
MARCADORES MOLECULARES PARA LOS ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA VARIACIÓN EN ECOLOGÍA Y SISTEMÁTICA

DOLORES GONZÁLEZ

Sistemática Vegetal, Instituto de Ecología, A. C.
Apartado Postal 63, Xalapa, Ver. 91000, México.

ABSTRACT

MOLECULAR MARKERS FOR COMPARATIVE STUDIES OF VARIATION IN ECOLOGY AND SYSTEMATICS. *Rev. Mex. Mic.* 14: 1-21 (1998). Variation in the organisms comes as consequence of ontogenetic, environmental or genetic changes. Polymorphism is the discontinuous genetic variation associated with non-sexual processes. Polymorphism may or may not be conspicuous and results from changes in the DNA due mutations or recombination. Variation at the individual, population or species level allows to find inherited attributes (morphological or molecular) that show if the variants under study belong or not to the same organism, population or species. The presence of these shared attributes distinguishes the ontogenetic, population or historical individuality. This manuscript describes molecular markers used to sample variation within and among populations for ecological or systematic studies. Methods to obtain markers from proteins are reviewed first, followed by those from nucleic acids. Some of these molecular markers are: immunological essays, isozyme electrophoresis, restriction fragment length polymorphisms, random amplified polymorphic DNAs, mini and microsatellites, single strand conformation polymorphism and DNA sequencing. Available molecular markers have helped solve diverse ecological and systematic problems, like: parentage, diversity, hybridization, geographic variation, speciation and phylogeny, among others. These markers can be explored in any gene or gene product from any organism.

Key words: molecular markers, proteins, DNA, polymorphism, ecology, systematics.

RESUMEN

La variación en los organismos puede deberse a cambios durante el desarrollo, por el ambiente y genéticos. Se denomina polimorfismo a la variación discontinua y de base genética asociada a procesos no sexuales. El polimorfismo puede ser conspicuo o no y es consecuencia de alteraciones en el ADN debidas a mutaciones o a la recombinación. La variación al nivel individual, poblacional ó específico hace posible encontrar atributos heredables (morfológicos o moleculares) que permiten inferir si los variantes bajo estudio pertenecen o no al mismo organismo, población o especie. La presencia compartida de esos atributos marca la individualidad ontogenética, poblacional o histórica. En este trabajo se describen los marcadores moleculares utilizados para el muestreo de la variación dentro y entre poblaciones en estudios ecológicos y sistemáticos. Se describen primero los métodos para obtener marcadores de proteínas y posteriormente de ácidos nucleicos. Algunos de estos marcadores son: ensayos inmunológicos, electroforesis de isoenzimas, fragmentos de restricción de longitud polimórfica, polimorfismo del ADN amplificado al azar, mini y microsatélites, conformación polimórfica de cadena sencilla y secuenciación de ADN. Los marcadores moleculares han ayudado a resolver diversos problemas ecológicos y sistemáticos, como: paternidad, diversidad, hibridación, variación geográfica, especiación y filogenias, entre otros. Estos marcadores se pueden explorar en cualquier gen o producto genico de cualquier organismo.

Palabras clave: Marcadores moleculares, proteínas, ADN, polimorfismo, ecología, sistemática.

Introducción

La variación en cualquier sistema de características (morfológicas o moleculares) puede reflejar una combinación de los factores ecológicos, genéticos e históricos. Al nivel individual, la variación incluye la observada durante la ontogenia hasta la madurez sexual, entre clases de edades o sexos e inclusive como respuesta a cambios durante distintas estaciones del año (Mayr, 1969; Roth, 1989; Smith, 1990). La variación al nivel de poblaciones se debe a diferencias en los hábitats, a diferencias sociales (castas), a transformaciones climáticas temporales, e inclusive a respuestas en los cambios de la densidad o estructura demográfica de la población, entre otros (Mayr, 1969; Wright, 1978). Un componente importante de la variación es la que se debe primariamente, a diferencias en la constitución genética intrapoblacional (Mayr, 1969; Oyama, 1996). Esta variación inducida genéticamente puede estar asociada a procesos sexuales, como las características asociadas al dimorfismo sexual y a la alternancia de generaciones, o estar asociada a procesos no sexuales como la variación continua y la discontinua (Mayr, 1969). La variación genética entre individuos, poblaciones y especies asociada a procesos no sexuales, por lo general, es continua (pequeña y gradual). Sin embargo, algunas características (morfológicas y moleculares) varían de manera discontinua. Esta variación discreta se denomina polimorfismo y se infiere que está controlado por un sistema genético particular (Mayr, 1969). Originalmente el polimorfismo se definió como "polifases" genéticas que dependen de dos o más alelos (Ford, 1940 *in*: Wright, 1978). Actualmente, el término se refiere primordialmente a dos o más clases genéticas diferentes en una misma población, por ejemplo el polimorfismo cromosómico. En una población, el polimorfismo puede ser transitorio cuando una determinada mutación está en el proceso de fijación o balanceado cuando la proporción de las distintas clases permanece igual por muchas generaciones. Además, si las distintas clases genéticas se localizan en distintas regiones, esta variación discontinua se conoce como polimorfismo geográfico (King & Stansfield, 1985).

El polimorfismo surge como consecuencia de alteraciones en el ADN, ya sea al nivel de nucleótidos (substitución de una base por otra), al nivel de segmentos de ADN (delección, adición, inversión y transferencia de ADN de una posición a

otra) o como consecuencia de la recombinación (Hoelzel & Dover, 1991). Además, puede ser conspicuo o no (Wright, 1978). La existencia de polimorfismo en las poblaciones tiene gran importancia para el estudio de varios procesos biológicos (adaptación, especiación, conservación, etc.) en la ecología evolutiva y sistemática. Por ejemplo, gracias a que existe variación a escala individual, poblacional y específica, es posible encontrar atributos heredables que hacen posible inferir si los semaforontes o variantes bajo examen pertenecen o no al mismo organismo, a la misma población o a la misma especie. La individualidad de estas tres entidades no siempre es tan evidente y obvia, especialmente al nivel de poblaciones y especies, por lo que se necesitan marcadores cuya presencia común sea indicadora de conexión ontogenética, genética o histórica. Ciertos marcadores durante la ontogenia, permiten reconocer las formas variables desde el embrión hasta un adulto como un sólo organismo. Otros marcadores a su vez, permiten identificar los individuos como un solo grupo genético. Algunos atributos que reflejan la integración histórica de los linajes también hacen posible reconocer los diferentes grupos genéticos como parte de una sola especie.

Durante la década pasada las estrategias clásicas para detectar polimorfismo como la morfometría, la citología, la genética y la bioquímica, se han complementado con diversas técnicas moleculares. Las técnicas moleculares, incluyen el análisis del polimorfismo de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos). El desarrollo de los llamados marcadores moleculares, ha facilitado, en gran medida, las investigaciones en disciplinas como taxonomía, ecología y genética (Weising *et al.*, 1995). Los marcadores moleculares se detectan a través de una serie de métodos o técnicas que exploran la variación de los organismos al nivel de proteínas o ADN globalmente (Otero *et al.*, 1997) y al nivel de un locus o varios loci en particular (Awise, 1994; Simpson, 1997). La variación se explora a través de las reacciones inmunológicas, la electroforesis de isoenzimas, la secuencia de proteínas, la hibridación de ADN, los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), los mapas génicos, el polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPDs), la huella digital del ADN (VNTRs o fingerprinting), los microsaté-

lites, la conformación polimórfica de cadena sencilla (SSCP), los mapas de sitios de restricción polimórficos en productos de PCR (MRSPs) y la secuencia de ADN entre otros.

Para que un marcador molecular sea útil debe presentar las siguientes propiedades: polimorfismo, codominancia, ser frecuente en el genoma, estar distribuido en todo el genoma y ser selectivamente neutro. Además, ser reproducible, de ensayo rápido y sencillo y de fácil acceso (Weising *et al.*, 1995). Actualmente, no existe algún marcador molecular que satisfaga todos estos criterios. Por lo tanto, para un estudio comparativo de la variación ya sea ecológico o taxonómico, es necesario seleccionar algún marcador que por lo menos combine algunas de estas propiedades.

Una ventaja de usar marcadores moleculares para estudiar la variación con respecto a las estrategias clásicas es que las metodologías para obtenerlos se pueden aplicar a cualquier gen o sus productos génicos y a la genética de cualquier organismo desde microbios hasta ballenas. Además, el grado de la variación que se obtenga va a depender de la tasa de mutación que presente la parte del genoma que se está investigando. También, dependiendo del tipo de marcador que se emplee se pueden obtener distintas coberturas y resoluciones (González, 1997). La cobertura puede ser tan amplia como la que se logra con la hibridación del ADN total, o tan reducida como cuando se explora sólo una sección de un gen particular. La resolución puede ser tan gruesa como obtener un índice de similitud entre dos moléculas o tan fina como cuando se conoce en detalle la secuencia de nucleótidos.

El objetivo de este trabajo es describir los métodos para obtener marcadores moleculares de proteínas y ácidos nucleicos en estudios ecológicos y evolutivos. Ya se han hecho revisiones de algunos de estos marcadores individualmente (Valverde & Paredes-Lopez, 1996; Pérez & Piñero, 1997; Otero *et al.*, 1997; Simpson, 1997; Martínez, 1997). El énfasis de esas revisiones es la descripción del método y sus aplicaciones. Este trabajo pretende actualizar e integrar la información disponible sobre otros nueve marcadores moleculares adicionales que se usan en estudios ecológicos y sistemáticos. El énfasis en esta integración es comparativo ya que se analiza la utilidad de los marcadores en cada nivel de variación (individual, poblacional y específico). En la primera sección se describen los métodos para obtener marcadores moleculares de

proteínas. En la segunda sección se incluyen los procedimientos para obtenerlos del ADN. Entre estos últimos, se describen los que se detectan en el ADN genómico total y los de productos de amplificación de porciones específicas del ADN.

Marcadores moleculares de proteínas

Los primeros procedimientos que se emplearon para la obtención de marcadores moleculares en proteínas fueron las reacciones inmunológicas. A estos le siguieron, la secuencia de aminoácidos de las proteínas y la electroforesis de isoenzimas. Las reacciones inmunológicas consisten en la respuesta inmune de los organismos a macromoléculas extrañas conocidas como antígenos. En este tipo de reacciones se hace uso de proteínas o polisacáridos que son abundantes y fácilmente purificables (Maxon & Maxon, 1990). La secuencia de aminoácidos consiste en la liberación progresiva de los aminoácidos de una proteína y la identificación de cada uno de ellos a través de una cromatografía o electroforesis (Burden & Whitney, 1995). La electroforesis de isoenzimas aprovecha las propiedades eléctricas de las proteínas. Este tipo de electroforesis hace uso de proteínas enzimáticas para las que existen tinciones histoquímicas específicas (Avisé, 1994; Murphy *et al.*, 1996). En esta sección se presenta una descripción breve de cada uno de estos tres métodos.

Ensayos inmunológicos: Los ensayos inmunológicos permiten estimar cualitativa y cuantitativamente las diferencias en los aminoácidos de las proteínas. En estos métodos se obtienen anticuerpos para un antígeno determinado a través de un proceso de inmunización. Estos anticuerpos formados a partir del antígeno de una especie "A" se hacen reaccionar con los antígenos de otras especies (B, C, D, etc.). El grado de respuesta inmunológica que se observa se interpreta como una medida de la similitud genética entre las especies. La reacción cruzada antígeno-anticuerpo de cada par de especies (AB, AC, etc.), se puede medir a través de diversos ensayos que estiman el precipitado antígeno-anticuerpo por ejemplo, precipitación, inmunodifusión, inmunoelectroforesis y radioinmunoensayo (Lowenstein, 1985; Price & Lowenstein 1989; Maxon & Maxon, 1990). Al reaccionar el antígeno con el anticuerpo se forman macromoléculas y éstas precipitan ya que cambian las propiedades de solubilidad. Se infiere que a mayor cantidad de precipitado generado corresponde una

mayor similitud entre las especies comparadas. Estas reacciones inmunológicas se llevan a cabo en diferentes medios: en solución, en difusión sobre agar o en electroforesis sobre acrilamida. La forma de detectar los precipitados también difiere y puede ser con un espectrofotómetro, por medio del número de reacciones o con la incorporación de radiactividad.

La medición más sensible para detectar las uniones antígeno-anticuerpo es la fijación microcomplementaria (Sarich & Wilson, 1966; 1967; Maxon & Maxon, 1986). El complemento es un grupo de proteínas que quedan atrapadas entre las uniones antígeno-anticuerpo. La cantidad de complemento fijado en la reacción es una función de la reactividad cruzada entre el anticuerpo de la especie "B", "C",

"D", etc., y el antígeno de la especie "A". En los ensayos que estiman el precipitado antígeno-anticuerpo, es posible que haya reacción antígeno-anticuerpo aún si el antígeno es ligeramente distinto al anticuerpo. En contraste, en la reacción microcomplementaria los antígenos que tienen un sólo aminoácido distinto no se unen al anticuerpo, por lo que estos últimos son excluidos de la reacción. La fracción de los anticuerpos que se excluyen causa una caída proporcional en la fijación del complemento y por lo tanto a mayor complemento libre mayor diferencia entre especies (Fig. 1). El nivel de complemento que queda sin unir se mide con un espectrofotómetro. Este nivel se monitorea como una función de la concentración de antígeno.

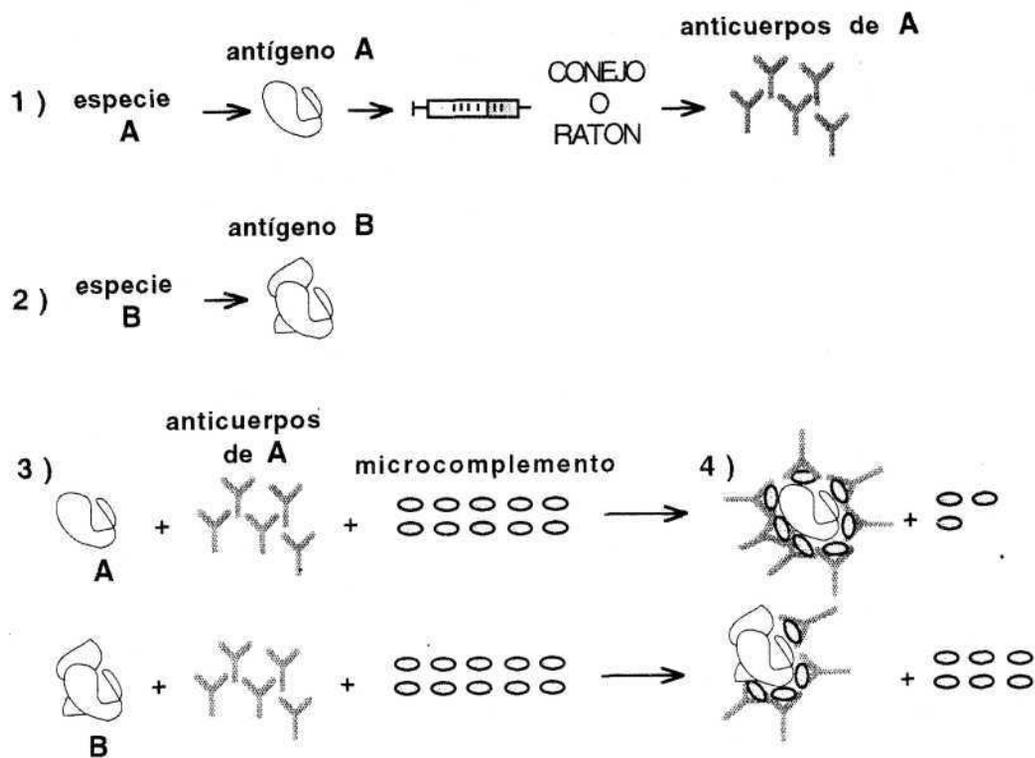


Fig. 1. Comparación inmunológica de proteínas por fijación microcomplementaria. 1) Proceso de inmunización. Un antígeno de la especie A se inyecta a un conejo o ratón. El sistema inmunológico de éste responde produciendo anticuerpos con diferentes grados de afinidad y especificidad a ese antígeno. 2) Se extrae el antígeno de cada especie a comparar con A. 3) Por separado se hacen reaccionar los antígenos de cada especie (A a la Z) con los anticuerpos de A y el microcomplemento. 4) En cada reacción se mide la cantidad de complemento fijado.

Secuencia de aminoácidos: El procedimiento más común para secuenciar una proteína es el conocido como "Edman", usado en la mayoría de los instrumentos disponibles comercialmente. Este método requiere de proteínas altamente purificadas las cuales son sometidas a una reacción química para modificar sus aminoácidos. Los aminoácidos ya modificados se separan progresivamente de la cadena polipeptídica para posteriormente identificarlos a través de una electroforesis o una cromatografía en fase reversa (Burden & Whitney, 1995). La técnica Edman está limitada a secuenciar sólo pequeñas cadenas polipeptídicas de hasta 40 aminoácidos. Para conocer la secuencia completa de una proteína (comúnmente de varias centenas de aminoácidos), primero se fragmenta química o enzimáticamente. Esto genera pequeños polipéptidos los cuales se separan por cromatografía o electroforesis. En un secuenciador de proteínas se determina la secuencia de aminoácidos de cada uno de los pequeños polipéptidos individuales y posteriormente se reconstruye la secuencia completa de aminoácidos de la proteína (Burden & Whitney, 1995).

Un procedimiento más práctico y conveniente es el de analizar con el método Edman sólo la secuencia terminal del grupo amino de la proteína. La información generada se utiliza para sintetizar "primers" (iniciadores) que a su vez permiten localizar el gen que codifica para esa proteína. Se sigue esta estrategia debido a que actualmente es más sencillo secuenciar las bases del ADN que los aminoácidos de una proteína. Por lo tanto, es mejor encontrar el gen que codifica para la proteína y entonces clonar y secuenciar el gene a fin de determinar indirectamente la secuencia de toda la proteína. Aunque, la secuencia de nucleótidos del gen no refleja necesariamente las modificaciones que puede sufrir una proteína después de la traducción (Burden & Whitney, 1995).

Electroforesis de isoenzimas: Las propiedades eléctricas de las proteínas permiten estimar diferencias en su movilidad sobre una matriz electroforética. Cada uno de los 20 aminoácidos tiene una cadena lateral caracterizada por su forma, tamaño y carga positiva o negativa. Estas cadenas laterales son las principales responsables de la carga total y del movimiento de una proteína a través del gel durante una electroforesis. Este método se realiza con varias proteínas enzimáticas para las que existen tin-

ciones histoquímicas específicas (May, 1992; Murphy *et al.*, 1996).

El paso inicial es el aislamiento de las proteínas. El aislamiento consiste en romper física o químicamente, el tejido biológico con el fin de liberar la proteína hacia un extracto. El proceso de ruptura puede ser suave como en la lisis celular o severo como en la ultrasonificación. Esto depende del tipo de célula o tejido donde se encuentre la proteína de interés. Las proteínas son susceptibles a desnaturalizarse cuando se liberan de su ambiente natural. Por lo tanto, el siguiente paso es solubilizarlas en un amortiguador apropiado que les provea un ambiente estable para que mantengan su integridad biológica y química. Para asegurar la solubilidad completa y la estabilidad de la proteína se deben tomar en cuenta algunos factores como el pH, la concentración de iones y la temperatura del amortiguador.

El tercer paso es someter el extracto de las proteínas a una electroforesis. Esta requiere de una fuente de corriente eléctrica, una matriz de soporte y un amortiguador iónico. Las proteínas que tienen carga positiva (cationes) migran hacia el cátodo y las proteínas cargadas negativamente (aniones) migran hacia el ánodo. Las proteínas se visualizan con una tinción específica o por fluorescencia con luz ultravioleta. En la tinción específica, un colorante se une al sustrato de una proteína particular, por lo que, de entre los cientos de proteínas diferentes de la extracción sólo se visualizan las que se unen a ese sustrato (Fig. 2).

Marcadores moleculares de ADN

Al nivel de los ácidos nucleicos, la hibridación del ADN fue uno de los primeros marcadores para detectar variación en las poblaciones (Britten *et al.*, 1978). A esto siguió el uso de los RFLPs, los mapas génicos y las secuencias. Con la introducción reciente de la RCP (reacción en cadena de la polimerasa [PCR en inglés]) ha habido una explosión en la diversidad de marcadores moleculares que se aplican en muchas áreas de la Biología (Mullis & Faloona, 1987; Ochman *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1988; Innis *et al.*, 1990; White, 1993; Griffin & Griffin, 1994; Mullis *et al.*, 1994). Algunos de ellos se desarrollaron con propósitos muy específicos, por ejemplo para diagnóstico clínico o mutagénesis (Bain & Todd, 1993; Mahbubani & Bej, 1994; Tao & Lee, 1994). Sin embargo, hay otros marcadores usados para detectar

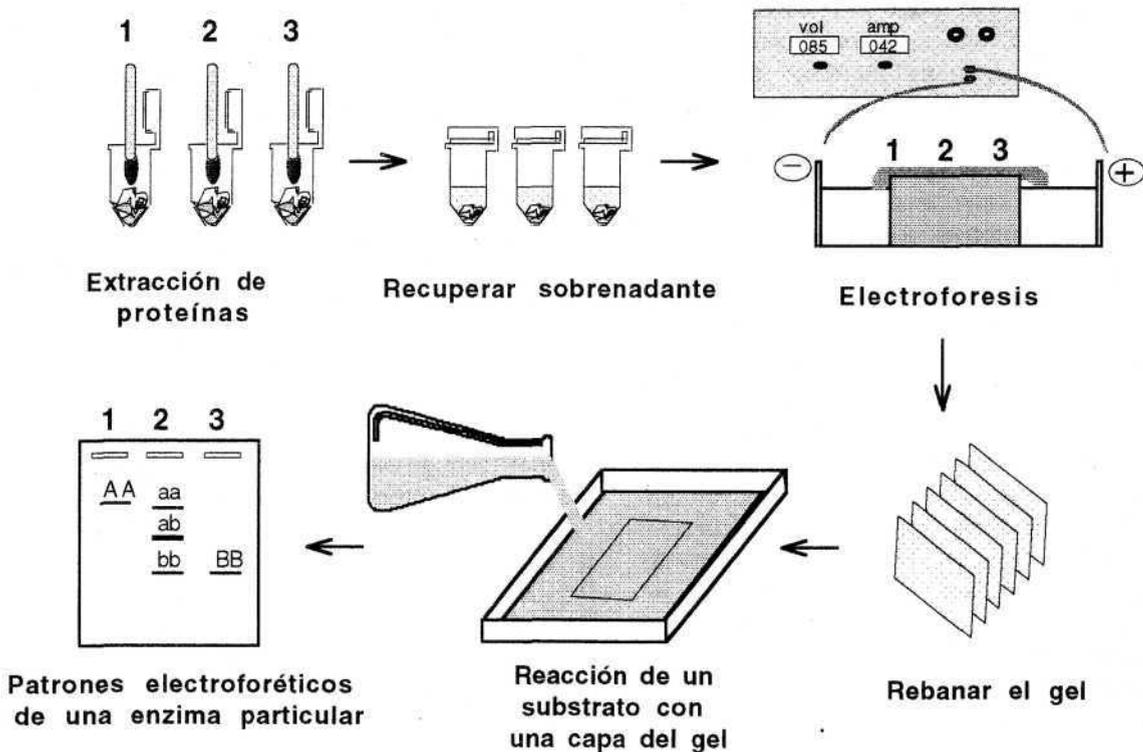


Fig. 2. Electroforesis de isoenzimas. El tejido de las especies a comparar (1, 2, 3) se homogeneiza y se centrifuga para recuperar el sobrenadante. Las proteínas disueltas en el sobrenadante se colocan en un gel de almidón y se exponen a un campo eléctrico. Al concluir la electroforesis, el gel se rebanar cuantas veces sea posible. Cada una de las rebanadas se hace reaccionar con un sustrato específico para diferentes enzimas. Los patrones electroforéticos de la enzima se visualizan con un colorante o si el sustrato es fluorescente entonces se aplica luz ultravioleta.

variación molecular que son de uso más general y que se emplean comúnmente para detectar variación al nivel de individuos, poblaciones o especies. Algunos de ellos son tan sensibles que permiten detectar mutaciones puntuales hasta de una sola base, por ejemplo, los microsatélites, la conformación polimórfica de cadena sencilla (SSCP) o la secuenciación de ADN.

Las metodologías de aislamiento del ADN difieren dependiendo de la fuente ya sea de animales, vegetales o microorganismos (Sambrook *et al.*, 1989; Croy, 1994; Burden & Whitney, 1995; Ferraris & Palumbi, 1996). En general, estos procedimientos involucran coleccionar células o tejidos, romper las paredes y/o membranas celulares con enzimas y/o detergentes, separar los ácidos nucleicos de otras biomoléculas y restos de tejido y finalmente concentrar y/o secar el ADN. Después de aislado, el ADN necesita purificarse

para separar un genoma de otro (mitocondrial, nuclear o del cloroplasto) o para eliminar las impurezas de la extracción. La separación de un genoma de otro se logra mediante la ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio o bien se usan columnas de intercambio iónico. La eliminación de impurezas es por métodos electroforéticos (geles de agarosa de bajo punto de fusión o electroelución) o con distintas resinas y columnas disponibles comercialmente (Qiagen, Wizard, etc.).

El ADN purificado se puede examinar a dos niveles alternativos (Fig. 3). Uno es buscar marcadores moleculares en el ADN total o en cada genoma (núcleo, mitocondria, cloroplasto); por ejemplo, hibridación de ADN, RFLPs o minisatélites. El otro es detectar marcadores en un segmento pequeño de ADN producto de una amplificación enzimática, como microsatélites o RAPDs.

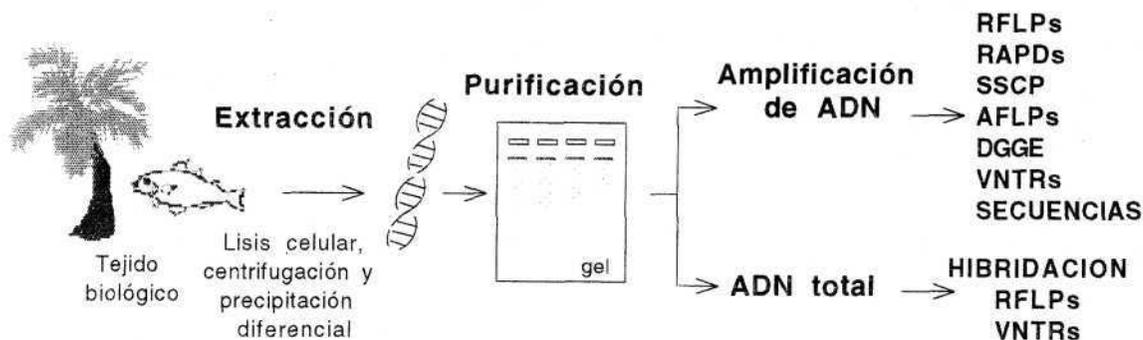


Fig. 3. Extracción de ADN y dos vías alternativas para la búsqueda de marcadores moleculares. El ADN extraído se purifica mediante varios métodos (ultracentrifugación, columnas o geles). Este ADN purificado se recupera para examinar la variación a nivel de todo el genoma o para amplificar una región específica.

Ahora se presenta primero una descripción breve de los marcadores que se observan en el ADN genómico total y después los que se examinan en productos de amplificación de fragmentos del ADN.

Hibridación de ADN: Estas observaciones se realizan en el ADN total nuclear y particularmente la fracción de genes de copia única. Los puentes de hidrógeno que unen los pares de nucleótidos de las cadenas complementarias se rompen cuando la temperatura se aumenta. Esto provoca que el ADN se disocie en cadenas sencillas. Si la temperatura baja, los puentes de hidrógeno se establecen y entonces las cadenas se reasocian nuevamente. Debido a que se encuentra en mayor proporción, el ADN repetitivo se reasocia más rápidamente que el ADN de copia única. La fracción de ADN repetitivo se retira, y sólo el ADN de copia única se hace hibridar con ADN de la misma especie (homoduplex) y con la de otras especies (heteroduplex). El último paso es caracterizar la estabilidad térmica del homoduplex y compararla con la del heteroduplex. Esto se logra al incrementar ligeramente la temperatura y monitorear el curso de la disociación de las moléculas a cadena sencilla (Fig. 4). La estabilidad térmica depende de la similitud de la secuencia de nucleótidos en las dos cadenas. Las diferencias en la estabilidad se interpretan como una medida de la similitud o disimilitud genética dentro y entre las especies (Werman *et al.*, 1990).

Fragmentos de restricción de longitud

polimórfica (RFLPs): Estos marcadores se observan tanto en el ADN total nuclear como en productos de amplificación de ADN. Los RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) son uno de los marcadores que más se utilizan para el muestreo de la variación entre los individuos (Dowling *et al.*, 1996). El polimorfismo se detecta debido a la habilidad de las enzimas de restricción para cortar una cadena de ADN en posiciones específicas (Fig. 5), lo que genera un número limitado y comparable de fragmentos de longitud variable. Los RFLPs se buscan en el ADN de cloroplastos, de mitocondrias o del núcleo. En los estudios con ADN de cloroplastos o mitocondrias la variación puede detectarse para un locus en el caso de los fragmentos de un gen específico o para varios loci si se fragmenta todo el genoma debido a su tamaño pequeño. Sin embargo, cuando el muestreo se hace en el ADN nuclear, la cobertura de la variación de fragmentos se reduce y debe estudiarse, por lo general, para un locus particular.

Una región pequeña del genoma puede ser fragmentada mediante dos estrategias distintas. La primera consiste en cortar el ADN total para entonces aislar los fragmentos de interés. La segunda procede primero a aislar la región de interés mediante la RCP para después producir los fragmentos. En el primer caso, el ADN total se digiere con una enzima de restricción. Mediante una electroforesis, todos los fragmentos

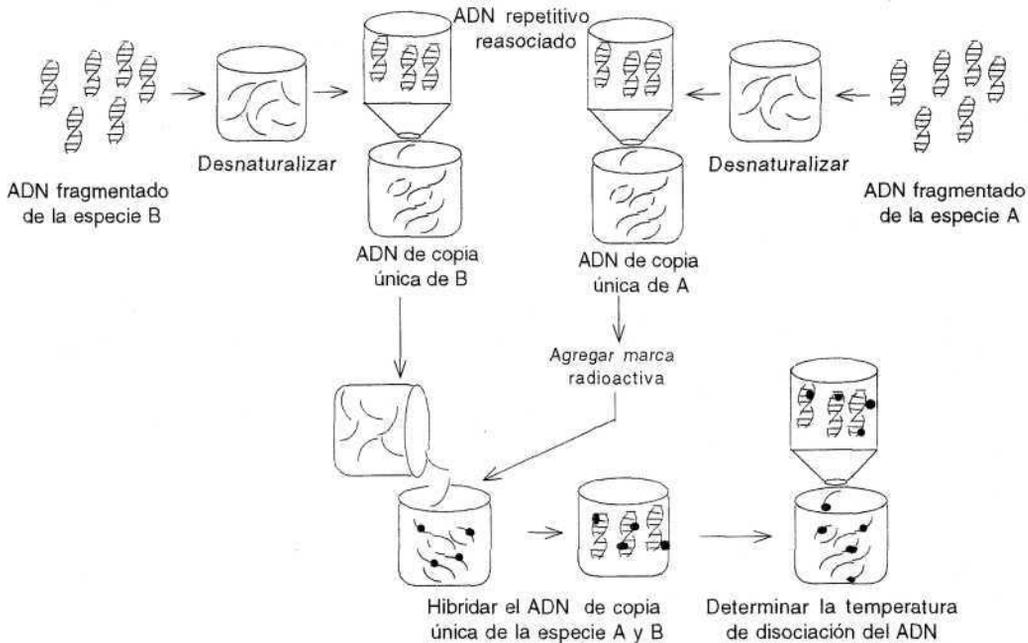


Fig. 4. Estrategia general para la hibridación de ADN. El ADN de las especies a comparar (A y B) se extrae y purifica. Posteriormente se corta en fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases y se desnaturalizan para eliminar las secuencias repetidas. Al bajar la temperatura a 50 °C aproximadamente las secuencias repetidas se reasocian y se quedan en la columna de aislamiento, mientras que las secuencias únicas permanecen desnaturalizadas, pasan por la columna y es posible aislarlas. El ADN de copia única de una especie se marca radioactivamente y se mezcla con el de la otra especie para que hibriden. Cuando la hibridación se completa la mezcla se coloca en una columna de hidroxipatita. Gradualmente se le aplica calor para determinar la temperatura de disociación de las cadenas híbridas. Las cadenas híbridas con secuencia muy similar se mantienen unidas a temperaturas más elevadas que las que tienen muchas diferencias.

cortados por la enzima se dispersan en el gel de acuerdo a su tamaño. La colección total de fragmentos se hibrida con una sonda o "prueba" específica para aislar solamente los fragmentos que pertenecen a una región de interés. La sonda puede ser cualquier segmento de ADN (un intrón, un gen, secuencias intergénicas, etc.) previamente identificado y aislado. Esta sonda se marca con compuestos radiactivos (Southern, 1975), fluorescentes o quimioluminiscentes (Kricka, 1992). Entre todos los fragmentos del ADN total sólo se hibridan con la sonda los que tienen secuencias complementarias. Estos fragmentos híbridos se visualizan exponiendo el gel a una película sensible a radiación o con un analizador de imágenes (Fig. 6). Aunque se fragmenta el ADN total, la sonda permite que solo se detecte la variación en la longitud de los fragmentos que derivan de una región específica del genoma.

La segunda estrategia está dirigida a aislar una región específica de ADN antes de la fragmentación con enzimas de restricción. El ADN total primero se desnaturaliza con calor para abrir las cadenas. La

región de interés se aísla con una amplificación enzimática mediante el uso de iniciadores específicos para una región particular de ADN. Esto permite que una ADN polimerasa sólo replique selectivamente tal región. Las copias amplificadas de la región seleccionada se purifican y entonces se digieren con varias enzimas de restricción una a la vez. Mediante una electroforesis, los fragmentos cortados por una enzima en cada digestión se dispersan en el gel de acuerdo a su variación de longitud. Los fragmentos de ADN se tiñen con bromuro de etidio y, por lo general, se visualizan directamente en el gel, aunque también pueden hibridarse a una membrana. Al igual que la técnica con el ADN total, este procedimiento logra detectar la variación en la longitud de los fragmentos para una región específica del genoma.

Mapas de sitios de restricción: A partir de los RFLPs se pueden construir mapas de restricción de los individuos. En la elaboración de estos mapas se determina no sólo el número y longitud de los fragmentos sino también el orden relativo de los

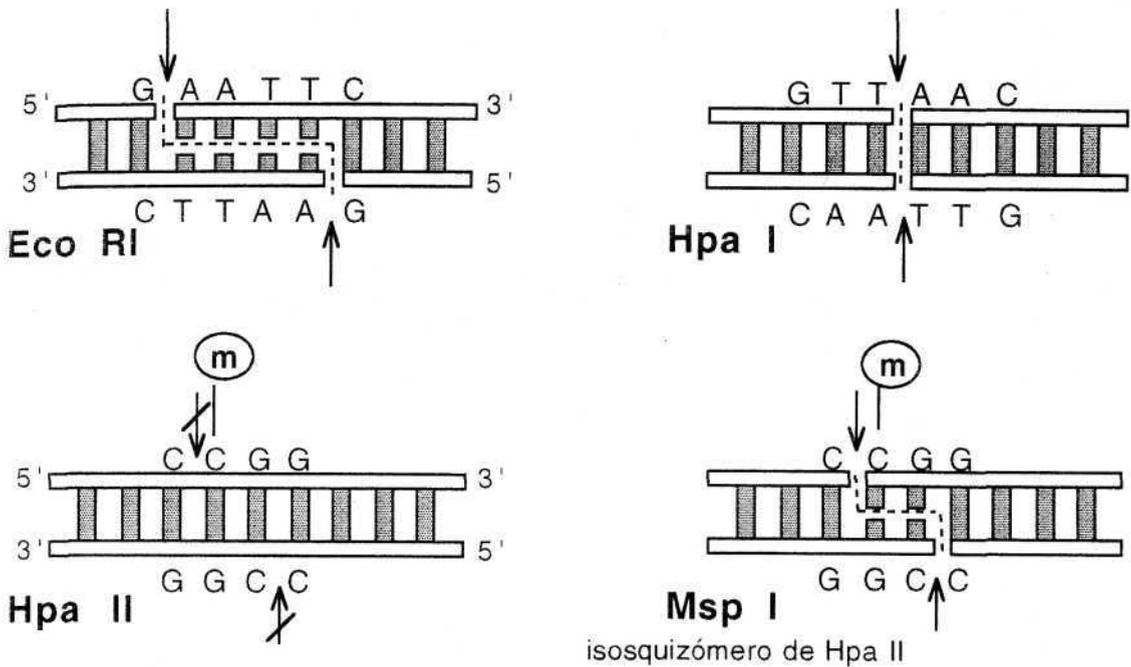


Fig. 5. Ejemplos de tres sitios en el ADN reconocidos por enzimas (Eco RI, Hpa I, Hpa II) y un isosquizómero (Msp I). Las secuencias en estos sitios son palindrómicas. Las enzimas se nombran con una abreviatura que indica la especie bacteriana de donde fueron aisladas, seguido por un número romano que indica el orden cronológico de su descubrimiento en el caso de que más de una enzima provenga de la misma bacteria. Las flechas indican los sitios de corte. Las enzimas como Eco RI producen fragmentos con terminaciones pegajosas o cohesivas, mientras que las enzimas como Hpa I producen fragmentos con terminaciones trancas. Cuando un nucleótido está metilado, las enzimas sensibles a la metilación como Hpa II no pueden cortar el AD, por lo que es necesario usar algún isosquizómero. Los isosquizómeros (como Msp I) también son enzimas de restricción que reconocen la misma secuencia palindrómica (en este caso la de Hpa II) pero son insensibles a la metilación.

sitios de restricción de la enzima. Estos mapas de RFLPs se elaboran de los fragmentos observados en el ADN genómico o en productos de la RCP. Estos últimos también se conocen como MRSPs (mapped restriction site polymorphisms). Los mapas de restricción a partir de ADN genómico requieren, además de la digestión con cada enzima, una digestión adicional pero ahora con dos enzimas a la vez. Esta doble digestión permite inferir dónde se localizan los sitios de restricción a lo largo de la región de ADN seleccionada (Fig. 7). Si cualquiera de los fragmentos de la digestión con la primera enzima es subfragmentado en la digestión doble entonces ese fragmento inicial contiene a su vez un sitio de corte de la segunda enzima. La localización de los sitios de restricción en el segmento depende de

determinar la longitud de los subfragmentos. Para ello se calibra el gel con marcadores de longitud conocida expresada en pares de nucleótidos (Palmer, 1982; Pearson, 1982; Carr *et al.*, 1987; Conant, 1994). En los MRSPs el ADN amplificado se digiere con varias enzimas de restricción una a la vez. Los fragmentos se separan en una electroforesis y se examinan para localizar los sitios de restricción de cada enzima. Para inferir dónde se localizan los sitios de restricción a lo largo del ADN amplificado también se hace una doble digestión. Al igual que con el ADN total, si cualquiera de los fragmentos de la digestión con la primera enzima es subfragmentado en la digestión doble entonces ese fragmento inicial contiene a su vez un sitio de corte de la segunda enzima (Ralph & McClelland, 1994).

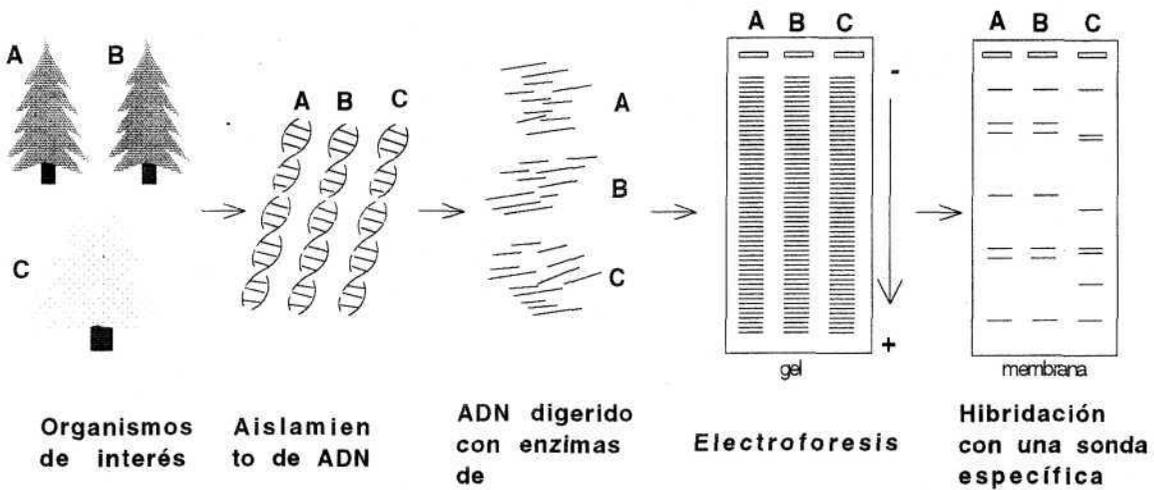


Fig. 6. Estrategia general para la obtención de "RFLPs". El ADN genómico de los organismos de interés se aísla y se corta con enzimas de restricción. Las enzimas cortan la cadena de ADN en sitios específicos originando una población de fragmentos de distintos tamaños. Los fragmentos se transfieren a una membrana para hibridarse a una sonda específica marcada que permite visualizar el patrón de bandas para esa sonda. Las muestras de poblaciones o especies con ADN similar producirán un patrón de fragmentos semejante (por ejemplo A y B). Si una mutación altera el sitio de restricción de la enzima se altera también el patrón de fragmentos.

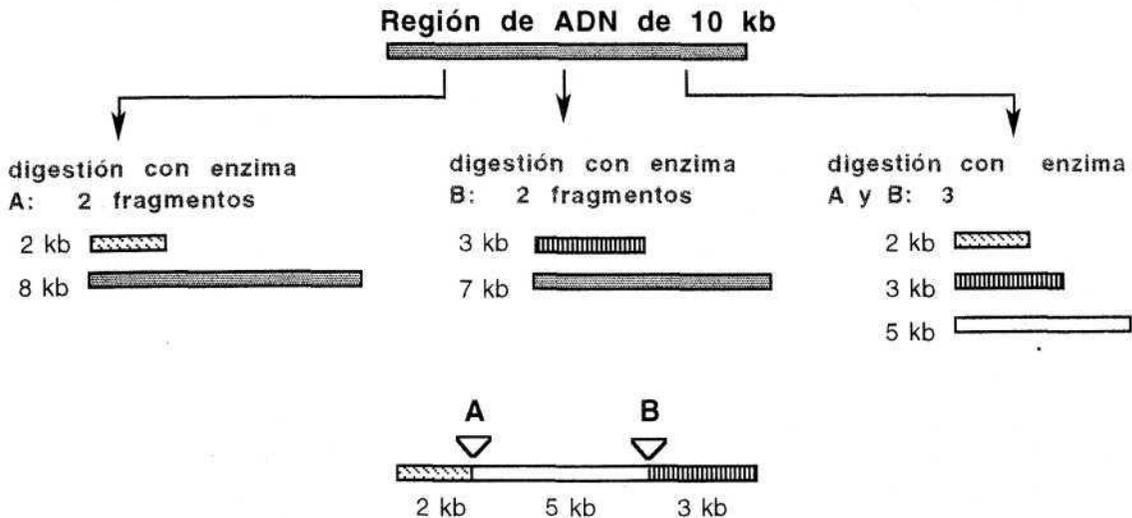


Fig. 7. Ejemplo de un mapa de sitios de restricción para dos enzimas basado en una doble digestión. Para inferir la localización de los sitios de restricción, el ADN se digiere primero con las dos enzimas individualmente y luego con las dos enzimas combinadas. Posteriormente, se determina el tamaño de los fragmentos que se generan. En el diagrama, la enzima A genera dos fragmentos, uno de 2 kb y otro de 8 kb. La enzima B genera también dos fragmentos, uno de 3 kb y otro de 7 kb. Esta combinación de tamaños indica que el sitio de corte de B sólo puede estar dentro del fragmento de 8 kb derivado de A. Con la digestión doble, el fragmento de 2 kb generado con la enzima A se mantiene íntegro, mientras que el de 8 kb es cortado en dos por la enzima B generándose fragmentos de 3 y 5 kb. Esta doble digestión nos indica que el sitio de corte de la enzima A debe estar en un extremo de la región de ADN y el sitio de corte de la enzima B debe estar en el extremo contrario. En la parte inferior del diagrama, se muestran el arreglo posible de los sitios de restricción para las dos enzimas. El ordenamiento de los fragmentos se puede hacer manualmente o con programas de cómputo.

Una ventaja de la amplificación enzimática respecto a la fragmentación del ADN total es que se elimina la fase de digestión del ADN total y la hibridación con una prueba. Además, la amplificación enzimática hace innecesario el uso de isoesquizómeros que son enzimas de restricción que reconocen el mismo sitio de corte pero que frecuentemente cortan ADN metilado (Fig. 5). La metilación inhibe la actividad de las enzimas de restricción y esto enmascara la ausencia o presencia de los sitios de corte debidos estrictamente a cambios de los nucleótidos. Durante la amplificación enzimática las copias se polimerizan con nucleótidos no metilados. Aunque el ADN original esté metilado, las copias producto de la amplificación ya no lo están. Se ha observado que el ADN mitocondrial o de cloroplastos no está metilado (Groot & Kroon, 1979). Sin embargo, en el ADN nuclear la metilación sí puede producir alteraciones en el número y tamaño de los fragmentos de restricción (Jorgensen & Cluster, 1988).

Huella digital del ADN (VNTRs): Los VNTRs (variable number of tandem repeat [número variable de secuencias repetidas en serie]), también conocidos como "DNA fingerprinting" o huella digital del

ADN son muy parecidos a los RFLPs. Los VNTRs también se observan tanto en el ADN total como en productos de amplificación de ADN. En el primer caso, se les denomina minisatélites y en el segundo, microsatélites. Ambos tipos de marcadores consisten en secuencias cortas que se encuentran repetidas y en serie dentro del genoma. En los minisatélites la longitud de estas secuencias repetidas varía de 7 a 65 pares de bases (Jeffrey *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1987; Vassart *et al.*, 1987). En los microsatélites, también conocidos como "short tandem repeats (STRs)" o "simple sequence repeats (SSRs)", la longitud de las secuencias repetidas sólo es de 1 a 6 pares de bases (Ali *et al.*, 1986; Epplen, 1988). El polimorfismo en los minisatélites y microsatélites se detecta en las diferencias del número de copias de las secuencias repetidas en los diferentes loci (Fig. 8). Por lo general, los minisatélites se encuentran concentrados cerca de los telómeros de los cromosomas y su variación al parecer depende de la recombinación interalelica y de la conversión génica. Mientras que las secuencias de microsatélites están distribuidas al azar y su variación depende, al parecer, de deslizamientos del ADN que ocurren durante la replicación.

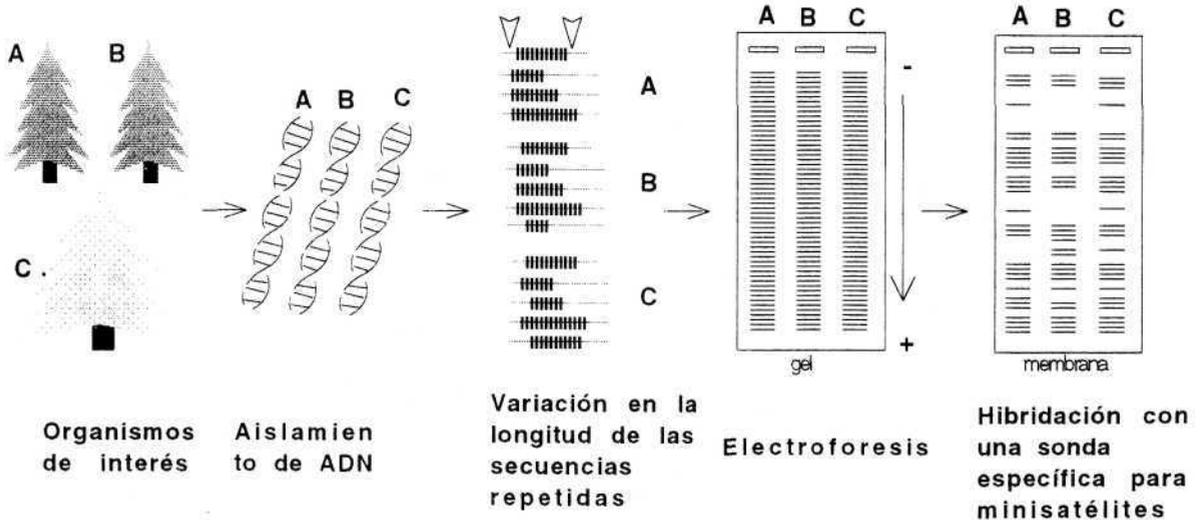


Fig. 8. Huella digital del ADN. El ADN genómico de los organismos de interés se aísla y se digiere con enzimas de restricción apropiadas (triángulos) que cortan por fuera de las secuencias repetidas. Los fragmentos de restricción generados se separan a través de una electroforesis y se transfieren a una membrana. Las secuencias repetitivas se detectan al hibridarlas con una sonda específica para minisatélites y se visualizan a través de una autoradiografía o por técnicas no radioactivas. El patrón de fragmentos en cada columna es lo que se denomina la huella digital ya que es exclusiva de un individuo. En este caso A y B son los padres potenciales, C tiene una huella digital de ADN muy parecida a B, entonces se puede inferir que B es el padre.

El examen de la variación de los minisatélites por lo general permite el muestreo de varios loci simultáneamente. Aunque también es posible examinar un locus a la vez con la técnica conocida como AMP-FLPs (amplified fragment length polymorphisms o PCR-amplified VNTR polymorphisms). Esta técnica se emplea en loci polimórficos humanos (ej. la proteína HLA-DQ) y se usan primordialmente con propósitos de identificación en la medicina forense (Budowle *et al.*, 1994). Por el contrario, el examen de la variación de los microsátélites por lo general permite el muestreo de un locus a la vez. Aunque también es posible examinar varios loci usando la técnica "multiplexing" que consiste en realizar numerosas amplificaciones simultáneamente (Dowling *et al.*, 1996).

La variación de los minisatélites entre los individuos se detecta al digerir el ADN total con enzimas de restricción que cortan fuera de las secuencias repetidas. El ADN digerido se separa de acuerdo a su tamaño por medio de una electroforesis. Posteriormente, se transfiere a una membrana y se hibrida con una sonda marcada con radiactividad, quimioluminiscencia o fluorescencia (Fig. 8). La sonda puede ser una secuencia comercial específica para minisatélites, una secuencia hipervariable completa o segmentos clonados o sintetizados que contengan secuencias minisatélites (Jeffreys *et al.*, 1985; Scribner *et al.*, 1994; Verheijen, *et al.*, 1994).

En los microsátélites la variación entre individuos se detecta amplificando una región específica para la cual se han diseñado los iniciadores. El diseño de los iniciadores requiere primero clonar fragmentos entre 300 y 500 bases del ADN total de la especie de interés. Para ello, el ADN total se digiere con alguna enzima de restricción (por ejemplo Sau3AI). Después, se seleccionan los fragmentos entre 300 y 500 pb y se clonan en plásmidos. Posteriormente, se hibridan con una secuencia que haya sido sintetizada y que tenga alguno de los elementos repetidos de microsátélites (por ejemplo [CA]_n). Por último, se seleccionan los clones positivos y se secuencian para diseñar los iniciadores que flanqueen los elementos repetidos CA. Estos iniciadores se usarán para amplificar el ADN de cada uno de los individuos de una población o especie. Después de la amplificación se corre una electroforesis. Las bandas en el gel van a diferir en longitud dependiendo del número de unidades repetidas de microsátélites que contengan. Ya existen

pruebas de microsátélites comerciales para varias especies. Sin embargo, cuando se usan en otras especies se ha observado que los resultados en ocasiones no son confiables, por ello, es preferible diseñar iniciadores para cada grupo de organismos (Dowling *et al.*, 1996).

ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs):

La técnica de los RAPDs (random amplified polymorphic DNAs), se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN polimórficos anónimos. Para ello se usa una reacción de amplificación estándar que genera fragmentos de ADN relativamente cortos de entre 200 a 2000 pares de bases. Esta amplificación, tiene la particularidad de que sólo se usa un iniciador cuya secuencia de nucleótidos es arbitraria, por lo general incluye sólo 10 bases.

Para obtener productos de amplificación con sólo un iniciador, debe haber dos sitios del iniciador idénticos o muy similares cerca uno del otro (hasta unas cuantas kilobases). Uno de los sitios debe estar en una cadena del ADN y el otro en la cadena complementaria en la dirección opuesta (Fig. 9). El sitio del iniciador más la secuencia de nucleótidos se le denomina por convención un "locus RAPD" y al producto de amplificación derivado de este locus particular se le denomina "marcador RAPD" (Grosberg *et al.*, 1996).

Las técnicas basadas en la amplificación con un sólo iniciador están diseñadas para detectar cambios en la secuencia del sitio del iniciador. Una sustitución dentro de las 10 bases del sitio afectará la eficiencia de la amplificación cambiando el patrón de fragmentos que produce un determinado iniciador (Caetano-Anollés *et al.*, 1991a; Caetano-Anollés & Bassam, 1993). La amplificación de un determinado segmento también se verá afectada por inserciones o deleciones en las bases localizadas entre los sitios del iniciador.

Se han generado otras técnicas que usan iniciadores arbitrarios en la reacción de amplificación como la AP-PCR "arbitrary primed polymerase chain reaction" (Welsh & McClelland, 1990) o la DAF "DNA amplification fingerprinting" (Caetano-Anollés *et al.*, 1991b). Estas técnicas son muy parecidas a la técnica de RAPDs, solo difieren en la longitud del iniciador que se usa, en los parámetros de los ciclos durante la amplificación y en la forma de visualizar los fragmentos generados (Weising *et al.*, 1995).

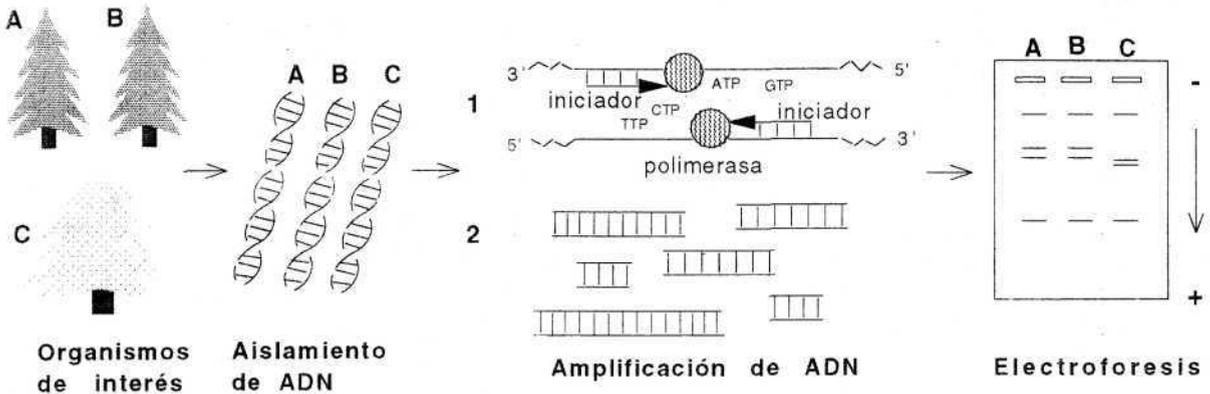


Fig. 9. Estrategia general para la obtención de "RAPDs". El ADN genómico de los organismos de interés (A, B, C) se someten a una reacción de amplificación (RCP) con un iniciador diseñado al azar (1). Si el iniciador se hibrida en direcciones opuestas y a una distancia conveniente el uno del otro, el fragmento entre ellos se amplificará (2). Los productos de la amplificación se separan por medio de una electroforesis de agarosa y se visualizan generalmente tiñendo el gel con bromuro de etidio. Las muestras de poblaciones o especies con secuencias de ADN similares, producen un patrón de fragmentos semejante (por ejemplo A y B).

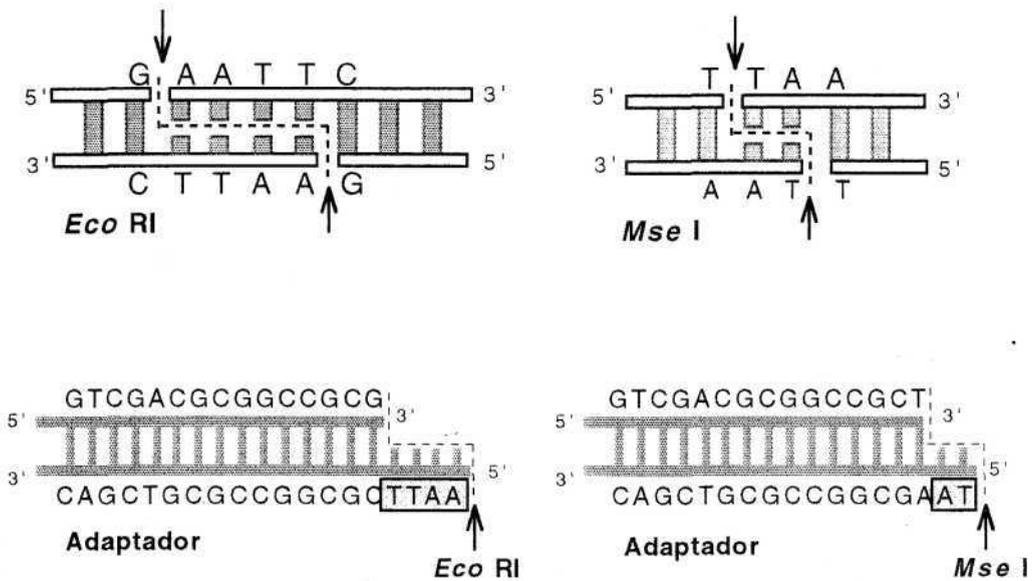


Fig. 10. Adaptadores de Eco RI y Mse I. Los adaptadores son iniciadores cortos (aproximadamente 10 a 15 bases) y de doble cadena. Uno de sus extremos es una extensión que contienen la secuencia de un sitio de restricción específico (flechas).

Fragmentos amplificados de longitud polimórfica (AFLPs): La técnica de los AFLPs (amplified fragment length polymorphisms) se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción del ADN genómico usando RCP (Vos *et al.*, 1995). Esta involucra primero, la digestión del ADN genómico con las enzimas de restricción, por ejemplo, Eco RI (sitio de reconocimiento de 6 pares de bases) y Mse I (sitio de reconocimiento de 4 pares de bases). Ambas enzimas generan extremos pegajosos (Fig. 10). Los fragmentos resultantes se ligan a unos adaptadores específicos para esos extremos. Los adaptadores son iniciadores cortos de doble cadena que contienen en uno de sus extremos una extensión con la secuencia complementaria al sitio de restricción (Fig. 10). Los fragmentos de restricción con el adaptador ligado servirán como patrones para una primera amplificación selectiva. Para esta primera amplificación se utiliza un

iniciador que contenga la secuencia del adaptador seguido del sitio de restricción y uno de los cuatro nucleótidos (A, C, G, T). De esta manera, en la primera RCP solo se amplificará una porción de los fragmentos de restricción originales. Se hace una segunda amplificación selectiva. En ésta, el iniciador contendrá tres nucleótidos selectivos en lugar de uno en cualquiera de sus combinaciones. Los productos de esta segunda amplificación sólo serán aquellos que concuerden con la combinación de los tres nucleótidos selectivos usados (Fig. 11). Este subconjunto de fragmentos se analizan en una electroforesis desnaturante de poliácridamida. El iniciador para la primera y/o segunda amplificación es marcado con radiactividad o quimioluminiscencia. El subconjunto de fragmentos seleccionados se visualizan en una autoradiografía.

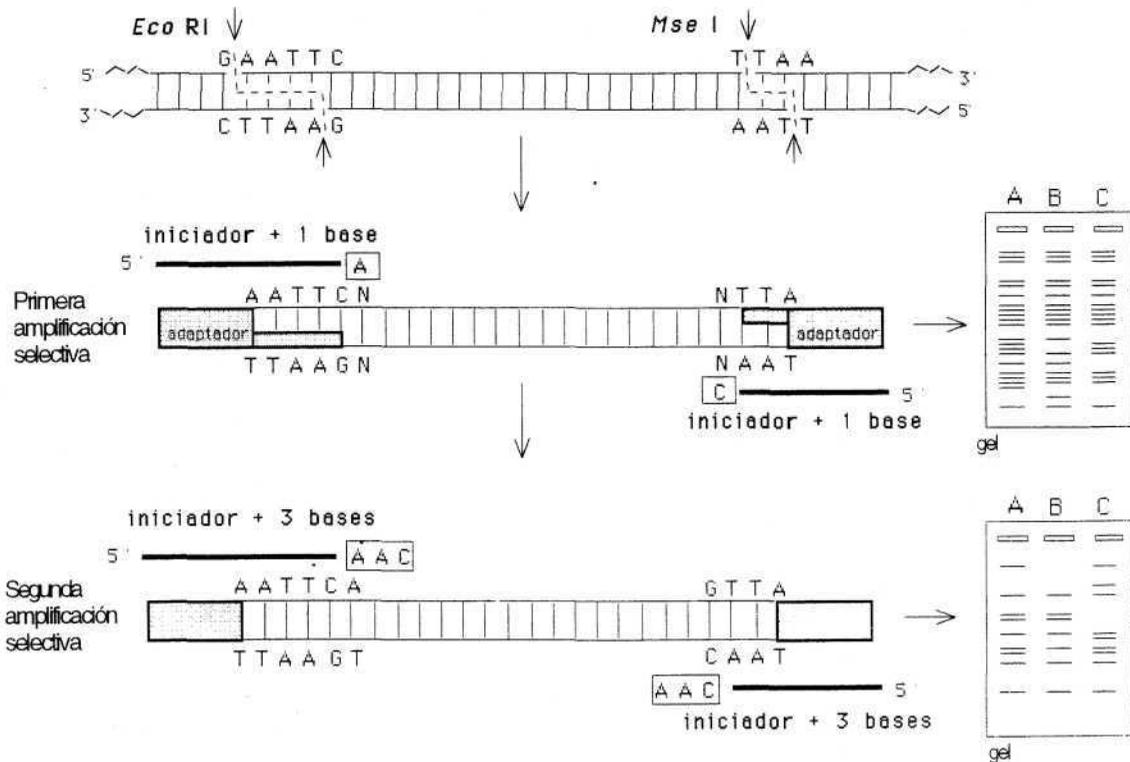


Fig. 11. Estrategia general para la obtención de fragmentos amplificados de longitud polimórfica. El ADN total se somete a una digestión doble con enzimas de restricción. La amplificación mediante el mismo iniciador específico permite seleccionar fragmentos de varias longitudes pero comparables entre poblaciones (A, B, C). Dado que no se conoce la secuencia interna de los fragmentos, el iniciador se puede diseñar al azar (por ejemplo "RAPDs") o con base en la secuencia conocida de un adaptador ("AFLPs"). Cuando un adaptador se liga a los fragmentos, éstos ahora ya pueden ser amplificados selectivamente mediante un iniciador diseñado con la secuencia del adaptador. La amplificación se hace aun más selectiva si a la secuencia del iniciador se le adicionan una o hasta tres bases extras respecto a las del adaptador. Este iniciador extendido por los nucleótidos adicionales permite una amplificación altamente selectiva de entre los fragmentos generados durante la doble digestión con las enzimas de restricción.

Conformación polimórfica de cadena sencilla (SSCP): El método de SSCP (single-strand conformation polymorphisms) se basa en la detección de cambios en la conformación de productos de RCP por medio de una electroforesis en geles de poliacrilamida. En esta técnica, se amplifica una secuencia específica (hasta de 400 nucleótidos) y se marca simultáneamente con iniciadores o nucleótidos que contienen isótopos radiactivos o sustancias quimioluminiscentes. Los fragmentos amplificados se calientan para disociar la doble cadena e inmediatamente después se colocan en hielo. Al enfriarse, muchas de las cadenas sencillas no se alinearán con sus complementos, en su lugar, formarán su propia estructura secundaria (o

conformación) al reasociarse las bases de la misma cadena sencilla (Fig. 12). La conformación de esas moléculas de cadena sencilla es dependiente de su secuencia y a menudo tienen movilidades electroforéticas distintas (Potts, 1996). El ADN de cadena sencilla o parcialmente desnaturizado, migra más lentamente que el ADN de cadena doble. Las mutaciones se detectan como diferencias en la movilidad de las bandas de cadena sencilla en un autoradiograma. La habilidad de esta técnica para detectar mutaciones depende de cómo afecten las mutaciones el doblamiento de la cadena sobre sí misma y cómo este afecte la movilidad electroforética. Actualmente no hay teoría disponible para predecir estos factores (Hayashi, 1994).

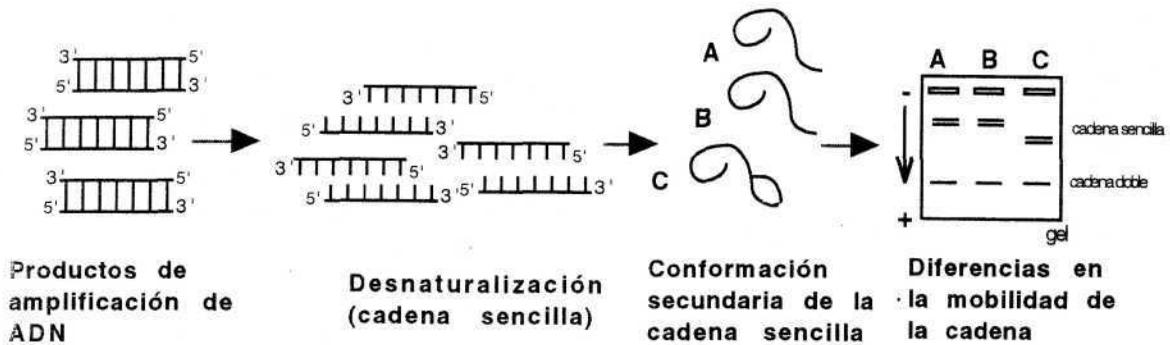


Fig. 12. Las observaciones de la conformación polimórfica de la cadena sencilla consisten en la detección de variantes de la estructura secundaria de las moléculas de ADN. Las cadenas sencillas forman una estructura secundaria específica para la secuencia de cada cadena. La estrategia básica consiste en la amplificación de un fragmento de ADN con un isótopo radiactivo para marcar los productos de la amplificación. Estos fragmentos se desnaturizan a 95 °C por 5 minutos e inmediatamente se transfieren a hielo. El enfriamiento rápido provoca que la mayoría de las cadenas sencillas no se reasocian con su complemento, sino que se pliegan sobre sí mismas. El plegamiento es parcial en la mayoría de los casos lo cual genera variación en la conformación o estructura secundaria que adquieren las cadenas sencillas plegadas. La variación conformacional se detecta separando la colección de fragmentos en un gel de poliacrilamida a 4 °C. Esta temperatura mantiene la estructura secundaria de las cadenas sencillas. La misma posición en el gel permite inferir que se trata del mismo fragmento al comparar entre poblaciones o especies (A, B, C).

Electroforesis en geles con gradientes desnaturizantes (DGGE): La DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) es una forma especial de electroforesis. Esta aprovecha el hecho de que el punto en que el ADN se desnaturiza depende de su secuencia de nucleótidos. Como consecuencia, dos fragmentos de ADN aunque del mismo tamaño se desnaturizarán a diferentes tiempos durante la electroforesis si tienen distintas secuencias (Potts, 1996). Esta electroforesis se realiza sobre geles de poliacrilamida con gradientes de un agente desnaturizante del ADN por ejemplo, urea (Myers *et al.*, 1987; Lessa, 1992). Productos de RCP de cadena doble y de menos de 600 bases se someten a una

electroforesis desnaturizante en gradiente. La doble cadena migra a través del gel hacia zonas con concentraciones del agente desnaturizante cada vez mayores. Conforme el ADN se desnaturiza la movilidad empieza a retardarse. El punto de desnaturización de los productos de RCP se detecta cuando el fragmento adquiere una movilidad diferente.

La posición del fragmento en el gel después de cierto tiempo está determinada por la "historia" de la desnaturización del fragmento (Hayashi, 1994). De esta forma, las secuencias que difieren escasamente por una sola base se desnaturizan en diferentes puntos dentro del gradiente, resultando en diferencias notables en sus movilidades. Se ha observado que el

ADN de cadena doble se desnaturaliza por segmentos. Estos segmentos se les ha llamado "dominios de fusión". La secuencia de nucleótidos de cada uno de estos dominios determina el punto donde ocurre la desnaturalización conforme la molécula se mueve a través del gradiente. En ocasiones, las mutaciones en el último de estos dominios no se pueden detectar puesto que la movilidad del ADN (en su mayoría desnaturalizado como cadena sencilla), es independiente de la secuencia (Potts, 1996). Con el objeto de detectar todas las mutaciones se ha recomendado añadir a un extremo del fragmento de RCP una secuencia estabilizadora (Sheffield *et al.*, 1989). Esto se logra usando iniciadores en la RCP que contengan una secuencia adicional de 35 a 40 nucleótidos rica en GC. En el proceso de la amplificación esta secuencia artificial se incorporará en los extremos del fragmento. Puesto que el enlace G-C es más estable, esta secuencia es la última que se desnaturaliza durante la electroforesis. Debido a ello, es posible detectar las mutaciones inclusive del último dominio del fragmento de ADN amplificado. De esta manera, esta técnica puede examinar casi todas las mutaciones de una secuencia dada.

Secuenciación de ADN: Para explorar la variación al nivel de secuencias del ADN nuclear o extranuclear, primero se selecciona un segmento particular del genoma (gen, intrón, secuencia espaciadora, etc.) cuya tasa de mutación sea apropiada para estudios a escala individual, poblacional o específica. Al nivel de especies o categorías superiores las secuencias de ADN son ampliamente usadas en sistemática. Esto se debe a que se han detectado diferentes sectores del genoma que contienen variación taxonómicamente útil (González, 1997). Sin embargo, al nivel de individuos o poblaciones el uso de secuencias ha sido limitado (Hillis *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1998). No obstante, el ADN mitocondrial y particularmente sus regiones intergénicas son útiles para el muestreo de la variación a este nivel (Taberlet, 1996; Parker *et al.*, 1998). Una vez seleccionado el segmento de ADN apropiado, éste se separa mediante una amplificación enzimática para su posterior secuenciación por alguno de los dos métodos disponibles, el químico (Maxam & Gilbert, 1977, 1980) o el enzimático (Sanger *et al.*, 1977).

El método químico de secuenciación se basa en la ruptura en un nucleótido específico del ADN por sustancias químicas. En este método, las cadenas de

ADN se marcan en una sola terminación (la 5' ó la 3') con un compuesto fluorescente, quimioluminiscente o radiactivo. Sólo una de las cadenas marcadas se separa mediante una digestión con enzimas de restricción o por desnaturalización. La solución que contiene estas cadenas marcadas se divide y se somete a cuatro tratamientos químicos con dimetil-sulfato, ácido fórmico, hidrazina e hidrazina+NaCl. Estos compuestos químicos empleados por separado metilan, protonan o substituyen por su isómero a un nucleótido específico dentro de la cadena en cada reacción. Se agrega piperidina a los cuatro tratamientos químicos y entonces la cadena de ADN se rompe en los sitios donde se encuentra el nucleótido modificado. El tratamiento con dimetil-sulfato origina fragmentos cuyo nucleótido terminal es guanina. En cambio, la reacción con el ácido fórmico corta la cadena en las adeninas y guaninas, mientras que la hidrazina lo hace en las timinas y las citosinas y la hidrazina con cloruro de sodio, en las citosinas. Finalmente, los fragmentos generados en cada una de estas cuatro muestras se someten a una electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida para separarlos por su tamaño.

El método enzimático de secuenciación se basa en la síntesis *in vitro* de una de las cadenas de ADN con una polimerasa. La síntesis se inicia en el sitio donde un iniciador se encuentra unido a la cadena de ADN. Se incorpora una marca radiactiva, quimioluminiscente o fluorescente a la cadena durante la síntesis o previamente al iniciador. La reacción de síntesis se termina cuando la polimerasa incorpora un nucleótido análogo (2',3'-dideoxynucleosido 5'-trifosfatos, [ddNTP's]). Los ddNTP's carecen del grupo 3'-OH que es necesario para que la polimerasa catalice la incorporación de otro nucleótido. La síntesis se lleva a cabo en cuatro reacciones por separado, cada una de las cuales contiene los cuatro nucleótidos regulares (2',3'-deoxynucleosido 5'-trifosfatos, [dNTP's]) pero sólo uno de los cuatro ddNTP's. Por último, los fragmentos generados en cada una de las cuatro reacciones se someten a una electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida para separarlos de acuerdo a su tamaño (González, 1997). La secuenciación enzimática es actualmente la más usada.

La nueva tecnología de los secuenciadores automatizados y los nuevos métodos para generar secuencias de ADN han facilitado los trabajos que involucran este tipo de datos. Una de estas técnicas es la secuenciación cíclica (Fig. 13). En ésta, la

secuenciación del ADN se lleva a cabo durante una amplificación enzimática. En la reacción de amplificación se utiliza sólo un iniciador y se incorporan los cuatro ddNTP's marcados con distintos compuestos fluorescentes. Los cuatro fluoróforos identificarán a cada uno de los nucleótidos (A, G, T y C). Los fluoróforos más usados son los derivados de la rodamina y la fluoresceína. El producto de la

secuenciación cíclica se somete a una electroforesis en un secuenciador automatizado. Conforme se lleva a cabo la electroforesis los fluoróforos son excitados por un rayo láser. Cada emisión fluorescente es transmitida como una señal a una computadora donde un programa la interpreta y la codifica como un nucleótido particular (Ferl *et al.*, 1991).

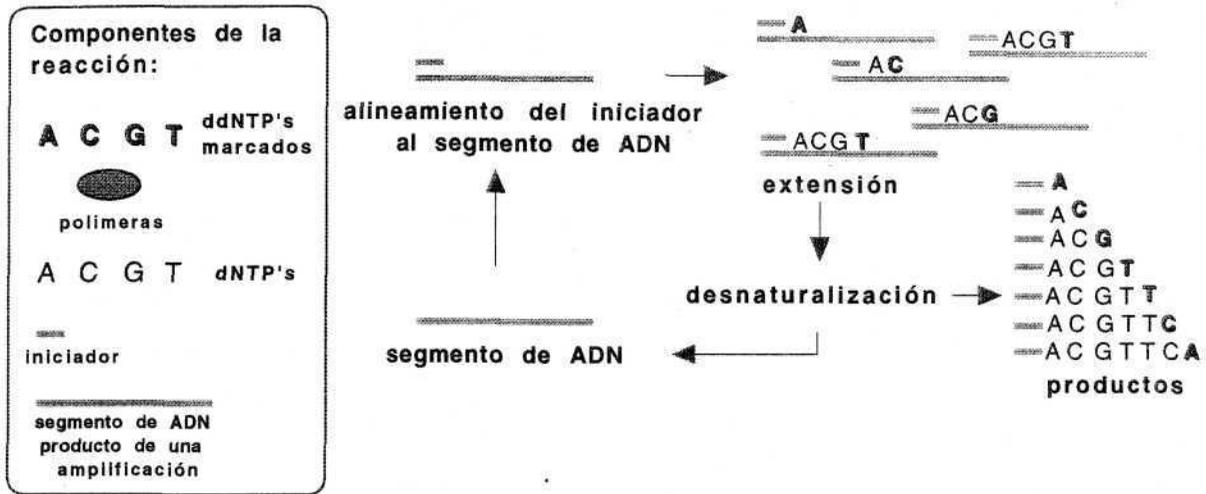


Fig. 13. La secuenciación cíclica de ADN se realiza durante una amplificación enzimática. Esta técnica de secuenciación utiliza un segmento de ADN previamente amplificado, un iniciador y los nucleótidos análogos (ddNTP's) marcados con compuestos fluorescentes. Cada uno de los ddNTP's contiene un fluoróforo diferente que identificará a cada uno de los nucleótidos (A, G, T y C). Durante la amplificación enzimática, cada ciclo incluye la desnaturalización del ADN con calor, la hibridación del iniciador y la extensión del ADN. En esta fase, la ADN polimerasa cataliza la incorporación de los dNTP's y de los ddNTP's marcados. Al terminar cada ciclo, la temperatura se eleva nuevamente y el proceso empieza de nuevo. Figura modificada de material impreso de Perkin-Elmer.

Conclusiones

Las estrategias clásicas para detectar polimorfismo al nivel individual, poblacional o específico se han visto complementadas recientemente con diversas técnicas moleculares. Estas técnicas permiten la obtención de marcadores de proteínas o de ácidos nucleicos. La incorporación de técnicas moleculares para detectar polimorfismo al nivel individual, poblacional o específico ha permitido investigar diversos problemas ecológicos o sistemáticos, como: paternidad (Quinn *et al.*, 1987; Burke *et al.*, 1989; Welsh *et al.*, 1991), diversidad genética (Scribner, *et al.*, 1994), heterocigosidad (Hubby & Lewontin, 1966; Lewontin & Hubby, 1966), sistema de apareamiento (Burke,

1989), variación geográfica (Olmstead, 1989; Marchant & Shaw, 1993), hibridación (Radtke *et al.*, 1995), delimitación geográfica de especies (Ferris, *et al.*, 1983), especiación (Crawford, 1985; Vilgalys, 1991; Vilgalys & Sun, 1994) y filogenias de especies (Martin & Dowd, 1991; Bruneau & Doyle, 1993; Anderberg, 1994; Baum *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 1994; Gupta, 1995) entre otros.

En la literatura es común que se promuevan ideas sobre la superioridad de un tipo de marcador sobre otro (Sibley & Ahlquist, 1987; Gottlieb, 1988). Sin embargo, todos los tipos de marcadores (morfológicos o moleculares) proveen información útil sobre algún nivel de la variación de los organismos. Lo importante es seleccionar el marcador apropiado para el nivel de

variación de interés particular. Por ejemplo, a escala individual, los métodos usados para detectar marcadores moleculares son: los RFLPs, los RAPDs, los SSCP y la DGGE. También se ha usado la electroforesis de isoenzimas, los mini y microsátélites y las reacciones inmunológicas. En cambio, a escala poblacional los más recomendables son la electroforesis de isoenzimas, los RFLPs, los RAPDs, los mini y microsátélites y los AFLPs. La hibridación de ADN también ha sido usada al nivel de poblaciones (Britten *et al.*, 1978; Caccone *et al.*, 1987; Sheldon, 1987). Sin embargo, su mayor aplicación ha sido en estudios taxonómicos que involucran niveles taxonómicos más inclusivos como familias y órdenes (Werman *et al.*, 1990). Los métodos usados al nivel específico son los ensayos inmunológicos, la secuencia de aminoácidos, la electroforesis de isoenzimas, la hibridación de ADN, los RFLPs y las secuencias de ADN. Aunque los estudios comparativos de variación basados en las secuencias de ADN son ampliamente utilizados en sistemática (González, 1997), su uso al nivel de individuos o poblaciones todavía es limitado (Hillis & Moritz, 1990; Innis *et al.*, 1990; Avise, 1994; Griffin & Griffin, 1994; Mullis *et al.*, 1994; Weising *et al.*, 1995; Ferraris & Palumbi, 1996; Hillis *et al.*, 1996).

Desde la década pasada, muchos grupos de investigación interesados en problemas ecológicos y sistemáticos han incorporado en sus trabajos por lo menos alguno de los métodos disponibles para generar marcadores moleculares. Con los avances de la tecnología (equipo especializado, mejores reactivos, etc.) cada vez es más fácil y rápido la obtención de muchos de estos marcadores. No es difícil anticipar que se continuarán usando estos marcadores y que sin lugar a duda se desarrollarán nuevas metodologías para obtenerlos.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Efraín De Luna y a dos revisores anónimos sus valiosas sugerencias y críticas al presente manuscrito. Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico del Instituto de Ecología, A. C., mediante la cuenta 902-14 y al proyecto PACIME-CONACyT No. 1837P-N9507.

Literatura citada

Ali, S., C. R. Müller & J. T. Eppelen, 1986. DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum. Genet.* 74: 239-243.

- Anderberg, A. A., 1994. Phylogeny of the Empetraceae, with special emphasis on character evolution in the genus *Empetrum*. *Syst. Bot.* 19: 35-46.
- Avise, J. C., 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall, New York.
- Bain, S. C. & J. A. Todd, 1993. Mapping MHC class II genes and disease-susceptibility. In: B.A. White (ed.), **PCR Protocols: current methods and applications**. Humana Press, Totowa, pp. 95-112.
- Baum, T. J., P. M. Gresshoff, S. A. Lewis & R. A. Dean, 1994. Characterization and phylogenetic analysis of four root-knot nematode species using DNA amplification fingerprinting and automated polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 39-47.
- Britten, R. J., A. Cetta & E. H. Davidson, 1978. The single-copy sequence polymorphism of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Cell* 15: 1175-1186.
- Bruneau, A. & J. J. Doyle, 1993. Cladistic analysis of chloroplast DNA restriction site characters in *Erythrina* (Leguminosae: Phaseoleae). *Syst. Bot.* 18: 229-247.
- Budowle, B., A. Sajantila, M. N. Hochmeister & C. T. Comey, 1994. The application of PCR to forensic science. In: K.B. Mullis, F. Ferré y R.A. Gibbs (ed.), **The polymerase chain reaction**. Cambridge MA, pp. 244-256.
- Burden, D. W. & D. B. Whitney, 1995. **Biotechnology: Proteins to PCR**. Birkhäuser, Boston.
- Burke, T., N. B. Davies, M. W. Bruford & B. J. Hatchwell, 1989. Parental care and mating behaviour of polyandrous dunnocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA fingerprinting. *Nature* 338: 249-251.
- Burke, T., 1989. DNA fingerprinting and other methods for the study of mating success. *Trends Ecol. Evol.* 4: 139-144.
- Caccone, A., G. D. Amato & J. R. Powell, 1987. Intraspecific DNA divergence in *Drosophila*: A study on parthenogenetic *D. mercatorum*. *Mol. Biol. Evol.* 4: 343-350.
- Caetano-Anollés, G., B. J. Bassam & P. M. Gresshoff, 1991a. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 292-305.
- Caetano-Anollés, G., B. J. Bassam & P. M. Gresshoff, 1991b. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9: 553-557.
- Caetano-Anollés, G. & B. J. Bassam, 1993. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Appl. Biochem. Biotech.* 42: 189-200.
- Carr, S. M., A. J. Brothers & A. C. Wilson, 1987. Evolutionary inferences from restriction maps of mitochondrial DNA from nine taxa of *Xenopus* frogs. *Evolution* 41: 176-190.
- Conant, D. S., 1994. Phylogenetic implications of chloroplast DNA variation in the Cyatheaaceae. I. *Syst. Bot.* 19: 60-72.
- Crawford, D. J., 1985. Electrophoretic data and plant speciation. *Syst. Bot.* 10: 405-416.
- Croy, R. R. D. (ed.), 1994. **Plant molecular biology: labfax**. Scientific Publishers, Oxford.
- Dowling, T. E., C. Moritz, J. D. Palmer & L. H. Rieseberg, 1996. Nucleic acids III: Analysis of fragments and restriction sites. In: D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable (eds.), **Molecular Systematics**. Sinauer, Sunderland, pp. 249-320.
- Eppelen, J. T., 1988. On simple repeated GAC/TA sequences in animal genomes: a critical reappraisal. *J. Hered.* 79: 409-417.

- Ferl, R. J., C. J. Nair, J.-X. She, E. Wakeland & E. Almira, 1991. The application of automated DNA sequence analysis to phylogenetic studies. In: M.M. Miyamoto y J. Cracraft (eds.), **Phylogenetic analysis of DNA sequences**. Oxford University Press, New York, pp. 45-58.
- Ferraris, J. D. & S. R. Palumbi, (eds.), 1996. **Molecular Zoology**. Wiley-Liss, New York.
- Ferris, S. D., R. D. Sage, C.-M. Huang, J. T. Nielsen, U. Ritte & A.C. Wilson, 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. **80**: 2290-2294.
- González, D., 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. **Bol. Soc. Bot. México** **60**: 137-157.
- Gottlieb, L. D., 1988. Towards molecular genetics in *Clarkia*: gene duplications and molecular characterization of PGI genes. **Ann. Missouri Bot. Gard.** **75**: 1169-1179.
- Griffin, H. G. & A. M. Griffin, (eds), 1994. **PCR technology: current innovations**. CRC Press, Boca Raton.
- Groot, G. S. P. & A. M. Kroon, 1979. Mitochondrial DNA from various organisms does not contain internally methylated cytosine in -CCGG- sequences. **Biochim. Biophys. Acta** **564**: 355-357.
- Grosberg, R. K., D. R. Levitan & B. B. Cameron, 1996. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous. In: J. D. Ferraris & S. R. Palumbi (eds.), **Molecular Zoology**. Wiley-Liss, New York, pp. 67-100.
- Gupta, R. S., 1995. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. **Mol. Biol. Evol.** **12**: 1063-1073.
- Hayashi, K., 1994. Manipulation of DNA by PCR. In: K.B. Mullis, F. Ferré & R. A. Gibbs (eds.), **The Polymerase Chain Reaction**. Birkhäuser, Cambridge, pp. 3-13.
- Hillis, D. M. & C. Moritz (eds.), 1990. **Molecular Systematics**. Sinauer, Sunderland.
- Hillis, D. M., C. Moritz & B. K. Mable (eds.), 1996. **Molecular Systematics**. Sinauer, Sunderland.
- Hoelzel, A. R. & G. A. Dover, 1991. **Molecular genetic ecology**. Oxford University Press, New York.
- Hubby, J. L. & R. C. Lewontin, 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics** **54**: 577-594.
- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, 1990. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, New York.
- Jeffrey, A. J., V. Wilson & S. L. Thein, 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature** **314**: 67-73.
- Jorgensen, R. A. & P. D. Cluster, 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Ann. Missouri Bot. Gard.** **75**: 1238-1247.
- King, R. C. & W. D. Stansfield, 1985. **A dictionary of genetic**. Oxford University Press, New York.
- Kricka, L. J. (ed.), 1992. **Nonisotopic DNA probe techniques**. Academic Press, San Diego.
- Lamb, T., C. Lydeard, R. B. Walker & J. W. Gibbons, 1994. Molecular systematics of map turtles (*Graptemys*): A comparison of mitochondrial restriction site versus sequence data. **Syst. Biol.** **43**: 543-559.
- Lessa, E., 1992. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. **Mol. Biol. Evol.** **9**: 323-330.
- Lewontin, R. C. & J. L. Hubby, 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amounts of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics** **54**: 595-609.
- Lowenstein, J. M., 1985. Molecular approaches to the identification of species. **Amer. Sci.** **73**: 541-547.
- Mahbubani, M. H. & A. K. Bej, 1994. Applications of polymerase chain reaction methodology in clinical diagnostics. In: H. G. Griffin & A. M. Griffin (eds.), **PCR Technology: current inovations**. CRC Press, Boca Raton, pp. 307-326.
- Marchant, A. D. & D. D. Shaw, 1993. Contrating patterns of geographic variation shown by mtDNA and karyotype organization in two subspecies of *Caledia captiva* (Orthoptera). **Mol. Biol. Evol.** **10**: 855-872.
- Martin, P. G. & J. M. Dowd, 1991. Studies of angiosperm phylogeny using protein sequences. **Ann. Missouri Bot. Gard.** **78**: 296-337.
- Martínez, M., 1997. Sistemática molecular: comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. **Bol. Soc. Bot. México** **60**: 123-136.
- Maxam, A. M. & W. Gilbert, 1977. A new method for sequencing DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**: 560-564.
- Maxam, A. M. & W. Gilbert, 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. **Methods Enzymol.** **65**: 499-559.
- Maxon, R. D. & L. R. Maxon, 1986. Micro-complement fixation: a quantitative estimator of protein evolution. **Mol. Biol. Evol.** **3**: 375-388.
- Maxon, L. R. & R. D. Maxon, 1990. Proteins II: Immunological techniques. In: D. M. Hillis & C. Moritz (eds.), **Molecular Systematics**. Sinauer, Sunderland, pp. 127-155.
- May, B., 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In: A. R. Hoelzel (ed.), **Molecular genetic analysis of populations: a practical approach**. IRL Press, Oxford, pp. 1-27.
- Mayr, E., 1969. **Principles of Systematic Zoology**. McGraw-Hill, New York.
- Mullis, K. B. & F. A. Faloona, 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** **155**: 335-350.
- Mullis, K. B., F. Ferre & R.A. Gibbs (eds.), 1994. **The polymerase chain reaction**. Springer-Verlag, New York.
- Murphy, R. W., J. W. Sites Jr., D. G. Buth & C. H. Haufler, 1996. Proteins: isozyme electrophoresis. In: D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable (eds.), **Molecular Systematics**. Sinauer, Sunderland, pp. 51-120.
- Myers, R. M., T. Maniatis & L. Lerman, 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods Enzymol.** **155**: 501-527.
- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin & R. White, 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science** **235**: 1616-1622.
- Ochman, H., A. S. Gerber & D. L. Hartl, 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction.

- Genetics** 120: 621-623.
- Olmstead, R. G., 1989. Phylogeny, phenotypic evolution, and biogeography of the *Scutellaria angustifolia* complex (Lamiaceae): Inference from morphological and molecular data. **Syst. Bot.** 14: 320-338.
- Otero, A., M. de la Cruz & K. Oyama, 1997. El Uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. **Bol. Soc. Bot. México** 60: 85-117.
- Oyama, K., 1996. Quantitative variation within and among populations of *Arabis serrata* Fr. & Sav. (Brassicaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 120: 243-256.
- Palmer, J. D., 1982. Physical and gene mapping of chloroplast DNA from *Atriplex triangularis* and *Cucumis sativa*. **Nucleic Acids Res.** 10: 1593-1605.
- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton & P. A. Fuerst, 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology** 79: 361-382.
- Pearson, W. R., 1982. Automatic construction of restriction site maps. **Nucleic Acids Res.** 10: 217-227.
- Pérez, N. & D. Piñero, 1997. Isoenzimas. **Bol. Soc. Bot. México** 60: 77-84.
- Potts, W. K., 1996. PCR-based cloning across large taxonomic distances and polymorphism detection: MHC as a case study. In: J.D. Ferraris & S.R. Palumbi (eds.), **Molecular Zoology**. Wiley-Liss, New York, pp. 181-194.
- Price, R. A. & J. M. Lowenstein, 1989. An Immunological comparison of the Sciadopityaceae, Taxodiaceae, and Cupressaceae. **Syst. Bot.** 14: 141-149.
- Quinn, T. W., J. S. Quinn, F. Cooke & B. N. White, 1987. DNA marker analysis detects multiple maternity and paternity in single broods of the lesser snow goose (*Anser caerulescens caerulescens*). **Nature** 396: 392-394.
- Radtke, R. D., S. D. Donnellan, R. N. Fisher, C. Moritz, K. A. Hanley & T. J. Case, 1995. When species collide: the origin and spread of an asexual species of gecko. **Proc. Roy. Soc. London B.** 258: 145-152.
- Ralph, D. & M. McClelland, 1994. Mapped restriction site polymorphisms (MRSPs) PCR products for rapid identification and classification of genetically distinct organisms. In: H. G. Griffin & A. M. Griffin (eds.), **PCR Technology: current innovations**. CRC Press, Boca Raton, pp. 121-131.
- Roth, V. L., 1989. Fabricational noise in elephant dentitions. **Paleobiology** 15: 165-179.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239: 487-491.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74: 5463-5467.
- Sarich, V. M. & A. C. Wilson, 1966. Quantitative immunochemistry and the evolution of primate albumins: micro-complement fixation. **Science** 154: 1563-1566.
- Sarich, V. M. & A. C. Wilson, 1967. Immunological time scale for hominid evolution. **Science** 158: 1200-1203.
- Scribner, K. T. J., W. Arntzen & T. Burke, 1994. Comparative analysis of intra-and interpopulation genetic diversity in *Bufo bufo*, using allozyme, single-locus microsatellite, minisatellite and multilocus minisatellite data. **Mol. Biol. Evol.** 11: 737-748.
- Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. Lerman & R. M. Myers, 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 232-236.
- Sheldon, F. H., 1987. Rates of single-copy DNA evolution in herons. **Mol. Biol. Evol.** 4: 56-69.
- Sibley, C. G. & J. E. Ahlquist, 1987. Avian phylogeny reconstructed from comparisons of the genetic material, DNA. In: C. Patterson (ed.), **Molecules and morphology in evolution: conflict or compromise?** Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, pp. 95-121.
- Simpson, J., 1997. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP's). **Bol. Soc. Bot. México** 60: 119-122.
- Simpson, J., 1997. Molecular markers. **Bol. Soc. Bot. México** 60: 73-76.
- Smith, T. B., 1990. Patterns of morphological and geographic variation in trophic bill morphs of the African finch *Pyrenestes*. **Biol. J. Linn. Soc.** 41: 381-414.
- Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** 98: 503-517.
- Taberlet, P., 1996. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. In: T. B. Smith & R. K. Wayne (eds.), **Molecular genetic approaches in conservation**. Oxford University Press, New York, pp. 125-142.
- Tao, B. Y. & K. C. P. Lee, 1994. Mutagenesis by PCR. In: H. G. Griffin & A. M. Griffin (eds.), **PCR technology: current innovations**. CRC Press, Boca Raton, pp. 69-83.
- Valverde, M. E. & O. Paredes-López, 1996. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad: El caso de los hongos. **Ciencia y Desarrollo Mayo-Junio**: 29-37.
- Vassart, G., M. Georges, R. Monsieure, H. Brocas, A. S. Lequarre & D. Christophe, 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. **Science** 235: 683-684.
- Verheyen, G. R., B. Kempenaers, T. Burke, M. V. D. Broeckhoven & A. Dhont, 1994. Identification of hypervariable single locus minisatellite DNA probes in the blue tit *Parus caeruleus*. **Mol. Ecol.** 3: 137-143.
- Vilgalys, R., 1991. Speciation and species concepts in the *Collybia dryophila* complex. **Mycologia** 83: 758-773.
- Vilgalys, R. & B.-L. Sun, 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 4599-4603.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T. v. d. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff & W. Meyer, 1995. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. CRC Press, Boca Raton.
- Welsh, J. & M. McClelland, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 18: 7213-7218.

Weish, J., R. J. Honeycutt, M. McClelland & B. W. Sobral, 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrary-primed polymerase chain reaction (AP-PCR). **Theor. Appl. Genet.** **82**: 473-476.

Werman, S. D., M. S. Springer & R. J. Britten, 1990. Nucleic acids I: DNA-DNA hybridization. *In*: D. M. Hillis & C. Moritz (eds.), **Molecular Systematics**. Sinauer, Sunderland, pp. 204-249.

White, B.A. (ed.), 1993. **PCR Protocols: current methods and applications**. The Humana Press, Totowa.

Wright, S., 1978. **Variability within and among natural populations**. The University of Chicago Press, Chicago.

Recibido: 9 de julio, 1998. Aceptado: 14 de septiembre, 1998.
Solicitud de sobretiros: Dolores González.