

**ESTANDARIZACIÓN DEL GENOTIPADO DE MARCADORES MOLECULARES
MICROSATÉLITES PARA ESTUDIOS POBLACIONALES DE
AVES DEL GÉNERO *Ramphocelus* EN EL DEPARTAMENTO DE
SANTANDER, COLOMBIA**

LADY YULIANA NORIEGA CABALLERO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

2015

**ESTANDARIZACIÓN DEL GENOTIPADO DE MARCADORES MOLECULARES
MICROSATÉLITES PARA ESTUDIOS POBLACIONALES DE AVES DEL
GÉNERO *Ramphocelus* EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER,
COLOMBIA**

LADY YULIANA NORIEGA CABALLERO

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar el título de
Biólogo**

Tutor

FERNANDO RONDÓN GONZALEZ

Biólogo, Ph.D.

Co-director

JORGE LUIS FUENTES LORENZO

Microbiólogo, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

2015

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional durante todo este tiempo, porque nunca dejaron de creer en mis capacidades.

A **Martha Cecilia Caballero** por inculcarme siempre la importancia de estudiar y ser un profesional en mi vida.

A mi pequeña hija **Isabella Fonseca Noriega**, por la colaboración durante mi carrera, eres aquel motor que todo lo hace posible.

A mi profesor **Fernando Rondón González**, por el apoyo incondicional durante mi carrera, por todos los conocimientos adquiridos durante este tiempo y sobre todo por la confianza depositada para la realización de este proyecto.

Por todos los docentes que aportaron para formarme como profesional e investigadora.

A mis amigas del alma **Mónica Patricia García, Lilu Santamaría, Linita Espitia**, que durante todo este tiempo han estado firme al filo del cañón, ese apoyo incondicional durante estos años de amistad han logrado que este sueño sea posible.

A los propietarios de las fincas que han permitido la realización de este proyecto, por su hospitalidad en las jornadas de campo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. Área de estudio	14
2.2. Fase de campo	14
2.3. Fase de laboratorio	15
2.3.1. Extracción de ADN	15
2.3.2. Amplificación de sistema de microsatélites	16
2.3.3 Separación y visualización de productos de PCR	17
3. RESULTADOS	18
3.1. Identificaciones de las especies en campo	18
3.2. Amplificación de microsatélites	19
3.2.3. Separación y visualización de productos de PCR	20
4. DISCUSIÓN	23
5. CONCLUSIONES	25
6. RECOMENDACIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Localidades de muestreo de especies de <i>Ramphocelus</i> en el departamento de Santander, Colombia.	15
Figura 2. Individuos de la especie <i>R. icteronotus</i> . A. Macho. B. Hembra.	18
Figura 3. Individuos de la especie <i>R. dimidiatus</i> . A. Hembra. B. Macho.	19
Figura 4. Escalera de $MgCl_2$. Se visualizan productos amplificados en PAGE 19:1 a partir de muestras de <i>R. icteronotus</i> con los iniciadores del microsatélite RcAAAG410.	21
Figura 5. Visualización de productos de PCR del microsatélite RcAAAG406 en PAGE 19:1. Se observan amplificados en siete muestras de <i>R. icteronotus</i> . Neg: control negativo. Pos: control positivo.	21
Figura 6. Visualización de productos amplificados por PCR del microsatélite RcAAAG410 en gel de agarosa al 2%.	22
Figura 7. Número de muestras amplificadas por PCR en <i>R. icteronotus</i> , bajo las condiciones Krueger & Williams, González y LGPC-UIS.	24

LISTADO TABLAS

Pág.

Tabla 1. Cebadores empleados en la amplificación de dos sistemas de microsatélites. **16**

Tabla 2. Condiciones de PCR reportadas para los microsatélites RcAAAG406 y RcAAAG410. **16**

RESUMEN

TÍTULO: ESTANDARIZACIÓN DEL GENOTIPADO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES PARA ESTUDIOS POBLACIONALES DE AVES DEL GÉNERO *Ramphocelus* EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER, COLOMBIA*

Autores: LADY YULIANA NORIEGA CABALLERO**

Palabras claves: PCR, Microsatélites, Poliacrilamida, *Ramphocelus*.

Los estudios de genética poblacional tienen como objetivo determinar y medir la variación existente entre y dentro de las poblaciones, analizar la estructura causada por fenómenos como la hibridación y generar soporte dirigido a la conservación de especies. El uso de la biología molecular ha permitido identificar dicha variación encaminada a caracterizar los genotipos individuales presentes en las poblaciones, aspecto requerido para el posterior análisis de diferentes parámetros genéticos poblacionales. El objetivo de la presente pasantía de trabajo de grado fue estandarizar el genotipado de los marcadores moleculares tipo microsatélites RcAAAG406 y RcAAAG410 tipificados en *Ramphocelus costaricensis*, a partir de 105 muestras de ADN de dos especies de aves del género *Ramphocelus* presentes en el departamento de Santander, Colombia. Se siguieron dos protocolos de PCR publicados y uno realizado en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación de la Universidad Industrial de Santander (LGPC-UIS); los productos de PCR fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 7% y de agarosa al 2%. Se observaron productos de PCR para los dos microsatélites propuestos en *R. icteronotus*; hecho que no se evidenció en *R. dimidiatus*. Este resultado probablemente se deba al hecho que *R. costaricensis* no es taxón hermano de *R. dimidiatus*, lo que dificulta la amplificación de microsatélites heterólogos en esta especie.

*Trabajo de Grado

**Facultad de ciencias. Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón González, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: STANDARDIZATION OF MOLECULAR MARKERS GENOTYPING MICROSATELLITE BIRD POPULATION STUDIES *Ramphocelus* GENDER IN THE DEPARTMENT OF SANTANDER, COLOMBIA.*

Authors: LADY YULIANA NORIEGA CABALLERO **

Key words: PCR, Microsatellites, Polyacrylamide, *Ramphocelus*.

Population genetics studies aim to identify and measure the variation between and within individuals, analyze the structure caused by phenomena such as hybridization and generate support aimed to the conservation of species. The use of molecular biology allowed us to identify such variation directed towards the characterization of individual genotypes present in populations, aspect required for subsequent analysis of different population genetic parameters. The objective of this internship was to standardize the genotyping of microsatellite molecular markers RcAAAG406 and RcAAAG410 established in *Ramphocelus costaricensis*, in 105 DNA samples from two species of birds of the genus *Ramphocelus* present in the department of Santander, Colombia. Two published and one developed in the Laboratory of Population Genetics and Conservation of the Industrial University of Santander (LGPC-UIS) PCR protocols were followed; PCR products were visualized on polyacrylamide (7%) and agarose (2%) gels. PCR products for both of the microsatellites proposed were observed in *R. icteronotus*; experience not evident in *R. dimidiatus*. This result is probably due to the fact that *R. costaricensis* is not a sister taxon to *R. dimidiatus*, which hinders the amplification of heterologous microsatellites in this species.

* Degree work, Research internship

** Science Faculty, Department of Biology. Director: Fernando Rondón González, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

La deforestación y la degradación del hábitat tienen un impacto negativo sobre la estructura y la diversidad genética de las poblaciones naturales, debido al incremento de la heterogeneidad de los bosques y su consecuente amenaza de la diversidad biológica (Gómez et al., 2008), causa principal de la extinción de muchas especies de aves (Anciaes & Marini, 2000).

Dentro de la clase Aves, las tangaras son el grupo más abundante y diverso del Neotrópico (Krueger & Williams, 2006); la gran mayoría de tangaras tienen en general colores brillantes y muchas de ellas presentan dimorfismo sexual para el color del plumaje (Isler & Isler, 1999). La tangara neotropical del género *Ramphocelus* (Thraupidae: Passeriformes) incluye nueve especies que se distribuyen desde México hasta el sur de Brasil (Isler & Isler, 1999). Las especies de este género se caracterizan por presentar un pico plateado y un amplio rango de coloración y preferencias de hábitat (Sibley, 1958; Hackett, 1996).

En Colombia se han registrado poblaciones de cinco especies de tangaras del género *Ramphocelus*, a saber: *R. carbo*, *R. dimidiatus*, *R. flammigerus*, *R. icteronotus* y *R. nigrogularis* (Hilty & Brown, 1986; McMullan & Donegan, 2014). En los últimos años se han reportado coexistiendo simpátricamente *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* en el departamento de Santander (Carreño, 2013). Lo anterior puede conducir a un deterioro gradual del hábitat natural de la especie residente y la ampliación del rango de distribución de la especie invasora, *R. icteronotus* (Archila, 2014); eventos que conllevan a contacto secundario (Confer, 2006), el cual puede reducir el tamaño de las poblaciones de *R. dimidiatus* y por ende su diversidad genética.

La revolución molecular en los últimos años ha producido una gran cantidad de técnicas y teorías que permiten a los ornitólogos examinar directamente la variación genética intra e inter poblacional (Haig 1998; Aranguren et al. 2005). A medida que las poblaciones divergen, los individuos comienzan a acumular cambios genéticos que eventualmente caracterizarán a cada población (Boecklen & Howard 1997; Rhymer & Simberloff 1996; Bedoya, 2007). Estos cambios son registrados en el genoma y pueden ser analizados a partir del genotipado de

marcadores moleculares como los microsatélites, los cuales han sido empleados para establecer la cantidad de divergencia y diferenciación genética (Loyau & Schmeller, 2009), además de examinar las relaciones entre poblaciones de diferentes especies relacionadas de aves (Haig et al., 2011).

Debido al hecho que recientemente se detectó la presencia de *R. icteronotus* en el departamento de Santander (McMullan et al. 2011) y teniendo en cuenta su evidente comportamiento invasor (Carreño, 2013; Archila, 2014), la presente tesis de pasantía de investigación pretendió contribuir al estudio de la diversidad y el grado de estructura genética en poblaciones simpátricas de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* residentes en este departamento. Con la realización de esta pasantía se estandarizó la amplificación mediante PCR, de los sistemas de marcadores microsatélites RcAAAG406 y RcAAAG410 caracterizados en *Ramphocelus costaricensis* (Krueger & Williams, 2006); así como la visualización de fragmentos de PCR separados en matrices de poliacrilamida teñidas con Nitrato de Plata (Santos et al. 1993) y matrices de agarosa utilizando EZ-VISION® (Amresco) como agente intercalante, técnicas requeridas en la resolución de los objetivos propuestos en el marco del proyecto de investigación VIE-UIS 1351.

En el presente documento se reporta la estandarización de los sistemas de microsatélites RcAAAG406 y RcAAAG410, contemplados dentro del citado Macroproyecto, dirigido al análisis de la diversidad y estructura genética de poblaciones de dos especies de aves del genero *Ramphocelus* presentes en el departamento de Santander, Colombia.

1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN

La pasantía fue enfocada en implementar técnicas de Biología Molecular reproducibles y útiles en estudios genéticos poblacionales en LGPC-UIS.

Una vez concluida dicha pasantía, la estudiante:

1. Identifica en campo los individuos de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*.
2. Extrae ADN a partir de muestras sanguíneas de los individuos de ambas especies capturados en campo.
3. Amplifica segmentos de ADN que contienen microsatélites.
4. Utiliza métodos de separación de ADN dirigidos a identificar variantes alélicas en distintos individuos de una misma especie.
5. Redacta informes con contenido científico de una manera adecuada aportando al desarrollo del proyecto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de grado hace parte del Macroproyecto de Investigación: “Diversidad y estructura genética de poblaciones de dos especies de aves del genero *Ramphocelus* presentes en el departamento de Santander, Colombia”. Dicho proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander (UIS) y quedó registrado bajo el código VIE-UIS 1351.

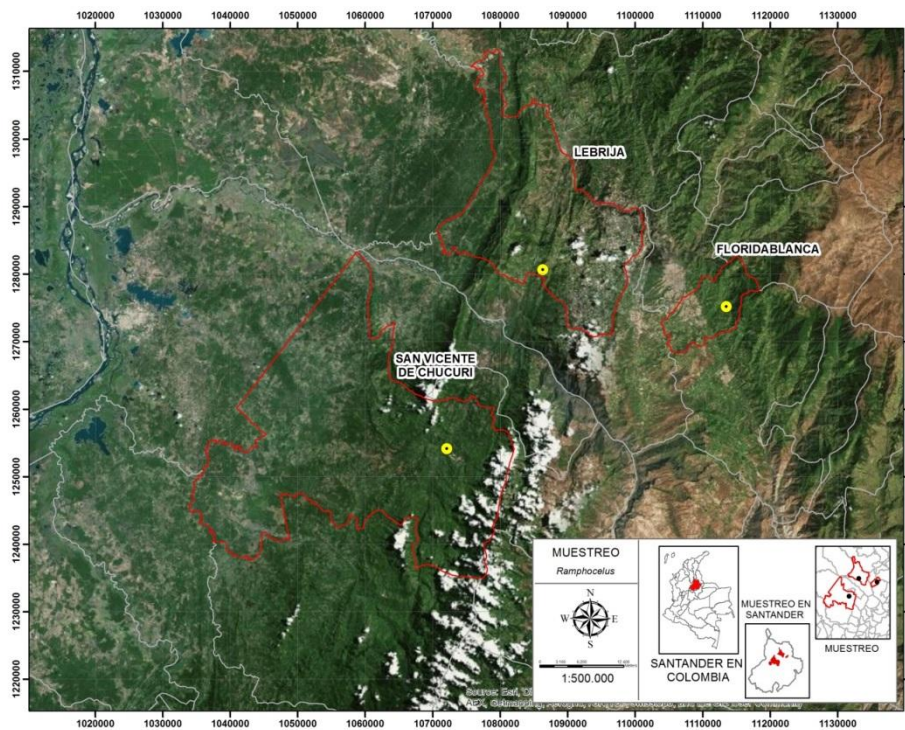
2.1. Área de estudio

El área de estudio comprendió tres localidades geográficas ubicadas en el costado occidental de la cordillera Oriental de los Andes colombianos, en el departamento de Santander: 1) Finca El Diviso, ubicada en la vereda La Colorada del municipio de San Vicente de Chucurí; 2) Finca Tierra Buena, ubicada en la vereda San Bernardo de la Cuchilla del municipio de Lebrija y 3) Fincas La Victoria y La Playita, ubicadas en la vereda Los Helechales del municipio de Floridablanca (Figura 1). Las localidades fueron escogidas debido a que en ellas se encontraron coexistiendo en simpatria las dos especies objeto de estudio.

2.2. Fase de campo

En cada localidad se colocó 10 redes de niebla, las cuales estuvieron abiertas entre las 5:00 y las 17:00 horas. A cada individuo capturado se le extrajo 50 μ L de sangre de la vena braquial, utilizando una jeringa de 1mL. La sangre fue almacenada en tubos de 1,5mL con EDTA 0,05M, así mismo se conservó una gota de sangre en una tarjeta estéril. Cada muestra se rotuló con las dos letras iniciales del género y del epíteto específico, además del número de captura del individuo. Posteriormente, cada individuo capturado fue anillado en el tarso izquierdo a objeto de evitar la réplica en el muestreo. Todas las muestras se almacenaron a 0°C hasta su procesamiento en el LGPC-UIS.

Figura 1. Localidades de muestreo de especies de *Ramphocelus* en el departamento de Santander, Colombia.



Fuente: Manuel Carvajal

2.3. Fase de Laboratorio

2.3.1 Extracción de ADN

A partir de cada muestra de sangre se obtuvo el ADN total con el kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante; así mismo se incrementó el período de incubación (overnight) a objeto de garantizar una concentración final superior a 40 ng/μl de ADN. Con el fin de corroborar el éxito de la extracción y realizar la cuantificación con patrones conocidos (Thermo Scientific), el ADN fue visualizado en geles de agarosa al 1% teñidos con EZ-VISION® (Amresco).

2.3.2 Amplificación de sistema de Microsatélites

En la amplificación de los sistemas de microsatélites RcAAAG406 y RcAAAG410 (Tabla 1), se utilizaron las condiciones de PCR propuestas por Krueger & Williams (2006) y González (2009) (Tabla 2). Los dos protocolos siguen los siguientes parámetros: 94°C por 2min, seguido por 30 ciclos de 10s a 94 °C, 10s a 50°C y 20s a 72°C y una extensión final a 72°C por 5 min.

Tabla 1. Cebadores empleados en la amplificación de dos sistemas de microsatélites.

Cebadores	Secuencias
RcAAAG410	F: 5'-CCACTGATTCCAAACACACT-3'
	R: 5'-TTTTTCTTTTGTCTTTCTCTCT-3'
RcAAAG406	F: 5'-ATGGGCAGATTGATTTGTGA-3'
	R: 5'-AAATGTCATTAGTTGCTCAAGTAAA-3'

F: forward; R: reverse.

Fuente: Lady Noriega Caballero.

Tabla 2. Condiciones de PCR reportadas para los microsatélites RcAAAG406 y RcAAAG410.

Reactivos	Krueger & Williams (2006)	González (2009)
PCR Buffer	1X	1X
MgCl ₂	No reporta	2 mM
dNTP's	200 µM	200 mM
Cebadores	0,5 µM	0,5 mM
Taq Polimerasa	0,2 U	0,2 U
ADN	50 ng/µL	20 ng/µL

Fuente: Lady Noriega Caballero.

2.3.3 Separación y visualización de productos de PCR

Los productos amplificados por PCR fueron separados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%; para visualizar los perfiles electroforéticos, previa a la corrida, se adicionó a cada muestra 2 μL de EZ-VISION® (Amresco). También los productos de PCR fueron separados en matrices de poliacrilamida (PAGE) 19:1 al 7%, las cuales fueron teñidas con nitrato de plata siguiendo las recomendaciones de Santos et al. (1993) y Franco et al. (2010).

3. RESULTADOS

3.1. Identificaciones de las especies en campo.

En las tres localidades contempladas para la ejecución del proyecto VIE-UIS 1351, se realizaron observaciones con binoculares con el fin de ubicar individuos de las especies de *Ramphocelus* en estudio. Durante el transcurso del siguiente proyecto se capturaron siete individuos correspondientes a cuatro *R. dimidiatus* y tres *R. icteronotus*. El macho de *R. icteronotus* presenta una coloración predominantemente negra, rabadilla amarillo limón y pico perlado azul (Figura 2); la hembra presenta tonalidades ocres entre el amarillo y marrón y conserva la tonalidad del color del pico descrito para el macho (Hilty & Brown, 1986).

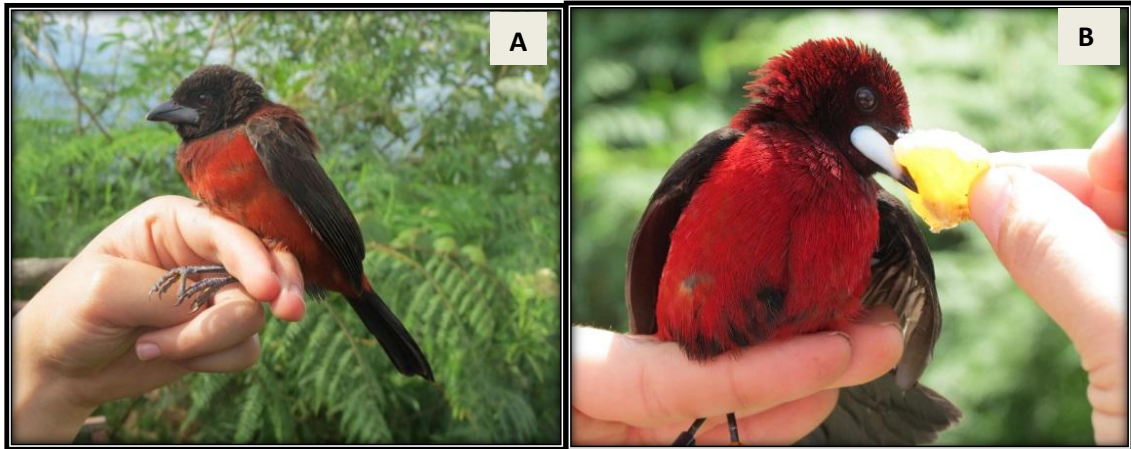
Figura 2. Individuos de la especie *R. icteronotus*. **A.** Macho. **B.** Hembra.



Fuente: Fernando Rondón González

Por su parte las hembras y machos adultos de *R. dimidiatus* (Figura 3) se distinguen fácilmente por presentar diferencias en el color del plumaje y pico; los machos son rojos escarlata con alas negras y pico plateado, mientras que las hembras presentan una coloración menos vistosa en tonalidades de rojo y su pico no presenta la coloración de los machos (Hilty & Brown, 1986; Olson & Violani, 1995); por su parte los juveniles en ambos sexos son similares a las hembras adultas (Moynihan, 1962).

Figura 3. Individuos de la especie *R. dimidiatus*. **A.** Hembra. **B.** Macho.

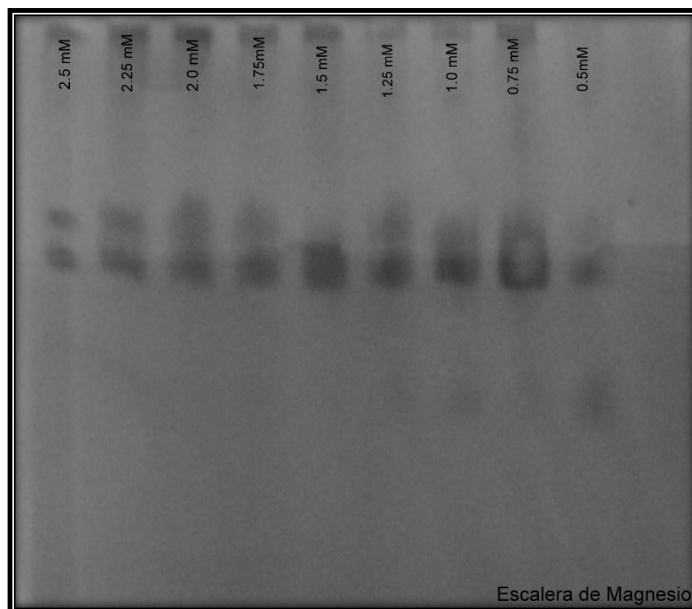


Fuente: Fernando Rondón González.

3.2. Amplificación de microsatélites

En el Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación de la Universidad Industrial de Santander, se realizó la estandarización de los sistemas microsatélites RCAAAG406 y RCAAAG410 reportados por Krueger & Williams (2006). Luego de analizar 28 muestras de ADN de *R. icteronotus*, las condiciones de PCR se determinaron de la siguiente manera para 15 μ L de volumen final por individuo: 30 ng/ μ L de ADN, 1X de buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de Cebadores y 0,2 U de Taq DNA polimerasa (Figura 4). Todas las reacciones de amplificación se desarrollaron en un termociclador AB 2720 (Applied Biosystems), siguiendo los siguientes parámetros: 94°C por 2min, seguido por 30 ciclos de 15s a 94 °C, 15s a 50°C y 30s a 72°C y una extensión final a 72°C por 10 min.

Figura 4. Escalera de $MgCl_2$. Se visualizan productos amplificados en PAGE 19:1 a partir de muestras de *R. icteronotus* con los iniciadores del microsatélite RCAAAG410.



Fuente: Lady Noriega Caballero.

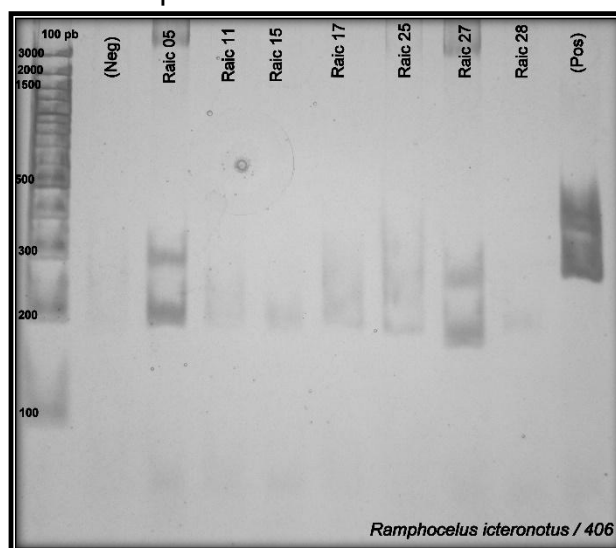
3.2.3. Separación y visualización de productos de PCR

La visualización de los productos de PCR obtenidos se realizó en geles de Poliacrilamida 19:1 al 7% mediante electroforesis vertical empleando geles de 10x10x0,01 cm (ancho, largo y grosor respectivamente). La separación de los fragmentos requirió de 3,0 μ L del producto amplificado mezclado con 3,0 μ L de Buffer de carga 6X. En todos los casos se realizó, una precorrida a 45V por 15min seguido de la corrida a 90V por 1h, en un equipo Vertical Blotter E2010-P (Labnet International, Inc).

Los geles de PAGE fueron puestos en una solución fijadora de etanol absoluto - ácido acético glacial por 20 min, a continuación el gel se tiñó en una solución de Nitrato de Plata durante 20 minutos y se reveló con una solución de NaOH y formaldehído, los volúmenes y concentraciones de cada reactivo se adicionaron siguiendo las recomendaciones de Santos et al. (1993) y Franco et al. (2010). Como modificación, la tinción del gel se llevó a cabo en un cuarto oscuro.

Dado que los productos de PCR esperados para los marcadores microsatélites RCAAAG406 y RCAAAG410 se encuentran en el rango comprendido entre 176 y 215 pb (Figura 5), estos se compararon con un ladder de 100 pb (Thermo Scientific) y un ADN control positivo (Rfbc02) facilitado por el profesor Oscar Enrique Murillo del Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle.

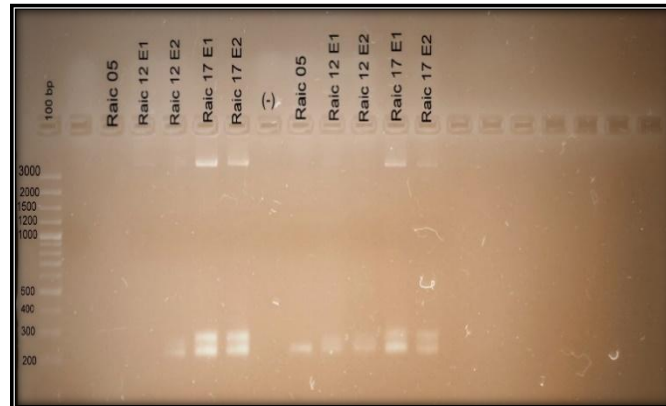
Figura 5. Visualización de productos de PCR del microsatélite RCAAAG406 en PAGE 19:1. Se observan amplificadas en siete muestras de *R. icteronotus*. Neg: control negativo. Pos: control positivo.



Fuente: Lady Noriega Caballero.

Inicialmente se adoptó como sistema de separación de los productos de PCR el uso de geles de Agarosa RA grado biotecnológico (Amresco) al 2%. La separación de los fragmentos requirió de 2,0 μ L del producto amplificado mezclado con 2,0 μ L de EZ-VISION® (Amresco). Las condiciones de corrida que permitieron una separación adecuada de los productos de PCR (Figura 6) de los marcadores microsatélites considerados fueron: precorrida a 45V por 15min, corrida a 90V por 1h, en una cámara electroforesis horizontal OWL EASYCAST B12 (Termo Scientific). Ninguna de las 77 muestras de *R. dimidiatus* mostró producto amplificado para los dos sistema de microsatélites analizado durante la pasantía.

Figura 6. Visualización de productos amplificados por PCR del microsatélite RcAAAG410 en gel de agarosa al 2%.



Fuente: Lady Noriega Caballero

4. DISCUSIÓN

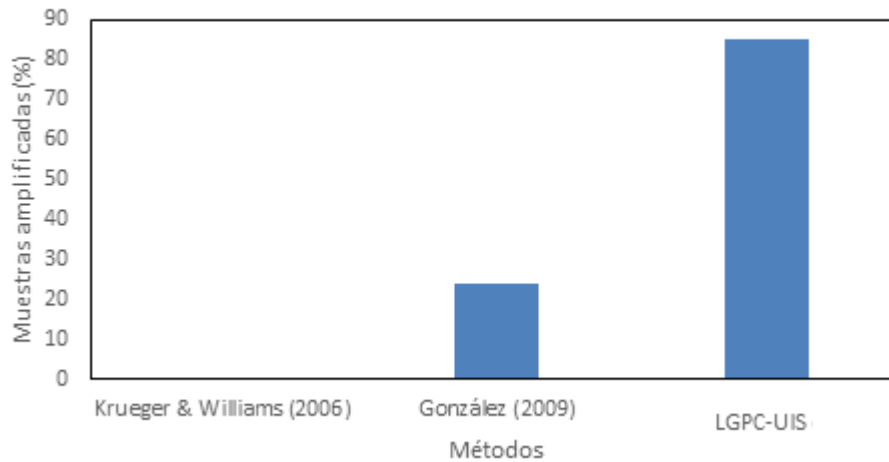
En la estandarización de la PCR de los microsatélites RCAAAG406 y RCAAAG410, se evidenciaron diferencias en cuanto a la concentración del $MgCl_2$. En el desarrollo del presente estudio se encontró, luego de realizar ajustes en escaleras de dicho reactivo, que los mejores productos amplificados se obtuvieron cuando la concentración de $MgCl_2$ fue de 2,5mM (Figura 4); concentración que difiere de la reportada por los autores en los que se basó la estandarización inicial (Tabla 2). Siendo la concentración de $MgCl_2$ un factor crucial en el proceso de la amplificación el cual puede afectar dicho suceso, un cambio de 0,25mM puede ser la diferencia entre un excelente producto o no tener producto (Harris, 1998), debido a que el exceso de $MgCl_2$ reduce la fidelidad enzimática (Eckert & Kunkel, 1990), por lo tanto aumenta los productos inespecíficos de amplificación (Williams, 1989; Ellsworth et al. 1993).

En la estandarización de los ciclos se incrementó el tiempo de desnaturalización e hibridación en cinco segundos y de extensión en diez segundos, adicionalmente se incrementó en cinco minutos el tiempo de extensión respecto a lo reportado por Krueger & Williams (2006). Según Narina (2011) el incremento del tiempo de extensión mejora la sensibilidad de los productos de PCR, lo cual redundará en un incremento del número de muestras amplificadas. En este caso, dicho incremento equivale a un 85% de muestras amplificadas, respecto a las obtenidas con las condiciones iniciales de PCR evaluadas. Con los incrementos reportados, se logró alcanzar una alta sensibilidad en los productos de amplificación para los marcadores de microsatélites analizados (Figura 7).

En el establecimiento del mejor método de separación de productos de PCR útiles en el análisis de microsatélites, las electroforesis en geles de poliacrilamida 19:1 fueron más informativas en comparación con las realizadas en geles de agarosa (Sánchez et al., 2014). Lo anterior se sustenta a partir del hecho que se obtuvo mayor sensibilidad en cuanto al número de alelos separados y observados (Figura 5), comparados con el número de alelos separados y observados en matrices de agarosa (Figura 6). Con base en lo anterior, se recomienda tener en cuenta este resultado, para estandarizaciones de otros marcadores microsatélites.

Figura 7. Porcentaje de muestras amplificadas por diferentes métodos de PCR.

Ramphocelus icteronotus



Fuente: Lady Noriega Caballero.

Los dos sistemas de microsatélites bajo estudio fueron identificados inicialmente en *Ramphocelus costaricensis*. Los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente pasantía demuestran que los microsatélites RCAAAG406 y RCAAAG410 (Kruger & Williams, 2006), sirven como marcadores para estudios genéticos poblacionales que se realicen en poblaciones de *R. icteronotus* presentes en el departamento de Santander. González (2009) identificó en poblaciones de *R. icteronotus* del Pacífico colombiano, alelos a partir del uso de los sistemas microsatélites anteriormente referenciados, lo cual es un aspecto importante a favor del planteamiento de una hipótesis que permita explicar la separación reciente de individuos de esta especie que han ido colonizando las regiones del bajo y Medio Magdalena, así como, de la cordillera Oriental (Carreño, 2013).

La no amplificación de los sistemas microsatélites RCAAAG406 y RCAAAG410 en muestras de *R. dimidiatus*, se puede explicar por el origen polifilético presente entre *R. dimidiatus* y *R. costaricensis*, hecho soportado a partir del análisis de secuencias de los genes citocromo b (*cyt b*) y nicotinamida deshidrogenasa subunidad dos (ND2) (Burns & Racicot, 2009), y confirmado en filogenias obtenidas a partir de secuencias de cuatro loci nucleares (un gen y tres intrones) obtenidas por Burns et al., (2014), marcadores útiles al momento de resolver relaciones a niveles más profundos en aves. Lo anterior ayuda a soportar el hecho que no hubo amplificación utilizando marcadores heterólogos en la totalidad de muestras analizadas de *R. dimidiatus*

5. CONCLUSIONES

Los sistemas de microsatélites RCAAAG406 y RCAAAG410 fueron amplificados en muestras de *R. icteronotus*, lo cual posibilita la exploración de la diversidad genética de poblaciones de esta especie que se encuentran por fuera del Chocó biogeográfico, siendo este su rango de distribución histórico.

Los sistemas de microsatélites RCAAAG406 y RCAAAG410 no amplificaron en muestras de *R. dimidiatus*, pese a esto es necesario hacer estudios posteriores para identificar si otros marcadores microsatélites reportados por Krueger & Williams (2006), pueden ser útiles al momento de evaluar la diversidad genética en esta especie de tangara.

En cuanto a los aspectos metodológicos, el incremento del tiempo de extensión final conllevó a garantizar que cerca del 85% de las muestras de *R. icteronotus*, exhibieran productos amplificados.

6. RECOMENDACIONES

Pese a que Krueger & Williams (2006) reportan las mismas condiciones de PCR en términos de tiempos de ciclado, concentración de reactivos, entre otros aspectos técnicos y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la puesta en marcha del proyecto de trabajo de grado de la presente pasantía, los demás sistemas microsatélites que se van a adoptar en el macroproyecto VIE-UIS 1351, deberán ser estandarizados a objeto de definir para cada sistema sus propias particularidades.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Anciaes, M & Marini, M.A. 2000. The effects of fragmentation on fluctuating asymmetry in passerine birds of Brazilian tropical forest. *Journal of Applied Ecology*. 37:1013–1028.
- Aranguren, M., Roman, R., Isea, W., Villasmil, Y., Jordana, Y.J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*. 13: 30-42.
- Archila, J.E. 2014. Estudio de la Diversidad Genética de *Ramphocelus icteronotus* (Aves: Thraupidae) Presente en el Departamento de Santander, Implementando Cebadores Diseñados para el Análisis de la Región Control del ADN Mitocondrial. [Tesis de pregrado]. [Santander (Colombia)]: Universidad Industrial de Santander.
- Bedoya, M.J. 2007. Comparación morfológica y ecológica de las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Aves: Emberizidae: Thraupinae) en el Valle del Cauca. [Tesis de pregrado]. [Valle del Cauca (Colombia)]: Universidad del Valle.
- Boecklen, W. & Howard, D. 1997. Genetic analysis of hybrid zones: number of markers and power of resolution. *Ecology*. 78: 2611-2616.
- Burns, K.J & Racicot, R.A. 2009. Molecular Phylogenetics of a Clade of Lowland Tanagers: Implications for Avian Participation in the Great American Interchange. *The Auk*. 126: 635–648.
- Burns, K.J., Shultz, A.J., Title, P.O., Mason, N.A., Barker, F.K., Klicka, J., Lovette, I.J. 2014. Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 75: 41–77.
- Carreño, M.F. 2013. Evaluación de la diversidad genética en poblaciones de *Ramphocelus dimidiatus* y *Ramphocelus icteronotus* (thraupidae) presentes en el departamento de Santander empleando secuencias del gen *cyt b*. [Tesis de pregrado]. [Santander (Colombia)]: Universidad Industrial de Santander.

Confer, J.L. 2006. Secondary Contact and Introgression of Golden-Winged Warblers (*Vermivora chrysoptera*): Documenting the Mechanism. *The Auk*. 123: 958-961.

Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D., Honeycutt, R.L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*. 14: 214–217.

Eckert, K.A. & Kunkel, T.A. 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Reserach*. 18: 3739–3744.

Gómez, Y.D., Rivera, A., Gómez, J.R., Vargas, N.P. 2008. Inventario preliminar de aves en dos fragmentos de bosque en la cordillera oriental de los Andes colombianos. *Actualidad & Divulgación Científica*. 11: 109–119.

González, F.L. 2009. Caracterización genética de las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Aves: Thraupidae) del Valle del Cauca y Cauca, mediante secuencias de ADN mitocondrial y microsatélites. [Tesis de pregrado]. [Valle del Cauca (Colombia)]: Universidad del Valle.

Hackett, S.J. 1996. Molecular phylogenetic and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 5: 368-382.

Haig, S.M. 1998. Molecular Contributions to Conservation. *Ecology*. 79: 413-425.

Haig, S.M., Bronaugh, W.M., Crowhurst, R.S., D'Elia, J., Eagles-Smith, C., Epps, C.W., Knaus, B., Miller, M.P., Moses, M.L., McCance, S.O., Robinson, W.D., Sidlauskas, B. 2011. Genetic Applications in Avian Conservation. *The Auk*. 205-229.

Harris, E. 1998. A low-cost approach to PCR Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. Oxford University Press. Madison Avenue, New York, Estados Unidos.

Hilty, S.L & Brown, W.L. 1986. A guide to the birds of Colombian. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

Isler, M.L & Isler, P.R. 1999. The Tanagers: Natural history, Distribution, and Identification. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C.

Krueger, T.R. & Williams, D.A. 2006. Microsatellite loci for Cherrie's tanager (*Ramphocelus costaricensis*). *Molecular Ecology Notes*. 6: 853-855.

Loyau, A & Schmeller, D.S. 2009. Polymorphic microsatellites identified by cross-species amplifications in the European Coot *Fulica atra*. *Journal of Ornithology*. 150: 703-707.

Moynihan, M. 1962. Display patterns of tropical American "nine-primaried" songbirds. II. Some species of *Ramphocelus*. *The Auk*. 79: 655-686.

Mcmullan, M., Donegan, T.M., Quevedo, A. 2011. Field guide to the Birds of Colombia. Fundación ProAves. Bogotá, Colombia.

Mcmullan, M & Donegan, T. 2014. Field guide to the Birds of Colombia. 2nd ed. Fundación ProAves. Bogotá, Colombia.

Narina, S. S., d'Orgeix, C.A., Sayre, B.L. 2011. Optimization of PCR conditions to amplify microsatellite loci in the bunchgrass lizard (*Sceloporus slevini*) genomic DNA. *BMC Research Notes*. 4: 26. doi:10.1186/1756-0500-4-26

Franco O. L, Pereira, J L., Costa, P. A. Rocha, T L. , Albuquerque, É V. Grossi-de-Sá , M F. Carneiro, Carneiro & Mehta, A. 2010. Methodological evaluation of 2-de to study root proteomics during nematode infection in cotton and coffee plants. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 40: 152-163.

Olson S.L & Violani C. 1995. Some unusual hybrids of *Ramphocelus* with remarks on Evolution in the Genus (Aves: Thraupinae). *Bolletín Museo Regionale Scienze Naturali Torino*. 13: 297-312.

Rhymer, J.M & Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Ecology and Systematics*. 27: 83-109.

Sánchez-Pérez, R., Ballester, J., Dicenta, F., Arús, P., Martínez-Gómez, P. 2006. Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticulturae*. 108:310-316.

Santos, F.R., Pena, S.D.J., Epplen, J.T. 1993. Genetic and population study of any- linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism. *Human Genetics*. 90: 655 - 656.

Sibley, C.G. 1958. Hybridization in Some Colombian Tanagers, Avian Genus *Ramphocelus*. *Proceedings of the American Philisophical Society*. 102: 448- 453.

Williams, J.F. 1989. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *BioTechniques*. 7: 762–769.