



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE
MICROSATÉLITES PARA SU POSTERIOR USO EN
LA EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD
GENÉTICA DE *MARATHRUM RUBRUM*
(PODOSTEMACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A :**

ABAN REZÁ D ACOSTA LAFÓN



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JAVIER ANDRÉS JUÁREZ DÍAZ**

2016

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL JURADO

1. D Acosta

Lafón

Aban Rezá

55 39 39 54 49

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

411017183

2. Doctor en Ciencias

Javier Andrés

Juárez

Díaz

3. Doctora en Ciencias

Guadalupe Judith

Márquez

Guzmán

4. Doctora en Ciencias

América Nixtin

Castañeda

Sortibrán

5. Doctor en Ciencias

Leonardo Osvaldo

Alvarado

Cárdenas

6. Maestro en Ciencias

Gabriel Sinué

Fonseca

Salazar

7. Optimización de la amplificación de microsatélites para su posterior uso en la evaluación de la variabilidad genética de *Marathrum rubrum* (Podostemaceae)

56 p.

2016

Esta tesis se realizó en el laboratorio *Biología del Desarrollo en Plantas* del Departamento de Biología Comparada (Facultad de Ciencias, UNAM), en el Taller de “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para el desarrollo de la tesis, gran parte del trabajo experimental se realizó también en las instalaciones del Taller de Plantas I y II de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, dirigido por la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León.

A mis papás y mis hermanos.

“...en la naturaleza la obra de dios”

Lord Baden-Powell

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz por toda su paciencia y colaboración, por confiar en que cuando decía que haría las cosas, encontraría la manera.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán por todos los ánimos y cada una de las breves pláticas, que siempre me regresaban el ánimo y me inspiraban a seguir adelante con fe en la ciencia.

A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León por su valiosa asistencia técnica y al hecho de que nos permitió el acceso al Taller de Plantas I y II para hacer uso del equipo de biología molecular para el desarrollo exitoso de esta tesis.

A la Dra. Margarita Collazo por sus consejos, apoyo y trabajo en el campo.

Al M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong y a la M. en C. Mónica Karina Perez Pacheco por su asistencia técnica en el trabajo de campo.

A la Biol. Vera Isabel Martínez Barradas por su apoyo en el trabajo de campo y en todo momento.

Al jurado revisor de este trabajo: Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. América Nixtin Castañeda Sortibrán, Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, Dr. Leonardo Osvaldo Alvarado Cárdenas y M. en C. Gabriel Sinué Fonseca Salazar, por sus correcciones a este trabajo.

A la UNAM

A los profesores que en su paso por mi crecimiento y desarrollo me marcaron en igual parte por ser exigentes y por ser un ejemplo a seguir: Alejandro Marché, Sara Frías, Sinué Fonseca, Guadalupe Barajas y Héctor Benavides. Sin su pasión por la ciencia yo no habría desarrollado la mía.

Al clan y la familia que tengo ahí por elección. A los que estuvieron, a los que están y a los que estarán. Los protagonistas de una historia entran y salen, pero la historia siempre permanece.

A Kevin, Carlos, Antonio y Félix, los amo. Y a Salua por estar siempre ahí.

Al CherryChili: A Víctor. A Pelu. A Arantxa. A Karina. A Casa. Por sus risas.

A mis increíbles amigas que conocí aquí pero espero que sigan por siempre: Marina, Rubí, Sandra Luz y en especial a Vera, quién me apoyo en cada paso de este trabajo.

Y por supuesto a Mariana (y su increíble familia) porque sin ella los cinco años más intensos que he tenido no habrían sido la mitad de increíbles.

A mi familia por la diversidad y por el refugio de amor que siempre han brindado (ocasionalmente por el refugio literalmente hablando).

A mis hermanos. Por inspirarme y ser reflejo de mí.

A mis padres. Por todo.

A mi amor por el planeta, por ser la única razón fundamental por la que decidí estudiar biología

ÍNDICE

Resumen.....	7
Introducción.....	8
Biología de Podostemaceae.....	8
La variabilidad genética en <i>Marathrum</i>	10
Los marcadores moleculares.....	12
Los microsatélites como marcadores moleculares.....	16
Marcadores moleculares en la familia Podostemaceae.....	22
Antecedentes.....	24
Microsatélites en <i>M. rubrum</i>	24
Justificación.....	25
Hipótesis.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares.....	26
Materiales y métodos.....	27
Colecta y almacenaje de material biológico.....	27
Purificación del DNA genómico.....	28
Amplificación de microsatélites.....	31
Análisis de la amplificación.....	33
Resultados.....	34
Purificación del gDNA de <i>M. rubrum</i>	34
Análisis de los productos de amplificación.....	35
Discusión.....	46
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	53

RESUMEN

La especie *Marathrum rubrum* (Podostemaceae) crece en forma de parches de vegetación lo que hace difícil la diferenciación de los individuos entre sí, es decir, identificar si las plantas son clonas o individuos genéticamente distintos. Tener conocimiento de los sistemas reproductivos de una especie es de suma relevancia, tanto para fines de investigación como de conservación y manejo de ecosistemas, por ello se debe contar con herramientas para obtener conocimiento fehaciente de éstos. Sin embargo, el conocimiento de la variabilidad genética del género *Marathrum* es limitado debido a que no existen muchos estudios concernientes a su biología de la reproducción.

En este trabajo se estandarizaron las condiciones de amplificación de microsatélites para su uso como marcadores moleculares en *M. rubrum*, permitiendo su aplicación en el estudio de la variabilidad genética inter e intrapoblacional de tres localidades estudiadas del estado de Jalisco.

Se logró la amplificación de siete microsatélites, concluyendo que las condiciones establecidas podrían ser replicadas para su posterior uso en análisis de variabilidad entre y dentro de las poblaciones de *M. rubrum*. En lo particular tres microsatélites identificados se podrían utilizar debido a polimorfismos detectados en su amplificación, se recomienda el uso de éstos para análisis posteriores de variabilidad intra e interespecífica de las tres poblaciones de *M. rubrum* estudiadas.

INTRODUCCIÓN

Biología de Podostemaceae

La familia Podostemaceae es la familia de angiospermas acuáticas más amplia, comprende alrededor de 270 especies distribuidas en 50 géneros. Todas las plantas de esta familia tienen una distribución tropical delimitada por su hábitat, comúnmente en ríos cercanos a la costa marina (Cook y Rutishauser, 2007; Philbrick *et al.*, 2010; Tippery *et al.*, 2011).

Las plantas de la familia Podostemaceae son muy particulares en su hábito de crecimiento y en su fenología, crecen adheridas a las rocas de ríos con corrientes rápidas, sumergidas en el agua. Cuando baja el nivel del agua en invierno, alrededor del mes de noviembre, las flores se desarrollan fuera del agua y, en cuestión de 30 días, se lleva a cabo la polinización y la fecundación, produciendo entre 300 y 700 semillas por fruto (Philbrick y Novelo, 1998). La adhesión de las podostemáceas al sustrato sobre el que habitan depende de biofilms de cianobacterias para la fijación de la semilla que, después de establecerse, germina y desarrolla en las raíces estructuras similares a vellosidades, así como de células escamosas que facilitan la unión a este biofilm y a la roca (Jäger-Zürn y Grubert, 2000; Katayama *et al.*, 2008).

En México se encuentran representados cinco géneros de esta familia, principalmente ubicados en la costa del Pacífico: *Marathrum*, *Oserya*, *Podostemum*, *Tristicha* y *Vanroyenella* (Philbrick *et al.*, 2010; Tippery *et al.*, 2011). De entre estos, *Marathrum* es el más diverso, pues está compuesto por 25

especies. Es también un género particularmente problemático en cuanto a su clasificación, principalmente debido a su alta variabilidad morfológica (Tippery *et al.*, 2011; Novelo *et al.*, 2009).

Marathrum es un género polifilético representado en México por siete especies (Tippery *et al.*, 2011). Debido a que su situación taxonómica aún se encuentra sin resolver, para este trabajo se decidió utilizar el nombre *Marathrum*; aun si la clasificación del género llegara a modificarse, no afectaría los resultados que aquí se obtuvieron debido a su enfoque específico. Recientemente, se propone agrupar a *M. rubrum* Novelo y Philbrick y a *M. schiedeanum* Cham. en la especie *M. foeniculaceum* Bonpl. (Novelo *et al.*, 2009).

Philbrick y Novelo (1995) reportan que, gracias a mecanismos como su alta producción de semillas, la propagación sexual de *Marathrum* es más frecuente que la propagación de tipo asexual, más de lo que se encuentra comúnmente en otros grupos de angiospermas acuáticas. Sin embargo, debido al hábito de crecimiento que presentan, es muy posible que la colonización de las rocas en que habita se dé por reproducción asexual, aunque esto sea otra de las incógnitas de la biología de la reproducción del género (Luna *et al.*, 2012).

Su crecimiento en forma de parches de vegetación hace difícil determinar si en una roca se encuentran uno o más individuos, es decir, si las plantas son clonas o individuos genéticamente distintos. Además, estas plantas presentan una importante plasticidad fenotípica y un gran polimorfismo vegetativo dentro del género e incluso a nivel de especie (Katayama *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2012;

Philbrick *et al.*, 2010; Rutishauser, 1997). Es por esto que contar con herramientas que ayuden al estudio de la variabilidad genética y a la identificación de individuos resulta fundamental para el estudio del género *Marathrum*.

La variabilidad genética en *Marathrum*

El conocimiento de la variabilidad genética del género *Marathrum* es relativamente limitado debido a que no existen muchos estudios concernientes a su biología de la reproducción (Luna *et al.*, 2012). A pesar de que se sabe que las plantas de este taxón tienen una eficiente reproducción sexual, no se conocen los alcances reales de ésta ni de su propagación asexual (Philbrick y Novelo, 1995).

Considerando su hábito de crecimiento, los mecanismos de colonización por vías asexuales podrían ser muy relevantes en el establecimiento de las podostemáceas (Saidman *et al.*, 2000); dado que la distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones depende directamente de los mecanismos reproductivos.

Si en una población vegetal domina la reproducción asexual la consecuencia natural es una disminución de la variabilidad genética, por ello las poblaciones clonales suelen considerarse menos adaptables a condiciones ambientales cambiantes. Sin embargo, aun tras el establecimiento de una población clonal, hay gran cantidad de variaciones fenotípicas y genotípicas en sus individuos, lo cual se observa incluso en especies representadas generalmente por poblaciones clonales (Raven *et al.*, 2005; Widén *et al.*, 1994).

Existen múltiples mecanismos presentes en plantas que reducen la pérdida de variabilidad en poblaciones clonales: (1) las mutaciones somáticas, que son poco frecuentes; (2) la segmentación de rametos y su transporte incidental, lo cual genera un flujo de información genética en el espacio; (3) una alta diversificación de genotipos durante el establecimiento de la población; (4) un ambiente que favorezca genotipos heterocigotos y, por lo tanto, la coexistencia de muchos genotipos sin la necesidad de intercambio genético constante; (5) la permanencia de conexiones entre rametos ayuda, amortiguando la presión de fuerzas selectivas sobre distintos parches de vegetación (Widén *et al.*, 1994). En cuanto a las podostemáceas, debido a su hábito de crecimiento es posible sugerir que en sus poblaciones existen mecanismos tales como el segundo y el quinto de los aquí mencionados.

Estos mecanismos son algunos de los que permiten mantener la diversidad genética cuando ésta disminuye naturalmente a lo largo del tiempo y la reproducción sexual no es factor suficiente para elevarla (Ellstrand y Roose, 1987; Widén *et al.*, 1994). Tener conocimiento de los sistemas reproductivos de una especie es de suma relevancia, tanto para fines de investigación como de conservación y manejo de ecosistemas, por ello se debe contar con herramientas para obtener conocimiento fehaciente de éstos (Jiménez, 2010).

En lo particular conocer más a fondo la biología de la reproducción, y consecuentemente de la variabilidad, de las podostemáceas tiene dos aplicaciones a corto plazo: (1) el monitoreo de especies en peligro de extinción; y

(2) la clarificación de los problemas taxonómicos que representa la casi imposible diferenciación morfológica entre algunas especies (Kelly *et al.*, 2010).

Más aún, mejorar la identificación genética en las podostemáceas contribuirá a conocer la variabilidad intra e interpoblacional, y al corto plazo, al monitoreo de especies en peligro de extinción y a la clarificación de sus problemas taxonómicos (Kelly *et al.*, 2010).

Los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son caracteres proteicos o de ácidos nucleicos, heredables y polimórficos, que ofrecen características con las que se puede evaluar la diversidad genética (Jiménez, 2010; Saidman *et al.*, 2000). Se pueden evaluar según factores como el costo, la reproducibilidad de sus metodologías y la resolución de análisis que ofrecen. Los marcadores moleculares de DNA detectan polimorfismos en regiones seleccionadas, por distintos métodos, del material genético. Por lo general, los marcadores moleculares se heredan de manera mendeliana, simplificando la detección de diferencias genotípicas entre individuos; por ejemplo, el color de una flor determinado por un *locus* específico en un cromosoma. En el caso de las plantas, éstos son ideales para los estudios relacionados a diversidad genética, dinámicas de meta-poblaciones, análisis de germoplasma, evolución, identificación de individuos, mapeo genético e hibridación vegetal (Powell *et al.*, 1996; Saidman *et al.*, 2000; Widén *et al.*, 1994).

Los primeros marcadores en desarrollarse fueron los proteicos y los más comunes de este tipo son las aloenzimas usadas como marcadores moleculares. Las aloenzimas son isoformas de una enzima cuyas variantes tienen migración electroforética diferencial y se utilizan para ver diferencias entre individuos en su conformación de variantes isomórficas (Jiménez, 2010). Debido a que los *loci* correspondientes a estas isoenzimas pertenecen a áreas funcionales del genoma están sujetos a selección y por lo tanto se eliminan rápidamente las mutaciones en ellos; esta condición reduce la variabilidad buscada para detectar polimorfismos a cierta escala. Algunas desventajas de esta técnica son que precisa de muestras celulares de alta calidad y que presenta problemas para poblaciones clonales, pues algunos *loci* analizados tienen una baja cantidad de polimorfismos (Jiménez, 2010; Powell *et al.*, 1996).

Otro marcador molecular basado en análisis de secuencia es el método de polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Los SNP son variaciones en una sola base nitrogenada en un *locus* determinado en el genoma y se usan, por ejemplo, para identificación de parentesco. Éstos son heredables en *loci* reconocidos que corresponden generalmente a fenotipos identificados y ocurren generalizados en porciones representativas de las poblaciones, por ejemplo han demostrado encontrarse relacionados con fenotipos de padecimiento específicos como la diabetes (Gutiérrez-Aguilar *et al.*, 2007). Para su uso se recurre a técnicas de secuenciación en regiones previamente identificadas, por lo que su uso en organismos en que no se han desarrollado es casi imposible (Selkoe y Toonen, 2006).

Por otro lado están los métodos de marcadores basados en amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que presentan algunas ventajas sobre los anteriores. De éstas tal vez la más importante es que precisan una menor cantidad de muestra de gDNA (Jiménez, 2010; Vos *et al.*, 1995).

El primero de ellos es la técnica de polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción (RFLP), un procedimiento con el que el gDNA es seccionado por enzimas de restricción específicas a cada secuencia, resultando en secuencias de longitud variable para cada especie; por lo general este procedimiento implica mucho trabajo y tiempo (Saidman *et al.*, 2000). La técnica de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) ofrece un análisis con múltiples *loci* aleatorios amplificados en el gDNA que se analizan comparativamente por la presencia o ausencia de su hibridación; este método fue popularizado por su velocidad para diferenciar un genoma de otro, en comparación con métodos como los RFLP, sin necesidad de un conocimiento previo de este (Saidman *et al.*, 2000). La técnica de polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados (AFLP) funciona por medio de la amplificación selectiva de secuencias obtenidas por enzimas de restricción; estas secuencias son aleatorias y se amplifican con oligonucleótidos que reconocen los sitios de restricción. Esta técnica revela polimorfismos en un alto número de *loci* anónimos en poco tiempo. Los AFLP y los RFLP reflejan polimorfismos en el tamaño de sitios de restricción seleccionados; sin embargo, los RAPD, así como los microsatélites discutidos posteriormente, detectan polimorfismos en sitios seleccionados por medio oligonucleótidos específicos (Powell *et al.*, 1996; Vos *et al.*, 1995).

Debido a las variables con que trabajan, estas tres técnicas son experimentalmente difíciles de reproducir y, generalmente, son funcionales únicamente para alelos dominantes de un *locus*; además, los oligonucleótidos utilizados para la PCR que se desarrollan para estas técnicas suelen tener una baja especificidad, llevando a posible contaminación en su uso (Jiménez, 2010; Selkoe y Toonen, 2006; Vos *et al.*, 1995).

Un marcador molecular que se ha popularizado debido a su potencial en identificación de especies, revisiones ecológicas e inventarios, es el conocido como código de barras de DNA. Esta técnica requiere el uso de una o varias regiones conocidas de DNA, de aproximadamente 700 pb, cuyas secuencias se analizan para identificar variaciones en regiones específicas. En la mayoría de los animales y en algunos otros pocos organismos la región estandarizada para usarse en análisis de códigos de barras de DNA es un fragmento del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa C (*COI*) (Fazekas *et al.*, 2008; Hebert *et al.*, 2003).

Dado el potencial de la técnica de códigos de barras de DNA se han buscado porciones genéticas que puedan ser utilizadas específicamente como códigos de barras en plantas, pues la ya mencionada *COI* no se puede usar para reconocimiento en plantas, ni siquiera para diferenciar especies del mismo género, debido a la transferencia horizontal de genes mitocondriales y debido a las bajas tasas de mutación de este gen en plantas (Fazekas *et al.*, 2008). Es importante mencionar que los códigos de barras de DNA generalmente no reportan buenos resultados para organismos poliploides, lo cual es un problema para su uso en

plantas. Por ello se ha buscado utilizar alternativas universales para plantas, por ejemplo usar *loci* de cloroplasto (CBOL Plant Working Group, 2009; Kelly *et al.*, 2010).

Para obtener información de la variabilidad genética de un grupo de organismos, los marcadores moleculares son analizados por medio de métodos como los mencionados a continuación.

La heterocigosidad esperada (H_e), propuesta por Nei (1973), es una de las medidas más utilizadas para estimar la variabilidad genética de un grupo, sea inter o intra poblacional; se basa en la frecuencia de las variantes alélicas para estimar la diversidad genética y se compara con la heterocigosidad observada (H_o).

Para datos de marcadores dominantes (e. g. AFLP mencionados anteriormente) suele utilizarse el coeficiente de concordancia simple. Por otro lado, tanto el coeficiente de Jaccard como el coeficiente de Nei-Li se pueden aplicar con datos de marcadores moleculares codominantes, por ello se recomienda su uso en microsatélites (Nei, 1973; Sneath y Sokal, 1973; Wright, 1978).

Los microsatélites como marcadores moleculares

Los microsatélites (también llamados SSR, *Simple Sequence Repeat*, o STR, *Short Tandem Repeat*) son secciones de DNA de entre 100 y 300 pb, de secuencias altamente repetitivas de 2 a 6 nucleótidos presentes en genomas

procariontes y eucariontes. Se pueden clasificar según su secuencia repetida en: bi, tri, tetra, penta y hexa nucleótidos. Estos marcadores moleculares se encuentran en regiones no codificantes flanqueadas comúnmente por *loci* altamente conservados. Estas regiones se han estudiado y han tenido un uso cada vez más amplio en plantas desde 1992 con las primeras descripciones de microsatélites específicos a plantas (Akkaya *et al.*, 1992; Selkoe y Toonen, 2006; Tautz y Renz, 1984).

El polimorfismo entre distintos alelos de un microsatélite se detecta por la longitud de los segmentos en que las repeticiones están contenidas, es decir por el número de repeticiones de la secuencia; ésta longitud se modifica de manera tan frecuente que estas regiones se han considerado secciones hipervariables (Ellegren, 2004). Las mutaciones que modifican el tamaño de estos *loci* generalmente se originan por errores naturales de la DNA polimerasa y son muy frecuentes debido a que estas regiones no están sujetas a selección (Tautz y Renz, 1984).

Los microsatélites usados como marcadores moleculares proporcionan información sobre la diversidad genética de los organismos estudiados, por lo que pueden ofrecer herramientas para el estudio de sus poblaciones y su reproducción, además de información valiosa sobre la historia evolutiva de la especie (Jiménez, 2010; Rajeev *et al.*, 2005; Selkoe y Toonen, 2006).

Una de las razones porque su uso resulta muy atractivo es por la fineza de identificación que pueden ofrecer. Por ejemplo, unos pocos *loci* con alto

polimorfismo es suficiente para establecer relaciones genealógicas o conocer estructura clonal de una población, para lo cual han demostrado mayor poder de identificación que los AFLPs (Díaz-Viloria *et al.*, 2013; Selkoe y Toonen, 2006). Con un mayor número de *loci* es posible discernir entre poblaciones de una especie y conocer información sobre las relaciones entre estas poblaciones (Pearse y Crandall, 2004; Selkoe y Toonen, 2006).

En cuanto a su uso para el estudio de poblaciones, los microsatélites poseen una característica muy importante: son codominantes. Este hecho indica que su herencia se adapta al modelo de herencia mendeliana, lo cual facilita establecer relaciones genealógicas y diferenciar entre individuos homocigotos y heterocigotos, información fundamental para el estudio de la variabilidad de una población (Díaz-Viloria *et al.*, 2013; Morillo *et al.*, 2009; Selkoe y Toonen, 2006).

Para la obtención de microsatélites existen dos protocolos muy conocidos. El primero se realiza por medio de una biblioteca genómica enriquecida, elaborada de modo similar a las bibliotecas genómicas usadas comúnmente en aplicaciones biotecnológicas. El gDNA de la muestra es digerido, en secciones de 400 a 800 pb, y seleccionado tomando fragmentos con segmentos repetitivos, con el uso de sondas enriquecidas. Los segmentos seleccionados como microsatélites son clonados en vectores bacterianos, tamizados por escrutinio, y analizados para diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar de 100 a 300 pb de cada segmento (Glen y Schable, 2005). A pesar de ser la técnica más utilizada para obtención de microsatélites, tiene resultados muy variables ofreciendo un bajo porcentaje de bacterias recombinantes efectivas; por ello se han desarrollado

métodos para mejorar los resultados de la técnica, por ejemplo, realizar la búsqueda de microsatélites en DNA fragmentado por una técnica de obtención de RAPD, o seleccionar los fragmentos por medio de hibridación selectiva (Zane *et al.*, 2002).

El segundo de los protocolos funciona a partir de la amplificación trans-específica, en la que con conocimiento de taxa relacionados al organismo objetivo se realiza una búsqueda de microsatélites reportados para éstos. Considerando la posición cercana a regiones conservadas que tienen los microsatélites, estos *loci* generalmente se mantienen dentro del genoma al paso de los eventos de especiación e incluso a lo largo de cientos de millones de años y se pueden encontrar, o al menos sus regiones adyacentes, preservados en taxa hermanos (Jiménez, 2010).

Por último, después de usar una técnica para obtener los microsatélites se suele proceder con un análisis de los oligonucleótidos generados para optimizar las condiciones ideales en que amplifican el microsatélite blanco. Después se lleva a cabo un análisis de los resultados, y durante éste se suelen realizar pruebas estadísticas de los resultados pues, tomando en cuenta dada la naturaleza variable de los *loci*, es necesario tomar muestras de tamaño considerable para establecer conclusiones (Jarne y Lagoda, 1996). Es importante destacar que el único resultado tangible de la identificación de microsatélites para un organismo es el par de oligonucleótidos correspondientes a los extremos del microsatélite estudiado, oligonucleótidos que se anclaran a los flancos del *locus* a amplificar (Selkoe y Toonen, 2006).

Se debe tomar en cuenta que este método presenta desventajas importantes. En una gran cantidad de plantas es necesario desarrollar microsatélites desde cero, debido a la escasa cantidad de estudios en algunos grupos vegetales. También muchos microsatélites obtenidos no resultan viables o interpretables, ya que la cantidad de microsatélites útiles tiene una relación con el tamaño del genoma haploide y algunas plantas con genoma muy amplio (Jiménez, 2010).

Al igual que otros métodos de análisis basados en PCR, el método de microsatélites depende en su amplificación de una correcta reproducibilidad del PCR, así como un funcionamiento universal de los oligonucleótidos, en los individuos estudiados (Selkoe y Toonen, 2006). Dado que algunos protocolos para el cálculo de la variabilidad genética necesitan considerar cuáles son los mecanismos de aparición de alelos, los microsatélites pueden representar un problema, pues aún no son claros todos sus mecanismos de mutación (Ellegreen, 2004; Selkoe y Toonen, 2006).

Por último, una desventaja poco común es que debido a la alta tasa de mutaciones inherente a estas regiones, existe la probabilidad de encontrar en grupos divergentes homoplasias de tamaño. En estas, dos alelos tienen el mismo tamaño, pero no debido a herencia (Selkoe y Toonen, 2006).

Como ventajas importantes, los microsatélites como marcadores moleculares son relativamente simples de usar (Morillo *et al.*, 2009); asimismo, la identificación de regiones variables para múltiples sitios a la vez se logra por sólo

una fracción del costo de otros métodos que implican secuenciación (Rajeev *et al.*, 2005; Tautz y Renz, 1984).

Otra ventaja es que como las regiones que contienen los microsatélites son generalmente de menor tamaño (100 a 300 pb) que las usadas en secuenciación, el DNA molde utilizado puede presentar algunos grados de degradación y aún ser de utilidad (Selkoe y Toonen, 2006).

Debido a que los oligonucleótidos generados para microsatélites son especie-específicos, hay una baja probabilidad de encontrarse con problemas de contaminación cruzada en las muestras, pues sería difícil que estos mismos oligonucleótidos amplificaran DNA de algún organismo no relacionado que contaminara la muestra (Jiménez, 2010; Selkoe y Toonen, 2006).

Desde el punto de vista de la universalidad de su aplicación son marcadores valiosos porque hay una alta tasa de transferencia de los *loci* en que se encuentran. Por esto es que se pueden encontrar a lo largo de varios grupos relacionados y se pueden aprovechar como marcadores trans-específicos para mapeo genético comparativo y estudios evolutivos (Powell *et al.*, 1996; Rajeev *et al.*, 2005; Raven *et al.*, 2005; Woodhead *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008).

Para el estudio de la genética de plantas, en específico, los microsatélites son cada vez más populares y múltiples estudios reportan la alta resolución de identificación obtenida con ellos (Woodhead *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008). En las plantas una aplicación interesante es desde el punto de vista de la domesticación y del mejoramiento artificial. Al estar flanqueados por áreas conservadas del

genoma, los microsatélites pueden transferirse en conjunto con *locus* que expresen características fenotípicas visibles, ofreciendo una asociación entre las relaciones de parentesco y la expresión de características heredables (Rajeev *et al.*, 2005).

Marcadores moleculares en la familia Podostemaceae

Se han realizado trabajos de variabilidad genética en Podostemaceae utilizando herramientas moleculares, con resultados diversos. El resumen de estos se muestra en la tabla 1 y posteriormente se explican los trabajos correspondientes.

Tabla 1. Resumen de resultados obtenidos del análisis de plantas de la familia Podostemaceae por medio de marcadores moleculares (Kelly *et al.*, 2010; Khanduri *et al.*, 2014; Ueda *et al.*, 1997).

Método	Resultados obtenidos
Búsqueda de secuencias de códigos de barras de DNA	Identificación a nivel de especie y recomendación de los <i>loci rpoC1</i> y <i>matK</i> .
Análisis de la secuencia del gen <i>rbcL</i>	Clasificación taxonómica de la familia Podostemaceae
Análisis de la secuencia del conjunto de genes ITS	Obtención de información taxonómica a nivel genérico

En estudios de códigos de barras de DNA específicos a Podostemaceae, se ha concluido que el gen mitocondrial *COI* no permite observar una resolución que permita la identificación a nivel de especie, por ello se ha propuesto utilizar varios *loci* que permitan la función de códigos de barras de DNA. Kelly *et al.* (2010) buscaron secuencias para análisis de código de barras de DNA que se probaron en términos de universalidad de amplificación, variabilidad intra e interespecífica y

resolución obtenida; proponiendo a partir de estos criterios el uso de las secuencias *rpoC1* y *matK*, ambas de cloroplasto, para la identificación a nivel de especie (Kelly *et al.*, 2010).

Se logró una aproximación de la filogenia de la familia Podostemaceae por métodos moleculares por medio del análisis del gen *rbcL* (Ueda *et al.*, 1997). En este trabajo se extrajo DNA de tres especies de podostemáceas, se amplificó por PCR la región del gen *rbcL* y se analizó la secuencia para determinar la cercanía de estas especies con algunas otras familias como Crassulaceae, Penthoroideae, Tetracarpaea, Saxifragaceae y Tetracarpaeoideae. A partir de este estudio se propone la cercanía de estas plantas a la familia Crassulaceae, teniendo ancestros terrestres comunes. Sin embargo, a partir del análisis de éste gen no se pudo conocer información de la variabilidad dentro de la familia misma (Ueda *et al.*, 1997).

En otro estudio más, se analizaron 14 especies de 8 géneros por medio del análisis de la secuencia de los genes ITS, o espaciador interno transcrito, un conjunto de *loci* ubicados al lado de los genes ribosomales, frecuentemente usados para la identificación en plantas. La secuencia extraída de estas 14 especies se purificó, amplificó, clonó y secuenció; al compararla con la misma secuencia de especies bien ubicadas dentro de cada uno de los 8 géneros se obtuvo información suficiente sobre la filogenia intergenérica (Khanduri *et al.*, 2014).

En función de los objetivos de este trabajo, se optó por utilizar una técnica que ofreciera mayor resolución de identificación que las técnicas ya mencionadas (Tabla 1). Y con el fin de conseguir una identificación genética con mayor resolución del análisis, que permitiera diferenciación a nivel individuo se decidió utilizar la técnica de microsatélites para la especie *M. rubrum*.

ANTECEDENTES

Microsatélites en *M. rubrum*

Previo a este trabajo Luna (datos sin publicar) colectó muestras de hojas de *Marathrum rubrum* en las tres localidades del estado de Jalisco especificadas en Materiales y métodos más adelante. A partir de estas muestras se purificó su gDNA y se generó una biblioteca genómica para obtención de microsatélites.

En el trabajo de Luna (datos sin publicar) a partir de esta biblioteca genómica se aislaron 9 microsatélites de *M. rubrum* y se generaron 9 pares de oligonucleótidos específicos para su amplificación (Tabla 3). Además, se obtuvieron las temperaturas de fusión (T_m) teóricas para cada par de oligonucleótidos, las cuales se utilizaron como base en este trabajo para la amplificación de cada uno de los microsatélites.

JUSTIFICACIÓN

Aunque *Marathrum rubrum* se reproduce sexualmente, su hábito de crecimiento dificulta conocer la efectividad de este sistema de reproducción y los alcances de sus mecanismos de dispersión. Estandarizar el uso de microsatélites como marcadores moleculares que puedan ayudar a la identificación de individuos permitirá realizar estudios sobre la variabilidad de las poblaciones, aportando información relevante para los estudios de reproducción, taxonomía y distribución de *M. rubrum*.

HIPÓTESIS

Si se definen las temperaturas de alineamiento para siete microsatélites de *Marathrum rubrum*, se optimizarán las condiciones de amplificación para utilizarlos en posteriores estudios de la especie, tales como la evaluación de su variabilidad genética, y durante su análisis se determinará si alguno de los microsatélites presenta características para su aplicación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de amplificación para siete microsatélites de *Marathrum rubrum* en las poblaciones de tres localidades en el estado de Jalisco para su posterior uso como marcadores moleculares en la determinación de la variabilidad genética inter e intrapoblacional.

OBJETIVOS PARTICULARES

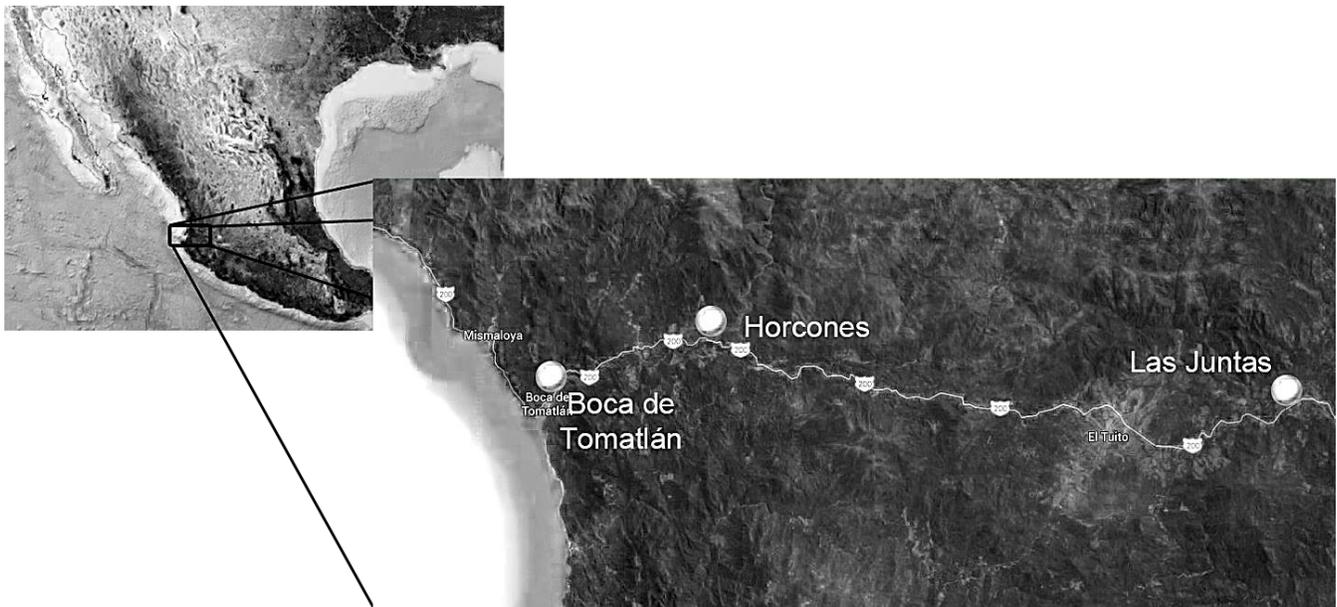
- Probar si el método de extracción de gDNA propuesto ofrece un buen rendimiento a partir de las muestras de *M. rubrum*.
- Optimizar las condiciones de amplificación por PCR específicas para cada uno de los microsatélites de *M. rubrum* con que se cuentan.
- Establecer si la temperatura de alineamiento utilizada para la amplificación de cada microsatélite coincide con la recomendada, obtenida por medios teóricos.

- Determinar cuál o cuáles de los microsátélites poseen características que pudieran ser relevantes para utilizarlos en posteriores estudios de variabilidad genética de *M. rubrum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y almacenaje de material biológico

Se colectó material vegetativo de *Marathrum rubrum* en los meses de enero del 2013 (temporada 2012-2013) y enero del 2014 (temporada 2013-2014). Las colectas se realizaron en tres ríos ubicados en la costa del estado de Jalisco (Mapa 1): Horcones ($20^{\circ}27'12.1''N$, $105^{\circ}17'23.9''W$), Boca de Tomatlán ($20^{\circ}31'50.2''N$, $105^{\circ}17'15.2''W$) y Las Juntas ($20^{\circ}14'43.6''N$, $105^{\circ}18'42.2''W$).



Mapa 1. Localización de los sitios de muestreo en que se realizó el trabajo de campo. El área ampliada del mapa muestra los sitios de colecta en la costa del estado de Jalisco.

Para la colecta se eligieron aleatoriamente de 4 a 6 rocas en cada río, distribuidas de la siguiente manera: (1) dos cercanas entre ellas; (2) una o dos río arriba de las anteriores; y (3) otra u otras dos río abajo de las primeras. En cada roca se trazaron nueve cuadrantes equidistantes de los que se tomaron de dos a seis muestras de hojas en suficiente cantidad para la purificación de DNA.

A las muestras se les eliminó el exceso de agua e inmediatamente se colocaron en papel absorbente para comenzar a secar el material, cambiando el papel húmedo cada 5 - 6 h, por dos ocasiones. Luego, se almacenaron en papel seco en bolsas herméticamente selladas con sílica gel, siguiendo el método reportado por Kelly *et al.* (2010), permitiendo que las muestras se conserven evitando condiciones degenerativas de humedad y daño físico, para la posterior purificación del gDNA.

Purificación de DNA genómico (gDNA)

Después de contar con las muestras vegetales secas colectadas en campo, se purificó gDNA de pocos individuos de cada uno de los tres ríos. El objetivo principal en la purificación del gDNA es separarlo de componentes celulares como lípidos, proteínas y RNA que se le asocian de forma natural. El primer paso es homogeneizar y llevar a cabo una lisis celular (Karp, 2010), para la cual se utilizó una solución amortiguadora con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

Se probaron dos protocolos de purificación distintos (Ahmed *et al.*, 2009) y Cortés Palomec y McCauley, 2009). Ambos mostraron distintos resultados en

cuanto al rendimiento de gDNA, siendo el de Cortés-Palomec y McCauley (2009) el más eficiente. Este protocolo tiene como característica particular la implementación de una solución amortiguadora con CTAB como agente tensoactivo; los pasos del protocolo son los siguientes.

1. Preparar el amortiguador de lisis con CTAB (100ml Tris 1M pH 8.0, 280ml NaCl 5M, 40ml EDTA 0.5M y 20g CTAB, llevar a 1L con agua destilada) adicionando polivinil pirrolidona 40,000 (PVP-40) y β -mercaptoetanol (β -ME) como se muestra en la Tabla 2, agitando para incorporar.
2. Macerar entre 40 y 50 mg de tejido de una hoja en un mortero con nitrógeno líquido.
3. Agregar 500 μ l del amortiguador de lisis al polvo fino obtenido a partir del macerado e incorporar.
4. Transferir la suspensión a un tubo de 1.5 ml.
5. Añadir 4 μ l de RNAsa A (20 mg/ml) y mezclar por inversión.
6. Incubar a 55°C por 1 h.
7. Agregar 500 μ l de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y agitar vigorosamente.
8. Centrifugar a 15,000 rpm por 8 min a temperatura ambiente.
9. Recuperar cuidadosamente la fase acuosa en un tubo de 1.5 ml y calcular el volumen recuperado.

10. Agregar 0.08 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M frío (-20 °C) y 0.54 volúmenes de isopropanol frío (-20 °C) y mezclar bien por inversión.
 11. Incubar a -20 °C al menos 10 h.
 12. Centrifugar a 15,000 rpm por 3 min a 4°C.
 13. Decantar cuidadosamente.
 14. Lavar la pastilla de DNA con 700 µl de etanol al 70%, centrifugando a 15,000 rpm por 1 min a 4°C y decantar cuidadosamente.
 15. Lavar la pastilla de DNA con 700 µl de etanol al 95%, centrifugando a 15,000 rpm por 1 min a 4°C y decantar cuidadosamente.
1. Secar la pastilla de DNA a 55 °C y resuspender en 100 µl de agua estéril.

Tabla 2. Cantidades necesarias de los reactivos que se requieren para la preparación del amortiguador de lisis.

Amortiguador de lisis con CTAB	PVP-40	β-ME
5 ml	0.2 g	25 µl
20 ml	0.8 g	100 µl

Después de la purificación se analizó el gDNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% tiñendo con GelRed (Biotum), para evaluar el rendimiento de la purificación observando la presencia del material genético.

Amplificación de microsatélites

Una vez obtenido el gDNA se utilizó éste como molde para la amplificación por PCR de los microsatélites. Dado que cada microsatélite es flanqueado por regiones conservadas (Ellegren, 2004; Tautz y Renz 1984) estas secuencias se utilizan para el diseño de oligonucleótidos para su amplificación por PCR. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (Tabla 3) fueron generados por Luna (datos sin publicar) a partir de una biblioteca genómica de *M. rubrum*; se trabajó con 7 de estos 9 pares de oligonucleótidos.

Tabla 3. Secuencias de los 7 oligonucleótidos generados en el laboratorio para su uso en la amplificación de microsatélites en *M. rubrum*. Se presentan las temperaturas teóricas de alineamiento de cada par de oligonucleótidos, así como su T_m calculada a partir de los datos de Luna (sin publicar) *Clave del oligonucleótido.

Clave*	T ^a de alineamiento en PCR	Secuencia del oligonucleótido	
		Sentido (F)	Antisentido (R)
16	53 °C	GCGAAATATGCGGATAGAGC $T_m=63$ °C	GCCAAAACGTTCTCGGAATA $T_m=65$ °C
29	53 °C	CAGAAGAAAATTCGCCCAAG $T_m=65$ °C	CTGAGCCGTGATAGATTGGT $T_m=63$ °C
37	56 °C	TGTCCGTGAGTGAACAGAGG $T_m=66$ °C	GCTTTTGAGAGTTGCCCGTA $T_m=67$ °C
71	53 °C	ATCGATATTACGCGCATGGT $T_m=63$ °C	CCGATTTGGCAAAGTTGTGT $T_m=63$ °C
107	53 °C	TTCCGATTCGATGCTTCAT $T_m=63$ °C	ATTGACGGCGATGCTCTCT $T_m=63$ °C
116	53 °C	AAGAACATGGCCAGTTTGG $T_m=63$ °C	AACAATGCCACCAAGGAAAC $T_m=63$ °C
119	56 °C	GGTCCCTAGCAGGTGATTAAG $T_m=66$ °C	TCACGAATAACGGTCACTGC $T_m=67$ °C

El esquema general de la amplificación de los microsatélites ya mencionados por PCR se llevó a cabo siguiendo el siguiente esquema:

- Desnaturalización inicial: 95 °C – 15 min
- Reacción en cadena: 30 ciclos.
 - a. Desnaturalización 95 °C – 30 s
 - b. Alineamiento 53 ó 56 °C – 30 s
 - c. Extensión 72 °C – 1 min
- Extensión final: 72 °C – 5 min

Se utilizó el termociclador ThermoHybaid PCR express HBPX1100 y la DNA polimerasa TEMPase Hot Start (Ampliqon), la cual requiere de una incubación de 15 min a 95°C para su activación, razón por la cual el paso de la desnaturalización inicial tiene este tiempo largo de incubación.

Como se puede ver en el esquema general de la amplificación la condición que varía es la temperatura de alineamiento pues depende de cada par de oligonucleótidos. Ésta temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de cada oligonucleótido, valor que depende del tamaño de la molécula y de la proporción entre citosinas y guaninas sobre adeninas y timinas en la secuencia (Karp, 2010).

La T_m correspondiente a estos oligonucleótidos se calculó usando la fórmula recomendada por el fabricante de los oligonucleótidos: $T_m = (2 \cdot (A+T)) + (4 \cdot (C+G))$ (Página en red: IBT, 2016).

Según lo reportado por Luna (datos sin publicar) la amplificación se probó utilizando las temperaturas de alineamiento recomendadas (53 ó 56°C) para cada par de oligonucleótidos como se muestra en la tabla 3. Posteriormente se eligió para cada reacción la temperatura que ofreció un mejor resultado de amplificación.

Análisis de los productos de amplificación

Los productos de la amplificación por PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se buscó la presencia de bandas que indicaran la efectividad de la amplificación del microsatélite y también se esperó encontrar un polimorfismo en el tamaño de los amplicones, es decir productos de amplificación, lo que indicaría diferencias entre los individuos y permitiría la evaluación de la variabilidad genética. Se podía esperar además un polimorfismo en cuanto al número de alelos, reflejándose en el número de bandas observadas en la electroforesis, dando la posibilidad de identificar individuos homocigotos y heterocigotos para cada *locus*, es decir microsatélite. Estos polimorfismos podrían no presentarse si las poblaciones son muy homogéneas, dando como resultado que a partir de las muestras analizadas no se encontraran diferencias.

RESULTADOS

Purificación de gDNA de *M. rubrum*

Se presentan a continuación los resultados de la purificación de gDNA de las colectas realizadas en el río Boca de Tomatlán (temporada 2013-2014), en el río Horcones (temporada 2012-2013) y en el río Las Juntas (temporadas 2012-2013 y 2013-2014). En la figura 1 se presentan estos resultados, mostrando únicamente los gDNA purificados que se utilizaron para el análisis posterior, tal y como se describe en Materiales y métodos.

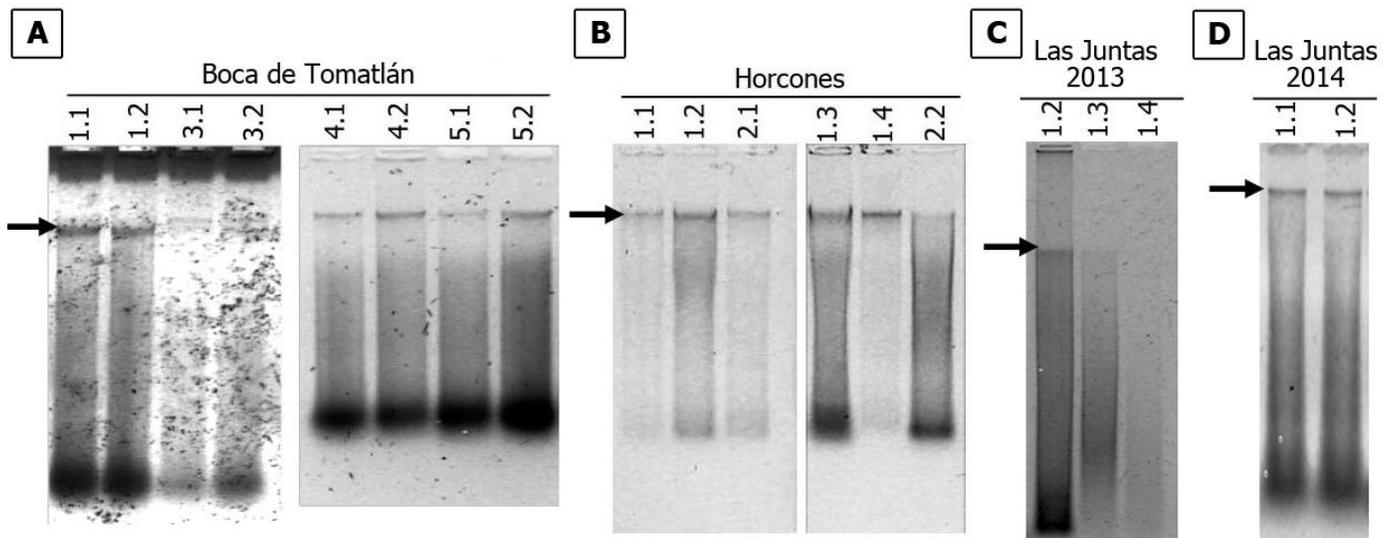


Figura 1. Análisis del gDNA purificado a partir de hojas de *M. rubrum*. **A.** Muestras del río Boca de Tomatlán (2012-2013). **B.** Muestras del río Horcones (2012-2013). **C.** Muestras del río Las Juntas (2012-2013). **D.** Muestras del río Las Juntas (2013-2014). El análisis de todas las muestras de gDNA se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1%, tñiendo al DNA con GelRed. La numeración señala el número de roca y el número de muestra de la misma, por ejemplo 3.1 se refiere a la muestra 1 de la roca 3. Las flechas indican la altura que corresponde a la banda del gDNA en cada gel.

Análisis de la amplificación de los microsatélites

Se amplificaron 7 microsatélites de *M. rubrum* por medio de PCR, utilizando como molde gDNA de muestras individuales de las poblaciones mencionadas en Materiales y métodos. Estos microsatélites se amplificaron probando los 7 pares de oligonucleótidos 16, 29, 37, 71, 107, 116 y 119 (Tabla 3).

Como se observa en la figura 2A, a partir de los pares de oligonucleótidos 16, 37, 107 y 119 se observa sólo un amplicón, menor de 200 pb en todos los casos. En cuanto a los pares de oligonucleótidos 29, 71 y 116 se obtuvo más de una amplicón, lo que, como se menciona más adelante, podría indicar la existencia de más de un alelo de cada uno (Figura 2A). Para calcular el tamaño aproximado de cada uno de los productos de amplificación, a partir del gel de la figura 2A se obtuvieron los datos para la curva de calibración (con un índice de confiabilidad $p=0.9969$) (Figura 2B).

El resumen de los resultados de amplificación obtenidos utilizando una temperatura de alineamiento de 56 y 53 °C se muestra en las tablas 4 y 5, respectivamente. En cada tabla se indica también la cantidad de bandas que se obtuvieron en cada ensayo.

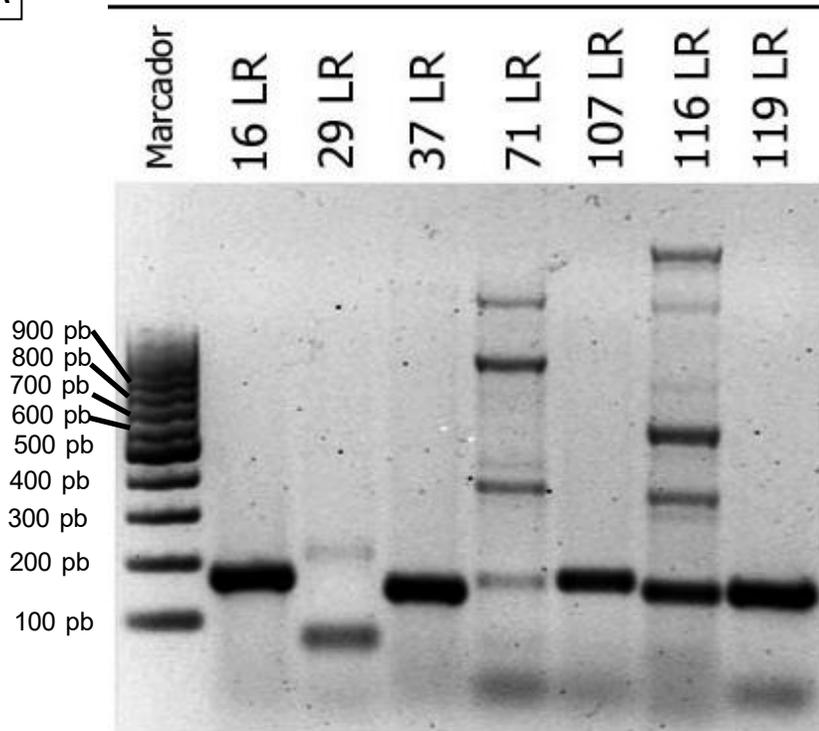
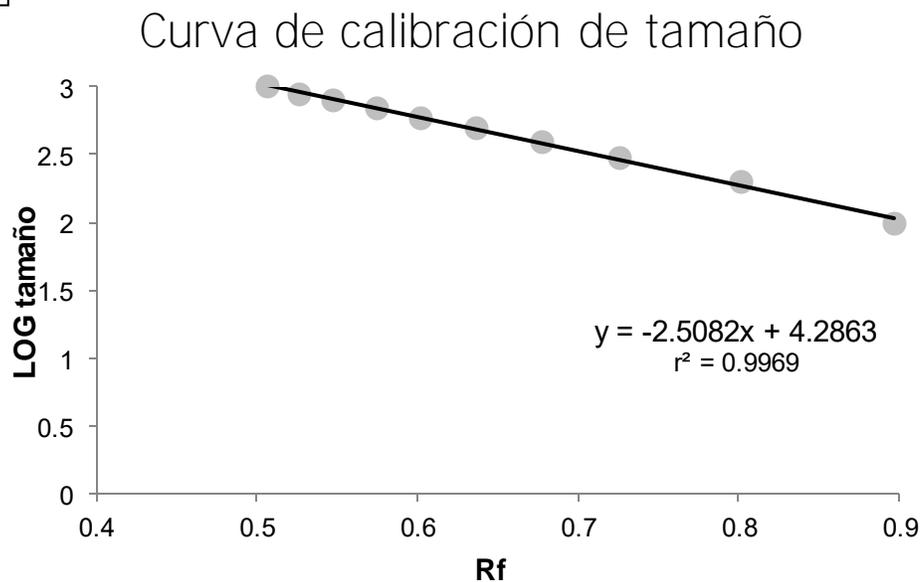
A**B**

Figura 2. Análisis de los productos de la amplificación y del tamaño de microsatélites de *M. rubrum* con cada uno de los 7 pares de oligonucleótidos analizados. **A.** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación utilizando los pares de oligonucleótidos indicados (#LR). El DNA se tiñó con GelRed. **B.** Curva de calibración de tamaño de los microsatélites obtenida a partir de marcadores de peso molecular.

Tabla 4. Resumen de los resultados de la amplificación de microsátélites por PCR con los distintos pares de oligonucleótidos. La temperatura de alineamiento durante la amplificación por PCR fue de 56 °C. Los números indican la cantidad de bandas detectadas como producto de amplificación con el par de oligonucleótidos señalado; el número 0 indica que no se obtuvo producto de amplificación bajo estas condiciones; nr: ensayo no realizado.

Localidad	Roca	Individuo	Número de bandas obtenidas por par de oligonucleótidos probado				
			Par de oligonucleótidos				
			16	37	107	116	119
Horcones Temporada 2012- 2013	1	1	1	1	1	nr	nr
		2	1	1	1	nr	nr
		3	1	1	nr	1	1
		4	nr	1	nr	2	1
	2	1	1	1	1	nr	1
		2	1	1	1	nr	1
Las Juntas Temporada 2012- 2013	1	2	nr	0	nr	nr	nr
		3	nr	0	nr	nr	nr
		4	nr	0	nr	nr	nr
Las Juntas Temporada 2013- 2014	1	1	1	nr	1	nr	1
		2	1	nr	1	1	1
B Tomatlán 2014	1	1	1	1	1	3	1
		2	1	1	1	3	1
	3	1	1	1	1	1	1
		2	1	1	1	1	nr
	4	1	1	1	1	3	nr
		2	1	1	1	3	nr
	5	1	1	nr	1	0	1
		2	1	1	1	1	1

Tabla 5. Resumen de los resultados de la amplificación por PCR de microsatélites con los distintos pares de oligonucleótidos probados. La temperatura de alineamiento durante la PCR fue de 53 °C. Los números indican la cantidad de bandas obtenidas como producto de la amplificación utilizando el par de oligonucleótidos señalado; el número 0 indica que no se obtuvo producto de amplificación bajo estas condiciones; nr: ensayo no realizado.

Localidad	Roca	Individuo	Número de bandas obtenidas por par de oligonucleótidos probado	
			29	71
Horcones 2013	1	3	0	0
		4	0	2
	2	1	nr	2
		2	nr	0
Las Juntas Temporada 2013-2014	1	1	1	1
		2	0	1
Boca de Tomatlán	1	1	0	3
		2	0	3
	3	1	1	3
		2	2	2

Utilizando el par de oligonucleótidos 16 (Tabla 4) en la amplificación de gDNA, la banda que se obtuvo fue de 160 pb aproximadamente en todas las muestras, como se puede observar en la figura 3.

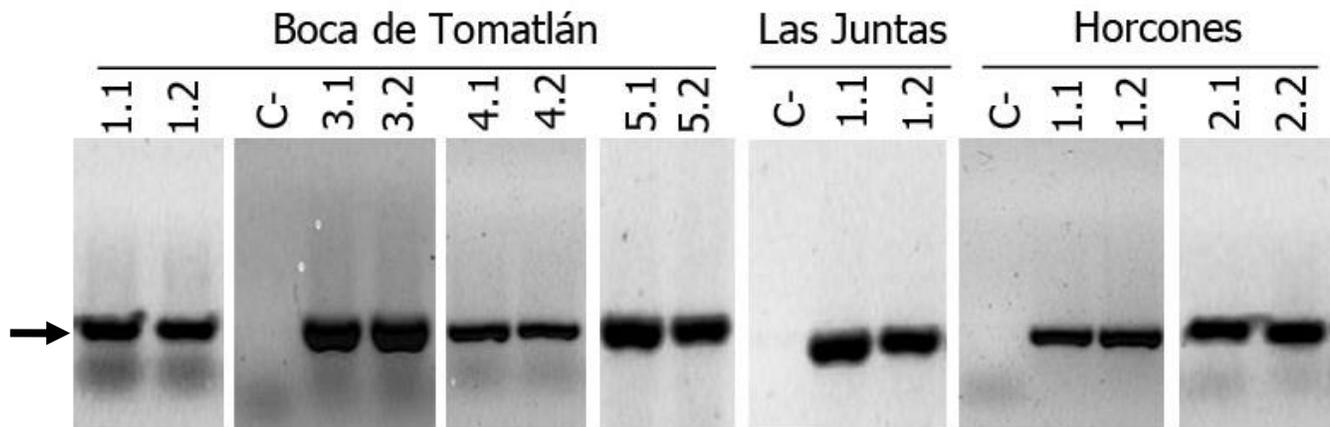


Figura 3. Análisis de la amplificación de microsatélites utilizando el par de oligonucleótidos 16 a partir de gDNA de *M. rubrum*. El análisis se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras analizadas son del río Boca de Tomatlán, río Las Juntas (2013-2014) y río Horcones. El DNA se tiñó con GelRed. La flecha indica las bandas que denotan la ubicación del producto de la amplificación por PCR.

La amplificación con el par de oligonucleótidos 29 (Tabla 5) se muestra en la figura 4. El resultado indica un polimorfismo en una de las poblaciones pues se observa un individuo heterocigo (3.2 de Boca de Tomatlán) con dos bandas como productos de la amplificación, de aproximadamente 95 y 220 pb, mientras que en otro individuo sólo se observa la banda de 220 (3.1 de Boca de Tomatlán). Esto sugiere que el microsatélite correspondiente a este par de oligonucleótidos se podría utilizar para diferenciar homocigos y heterocigos (para el alelo de 95 pb) contribuyendo a un posterior análisis de variabilidad de *M. rubrum*.

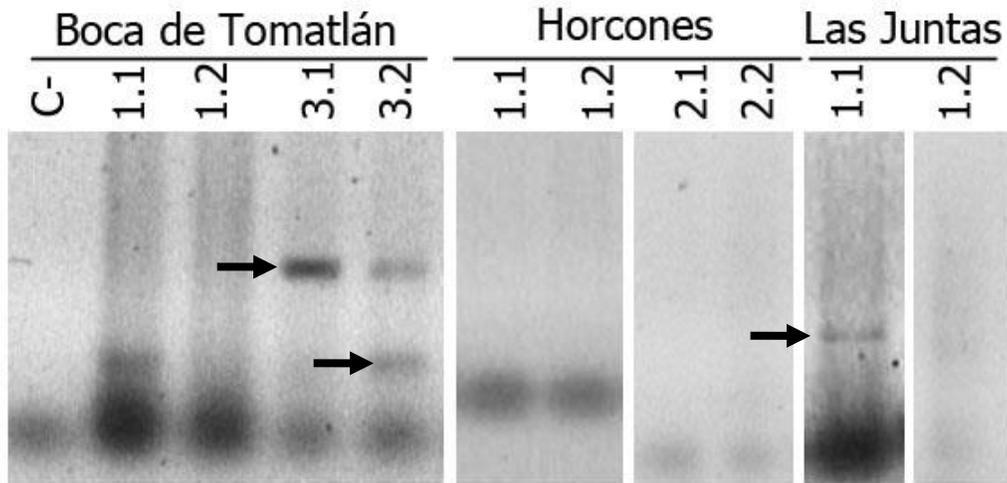


Figura 4. Análisis de la amplificación de microsatélites utilizando el par de oligonucleótidos 29 a partir de gDNA de *M. rubrum*. El análisis se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras analizadas son del río Boca de Tomatlán, río Horcones y río Las Juntas (2013-2014). El DNA se tiñó con GelRed. Las flechas indican las bandas que denotan la ubicación del producto de la amplificación por PCR.

La reacción de PCR realizada con el par de oligonucleótidos 37, resultados resumidos en la tabla 4, resultó en un amplicón de 150 pb aproximadamente, para todas las muestras (Figura 5), de tal manera que este microsatélite no refleja un polimorfismo que sirva para un análisis de variabilidad en *M. rubrum*.

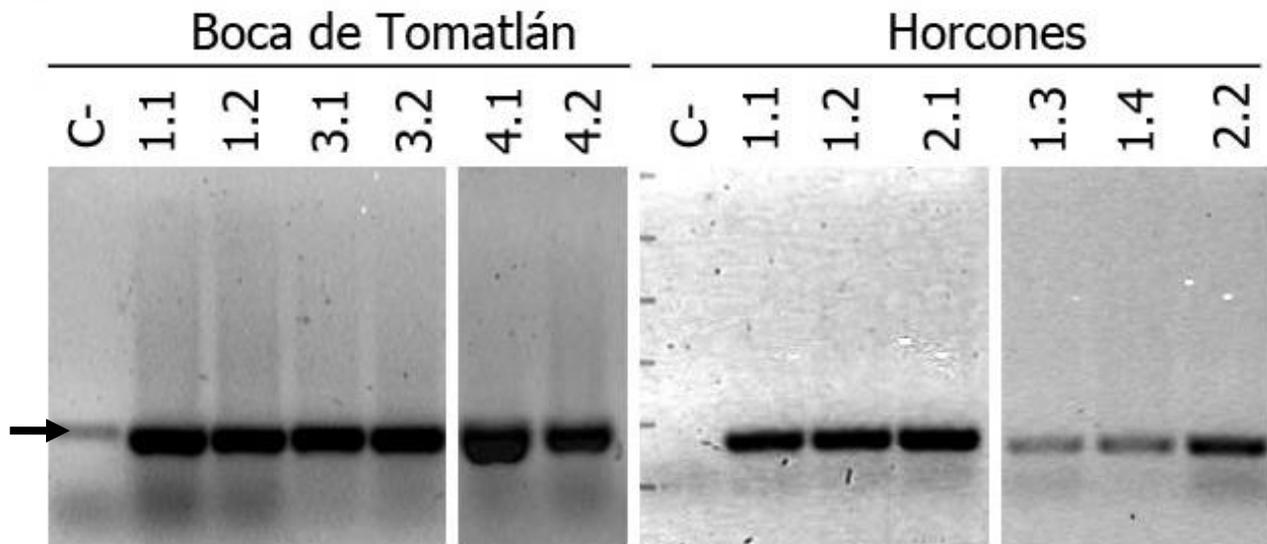


Figura 5. Análisis de la amplificación de microsatélites utilizando el par de oligonucleótidos 37 a partir de gDNA de *M. rubrum*. El análisis se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras analizadas son del río Boca de Tomatlán, río Horcones y río Las Juntas (2012-2013). El DNA se tiñó con GelRed. La flecha indica las bandas que denotan la ubicación del producto de la amplificación por PCR.

Se muestran los resultados de amplificación con el par de oligonucleótidos 71 en la figura 6, resumidos en la tabla 5, en los que se puede observar un grado de polimorfismo intra e interpoblacional. En un individuo se pueden observar tres bandas de aproximadamente 170, 350 y 1200 pb (3.1 de Boca de Tomatlán), en tres individuos las bandas de 350 y de 1200 pb (1.1 y 1.2 de Boca de Tomatlán y 1.4 de Horcones), en uno las bandas de 170 y de 350 pb (3.2 de Boca de Tomatlán), en otro la banda de 350 pb (2.1 de Horcones) y en dos más la banda de 170 pb (1.1 y 1.2 de Las Juntas).

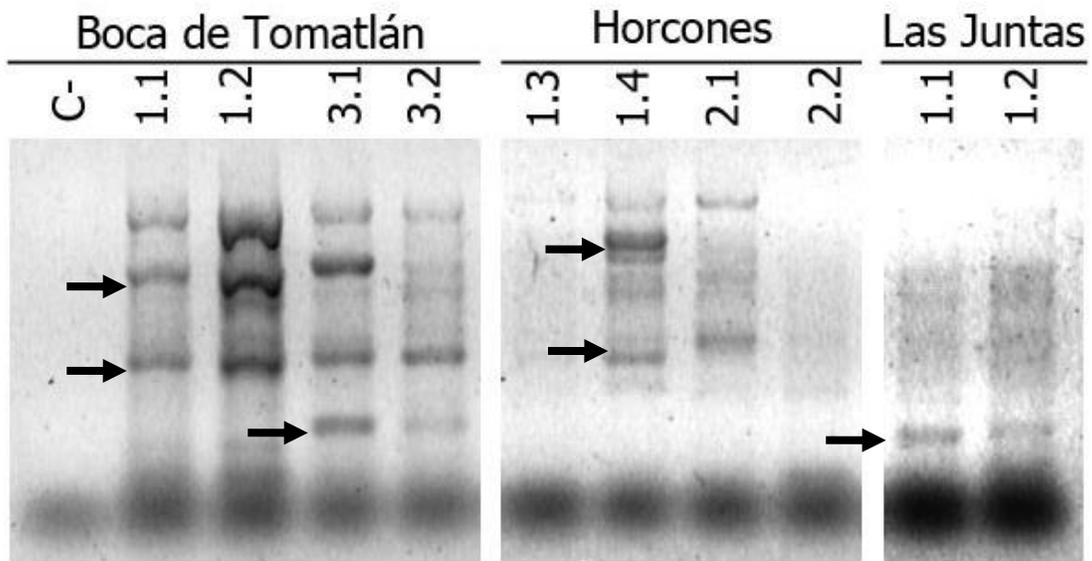


Figura 6. Análisis de la amplificación de microsatélites utilizando el par de oligonucleótidos 71 a partir de gDNA de *M. rubrum*. El análisis se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras analizadas son del río Boca de Tomatlán, río Horcones y río Las Juntas (2014). El DNA se tiñó con GelRed. Las flechas indican las bandas que denotan la ubicación del producto de la amplificación por PCR.

Con el par de oligonucleótidos 107 (Tabla 4) se obtuvo una sola banda de aproximadamente 170 pb de todas las muestras (Figura 7), indicando una homogeneidad entre y dentro de las poblaciones, similarmente a lo observado en las figuras 3 y 5.

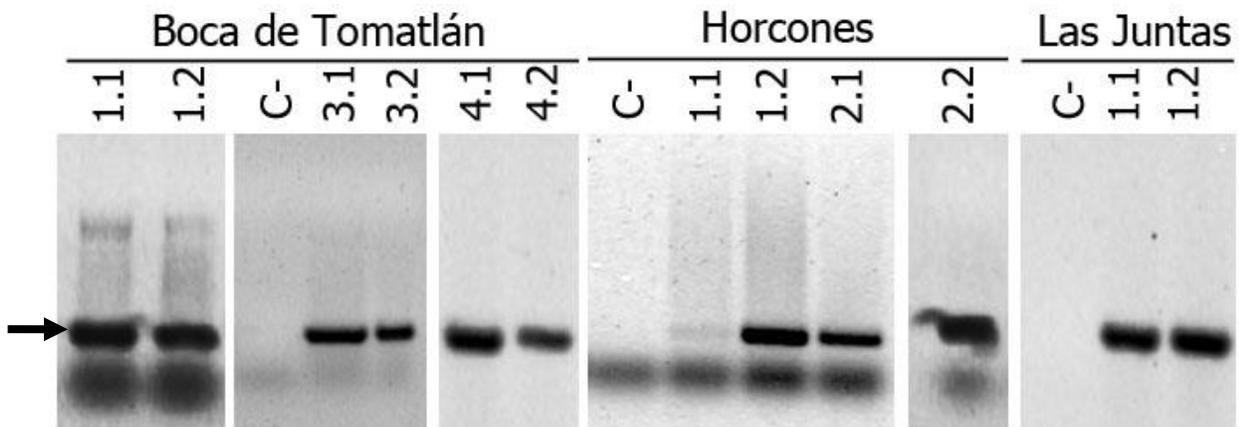


Figura 7. Análisis de la amplificación de microsatélites utilizando el par de oligonucleótidos 107 a partir de gDNA de *M. rubrum*. El análisis se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras analizadas son del río Boca de Tomatlán, río Horcones y río Las Juntas (2014). El DNA se tiñó con GelRed. La flecha indica las bandas que denotan la ubicación del producto de la amplificación por PCR.

Al analizar el par de oligonucleótidos 116 (Figura 8) se obtuvieron bandas que indican polimorfismo dentro y entre las poblaciones, como se resume en la tabla 4. Se observan tres bandas de aproximadamente 160, 370 y 650 pb en cuatro individuos (1.1, 1.2, 4.1 y 4.2 de Boca de Tomatlán) mientras que en los demás sólo se observa la banda de 160 pb, por lo tanto el microsatélite correspondiente a este par de oligonucleótidos también se podría utilizar para un análisis de variabilidad.

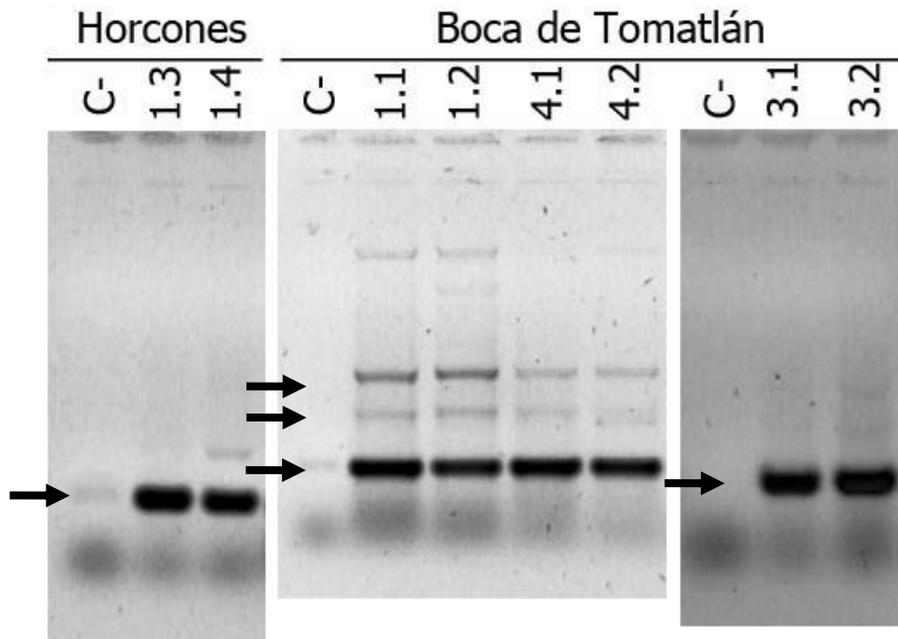


Figura 8. Análisis de la amplificación de microsatélites utilizando el par de oligonucleótidos 116 a partir de gDNA de *M. rubrum*. El análisis se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras analizadas son del río Horcones y del río Boca de Tomatlán. El DNA se tiñó con GelRed. Las flechas indican las bandas que denotan la ubicación del producto de la amplificación por PCR.

Los resultados de los productos de amplificación obtenidos utilizando el par de oligonucleótidos 119, resultados resumidos en la tabla 5, permiten observar una banda única de 150 pb aproximadamente para todos los individuos (Figura 9).

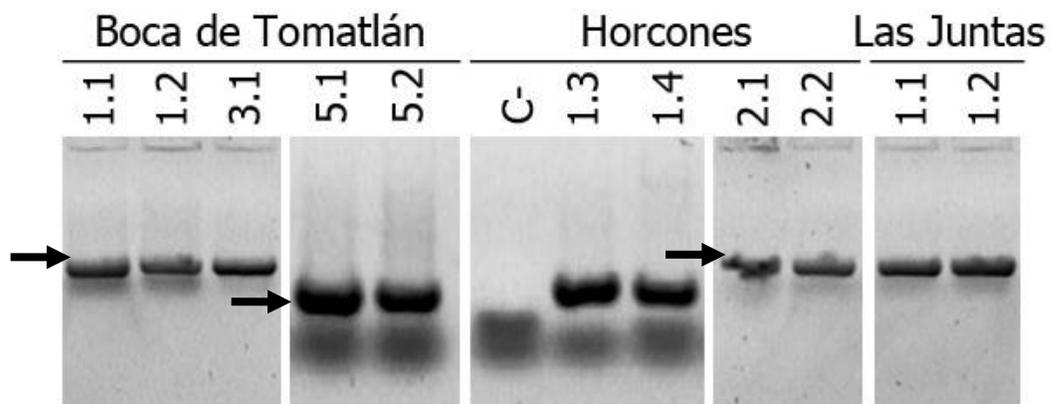


Figura 9. Análisis de la amplificación de microsatélites utilizando el par de oligonucleótidos 119 a partir de gDNA de *M. rubrum*. El análisis se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras analizadas son del río Boca de Tomatlán, río Horcones y río Las Juntas (2014). El DNA se tiñó con GelRed. Las flechas indican las bandas que denotan la ubicación del producto de la amplificación por PCR.

DISCUSIÓN

El método de purificación de gDNA elegido (Cortés-Palomec y McCauley, 2009) dio buenos resultados en cuanto a su rendimiento y la presencia del gDNA. El gDNA purificado mostró un patrón íntegro en los análisis por electroforesis (Figura 1).

Para el río Las Juntas se procesaron tanto muestras de la temporada 2012-2013 como de la temporada 2013-2014, lo que se puede observar en la figura 1, asimismo se observa que el gDNA de las muestras de la temporada 2012-2013 no ofreció resultados positivos en los ensayos de amplificación (Tabla 4). Ésto seguramente se debió a que las condiciones de almacenaje del material biológico no fueron las adecuadas, facilitando que el gDNA se dañara físicamente o por contaminación (e.g. por organismos como hongos) y, por lo tanto, que no ofreciera la calidad necesaria para una amplificación por PCR. Para evitar estos daños a las muestras de material vegetal éste debió haberse almacenado en ausencia de humedad, para evitar que esta condición promueva el daño del gDNA.

En los casos en los que no se obtuvo producto de amplificación (i.e. pruebas con los pares de oligonucleótidos 29, 71 y 116 resumidas en tablas 4 y 5) los motivos podrían ser: (1) el individuo del que se obtuvo la muestra analizada no contaba con el *locus* buscado; (2) el gDNA estaba dañado por alguna condición ambiental, de manera que el *locus* que se busca amplificar estuviera físicamente dañado. En el segundo caso el daño debió haber sido profundo, ya que Selkoe y Toonen (2006) reportan que en términos generales un gDNA molde con leve grado de degradación puede ser utilizado para amplificar microsatélites.

Se consiguió la optimización de las condiciones de amplificación por PCR de 7 de los 9 pares de oligonucleótidos diseñados previamente por Luna (datos sin publicar); sólo se trabajó con estos 7 ya que no se contaba con los pares de oligonucleótidos restantes (pares 61 y 118) en el laboratorio.

Las condiciones de amplificación recomendadas no resultaron ser las más apropiadas para todos los microsatélites pues las temperaturas de alineamiento ideales (Tabla 3) difirieron de las recomendadas por Luna (sin publicar). Para los pares de oligonucleótidos 37 y 119 la temperatura de alineamiento recomendada era 56°C y fue esta la que ofreció los mejores resultados de amplificación. Por otro lado, para los pares de oligonucleótidos 16, 107 y 116 se recomendaba una temperatura de alineamiento de 53°C, pero ofrecieron mejores resultados de amplificación con una temperatura de 56°C. La amplificación de los pares de oligonucleótidos 29 y 71 se llevó a cabo ofreciendo buenos resultados con la temperatura de alineamiento recomendada de 53°C según lo mostrado en la.

Al utilizarse el par de oligonucleótidos 29 para las amplificaciones se obtuvo más de un amplicón en algunos individuos, esto sugiere la existencia de al menos dos alelos del microsatélite amplificado. Por esta condición es que se pudieron observar individuos homocigotos (para el amplicón de aproximadamente 220 pb y el de 95 pb) y un individuo heterocigoto (Figura 4). También se encontró un alto polimorfismo en el microsatélite amplificado con el par de oligonucleótidos 71, en la figura 6 se puede observar que hay al menos tres alelos del microsatélite amplificado. En un individuo se observan tres amplicones de aproximadamente 170, 350 y 1200 pb, tres individuos denotan los de 350 y de 1200 pb, un individuo

los de 170 y de 350 pb, otro individuo el de 350 pb y dos más el de 170 pb. Al analizarse los resultados de las amplificaciones en que se utilizó el par de oligonucleótidos 116 también se encontró polimorfismo; como se observa en la figura 8 las bandas observadas sugieren al menos tres alelos del microsatélite amplificado. En cuatro individuos se detectaron tres bandas (aproximadamente 160, 370 y 650 pb) y en cuatro individuos más se observó un solo amplicón (de aproximadamente 160 pb),

Para los tres pares de oligonucleótidos discutidos anteriormente (29, 71 y 116) se puede observar una alta variabilidad entre los resultados de amplificación. Esta variabilidad en la cantidad de amplicones sugiere que cada uno de los microsatélites amplificados presenta varios alelos, dos para el microsatélite que corresponde al par de oligonucleótidos 29, tres para el que corresponde al par de oligonucleótidos 71 y tres para el amplificado con el par de oligonucleótidos 116 (Figuras 4, 6 y 8, respectivamente).

Los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de amplicones sugieren la posibilidad de contar con individuos poliploides en *M. rubrum*, lo cual no es un fenómeno extraño en plantas (Raven *et al*, 2005).

La identificación de microsatélites con múltiples alelos es muy conveniente, pues se ha reportado que los microsatélites con múltiples alelos ofrecen mejores resultados en la identificación y por ello son los que se prefieren para el análisis de variabilidad genética (Woodhead *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008). Y aunque para hacer estudios interpoblacionales se recomienda el uso de múltiples

microsatélites, unos pocos *locus*, como los ya mencionados, pueden utilizarse para establecer relaciones genealógicas o conocer estructura clonal de una población (Díaz-Viloria *et al.*, 2013; Pearse y Crandall, 2004; Selkoe y Toonen, 2006). Estos resultados recalcan la importancia de la fineza de identificación que permiten los microsatélites como marcadores moleculares (Morillo *et al.*, 2009; Rajeev *et al.*, 2005).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden hacer algunas observaciones preliminares sobre la variabilidad de las tres poblaciones analizadas. Con base en la presencia de alelos de cada microsatélite, se identificaron distintos genotipos entre individuos de la misma roca; esto se puede notar para el par de oligonucleótidos 116 en la roca 1 del Río Horcones (Figura 8), para el par de oligonucleótidos 29 en la roca 1 del Río Las Juntas y 3 del Río Boca de Tomatlán (Figura 4), y para el par de oligonucleótidos 71 en las rocas 1 y 2 del Río Horcones y roca 3 del Río Boca de Tomatlán (Figura 6). Otra observación preliminar que podría estudiarse a mayor profundidad es que el río con mayor diversidad genética para los microsatélites estudiados es el Río Boca de Tomatlán, para el que se observaron con microsatélites con uno, con dos y con tres alelos (Tablas 4 y 5).

Para proceder con el análisis de estos microsatélites se podrían realizar los análisis estadísticos correspondientes para conocer valores como su heterocigosidad (Nei, 1973; Wright, 1978). También sería conveniente realizar un análisis de la secuencia de los microsatélites amplificados. Por último, al llevar a cabo amplificaciones trans-específicas se podría encontrar que estos

microsatélites puedan utilizarse para la identificación y estudio de otras especies (Woodhead *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Debido a que la purificación del gDNA a partir de muestras de tejido vegetativo de *M. rubrum* fue exitosa, se pudo proseguir con el análisis de los microsatélites.

Se recomienda asegurarse de almacenar el material vegetal completamente seco ya que a humedad promueve la contaminación por otros organismos y la degradación del gDNA de las muestras, como se pudo observar en este trabajo.

Se logró optimizar la amplificación de siete microsatélites (Figuras 3 a 9) encontrando que la temperatura de alineamiento ideal para los pares de oligonucleótidos era distinta a la calculada por Luna (sin publicar). Para los pares de oligonucleótidos 16, 37, 107, 116 y 119 fue de 56°C (Tabla 4), mientras que para los pares de oligonucleótidos 29 y 71 fue de 53°C (Tabla 5). Estos resultados no corresponden a lo reportado por Luna (sin publicar).

En los microsatélites amplificados con los pares de oligonucleótidos 29, 71 y 116 se observa polimorfismo en cuanto a la cantidad de alelos. El par de oligonucleótidos 29 amplificó al menos dos alelos, lo que permitió identificar individuos homocigotos (para cada uno de los dos alelos) así como individuos heterocigotos (Figura 4); al amplificar el par de oligonucleótidos 71 se obtuvieron al menos tres alelos y se observaron individuos con distintas combinaciones de estos (Figura 6); y por último, con el par de oligonucleótidos 116 se observaron individuos con tres alelos e individuos con uno solo (Figura 8).

La multiplicidad de alelos obtenidos con algunos pares de oligonucleótidos refuerza la posibilidad de contar con individuos poliploides en *M. rubrum*.

Debido a los polimorfismos observados a partir de la amplificación de los pares de oligonucleótidos 29, 71 y 116 se recomienda el uso de éstos para análisis posteriores de variabilidad intra e interespecífica de las tres poblaciones de *M. rubrum* estudiadas.

La decisión de hacer uso de microsatélites como marcadores moleculares se basó en la resolución de identificación buscada, en ese sentido las variaciones encontradas en distintos microsatélites este trabajo son de suma relevancia pues permiten una aproximación al conocimiento de la variabilidad de la especie.

Es importante destacar que se puede profundizar significativamente en el análisis de los microsatélites utilizados, para su posterior uso en la evaluación de la variabilidad de la especie. Este análisis podría consistir en los procedimientos comunes para el análisis de microsatélites, es decir, análisis de su secuencia, obtención de índices estadísticos y ensayos amplificación trans-específica, por nombrar algunos.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se presenta una poderosa herramienta para el estudio de la variabilidad de *M. rubrum*. Posteriores análisis de los microsatélites obtenidos para esta especie ayudarán a profundizar la comprensión de la biología de la reproducción, distribución y genética de esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed I., M. Islam, W. Arshad, A. Mannan, W. Ahmad y B. Mirza. 2009. High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. *Journal of Applied Genetics* 50 (2): 105-107
- Akkaya M. S., A. A. Bhagwat y P. B. Cregan. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131–1139
- CBOL Plant Working Group: P. M. Hollingsworth, L. L. Forrest, J. L. Spouge, M. Hajibabaei, S. Ratnasingham, M. van der Bank, M. W. Chase, R. S. Cowan, D. L. Erickson, A. J. Fazekas, S. W. Graham, K. E. James, K.-J. Kim, W. J. Kress, H. Schneider, J. van AlphenStahl, S. C. H. Barrett, C. van den Berg, D. Bogarin, K. S. Burgess, K. M. Cameron, M. Carine, J. Chacón, A. Clark, J. J. Clarkson, F. Conrad, D. S. Devey, C. S. Ford, T. A. J. Hedderson, M. L. Hollingsworth, B. C. Husband, L. J. Kelly, P. R. Kesanakurti, J. S. Kim, Y.-D. Kim, R. Lahaye, H.-L. Lee, D. G. Long, S. Madriñán, O. Maurin, I. Meusnier, S. G. Newmaster, C.-W. Park, D. M. Percy, G. Petersen, J. E. Richardson, G. A. Salazar, V. Savolainen, O. Seberg, M. J. Wilkinson, D.-K. Yi y D. P. Little. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (31): 12794-12797
- Cook C.D.K. y R. Rutishauser. 2007. Podostemaceae, en: Kubitzki K. (ed.), The families and genera of vascular plants, vol. 9. *Springer*. Alemania. p: 304–344
- Cortés Palomec A. y R. McCauley. 2009. CTAB/Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol. En: *Curso de Introducción a la Ecología Molecular en Plantas*, del 25 de de junio al 3 de julio del 2009, Facultad de Ciencias UNAM, México.
- Díaz-Viloria N., R. Pérez-Enríquez, P. Cruz-Hernández y D. Aguilar-Osuna. 2013. Herencia mendeliana en microsatélites de abulón amarillo *Haliotis corrugata*. *Interciencia* 38(6): 455-460
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. *Nature Reviews* 5: 435-445
- Ellstrand N.C. y M. J. Roose. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* 74: 123-131
- Fazekas A.J., K.S. Burgess, P.R. Kesanakurti, S.W. Graham , S.G. Newmaster, B.C. Husband, D.M. Percy, M. Hajibabaei y S.C.H. Barrett, S.C.H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3 (7): e2802

- Glenn T.C. y N. A. Schable. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* 395: 202–222
- Gutiérrez-Aguilar R., Y. Benmezroua, E. Vaillant, B. Balkau, M. Marre, G. Charpentier, R. Sladek, P. Froguel y B. Neve. 2007. Analysis of KLF transcription factor family gene variants in type 2 diabetes. *BMC Medical Genetics* 8 (53)
- Hebert P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball y J.R. deWaard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the royal society of London, Series B, Biological sciences* 270: 313–321
- Instituto de Biotecnología, UNAM. 2016. Temperatura de fusión de oligonucleótidos. Página en red: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/tm.html>. Consultada 15 febrero 2016
- Jäger-Zürn I. y M. Grubert. 2000. Podostemaceae Depend on Sticky Biofilms with Respect to Attachment to Rocks in Waterfalls. *International Journal of Plant Sciences* 161 (4): 599-607
- Jarne P. y P. J. L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* 11: 424-429
- Jiménez A. 2010. Microsatellites: A Powerful Genetic Marker for Fern Research. En: Fernández H., A. Kumar y M. A. Revilla. Working with Ferns: Issues and Applications. *Springer*. Estados Unidos. p: 207-220
- Karp G. 2010. Cell and Molecular Biology, Concepts and experiments. 6a ed. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos. p: 837
- Katayama N., S. Koi y M. Kato. 2008. Developmental anatomy of the reproductive shootin *Hydrobryum japonicum* (Podostemaceae). *Journal of Plant Research* 121: 417-424
- Kelly L. J., G. K. Ameka y M. W. Chase. 2010. DNA barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): A test of proposed barcode regions. *Taxon* 59 (1): 251–260
- Khanduri P., R. Tandon, P. L. Uniyal, V. Bhat y A. K. Pandey. 2014. Comparative morphology and molecular systematics of Indian Podostemaceae. *Plant Systematics and Evolution* 301: 861–882
- Luna R., D. Guzmán-Merodio, J. Núñez-Farfán, C.T. Philbrick, M. Collazo-Ortega y J. Márquez-Guzmán. 2012. Cross compatibility between *Marathrum rubrum* and *Marathrum schiedeanum* (Podostemaceae), two closely related species of the Pacific Mexican Coast. *Aquatic Botany* 102: 1– 7

- Morillo, A. C., Y. Morillo, Y. Chagüeza, A. Caicedo, J. Jaramillo, O. J. Muñoz, A. Lucía, H. D. Vásquez y J. E. Muñoz. 2009. Caracterización de la diversidad genética en naranja y comparación del polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAMs) usando electroforesis de poliacrilamida y agarosa. *Acta agronómica* 58 (4): 234-244
- Nei, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 70: 3321-3326
- Novelo A., C. T. Philbrick y G. E. Crow. 2009. Podostemaceae. Flora Mesoamericana, vol. 3. Página en red: <http://www.tropicos.org/docs/meso/podostemaceae.pdf> Consultada febrero 20 2016
- Pearse D. E. y K. A. Crandall. 2004. Beyond FST: analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5: 585–602
- Philbrick C. T. y A. Novelo. 1995. New World Podostemaceae: ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia* 47: 210–222
- Philbrick C. T. y A. Novelo. 1998. Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* 62: 199-206.
- Philbrick C. T., C. P. Bove y H. I. Stevens. 2010. Endemism in Neotropical Podostemaceae. *Annals of the Missouri Botanic Garden* 97 (3): 425–456
- Powell W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey y Antoni Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238
- Raven P. H., S. E. Eichorn y R. F. Evert. 2005. Biology of plants 7a ed. W. H. Freeman & Company Publishers. Nueva York. p: 686
- Rajeev K. V., A. Graner y M. E. Sorrell. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23(1): 48-55
- Rutishauser R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquatic Botany* 57(1): 29-70
- Saidman, B. O.; C. F. Bessega, L. Ferreyra, N. Julio y J. C. Vilardo. 2000. Estudios evolutivos y poblacionales en el genero *Prosopis* utilizando marcadores bioquímicos y moleculares. *Multequina* 9(2): 81-93
- Selkoe K. A. y R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615–629

- Sneath, P. H. y R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. *W.H. Freeman & Co.* San Francisco. p: 573
- Tautz D. y M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127–4138
- Tippery N. P., C. T. Philbrick, C. P. Bove y D. H. Les. 2011. Systematics and Phylogeny of Neotropical Riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae) *Systematic Botany* 36 (1): 105–118
- Ueda K., T. Hanyuda, A. Nakano, T. Shiuch, A. Seo, H. Okubo y M. Hotta. 1997. Molecular Phylogenetic Position of Podostemaceae, a Marvelous Aquatic Flowering Plant Family. *Journal of Plant Research* 110: 87-92
- Vos, P., M. Hogers, M. Bleeker, M. Rijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414
- Widén B., N. Cronberg y M. Widén. 1994. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 29 (2): 245-263
- Woodhead M., J. Russell, J. Squirrell, P. M. Hollingsworth, L. Cardle, L. Ramsay, M. Gibby y W. Powell. 2003. Development of EST-SSRs from the alpine lady fern, *Athyrium distentifolium*. *Molecular Ecology Notes* 3:287–290.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations. *University of Chicago Press* 4: 335
- Zane L., L. Bargenlloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16
- Zhao L., Z. Liu, L. Chen, M. Yao y X. Wang. 2008. Generation and characterization of 24 novel EST derived microsatellites from tea plant (*Camellia sinensis*) and cross-species amplification in its closely related species and varieties. *Conservation Genetics* 9:1327–1331