijación debe ser guardada a temperatura ambiente, pero la solución de revelado deberá ser guardada a 4°C. La solución de ácido acético es estable y usualmente se hace en grandes volúmenes. La solución de nitrato/formaldehído se hace al momento de uso y protegida de la luz por un tiempo relativamente largo. El nitrato de plata es tóxico y se tiene que manejar con sumo cuidado. El nitrato utilizado se puede precipitar con NaOH y la sal insoluble acumulada se puede desechar. La solución reveladora es elaborada en el momento de uso, cantidades acordes a lo que se va a utilizar y es guardada a 8°C. Las soluciones de carbonato de sodio son relativamente estables y se pueden preparar en grandes volúmenes. El tiosulfato tiene que ser preparado al momento de uso. El formaldehído debe ser guardado a temperatura ambiente, temperaturas bajas pueden inactivarlo (Freifelder & Davison, 1963).

Es necesario contar con un agitador de geles durante la tinción, y se debe portar guantes para evitar la tinción de artefactos. Las bandejas de tinción no necesitan ser absolutamente limpias, pero se pueden limpiar con papel toalla después de uso. Se debe limpiar inmediatamente cualquier derrame de solución de nitrato, el cual puede ser removido con ácido nítrico (Chambers *et al.*, 1962).

a. Parámetros que influyen en la tinción

i. Fijación de ácidos nucleicos

Según Bassam *et al.* (1991), la fijación es un paso usado para prevenir la difusión de moléculas de ácido nucléico separadas en la matriz del gel, también ayuda a remover y neutralizar químicos no deseados en la tinción como Urea y Buffer. La fijación es muy importante con respecto a la sensibilidad, dado que al omitir o limitar la fijación a tiempos de exposición cortos, resulta en una imagen poco desarrollada. Por el contrario largas exposiciones pueden resultar en bandas borrosas

(débiles), un mínimo de 5 minutos en inmersión a 7.5% de ácido acético mantiene el límite de detección de fragmentos de ADN de distintas longitudes.

ii. Lavado del gel

Según estos mismos autores, este paso remueve ácidos, sustancias trazas y remanentes de componentes solubles en el gel que interfieren con la tinción. Un mínimo de tres lavados de 2 minutos en agua desionizada es adecuado. Un mayor o menor número de lavados son posibles, dependiendo del grosor del gel

iii. Impregnación de Nitrato (Tinción)

Entre 1 y 2 gramos de nitrato de plata por cada litro de solución son recomendables. La concentración de nitrato no puede ser reducida sin afectar la sensibilidad y el contraste. Tinciones óptimas deberán realizarse por un tiempo de solo 20 minutos. Largos tiempos de impregnación pueden causar pérdida de la imagen. La presencia de formaldehído en la solución de nitrato mejora la sensibilidad y el contraste. El formaldehído reduce el nitrato a cantidades bajas pero suficientes para producir nucleación inicial de los sitios alrededor del sustrato a teñir (ADN). Estos sitios favorecen la construcción rápida de depósitos durante el paso de revelado (Bassam *et al.*, 1991).

iv. Lavado post Impregnación

Este lavado con agua desionizada se da con el propósito de que los remanentes de nitrato no formen precipitados color café en la solución durante el revelado. Alternativamente, puede ser remplazado por un enjuague con solución de revelado (Harwood, 2000). Disminuir la concentración de nitrato en la superficie del gel a través de un lavado evita tanto la precipitación de nitrato como la disminución de la sensibilidad (Bassam *et al.*, 1991).

v. Desarrollo de la imagen

En la mayoría de procedimientos de tinción con nitrato de plata, el desarrollo de la imagen requiere un abrupto cambio en el pH, lo que causa la inevitable formación de sales de nitrato insolubles. Estas sales, precipitan sobre la superficie del gel y disminuyen el contraste de la imagen, incrementando la oscuridad del fondo (Bassam *et al.*, 1991).

Los complejos de iones de nitrato, tanto como el tiosulfato de sodio, disminuyen la concentración de iones libres de nitrato e incrementan el potencial redox alrededor de la matriz del gel, minimizando el fondo oscuro en la tinción. La concentración de 4 μ l de tiosulfato de sodio, reduce la tinción no específica del fondo del gel, y altas concentraciones no proveen ventajas notables. Disminuir la concentración de carbonato de sodio debajo de los niveles recomendados (menos de 4g/l) causa fondos muy oscuros y pobre contraste de la imagen, probablemente disminuyendo la velocidad total de la reducción de nitrato (Szabadváry, 1992).

Según Bassam *et al.* (1991), concentraciones de formaldehído entre 0.028 y 0.111% por volumen, proveen una tinción óptima. Bajas concentraciones causan el efecto general de reducción de sensibilidad produciendo colores café claros. En contraste, altas concentraciones de formaldehído reducen el tiempo de revelado, haciendo difícil el control de la reacción de tinción y producen un fondo oscuro con bandas café negruzcas. El tiempo de revelado está en dependencia de los componentes de la solución de revelado y puede variar altamente de segundos a minutos. La concentración de formaldehído utilizada en la tinción de geles de acrilamida también afecta la calidad de la tinción (ver en anexo, Figura 8). Obviamente, el tamaño y la densidad de granos de nitrato y la velocidad de la formación de los mismos, ocasiona cambios en el color de las bandas. La oscuridad de los ácidos nucleicos teñidos, no es controlable.

La temperatura en el revelado es crucial, la cual tiene que mantenerse entre 8-10°C. Los requerimientos de temperatura varían con el grosor del

gel y los componentes químicos de revelado. Como una regla general el revelado de la imagen ocurre rápidamente, para poder controlarlo el revelado es realizado a temperaturas cercanas a 10°C, de no realizarse a 10°C el gel se tornara café (Hamilton, 2003).

vi. Solución de parada

Cuando se obtiene una imagen óptima, la solución de revelado es detenida por disminución del pH, para evitar un sobre revelado accidental. La reacción debe ser parada tan rápido como se pueda. Esto se logra preferiblemente usando ácido acético a 7.5 % a 4°C. Altas concentraciones de ácido acético pueden causar imagen borrosa (Rabilloud *et al.*, 2009).

viii. Preservación del gel

La preservación del material original provee muchas ventajas, por ejemplo, no requerir cámara fotográfica y cuarto oscuro. Cuando se requiera las bandas de ADN pueden ser extraídas de los geles teñidos con nitrato de plata seco, el gel se puede preservar en glicerol y posteriormente ser cubierto con plástico de envolver (Ciopardini, 1994).

3.7. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN ALÉLICA

En genética de poblaciones y filogeografía actualmente se están utilizando herramientas como: Inferencias de coalescencia (Beerli & Felsenstein, 1999; Rannala & Mountain, 1997), acercamientos a la determinación de la panmixia de una población (Pritchard *et al.*, 2000), análisis asimétrico de migración (Beerli & Felsenstein, 1999), análisis de cuellos de botellas y comparaciones de la estructura de la herencia del ADN mitocondrial (Piertney *et al.*, 2000; Chesser & Baker, 1996). Entre otras herramientas estadísticas en genética de poblaciones se encuentran; la Heterocigosidad, el equilibrio de Hardy-Weinberg, el desequilibrio de ligamiento, el estadístico F, las distancias genéticas (Distancia de cuerda, Distancias de Nei), la mutación y la migración. También, se utilizan estadísticos específicos para datos microsatélites basados en el modelo mutacional SMM como: $\delta\mu^2$ (delta mu squared) de Goldstein *et al.*

(1995); D_{sw} de Shriver *et al.* (1995); R_{ST} de Slatkin (1995); implementada por Goodman (1997); y Φ de Michalakis y Excoffier (1996) resultan útiles para analizar información alélica.

IV. METODOLOGÍA

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN- León, en el periodo comprendido entre septiembre 2008 a 2010.

4.1. MATERIAL VEGETAL Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas que se utilizaron para el presente estudio fueron recolectadas, por el Laboratorio de Genética Molecular (Proyecto Pino), en el año 2005 entre Marzo y Abril de poblaciones de la zona norte de Nicaragua (Nueva Segovia, Matagalpa y Jinotega) entre los 901 y los 1242 msnm.

Se tomaron semillas de 17 individuos de diferentes poblaciones, las que primeramente se lavaron con agua del grifo. Luego se depositaron en un Beaker conteniendo cloro al 2 % agitando con barra magnética por 20 min para su debida desinfección. En platos Petri se colocó papel filtro humedecido y con pinzas esterilizadas se depositaron las semillas sobre éste. Se taparon las placas Petri y se cubrieron con papel aluminio. Entre 5 - 7 días de germinada la plántula se extraía el ADN. Finalmente se rotuló con la fecha y la población que le correspondía.

4.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se partió del protocolo Doyle y Doyle (1990) modificado por Cerda G. (2007) y se hicieron varias modificaciones las que se presentan en el siguiente protocolo.

Inicialmente se precalentó en un baño maría a 65°C el buffer de extracción compuesto por CTAB (w/v) 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 50 mM, Tris-HCl 100 mM, a pH 8.0, se agregaron 5 µl de 2-β mercaptoetanol y 5 µl de proteinasa K. En un mortero, se depositó una plántula de aproximadamente 60-75 mg a la que se le adicionó 1 ml de buffer de extracción, y se maceró hasta obtener un líquido. La muestra se paso a un tubo eppendorf de 2 ml y se incubó a 65°C por 40 min en baño maría, con agitación fuerte por inversión cada 10 min. Para separar los ácidos nucleicos de los restos celulares se agregó 1 volumen de

cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) mezclando por inversión. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C y se repitió el proceso de separación una vez más en las mismas condiciones. Posteriormente para precipitar los ácidos nucleicos se trasladó el sobrenadante a un tubo limpio, se añadieron 2 volúmenes de isopropanol frio, y se mezcló por inversión (Foto1).

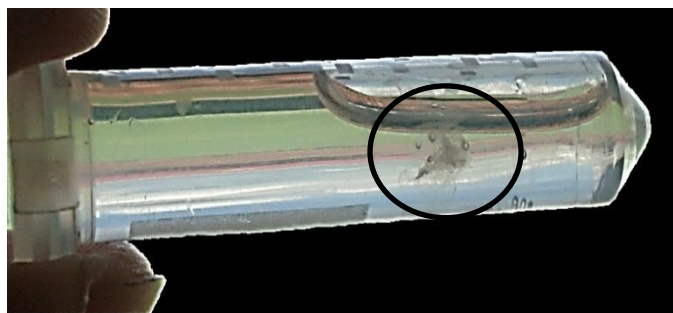


Foto 1. Precipitación de los ácidos nucleicos de *Pinus spp.* con isopropanol frio.

Con este mismo propósito se dejó el ADN a -20 °C por un mínimo de media hora y luego se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. Se descartó el isopropanol y se lavó el sedimento por 20 min con 200 µl de Buffer de lavado I (etanol al 76% y 1 M de acetato de sodio).

A continuación, se realizó un segundo lavado con 500 µl de Buffer de lavado II (etanol al 76% y 10 mM de acetato de amonio). Seguidamente se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento. Finalmente el sedimento se disolvió en 100 µl de buffer TE [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA], el cual se trató con ARNasa (1 µl por cada 100 µl de solución de ADN) durante 15 min a 37 °C y se conservó a – 20°C.

4.3. CHEQUEO Y CUANTIFICACION DE ADN (Sambrook & Rusell, 2001)

El ADN extraído se chequeó **cuantitativamente** por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En un microondas se fundió la agarosa en una solución de TAE 1X, se dejó enfriar y se vertió el gel líquido en la cubeta conteniendo los peines para formar los pocillos y se esperó a que solidificara para depositarlo en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TAE 1X.

A 10 µl de ADN se le agregó 2 µl de azul bromofenol (conteniendo glicerol al 30% y azul bromofenol 0.25%) esta mezcla se depositó en los pocillos y, se conectó la cámara a la fuente de poder y la corrida electroforética se realizó a 90V por media hora. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó el gel en una cubeta conteniendo en bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 30 minutos. Se visualizó la presencia de ADN sobre una lámpara de luz ultravioleta y se tomó una foto con cámara digital utilizando un filtro.

El chequeo **cuantitativo** se realizó mediante espectrofotómetro (Lambda EZ201 UV/Vis Perkin Elmer) para lo cual, las muestras se diluyeron con un factor de dilución de 200. Se calibró el aparato y se realizó la lectura en cubetas de cuarzo, a una absorbancia de 260 nm. La concentración de ADN se calculó con la fórmula presentada a continuación (Robert & Farrell, 2010):

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(A_{260} \times 200 (\text{factor de dilución}) \times 50 \mu\text{g/ml})}{1000}$$

Una vez conocida la concentración del ADN extraído para su amplificación, se prepararon diluciones en buffer TE a 5 ng/µl y se conservaron a – 20°C.

4.4. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES POR PCR

Se hicieron varias pruebas en las que se modificaron diferentes concentraciones de Taq polimerasa, ADN y cloruro de magnesio. También se hicieron varias pruebas en las que se probaron diferentes temperaturas de anillamiento. Dichas modificaciones aparecen reflejadas en el siguiente protocolo:

Se amplificaron microsatélites utilizando un Termociclador Amplitron® II Thermolyne en el cual se corrió el siguiente programa de PCR:

Una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguidos de 30 ciclos, cada uno de los cuales incluía:

A. Desnaturalización a 95 °C por 1 min

B. Hibridación a 56 °C (con variantes según el primer a amplificar) por 1 min

C. Elongación a 71 °C por 1 min

Con una elongación final a 72 °C por 5 min y con la opción de refrigeración a 4° C.

Para realizar la mezcla de reacción, se prepararon reacciones de PCR para un volumen final de 12 µl. Los detalles de la concentración de los reactivos utilizados se encuentran en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones iniciales y finales de la mezcla de reacción de PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 12 µl (µl)
Buffer A	10 X	1 X	1.2
MgCl	25 mM	1.5 mM	0.72
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.24
Primer F	10 mM	0.25 µM	0.3
Primer R	10 mM	0.25 µM	0.3
Taq polimerasa	5 U/µl	0.5U	0.1
H ₂ O			5.13
ADN	5 ng/µl	20 ng (1.6 ng/µl)	4 µl

Se ensayaron 6 primers con 5 individuos de diferentes procedencias cada primer se amplificó a la temperatura recomendada por Auckland (2002) y luego se realizaron variaciones de los parámetros de PCR según fue requerido.

Los primers utilizados en este estudio se encuentran inventariados en la Universidad de Texas A&M. Las características de los mismos se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla 4. Las características de los cebadores utilizados (Auckland, 2002)

Nombre del primer	Código de acceso	Tamaño aproximado del producto de PCR (pb)	Temperatura de inicio	Tamaño del clon (pb)	Primer (Secuencia de nucleótidos)	Motivo del Primer
PtTX2123	AF143960	202	55	400	GAAGAACCCACAAACACAAG-F GGGCAAGAATTCAATGATAA-R	(AGC) ₈
PtTX3013	AF143966	134	63	235	GCTTCTCCATTAATAATTCTA-F TCAAATTGTTTCGTAAAACCTC-R	(GTT) ₁₀
PtTX3025	AF143970	266	59	306	CACGCTGTATAATAACAATCTA-F TTCTATATTCGCTTTTAGTTTC-R	(CAA) ₁₀
PtTX3030	AF143972	287	59	334	AATGAAAGGCAAGTGTCG-F GAGATGCAAGATAAAGAAGTT-R	(TA) ₄ ...(GGT) ₁₀
PtTX4033	AF324769	156	59	190	ACCCATTTCTTTTTCAAC-F GGTGGCGAGGCATTATTC-R	(CA) ₁₅
PtTX4114	AF324791	130	56	281	ACACATGTCTTGAGGAGT- F CAATTTGATCTATAACTTTCCACC-R	(CA) ₂₃

4.5. ELECTROFORESIS Y TINCIÓN DE ADN MICROSATÉLITES

A. Preparación de vidrios

Vidrio con pestaña. El vidrio con pestaña se lavó muy cuidadosamente con jabón líquido, luego se enjuagó con abundante agua del grifo, y posteriormente con abundante agua destilada. Se dejó secar y se hizo una segunda limpieza en el lado del vidrio que estaría en contacto con el gel, la que consistió en verter alcohol corriente y distribuirlo homogéneamente con papel toalla hasta secarse totalmente (Foto 2). Procedimiento que se realizó tres veces. Posteriormente se le agregó 50 μ l de RepelSilane (llamado comúnmente repelente), el que evita que el gel se adhiera a este lado del vidrio. El repelente se distribuyó con papel toalla (Foto 3).

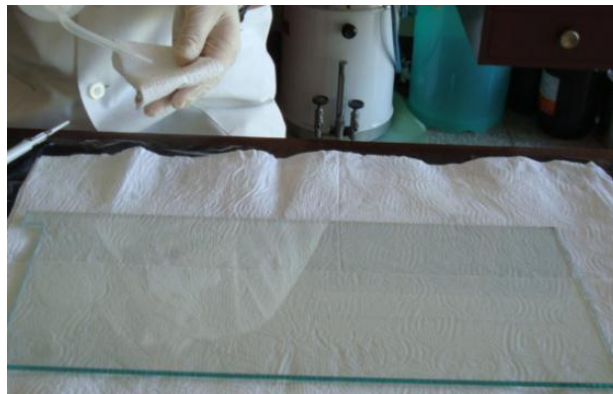


Foto 2. Limpieza del vidrio con pestaña

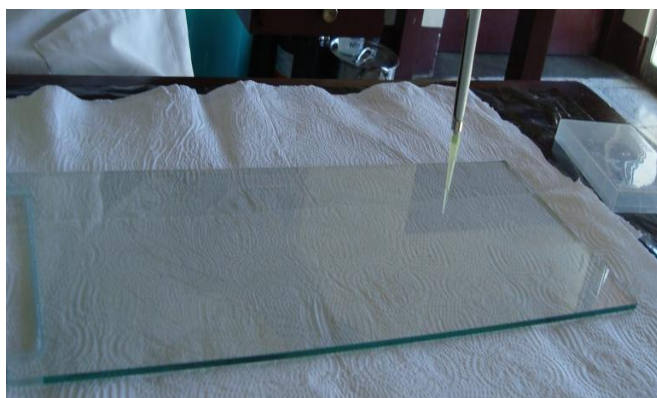


Foto 3. Agregando RepelSilane

Vidrio sin pestaña. El vidrio sin pestaña se lavó utilizando el mismo procedimiento que para el vidrio con pestaña, sin embargo, a este vidrio se le agregó 1 μL de una mezcla conteniendo: 992 μL de etanol, 5 μl de ácido acético y 3 μL de BindSilane. Se esparció la mezcla con un papel toalla por el lado del vidrio en la que se debía adherir el gel. Se limpió el excedente y se dejó secar durante 5 minutos procurando obtener un vidrio con una superficie lo más uniformemente posible (Foto 4).



Foto 4. Distribución del BindSilane sobre el vidrio sin pestaña con papel toalla

B. Ensamblaje de la cámara

Se preparó un espacio en la mesa de trabajo sobre el cual se ubicó el vidrio sin pestaña. Luego a lo largo del margen de este vidrio se colocó un separador de 0.4 mm que determina el grosor del gel (Foto 5).



Foto 5. Ubicación de separadores

Seguidamente se colocó el vidrio con pestaña con la cara tratada con repelente sobre el vidrio sin pestaña (cara tratada con adherente) quedando ambos separados por 0.4 mm (Foto 6).



Foto 6. Ensamblaje de molde de gel

Seguidamente se cubrió la superficie de trabajo con un color que hiciera contraste de fondo, para una mejor visualización. Se colocaron objetos que permitieran mantener los vidrios a una altura aproximada de 2 cm, uno en cada esquina (Foto 7). Para presionar los vidrios se colocaron clanes a lo largo de estos (3 a cada lado) y los cristales se inclinaron un poco de 2 a 3 cm con un soporte más alto en la parte superior de los vidrios, para facilitar el desplazamiento de la solución de acrilamida (Foto 8).



Foto 7. Molde de gel de acrilamida ensamblado



Foto 8. Ubicación de clanes

C. Preparación del gel de acrilamida

El gel se preparó al momento del uso, vertiéndose en un Beaker 50 ml de solución de acrilamida al 4%, 300 μ l de persulfato de amonio al 10% y 50 μ l de TEMED. Se mezcló bien, evitando la formación de burbujas.

La mezcla se depositó con una jeringa de 50 ml, procurando mantener constante la solución de acrilamida en la parte superior de los vidrios, para evitar que entrara aire y se formaran burbujas (Foto 9). En los casos que se formaron burbujas, los cristales se lavaron nuevamente y se reiniciaba todo el procedimiento (Foto 9).



Foto 9. Depositando acrilamida con jeringa de 50 ml

Una vez vertido el gel, para evitar pérdida de éste, rápidamente se eliminó la inclinación y se dejó en posición totalmente horizontal. Posteriormente se introdujo el peine en posición invertida (dientes hacia arriba) para formar un frente totalmente lineal donde se ubicaron los pocillos, luego se espera una hora para que ocurriera la polimerización (Foto 10).

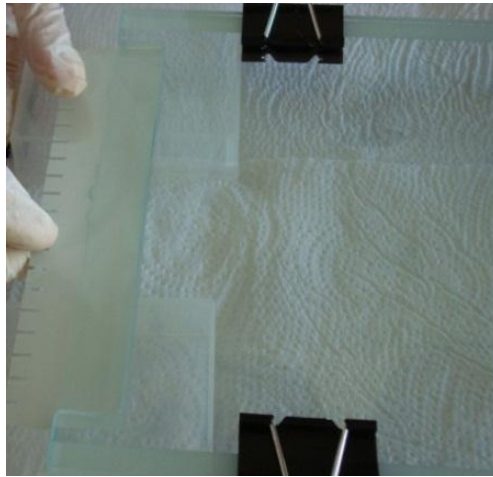


Foto 10. Introducción del peine invertido para formar frente de corrida del gel de poliacrilamida

D. Precorrida y corrida del gel

Para eliminar restos de acrilamida, se lavaron muy bien los vidrios a nivel del frente de corrida con gasa o esponja. Luego se colocaron los vidrios sobre la cubeta de buffer inferior y se ajustaron a la cubeta superior con los sujetadores de la cámara de electroforesis (Foto 12). Se llenaron las cubetas (superior e inferior) de la cámara con TBE (Tris, Ácido Bórico y EDTA) 1X (Foto 11, Foto 12).

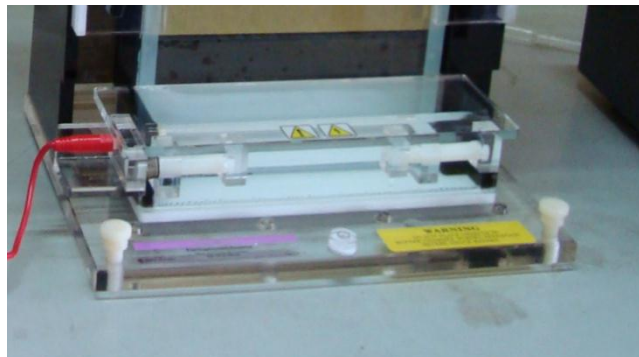


Foto 11. Llenado de Buffer cámara inferior



Foto 12. Llenado de Buffer cámara superior

Una vez polimerizada la acrilamida, se retiró el peine que formó el frente de corrida y se limpió nuevamente el frente del gel de urea y restos de poliacrilamida con la misma solución buffer. Se colocó el peine con los dientes de tiburón hacia abajo para formar los pozos (Foto 13). Se repitió el procedimiento de limpieza del frente de corrida. Se depositaron 2 μ L de tampón de carga (Formamida 95%, EDTA 2mM, Azul de bromofenol 0.05% y Xilenocianol 0.05%) en algunos de los pozos. Se conectó la cámara a la fuente de poder y se realizó la precorrida a 100 W, 2000 V y 400 mA. Alcanzando el gel 45 °C durante 20 minutos para verificar la correcta formación de pozos y el desplazamiento de la mezcla (Formamida/EDTA/Azul de bromofenol /Xilenocianol) en el gel (Foto 14).

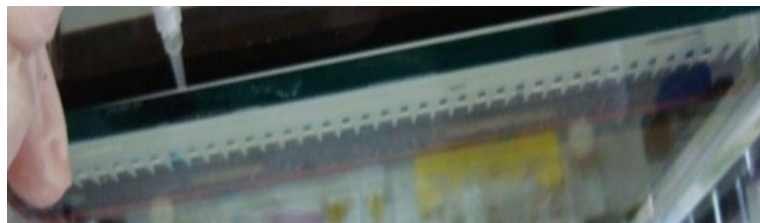


Foto 13. Limpieza de pocillos y disposición de peine



Foto 14. Precorrida de gel

Mientras transcurría la precorrida, se agregaron 5 μ l de tampón de carga a cada uno de las muestras (productos de PCR), las que se desnaturalizaron a 95 °C durante 2 min y se enfriaron rápidamente en un termo con hielo (Foto 15).



Foto 15. Muestras en hielo

Se detuvo la pre-corrída y para efectuar la corrída se colocaron entre 2.5 a 3 μL de muestra de ADN por pozo. Se inició la corrída (100 W, 2000 V, 400 mA) y se dejó que las muestras hubieran recorrido 2 cm dentro del gel, se detuvo la corrída y se retiraron los peines. Seguidamente se corrieron las muestras durante aproximadamente 2 horas.

Una vez finalizada la corrída se desmontó la cámara electroforética, se retiraron los vidrios que contienen el gel, y se desprendió el vidrio con pestaña del gel, evitando que el gel se desprendiera del vidrio sin pestaña, ya que este sirvió de soporte al gel en el proceso de tinción (Foto 16).



Foto 16. Separar con delicadeza el vidrio con pestaña el vidrio sin pestaña

E. Tinción de geles con nitrato de plata

La tinción del gel con nitrato de plata consistió de siete pasos sucesivos, en los cuales es indispensable hacer uso de guantes de látex, mascarilla y gabacha para evitar el contacto físico y la inhalación de soluciones nocivas.

El proceso de tinción comprendió diferentes pasos y en cada paso se sumergió el gel de poliacrilamida (adherido al vidrio sin pestaña) en dos litros de solución, dentro de una bandeja plástica de un metro por cuarenta centímetros.

a. Fijación

Se depositó el gel en la solución fijadora compuesta de ácido acético al 10 %, durante veinte minutos o más (Foto 17). La solución de fijación se preparó al momento de la corrida.



Foto 17.Fijación de ácidos nucleicos

b. Lavado con agua destilada

Se realizaron tres lavados con agua destilada a temperatura ambiente, cada lavado se realizó por dos minutos en constante agitación (Foto 18).



Foto 18. Lavado de geles con agitación gentil y constante

c. Tinción

Se sumergió el gel durante 30 minutos en una solución de nitrato de plata al 0.01% con 2.6 ml de formaldehído para un litro de solución, evitando el contacto con la luz (Foto 19). La solución de nitrato de plata se preparó en un frasco oscuro preferiblemente al momento de uso, una vez utilizada, la solución se desechó precipitándola con NaCl a saturación.

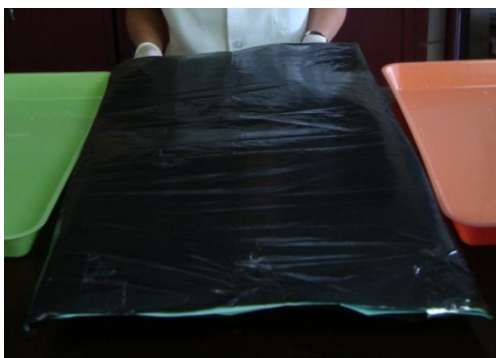


Foto 19. Gel sumergido en solución de nitrato de plata y protegido contra la luz

d. Lavado con agua estilada

Para eliminar restos de nitrato de plata se sumergió el gel en agua destilada a temperatura ambiente y en constante agitación por 10 segundos.

e. Revelado

Se colocó el vidrio con el gel en la solución reveladora en agitación constante, hasta que aparecieron las bandas, entre 3 y 5 minutos (Foto 20). La solución reveladora está compuesta por carbonato de sodio (30 g), formaldehído (1.28 g) y tiosulfato de sodio (200 μ l) por un litro de solución. El tiosulfato de sodio se preparó en un tubo eppendorf en el cual se agregó 1 ml de agua destilada, adicionando luego los cristales de tiosulfato (0.01 g). Esta mezcla se agitó en vórtex a temperatura ambiente.

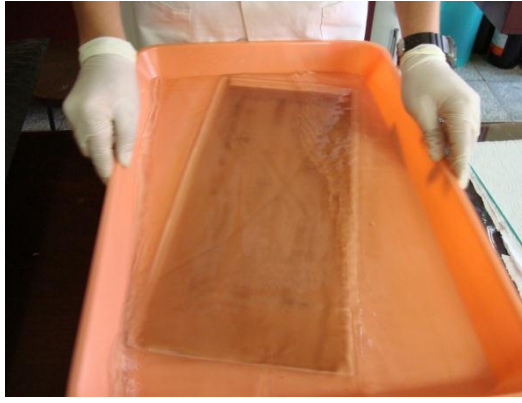


Foto 20. Gel de poliacrilamida revelado con nitrato de plata

f. Fijación/Parada

El gel se sumergió por cinco minutos en solución de parada (ácido acético 10%) para detener el proceso de revelado. Posteriormente se realizó un lavado con agua desionizada para eliminar los restos de ácido acético, para lo que se sumergió el gel en agua destilada por cinco minutos, eliminando excesos de ácido acético.

F. Documentación del gel

Las bandas fueron observadas directamente sobre el gel y se tomaron fotos con una cámara digital.

G. Desprendimiento del gel

Para desprender el gel adherido se introdujo el vidrio sin pestaña en 2 litros de NaOH al 2%, agitando constantemente. Una vez desprendido el gel, se desechó en un recipiente para su eliminación segura. Luego, se procedió a la limpieza del vidrio a través de 3 lavados de 15 minutos con 2 litros de agua corriente, utilizando una esponja con jabón líquido (botando el agua utilizada después de cada lavado y fregando con la esponja). Finalmente se realizó limpieza, la que consistió en agregar alcohol corriente con una pizeta, extendido con papel toalla a lo largo del vidrio. Se dejó secar y se repitió el procedimiento una vez más. Los vidrios se guardan limpios entre papel toalla.

V.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN del presente estudio se utilizó tejido diploide de plántulas de *Pinus spp.* a diferencia de Cerda G. (2007), quien utilizó ADN genómico de megagametofitos. Cuando se extrae ADN de diferentes tejidos a veces hay que hacer modificaciones para dicho tejido como explica Cerda-Granados y Díaz (2013). Al usar las modificaciones que hizo Cerda G. al protocolo original de Doyle y Doyle (1990), el ADN que se obtuvo estaba degradado y buena parte de él quedaba retenido en los pocillos, indicando algún tipo de contaminación (Zimmer, 2005) (Foto 22). Esto se comprobó con las pruebas de espectrofotometría donde se obtuvieron valores medios $A_{260}/A_{280}=1.96$. Por consiguiente se tuvieron que hacer las siguientes modificaciones aplicadas al tejido diploide de plántulas:

Se utilizó 1 ml de buffer de extracción, conteniendo 50 mM de EDTA, similares concentraciones utilizó Teza *et al.*, (2012) en la estandarización de microsatélites para la industria forestal en Colombia, diferente a la concentración de 20 mM utilizada por Cerda G. (2007) y Cerda-Granados y Díaz, 2013), el EDTA es un agente quelante que inhibe la acción de las nucleasas (Puerta & Ureña, 2005).

La proteinasa K se incubó a 65 °C igual a lo utilizado por Teza, (2012), esta proteasa se inactiva a temperaturas mayores de 65 °C, la temperatura óptima de la proteinasa K es de 65 °C y la actividad puede durar aproximadamente 30 min, incubaciones muy largas no son necesarias (Hilario & Mackay, 2007).

Se hicieron dos lavados (precipitaciones de ADN) parecido al protocolo utilizado por Teza 2012, uno con solución de lavado I (Acetato de sodio/ Etanol) y otro con solución de lavado II (Acetato de amonio/Etanol), igual a lo utilizado por Hicks, *et al.* (1998) en el desarrollo de marcadores RAPDs y Microsatélites en *Pinus contorta*. El acetato de sodio es una sal carboxilada utilizada en la precipitación de ADN y ARN (Maniatis *et al.* 1982). Debido a las

diferencias estructurales del etanol con el agua (constante dieléctrica: 24/80), el etanol (alcohol preferido para la precipitación de ADN y ARN) aumenta la atracción entre los cationes y el ADN con carga negativa. Cuando cationes y ácidos nucleicos con carga negativa interactúan, los ácidos nucleicos son neutralizados, de tal manera que precipitan fuera de la solución, las sales en particular los iones monovalentes son críticos para una efectiva precipitación de ácidos nucleicos, en algunas situaciones una sal es preferida sobre otra. El acetato de amonio reduce la coprecipitación de dNTPs libres y oligosacáridos, sin embargo, el acetato de sodio es la sal más utilizada para precipitaciones (Maniatis *et al*, 1982).

Una vez realizados los cambios obtuvimos un ADN limpio con valores medios de $A_{260}/A_{280}=1.87$. Esto se puede comprobar al observar en la Foto 23 donde obtuvimos bandas de ADN bien definidas y sin arrastre. En algunos casos en que el ADN no quedó totalmente limpio (quedaba retenido en el pocillo), por lo cual se resuspendió en mayor volumen de buffer TE hasta 200 μl y se precipitó nuevamente con buffer de lavado I y Buffer de lavado II. También se hizo un segundo tratamiento con ARNasa.

El ADN obtenido con el protocolo modificado fue de alto peso molecular, con poco barrido y de concentración de 100 ng/ μl promedio, cuantificado por espectrofotometría con ratios cercanos a 1.8 (ver en Anexo **Figura 9**).

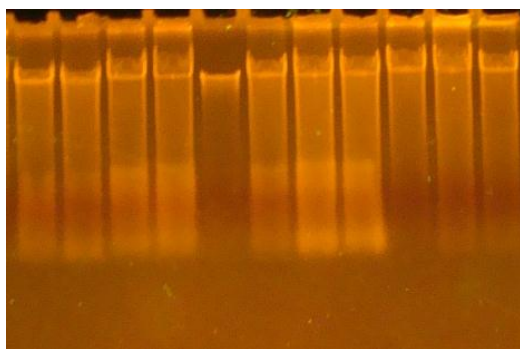


Foto 22. ADN obtenido con el protocolo de Doyle y Doyle (1990) modificado por Cerda G. (2007) (10 μl de ADN/5 μl tampón de carga)

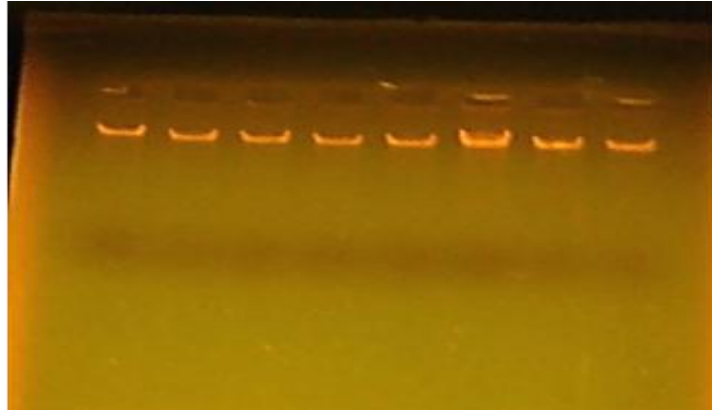


Foto 23. Extracciones con protocolo modificado (10 μ l de ADN/5 μ l tampón de carga)

5.2. EFECTO DE CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Para amplificar las regiones microsatélites, inicialmente se establecieron las condiciones de amplificación (temperatura, tiempo y número de ciclos). Para ello se ensayaron concentraciones estándares de los componentes de la mezcla de reacción de la PCR.

A. Efecto de la concentración de ADN

En este trabajo las amplificaciones se ensayaron con concentraciones de ADN de 1.3 y 1.6 ng por μ l, obteniéndose mejor resultado a 1.6 ng. Lo que es una pequeña diferencia del protocolo de Xiang-xiang y Ji-sen (2005) que utilizaron de 2 a 5 ng por μ l en *Pinus spp.* Por otra parte, Zhang *et al.* (2005) utilizaron 1ng/ μ l para amplificar *P. squamata*. En cambio, Mei *et al.* (2009) utilizaron hasta 6ng/ μ l para obtener bandas claras y específicas en *P. radiata* y *P. tabulaeformis*, Estos datos ponen de manifiesto que la optimización de la concentración de ADN es necesaria para cada especie. Además la concentración del ADN es uno de los principales factores que afectan las reacciones de PCR para amplificar regiones microsatélites. Con altas concentraciones se pueden obtener productos no específicos y a bajas concentraciones no se obtienen productos amplificados (Mei *et al.*, 2009).

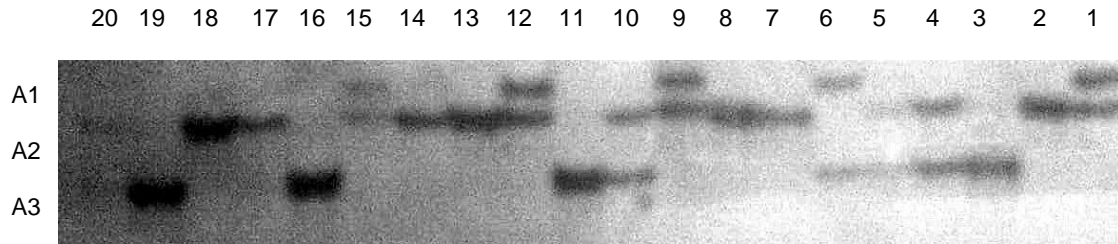


Foto 24. Microsatélites amplificados en el Laboratorio de Genética Molecular, utilizando el primer PtTX2123

B. Efecto de la concentración de Magnesio

Se ensayaron dos concentraciones de $MgCl_2$: 1.5 y 2 mM, obteniéndose buenos resultados a 1.5 mM. En cambio se han reportado buenas amplificaciones a 2 mM para los cebadores PtTX2123, PtTX3025 y PtTX3030 en *P. palustris*, *P. echinata*, *P. radiata*, *P. patula*, *P. halepensis*. y *P. kesiya*, de acuerdo al estudio de Kutil y Williams, (2000). Altas concentraciones de $MgCl_2$ pueden aumentar las probabilidades de inespecificidad, lo que se observa como un barrido de bandas en el gel, por otra parte, bajas concentraciones pueden eliminar productos no específicos (Cortazar & Silva, 2004), pero muy bajas concentraciones pueden resultar en poco producto de PCR (Sigler, 2004). Otro efecto es que mucho magnesio inhibe a la polimerasa (Espinosa, 2007).

C. Efecto de la concentración de Taq polimerasa

Mei *et al.* (2009) luego de ensayar diferentes concentraciones de Taq polimerasa obtuvieron los mejores resultados para *P. radiata* y *P. tabulaeformis* en concentraciones dentro de un rango de 1 y 1.5 U. Por otra parte Kutil & Williams (2000) usó 0.62 U/ μ l. En este estudio la concentración de óptima de la enzima utilizada fue de 0.5 U/ μ l, al igual que Teza *et al.* (2012) en *P. taeda* y *Araucaria angustifolia*, concentraciones bajas de Taq polimerasa son muy recomendadas dado el alto costo que tiene la enzima.

D. Efecto de la concentración de dNTPs

Las concentraciones de dNTPs en este trabajo se mantuvieron constantes a 200 μM durante toda la fase experimental. Similares concentraciones fueron utilizada por autores como Marquardt y Epperson (2004) en *Pinus strobus* y Acuña *et al.* (2012) en *Eucalyptus globulus*. Es ampliamente documentado que altas concentraciones pueden promover incorporaciones incorrectas por un fenómeno conocido como “infidelidad” (Cortazar *et al.*, 2004). En 2007, Wujun *et al.* probaron un amplio rango de concentraciones, encontrando que la concentración de 200 μM es la recomendada y que a concentraciones menores a 100 μM se obtienen productos de amplificación con barrido y bandas inespecíficas.

E. Efecto de la concentración de primers

En este estudio, la concentración final de primers utilizada fue de 0.2 μM , un poco más de la que utilizaron Marum *et al.* (2009) en *P. pinaster* (0.1 μM de cada primers) y menos de lo que utilizó Moraga *et al.* (2012), con 0.25 μM para amplificar ISSR en *P. radiata*. En 2007, Wujun *et al.* establecieron parámetros críticos de concentración de primers entre 0.2 y 1 μM , para amplificar ISSR en una especie herbácea (*Osmanthus spp.*).

McPherson y Møller (2006) documentan que altas concentraciones de primers pueden aumentar la formación de dímeros de primers y el mal apareamiento con secuencias no objetivos. Estos mismos autores reportan que se recomiendan concentraciones de primers en un rango de 0.1 a 1 μM .

F. Efecto de la temperatura de anillamiento

La temperatura de anillamiento es uno de los parámetros críticos en las amplificaciones por PCR. De las tres temperaturas de anillamiento probadas en este estudio (50°C, 56°C y 59°C), los primers utilizados presentaron óptima amplificación a 56°C. Estos resultados difieren a los publicados por Mei (2009), quien utilizó entre 45°-49°C para amplificar secuencias microsátélites en *P. radiata* y *P. tabulaeformis*, y Acuña *et al.*, (2012) quienes reportan entre 42°C y 58°C, en dependencia del primers en *E. globulus*. Lo que evidencia que

la temperatura de anillamiento en microsatélites debe ajustarse a cada primer y a cada especie.

5.3. ANÁLISIS DE BANDAS

Se observaron un total de 120 bandas. Los amplicones tuvieron un tamaño entre 250 pb y 350 pb, presentándose con mayor frecuencia bandas de 300 pb. Las bandas obtenidas representan de 2 a 3 alelos por locus para *Pinus spp.* con los 3 primers que amplificaron las regiones microsatélites.

Los primers que amplificaron estas regiones fueron: PtTX2123, PtTX3025 y PtTX3030. Estas regiones microsatélites en triplete son ortólogas para *P. taeda* (Elsik *et al.*, 2000). Según Ellegren *et al.* (1995), cuando microsatélites ortólogos son amplificados con otras especies es probable la obtención de poco polimorfismo, a pesar de ello, Kutil y Williams en 2000 determinaron que los microsatélites son útiles para el estudio de diversos linajes de coníferas.

Pocos microsatélites nucleares de copia simple han sido reportados en *Pinus*, ya que la complejidad de los genomas de *Pinus* y el antiguo tiempo de divergencia empobrecen la transespecificidad de los microsatélites. Chagné *et al.*, en 2004 obtuvieron un porcentaje de éxito de transpecificidad de 54% de primers de *P. radiata* en *P. pinaster*, Echt *et al.* en 1999 detectaron un 29% entre las especies *P. strobus* y *P. radiata* y Gonzáles *et al.* (2004) un 42 % entre *P. taeda* y *P. pinaster*. En este ensayo, amplificaron 3 de 6 cebadores, es decir, un 50% de las secuencias flanqueantes de microsatélites de *P. taeda* se encuentran conservadas en *Pinus spp.* de Nicaragua. Los locus no amplificados podrían tener repeticiones interrumpidas que hacen irreconocible la secuencia del cebador, quizá por mutaciones puntuales De acuerdo con Taylor (1999), estas interrupciones son responsables por monomorfismos y degeneración de la región microsatélite. Sin embargo, polimorfismos en regiones de flaqueo pueden ser útiles para determinar relaciones entre alelos o entre especies (Ortí *et al.*, 1997).

En el caso de *P. taeda*, se han reportado hasta 4 alelos por locus para el cebador PtTX3030 y 7 alelos por locus para el cebador PtTX3025 (Liewlaksaneeyanawin *et al.*, 2004). Al-Rabab'ah (2003) reporta para esta misma especie (*P. taeda*) 6 alelos con PtTX2128 y 16 alelos con PtTX3030. Para el caso del cebador PtTX2123 se ha reportado hasta 6 alelos por locus en *P. roxburghii*. Comparando con estas especies probablemente *Pinus spp. de grupos reproductivos nicaragüenses* posean un bajo número de alelos para estos locus, puesto que la diferencia no se debe a ningún aspecto metodológico en la aplicación de la técnica, las bandas se diferencian con la suficiente nitidez, lo que elimina la ambigüedad de presencia o ausencia de las bandas obtenidas por medio de otras técnicas, como por ejemplo, RAPD, aunque el número de muestras amplificadas podría influir en el bajo nivel de loci por locus obtenido. Sin embargo, para poder afirmar que hay baja heterocigosidad entre las poblaciones de *Pinus spp.* estudiadas, hay que realizar un estudio poblacional en donde la unidad muestral sea suficientemente significativa.

Es importante mencionar que en este ensayo se amplificaron 3 locus microsatélites. Según Nowakowska (2005), para estudios parentales en *P. sylvestris* como mínimo deberían ser utilizados de 3 a 4 locus microsatélites. Con el propósito de reducir el sesgo en los resultados Takezaki y Nei en 2008 demostraron que aumentando el número de loci dentro de los dos modelos evolutivos IAM (Modelo de Alelos Infinitos) y SMM (Modelo de mutación paso a paso) se incrementa la probabilidad de encontrar la verdadera topología en un grupo taxonómico.

El cebador PtTX2123 se utilizó como indicador de la fiabilidad de la técnica, el cual se corrió 3 veces obteniendo resultados repetibles claros y confiables. Cabe destacar que el motivo de repetición de PtTX2123, lo podemos encontrar en más de 7 especies de *Pinus* (Kutil, 2000). El único parámetro de elección de este cebador para demostrar la repetitividad de los resultados con las muestras de *Pinus spp.* fue la suficiente disponibilidad del cebador en el Laboratorio de Genética Molecular.

Mediante este ensayo determinamos que los microsatélites utilizados en este estudio son transespecíficos y proveen una herramienta eficaz en estudios de *Pinus spp.* (ej., Fitzsimmons *et al.*, 1995; van Treuren *et al.*, 1997; Whitton *et al.*, 1997).

VI. CONCLUSIONES

- Con el protocolo de extracción de ADN de plántulas de *Pinus spp.* optimizado, se obtuvo ADN de alto peso molecular, amplificable para la Taq-polimerasa, con ratios de A_{260}/A_{280} entre 1.6 - 1.85 y concentraciones máximas de ADN de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN.
- Electroforamos regiones microsátélites en geles verticales a 2000 v, 500 ma y 150 W solucionando problemas de resistencia eléctrica y limpieza.
- Visualizamos los fragmentos electroforados utilizando un método sencillo y barato como es el caso de la tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.
- Se logró amplificar regiones microsátélites con las siguientes condiciones de amplificación: Concentración de ADN: 1.6 ng, MgCl_2 : 1.5 mM; Taq polimerasa: 0.5 U/ μl , dNTPs 200 μM , primers: 0.2 μM y temperatura de anillamiento: 56°C, en un volumen final de 12 μl .
- Con dichos parámetros optimizados se logró amplificar 3 de 6 regiones microsátélites probadas para *Pinus spp.*
- Las regiones microsátélites PtTX2123 PtTX3030 y PtTX3025 empleadas en este estudio muestran transespecificidad para *Pinus spp.*
- Se detectaron 3 alelos para el locus PtTX2123 y 2 alelos para PtTX3030 y PtTX3025.

VII. RECOMENDACIONES

- Reutilizar reactivos de tinción para ahorrar recursos (fijación y revelado).
- Probar otros primers en un estudio poblacional con *Pinus spp.*
- Mejorar condiciones de infraestructura en el Laboratorio de Genética Molecular, que facilite el desarrollo de la técnica y la adopción de medidas de bioseguridad.
- Adquirir primers transespecíficos para otros géneros, con el propósito de aplicar esta técnica en otras especies forestales.
- Evaluar los resultados en otras condiciones y comprobar la reproducibilidad de la técnica en otros laboratorios nicaragüenses.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Acuña, C., Villalba, P., García, M., Pathauer, P., Hopp, S. & Poltri, M. (2012). Microsatellite markers in candidate genes for wood properties and its application in functional diversity assessment in *Eucalyptus globulus*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. *Electronic Journal of Biotechnology*, (15), 2.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell*. Garland science, Taylor & Francis Group US.
- Alcoceba, M. (2010). *Estudio de polimorfismos genéticos en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos*. Tesis para optar al grado de doctor en medicina. Universidad de Salamanca, España.
- Al-Rabab'ah, M. (2003). *Evolutionary dynamics of Pinus taeda L. in the Late Quaternary: An interdisciplinary approach*. Tesis doctoral. Texas A&M University, Texas.
- Aranguren, J., Román, R., Isea, W., Villasmil, Y. & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch. Latino a. Prod. Anim*, 13(1), 30-42.
- Aranzana, J., Ballester, J., Carbó, J. & Arús, P. (2001). Microsatélites: marcadores de alta eficiencia para la identificación varietal de melocotonero. *Fruticultura Profesional*, 118.
- Armour, JAL. (1996). Tandemly repeated microsatellites: generating human genetic diversity via recombinational mechanism en: *Human Genome Evolution*. 1 ed. Bios Scientific publishers, 172-190.
- Armour, JAL., Harris, PC. & Jeffreys, AJ. (1993). Allelic diversity at minisatellite Ms205 (D16s309): Evidence for polarized variability. *Humane Molecular Genetics*, (2), 1137-1145.

- Armour, JAL., T. Anttinen, May CA., Vega, EE. & Sajantila, A. (1996). Minisatellite diversity supports a recent African origin for modern humans. *Nature. Genetics*, 13, 154-160.
- Armour, JAL., Wong, Z., Wilson, V., Royle, NJ. & Jeffreys, AJ. (1989). Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with tandem and dispersed repeats elements. *Nucleic Acids Research*, 17, 4925-4935.
- Auckland, L. (2002). *Conifer microsatellite handbook*. Texas A&M University.
- Awadalla, P. & Ritland, K. (1997). Microsatellite variation and evolution in the *Mimulus guttatus* species complex with contrasting mating systems. *Molecular Biology and Evolution*, 14(10), 1023-1034.
- Baginsky, C. (2005). Uso de marcadores moleculares, aplicaciones y ejemplos Fisiogenética Vegetal. Universidad de Chile. Consultado el 09 de Septiembre del 2013, de:
http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/uso_de_marcadores_moleculares.PDF
- Barros, P. (2008). *El minisatélite MsH43: una sorprendente secuencia del genoma humano*. Universida de Servizo de Publicacións e Intercambio Científico. Santiago de Compostela.
- Bassam, BJ., Anollés, GC. & Gresshoff, PM. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196, 80-83.
- Beerli, P. & Felsenstein, J. (1999). Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152, 763-773.
- Beidler, JL., Hilliard, PR. & Rill, RL. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* 126, 374-380.
- Benbouza, H., Baudoin, JP. & Mergeai, G. (2006). Amélioration de la méthode d extraction d ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *Biotechnol. Agr. Soc. Environ*, 10 (2), 73-76.

- Blum, H., Beier, H. & Gross, HJ. (1987). Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.
- Bowcock, A., Ruiz, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. & Cavalli, L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368, 455-457.
- Brede, EG., Rowe, G., Trojanowski, J. & Beebee, T. (2001). Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the common toad (*Bufo bufo*). *Molecular Ecology Notes*, 1, 308-310.
- Brinkmann, B., Meyer, E. & Junge, A. (1996). Complex mutational events at the HumD21S11 locus. *Humane Genetics*. 98(1), 60-64.
- Brown, SM., Hopkins, MS., Mitchell, SE., & Senior, ML. (1996). Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor. Appl. Genet.* 93, 190-198.
- Brown, TA. (2002). *Genomes*. (2 ed.). BIOS Scientific Publishers.
- Caetano, G., Bassam, BJ. & Gresshoff, PM. (1994). Buffer components tailor DNA amplification with arbitrary primers. *PCR Methods Appl*, 4, 59-61.
- Cal, M. (2001). *Análisis de polimorfismos de ADN microsatélite de cromosoma Y. Estudio de la población de Galicia y aplicaciones forenses ..* Tesis para optar al título de Doctora en Medicina. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Callisaya, R. (2007). *Creación de una base de datos de frecuencias alélicas en población mestiza de la región andina boliviana*. Tesis para optar al título de licenciado en bioquímica. Universidad de San Andrés, La paz, Bolivia.
- Cerda-Granados, D. A. & Díaz, V. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. *Encuentro*, 94, 82-92. Disponible en: <http://encuentro.uca.edu.ni/pdf/art-4.pdf>

- Cerda Granados, D. A. (2007). Evaluación de la diversidad genética de poblaciones naturales de *Pinus tecunumanii* Eguiluz & Perry de Nicaragua mediante el uso de marcadores RAPDs. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, León, Nicaragua. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/235665820_Evaluacin_de_la_Diversidad_Gentica_de_Poblaciones_Naturales_de_Pinus_tecunumanii_Eguiluz_J.P._Perry_de_Nicaragua_Mediante_el_Uso_de_Marcadores_RAPDs/file/32bfe5126b7a2e3c30.pdf?ev=pub_int_doc_dl&docViewer=true
- Chagné, D., Chaumeil, P., Ramboer, A., Collada, C., Guevara, A., Cervera, M., Vendramin, G., García, V., Frigerio, J., Echt, C., Richardson, T. & Plomion, C. (2004). Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1204-1214.
- Chambers, C., Proctor, C. & Kabler, P. (1962). Bactericidal Effect of Low Concentrations of Silver. *Journal of the American Water Works Association*, 54, 208-216.
- Chambers, GK. & MacAvoy, ES. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 126(4), 455-76.
- Chan, LM. (2007). Characterization of microsatellite markers for Couch's spadefoot toad (*Scaphiopus couchii*) and cross-amplification in other species of the family Scaphiopodidae. *Molecular Ecology Notes*, 7, 318-320.
- Cheng, HH. & Crittenden, LB. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*. 73, 539-546.
- Chesser, RK. & Baker, RJ. (1996). Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics*, 144, 1225-1235.
- Choo, KH., Vissel, B., Nagy, A., Earle, E. & Kalitsis, P. (1991). A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA and all the human

chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic acids research*, 19, 1179-1182.

Christensen, M., Sunde, L., Bolund, L. & Orntoft, TF. (1999). Comparison of three methods of microsatellites detection. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 59, 167-178.

Ciafardini, G. (1994). A method for the long-term preservation of polyacrylamide gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology*, 19(4), 221-224.

Coltman, D., Bowen, D. & Weith, J. (1996). PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. *Molecular Ecology*, 5, 161-163.

Cooper, GM. & Sunderland.(2000). *The Cell: A Molecular Approach*. (2ed.) Sinauer Associates.

Cornuet, J., Piry, S., Luikart, G., Stoup, PA. & Solignac, M. (1999). New methods employing multi locus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153, 1989-2000.

Cortazar, A. & Silva, E. (2004). Métodos físico-químicos en biotecnología PCR. Universidad Nacional Autónoma de México- Instituto de Biotecnología. Consultado el 24 de Agosto del 2013, de:
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>.

Cruz, P. (2003). *Identificación, caracterización y herencia de microsatélites y su aplicación como marcadores moleculares en un programa de mejoramiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei**. Tesis para optar al título de doctor en ciencias. Centro de investigaciones biológicas del noreste S.C. La paz, Bolivia.

Dávila, JA., Sánchez de la Hoz, MP., Loarce, Y. & Ferrer, E. (1998). The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA and coefficients of parentage to determine genetic relationship in barley. *Genome*, 41, 477-486.

- Dervey, ME., Bell, JC., Smith, DN., Neale, DB. & Moran, GF. (1996). A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 92, 673-679.
- Dolmus, C., García, I. & Callejas, L. (2006). Evaluación de la variabilidad genética en un ensayo de progenies de *Pachira quinata* usando marcadores moleculares. *Encuentro*, (75), 79-88.
- Doyle, J. & Doyle, J. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Dushek, J. & Tobin, A. (2005). *Asking About Life* (3 ed). Thomson books/cole.
- Echt, CS. & Burns, R. (1999). PCR primer pair sequences and SSRs for various *P. taeda* ESTs. *Canadian Journal of Forest Research*, 29, 365-371.
- Echt, CS., Anzidei De Verno, M. & Vendramin, GG. (1998). Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Mol Ecol.*, 7, 307-317.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, HA. & Caskey, CT. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet*, 49, 746-757.
- Ellegren, H., Primmer, CR. & Sheldon, BC. (1995). Microsatellite evolution: directionality or bias?. *Nature Genetics*, 11, 360-362.
- Elsik, CG., Minihan, VT., Hall, SE., Scarpa, AM. & Williams, CG. (2000). Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*. 43(3), 550-555.
- Entrala, C. (2000). *Curso de antropología y genética forense (9 ed.)*. División de Investigación. Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada. España.
- Espinosa, L. (2007). Capítulo 17: Guía práctica sobre la técnica de PCR. 517-539 . de: *Ecología Molecular*,(1 ed.) Eguiarte Luis, Souza Valeria y Aguirre Xitlali. México.

- Evgen'ev, MB. & Arkhipova, IR. (2005). Penelope like elements a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance. *Cytogenetic Genome Research*, 110 (1-4), 510-21.
- Farid, A., O'really, E., Dollard, C. y Kelsey, CR. (2000). Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Canadian Journal of Animal Science*, 80, 9-17.
- Fendri, M. (2008). *Uso de marcadores microsatélites (SSRs) para el análisis de la variabilidad molecular y la identificación de las variedades de olivo del banco de germoplasma de "Boughrara" (Sfax, Túnez)*. Tesis de master Córdoba.
- Fernández, F. (2008). *Análisis de 15 loci tipo Short Tandem Repeats (STR) en la población de Paraguay para su uso en identificación forense*. Memoria para optar al grado de doctor en ciencias biológicas granada. Universidad de granada. España.
- Feschotte, C. & Pritham, EJÂ. (2007). Computational Analysis and Paleogenomics of Interspersed Repeats in Eukaryotes.in *Computational Genomics: Current Methods. Horizon Scientific Press*, 31-53.
- Fisher, J, Gardner, C. & Richardson, E. (1996). Single locus microsatellites isolated using 5'anchored PCR. Oxford University Press. *Nucleic Acids Research*, 24(21), 4369–4371.
- Fitzsimmons, N., Moritz, C., & Moore, S. (1995). Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol Biol Evol*,12, 432-440.
- Flores, I. & Garrido, M. (2012). The repetitive DNA content in eukaryotic genome - Repetitive DNA, de: Garrido-Ramos Manuel A .S Karger AG. *Genome Dynamics*, 7, 1-28.
- Ford, EB. (1940). Polymorphism and taxonomy. En Huxley J. The new systematics. Oxford Clarendon Press.
- Freeland, J. (2005). *Molecular Ecology*. (1 ed.).Wiley John Wiley & Sons Ltd.

- Freifelder, D. & Davison, P. (1963). Physicochemical Studies on the Reaction between Formaldehyde and DNA. *Biophys J.* 3(1), 49-63.
- Gill, P., Kimpton, CP. & Sullivan, KM. (1992). A rapid polymerase chain reaction methods for identifying fixed specimens. *Electrophoresis*, 13, 173-175.
- Goldman, D. & Merrill, CR. (1981). Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis*, 3, 24-26.
- Goldstein, DB., Linares, AR., Cavalli, LL., & Feldman, MW. (1995). Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *PNAS USA*, 92, 6723-6727.
- Goldstein, DB., Zhivotovsky, LA., Nayar, K., Linares, AR., Cavalli, LL. & Feldman, MW. (1996). Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y chromosomes. *Mol Biol Evol.*, 13(9), 1213-8.
- Gonzales, S., Robledo, J., Collada C., Díaz, A., Williams, C., Alia, R. & Cervera, M. (2004). Cross-amplification and sequence variation of microsatellite loci in Eurasian pines. *Theor. Appl. Genet.* 109, 103-111.
- González, DO., Palacios, N. & Tohme, J. (1995). Protocolos para Marcadores Moleculares. Publicación CIAT, 258.
- Goodman, S. (1997). Rst Calc: a collection of computer- programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Mol. Ecol.*, 6, 881-885.
- Guido, D. & Díaz, V. (2006). Estudio preliminar de la diversidad genética en procedencias de Sabal mexicana de Nicaragua aplicando marcadores moleculares. *Encuentro*, (75), 69-78.
- Gupta, PK., Balyan, HS., Sharma, PC. & Ramesh, B. (1996). Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr Sci*, 70, 45-54.
- Hagelberg, E., Bell, L. & Allen, T. (1991). Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, 333, 399-407.

- Hagelberg, E., Gray, IC. & Jeffreys, AJ. (1991). Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature*, 352, 427-429.
- Hamilton, R. (2003). A simple method of surveying plant populations for random amplified DNA polymorphisms. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences*.
- Harwood, A. (2000). Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis By: The Nucleic Acid Protocols Handbook .University of Hertfordshire.Hatfield. UK.
- Hayden, MJ., Nguyen, TM., Waterman, A. & Chalmers, KJ. (2008). Multiplex ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*, 9,80.
- Heslop, J. & Schmidt, T. (2007). Plant Nuclear Genome Composition. *eLS publications*. Consultado el 24 de Agosto del 2013 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0002014.pub2/abstract;jsessionid=713454C8EB7D7DA91023D31FA3FC5A35.d01t04>.
- Hicks, M., Adams, D., O'Keefe, S., Macdonald, E., & Hodgetts, R. (1998). The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) *Genome*,41,797–805 .
- Hilario, E. & Mackay, J. (2007). Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. *Methods in molecular biology*, 353.
- IPGRI & Cornell University. (2003). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Sitios de secuencia etiquetada (Microsatélites, SCAR, CAPS, ISSR).Consultado el 24 de Agosto del 2013 de: http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/documents/publications/Molecular_Markers_Volume_1_es/IV.4.STS.pdf
- Jarne, P. & Lagoda, PJ. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol*. 11(10), 424-9.
- Jeffreys, AJ. & Neumann, R. (1997). Somatic mutation processes at a human minisatellite. *Human Molecular Genetics*, 1,129-136.

- Jeffreys, AJ., Allen, MJ., Halenberg, E. & Sonberg, A. (1992). Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Scientific International*, 56, 65-76.
- Jeffreys, AJ., Wilson, V. & Thein, SL. (1985). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314,67-73.
- Jovera, R. & Payáb, A. (2003). *Inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal: concepto, métodos de detección y utilidad clínica a Sección de Medicina Digestiva*. Hospital General Universitario. Alicante. B .Servicio de Anatomía Patológica. España.
- Julian, SE. & King, TL. (2003).Novel tetranucleotide microsatellite DNA markers for the wood frog, *Rana sylvatica*. *Molecular Ecology Notes*, 3, 256-258.
- Jürgens, I. (2009). *Review of microsatellites in ecology and parentage analysis of Norwegian beavers (Castor fiber) based on cross-specific microsatellites*. Tesis de maestria. Telemark University College.
- Kantartzi, S. (2013). *Microsatellites: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology* . Springer protocols, 1006.
- Karl, A. (2008). *Guía para Principiantes de Biología Molecular Aplicada a la Acuicultura*. IRTA - Sant Carles de la Rapita.. Consultado el 24 de Agosto del 2013 de :http://www.recercat.cat/bitstream/handle/2072/12321/MolToolsAquacult_Spanish.pdf?sequence=1.
- Kathleen, J., Owens, J. & Ashley, M. (2006). Application of plant DNA markers in forensic botany: Genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *PubMed*, 17,85(22),1819-27.
- Kissinger, C & DeBarry, J. (2011). Genome cartography: charting the apicomplexan genome. *Trends Parasitol.* 27(8):345-354.
- Korenberg, JR. & Rykowski, MC. (1988). Human genome organization: Alu, Lines, and molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell*, 53, 391-400.

- Kutil, BL. & Williams, CG. (2000). Triplet-Repeat Microsatellites Shared Among Hard and Soft Pines. *Journal of Heredity*, 92(4), 327-332.
- Lareu, MV., Pestoni, C., Schürenkamp, M., Rand, S., Brinkmann, B. & Carracedo, A. (1996). A highly variable STR at the D12S391 locus. *Int J Legal Med*, 109,134-138.
- Liewlaksaneeyanawin, C., Ritland, C., El-Kassaby, Y. & Ritland, K. (2004). Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 361-369.
- Litt, M & Luty, JA.(1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 397-401.
- Liu, S., Saha, S., Stelly, D., Burr, B. & Cantrell, RG. (2000). Chromosomal assignment of microsatellites loci in Cotton. *Amer. Genet. Assoc.* 91, 326-332.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, SL., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*.(4 ed.) New York: W. H. Freeman.
- López, A. (2003). *Estudio de la inestabilidad genómica espontanea e inducida en mutantes deficientes en la reparación del ADN de Drosophila melanogaster*. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Maldonado, A. & Jorrín, J. (2006). Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana. Universidad de Córdoba departamento de bioquímica y biología molecular. Consultado el 24 de Agosto del 2013 de:
<http://www.uco.es/dptos/bioquimicabiolmol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>.
- Maniatis, T., Fritsch, EF. & Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Manikanda, N. (2013). *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection: Basics, Practice and Benefits*. Springer India.
- Marquardt, PE. & Epperson, BK. (2004). Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Mol Ecol.* 13(11), 3305-15.
- Martínez, AM., Quiroz, J., Marques, JR. & Delgado, JV. (2007). Estudio de la diversidad genética del cerdo negro canario con microsatélites de ADN. Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. 14014 Córdoba. España. *Arch. Zootec.*, 56 (1), 425-428.
- Marum, L., Loureiro, J., Rodríguez, E., Santos, C., Oliveira, MM. & Miguel, C. (2009). Flow cytometric and morphological analyses of *Pinus pinaster* somatic embryogenesis. *J Biotechnol.* 25;143 (4):288-95.
- Matsuoka, Y., Mitchell, SE., Kresovich, S., Goodman, MM., & Doebley, J. (2002). Microsatellites in *Zea*-variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 436-450.
- McCracken, GF., Burghardt, GM., & Houts, SE. (1999). Microsatellite markers and multiple paternity in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Molecular Ecology*, 8, 1475-1479.
- McPherson, M. & Møller, S. (2007). *PCR*. (2ed.). Taylor & Francis.
- Mei, L., Xiu-Lan, L., Cheng-De, L., Fen, Z., Zong-Xing, W. & Jing-Yong, Z.. (2009). Optimizing system of SSR-PCR in *Pinus radiata* and *Pinus tabulaeformis*. *Journal of molecular genetics*, 1 (2-4), 44-49.
- Merrill, CR., Goldman, D., Sedman, SA. & Ebert, MH. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211, 1437-1438.
- Merrill, CR. (1990). Gel-staining techniques. *Meth. Enzymol.* 182, 477.
- Merrill, CR., Harrington, M., & Alley, V. (1984). *Electrophoresis R.*, 5, 289-297.

- Michalakis, Y. & Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142, 1061-1064.
- Mifflin, TE. (1997). Control of Contamination Associated with PCR and Other Amplification Reactions by DABCC. Molecular BioProducts, Inc.
- Milbourne, D., Meyer, RC., Collins, AJ., Ramsey, LD., Gebhardt, C. & Waugh, R. (1998). Isolation, characterization, and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.*, 259, 233-245.
- Moraga, P., Orellana, L., Quiroga, P., Whetten, R., Hasbún, R., Sanfuentes, E., Balocchi, C. & Valenzuela, S. (2012). Development of a genetic linkage map for *Pinus radiata* and detection of resistance associated QTLs against *Fusarium circinatum*. *Tree Genetics and Genomes* (June).
- Morera, L., de Andrés, DF., Barbancho, M., Garrido, JJ. & Barba, CJ. (1999). Detección de variabilidad genética por microsatélites en el alano español. *Arch. Zootec.* 48,63-70.
- Morgante, M. & Olivieri, AM. (1993). PCR- amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3(1), 175-82.
- Mullis, K. & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335- 50.
- Murray Lab. (2011). Polymerase Chain Reaction (PCR). University of Iowa. Consultado el 09 de Septiembre del 2013, de:
www.genetics.uiowa.edu/get_file.php?id=12
- Nakamura, Y., Leppert, M., OConnell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E. & White, R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616-1622.
- Nowakowska, J. (2005). Microsatellite sequences in scots pine as a new tool in forest tree genetics.en: Analysis of microsatellite sequences in scots pine. Proceedings of Workshop WP5.4 *Forest tree genetics* , 9-24.

- Olivares, C. & Gonzales, I. (2012). *Caracterización de la diversidad genética de poblaciones naturales de Calycophyllum candidissimum (Vahl) DC. en la región del Pacífico de Nicaragua con la técnica RAPD*. Tesis para optar al título de licenciada en biología. UNAN-León. León, Nicaragua.
- Ortí, G., Pearse, E., & Avise, J. (1999). Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings National Academy of Sciences*, 10745-10749.
- Ortiz, J. (2011). *Evaluación del polimorfismo del gen leptina en bovinos en el sistema doble propósito en Chiapas, México*. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Tesis para optar al título de Doctor en ciencias. México.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*. 4,347-354.
- Páiz, J. (2013). *Evaluación de la diversidad genética de Thalassia testudinum Banks ex Konig, en poblaciones marino costeras del atlántico guatemalteco*. Informe final de investigación. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Picó, M. & Gómez, C. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats or Short Tandem Repeats). Microsatélites. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Piertney, S., Snow, A., MacColl, A., Bacon, P., Racey, P., Lambin, X. & Dallas, J. (2000). Matrilineal genetic structure and female-mediated gene flow in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): An analysis using mitochondrial DNA. *Evol.* 54, 279-289.
- Poddar, SK., Sawyer, MH. & Connor, JD. (1998). Effect of inhibitors in clinical specimens on Taq and Tth DNA polymerase-based PCR amplification of influenza A virus. *J Med Microbiol.* 47(12),1131-5.
- Ponsuksili, S., Wimmers, K., Schmoll, F., Horst, P. & Schellander, K. (1999). Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an

estimate of genetic distance in Chicken. *The Journal of Heredity*. 90, 656-659.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for gemplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2,225-238.

Powell, W., Morgante, M., Mcdevitt, R., Vendramin, GG., & Rafalski, AJ. (1995). Polymorphic simple sequence repeat regions in the chloroplast genome: applications to the population genetics of pines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7759-7763.

Pritchard, J.K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959

Puerta, C. & Ureña, C. (2005). *Prácticas de biología molecular*. Pontificia Universidad Javeriana.

Queller, DC., Strassmann, JE. & Hughes, CR. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends. Ecol. Evol.*, 8, 285-289.

Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C. & Lawrence, J. (2009). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. Cornell University library. Consultado el 24 de Agosto del 2013 de:
<http://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/0911/0911.4458.pdf>.

Rannala, B. & Mountain, J. (1997). Detecting immigration by using multi locus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 94, 9197-9201.

Raven, PH., Evert RF., Eichhorn SE. (2005). *Biology of Plants*, (7 ed.), W.H. Freeman and Company Publishers, New York.

Rentaría, M. (2007). Capítulo 18 : Las herramientas moleculares Breve revisión de los marcadores moleculares, pp:555-580 en: Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. México.

- Reveles, L., Echavarría, F., Bañuelos, R., Salinas, H. & Cabral, F. (2008). Empleo de marcadores moleculares en la diferenciación de razas caprinas del estado de zacatecas, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9,15 - 27.
- Rober, LN. (2008). *Genética en medicina*.(7ed.) Thompson & Thompson.
- Robert, E. & Farrell, Jr. (2010). *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. Academic Press.
- Rochambeau, H., Fournet-Hanocq, F. & Tien, J. (2000). Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.*,49, 77-93.
- Roche Diagnostics GmbH. (2008). LightCycler® 480 Real-Time PCR System. Technical Note No. 1. Consultado el 24 de Agosto del 2013 de: <http://www.gene-quantification.de/LC480-Technical-Note-01-HRM.pdf>.
- Ruiz, A., Tomfohrde, J., Minc, E., Kidd, JR. & Cavalli, LL. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. 368, 455-457.
- Russell, PA. (1992). *Genetics*. (3 ed.)Harper Collins Publishers.
- Salazar, L. (2004). Modulo VII biología molecular aplicada. Universidad de la frontera. Facultad de Medicina. Departamento de ciencias. Consultado el 15 de Octubre del 2013 en: <http://www.med.ufro.cl/Recursos/Bioquimica-offline/Apuntes/modulobiomol2004.pdf>
- Sambrook, J. & Russell, DW. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*.(3 ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- San Miguel, P. & Bennetzen, JL. (1998). The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Ann. Bot.*, 82, 37-44.
- San Miguel, P. & Bennetzen, JL. (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany*, 82 (A): 37–44.

- Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E. & Simpson, A.J.G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17, 915-919.
- Schlötterer, C. & Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl. Acids Res.*, 20(2), 211-215.
- Schlötterer, C. (1998). Microsatellites. Pp. 237-261 en A. R. Hoelzel. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach.*(2nd ed.). Oxford University Press. England.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å. & Ndjioudjop, MN. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25), 2540-2568.
- Shriver, M., Jin, L., Boerwinkle, E., Deka, R., Ferrell, R. & Chakraborty, R. (1995). A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Mol. Biol. Evol.* 12,914-920.
- Sigler, Von. (2004). Polymerase Chain Reaction (PCR). Laboratory for Environmental Pathogens Research Department of Environmental Sciences. Universidad de Toledo. Consultado el 24 de Agosto del 2013 de :http://www.eeescience.utoledo.edu/Faculty/Sigler/Von_Sigler/LEPR_Protocols_files/PCR.pdf
- Silué, S., Jacquemin, JM., Toussaint, A. & Baudoin, JP. (2004). Étude des gènes impliqués dans lembryogenèse de Phaseolus. In: Gumedzoe Y.M.D (éd.). *Biotechnologies Végétales, Biodiversité et Biosécurité: Dés et Enjeux.* IXe Journées Scientifiques du Réseau BIOVEG, AUF. p 73-76.
- Singer, MF. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *International Review of Cytology*, 76, 67-112.
- Slagel, V., Flemington, E., Traina-Dorge, V., Bradshaw, H. & Deininger, P. (1987). Clustering and subfamily relationships of the Alu family in the human genome. *Mol Biol Evol.*, 4(1), 19-29.

- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139,457-462.
- Sommerville, LL. & Wang, K. (1981). The ultrasensitive silver protein stain also detects nanograms of nucleic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 530-548.
- Soranzo, N., Provan, J. & Powell, W. (1998). Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Mol. Ecol.*, 7,1260-1261.
- Soranzo, N., Provan, J. & Powell, W.(1999). An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. NRC Canada. *Genome*, 42, 158-161.
- Stockinger Lab. (2005). Acrylamide Gels for Resolving Small (25bp-700bp) DNA fragments. Ohio State University Ohio Agricultural Research and Development Center. Consultado el 24 de Agosto de : <http://www.oardc.ohio-state.edu/stockingerlab/Protocols/AcrylamideGels%28DNA%29.pdf>.
- Szabadvary, F. (1992). *History of analytical chemistry*. p. 17. Gordon and Breach Science Publishers.
- Takezaki, N. & Masatoshi, N. (2008). Empirical Tests of the Reliability of Phylogenetic Trees Constructed With Microsatellite DNA by the Genetics Society of America. *Genetics*, 178, 385-392.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17, 6463-6471.
- Taylor, GR. (1999). Enzymatic and chemical cleavage methods. *Electrophoresis*, 20,1125-1230.
- Teza, V., Fonseca, M., Walantus, L., Davalos, P., Toro, A., Cariaga, A., Villalba, L. & Darío, P. (2012). Estandarización de marcadores moleculares microsatélites para su uso en la industria forestal de Misiones, Argentina Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIV No. 1 Julio 216-223.

- Tijerino, A. (2009). *Determinación de la variabilidad genética en cinco poblaciones naturales de Cedrela odorata L. utilizando la técnica RAPD*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León Nicaragua.
- Urquhart, A., Kimpton, CP., Downes, TJ. & Gill, P. (1994). Variation in short tandem repeat sequences a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med.*, 107,13-20.
- van Pelt-Verkuil, E., van, Belkum, A. & Hays, J. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Science, Business Media B.V.
- van Treuren, R., Kuittinen, H., Kauarkkauainen, K., Baen E., & Savolainen, O. (1997). Evolution of microsatellites in *Arabis petraea* and *Arabis lyrata*, outcrossing relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol*, 14, 220-229.
- Varshney, A., Mohapatra, T. & Sharma, RP. (2004). Molecular Mapping and Marker Assisted Selection of Traits for Crop Improvement.pp.301-343, en: Srivastava P., Narula A, y Srivastava S. *Plant Biotechnology and Molecular Markers* .Anamaya Publishers, New Delhi, India.
- Vendramin, GG., Anzidei, M., Madaghiele, A. & Bucci, G. (1998). Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Aitas revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 456-463.
- Vendramin, GG., Lelli, L., Rossi, P. & Morgante, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol Ecol.*, 5 (4), 595-8.
- Villamón, F. (2000). *Caracterización de microsatélites de Solanum tuberosum subsp.tuberosum y en las otras especies de papa cultivada*. Tesis para optar Título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Mayor San Marcos. Lima, Perú.
- Villarreal, L. (2009). *Origin of Group Identity Viruses, Addiction and Cooperation*. Springer Science, Business Media, LLC.

- Vogt, P. (1990). Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence block in the human genome are based on highly conserved chromatin folding code. *Human genet.*, 84, 301-336.
- Vroh, Bil., Harvengt, L., Chandelier, A., Mergeai, G. & Du Jardin, P. (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breed.* 115, 205-206.
- Waye, JS. & Willard, HF. (1987). Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: a survey of alphoid sequences from different human chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 25,15 (18), 7549-7569.
- Weber, JL. & May, PE. (1989). Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 388-396.
- Westermeier, R. (2001). *Electrophoresis in practice.*(3ed.). Wiley- VCH, Weinheim. Germany.
- Whitton, J., Rieseberg, LH., & Ungerer, MC. (1997). Microsatellite loci are not conserved across the Asteraceae. *Mol Biol Evol.* 14, 204-209.
- Wieczorek, AM., Zamudio, KR., King, TL. & Gjetvaj, B. (2002). Isolation of microsatellite loci in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Mol Ecol Notes*, 2, 313-315.
- Williams, L., Ramos, E. & Callejas, L. (2000). Uso de marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) para evaluar la variabilidad genética en 7 cultivos de *Jatropha curcas* L. *Encuentro*, (52), 20-29.
- Wright, JM. & Bentzen, P. (1994). Microsatellites: Genetic markers for the future. *Rev Fish Biol Fish*,4, 384-388.
- Wujun, G., Shufen, L., Da, H., Chuanliang, D. & Longdou, L. (2009). Phylogenetic classification as revealed based on optimize ISSR-PCR system in the *Osmanthus* 8,1 .Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza" din Iasi Sec. II a. Genetica si Biologie Moleculara.

- Xiang-xiang, F. & Ji-sen, S. (2005). Identification of seeds of Pinus species by Microsatellite Markers *Journal of Forestry Research*. 16 (4), 281-284.
- Yáñez, V. (2002). *Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de Camote (Ipomoea batatas L.)*. Lima-Perú.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11(1),1-16.
- Zhang, ZY., Chen, LY. & Li, DZ. (2005). Detection of low genetic variation in a critically endangered Chinese pine, Pinus squamata, using RAPD and ISSR markers. *Biochem Genet.* , 43(5-6), 239-49.
- Ziegler, RG., Hoover, RN., Pike, MC., Hildesheim, A., Nomura, AM., West, DW., Wu-Williams, AH., Kolonel, LN., Horn-Ross, PL., Rosenthal, JF. & Hyer, MB. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J. Natl. Cancer Inst.* 17,85 (22),1819-27.
- Zimmer, E., Roalson, E. (2005). *Molecular Evolution, Producing the Biochemical Data* Academic Press.

ANEXOS

Tabla 2. Principales marcadores moleculares y sus características más importantes (modificado de K. Semagn, 2006)

Características	RFLP	Minisatélites	Microsatélites	RFLP-PCR	RAPD
Principio	Digestión con Enzimas de restricción. Southernblot de hibridación.	Digestión con Enzimas de restricción. Southernblot de hibridación.	Amplificación por PCR de secuencias repetidas simples	Amplificación por PCR de locus simple y digestión con enzimas de restricción.	PCR con partidores arbitrarios
Tipo de polimorfismo	Cambios de bases en sitios de restricción, inserciones y deleciones	Cambios de bases ,inserciones y deleciones	Diferencias en longitud debido a número de unidades repetidas	Cambios de bases en sitios de restricción, inserciones y deleciones	Cambios de bases en sitios de unión del partidor al templado inserciones y deleciones
Polimorfismo	Moderado	Bajo	Alto	Moderado	Maderado a bajo
N° loci detectados	1 a 3	Muchos	1	1	1 a 10
Dominancia	Codominante	Dominante	Codominante	Codominante	Dominante
Conocimiento del genoma estudiado	Ninguno	Ninguno	Si	Si	No
Dificultad técnica	Intermedia	Intermedia	Baja	Baja	Intermedia
Costo de desarrollo	Intermedio	Intermedio	Alto	Alto	Bajo

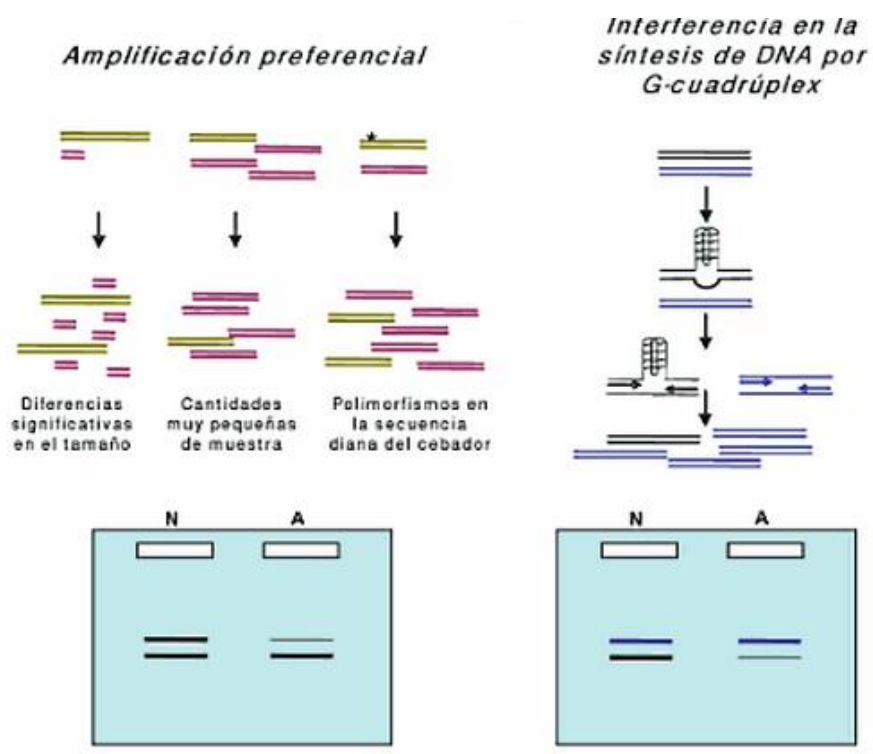


Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos que pueden producir artefactos durante la PCR. En el esquema de todos los geles en el carril N se muestra lo que se obtendría en una amplificación normal y en el carril A lo que produciría como consecuencia del artefacto (Barros, 2008)

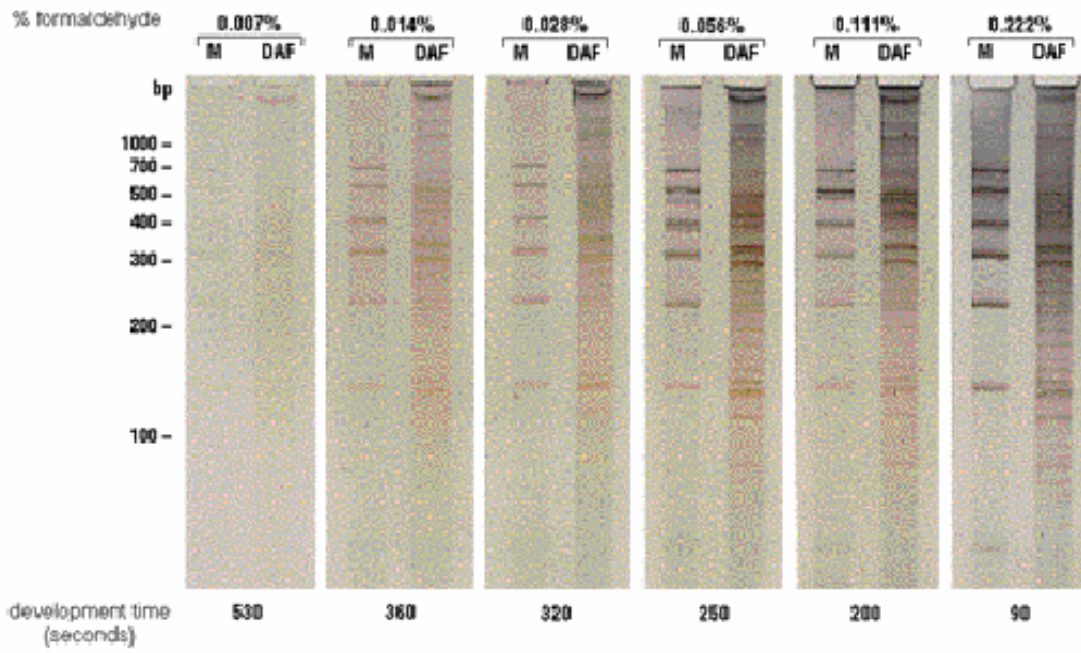


Figura 9. Efecto de la concentración de formaldehido durante el rebelado de la imagen. Tomado de Bassam, 1991