



**ESTANDARIZACION DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS SISTEMAS
MICROSATELITES RCAAAG14 Y As μ 15 EN AVES DEL GENERO
Ramphocelus PRESENTES EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER,
COLOMBIA**

JOSE PABLO CORNEJO BAUTISTA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2016**



**ESTANDARIZACION DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS SISTEMAS
MICROSATELITES RCAAAG14 Y As μ 15 EN AVES DEL GENERO
Ramphocelus PRESENTES EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER,
COLOMBIA**

JOSE PABLO CORNEJO BAUTISTA

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de
BIÓLOGO

Director

FERNANDO RONDÓN GONZÁLEZ

PhD. Ciencias Biología

Codirector

JORGE LUIS FUENTES LORENZO

PhD. Ciencias Agrícolas

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2016

AGRADECIMIENTOS

Como ya sabemos ya sea por experiencia propia o porque no lo ha contado, la elaboración de una tesis es difícil incluso muchos por lo mismo prefieren dejarla para otro momento, ya sea porque falta de tiempo, inspiración, entusiasmo, que el tema de la tesis no lo dominan bien o porque simplemente no es su prioridad.

Pero para los que deciden comenzar con su tesis sabemos que conforme vamos desarrollando se nos van presentando problemas, a veces no necesariamente tienen que ser problemas sobre tu proyecto de investigación si no problemas personales o ajenos, por ejemplo, alguna enfermedad, problemas económicos, sentimentales o que simplemente has llegado a un punto en tu proyecto que no conoces o dominas y toca investigar, estudiar y luego probar una y otra vez hasta que por fin lo dominas.

Así que la vida de estudiante de carrera profesional es difícil y más cuando se encuentra trabajando día y noche tratando de lograr un resultado que muchas veces fue esquivo.

Afortunadamente en la mayoría de los casos no estamos solos y siempre está esa persona que está al pendiente de tu situación, ya sean tus padres, tu familia, tu novia, tus suegros, tus amigos, tu director de tesis, entre muchas otras más.

Martha Cecilia Bautista, mami gracias por el apoyo brindado durante la carrera y mi vida, te quiero mucho.

Trinidad Bautista, la abuela más hermosa que hay en la tierra. Las palabras son pocas, pero el cariño inmenso.



Nathalie Ñañez, la mujer que amo y que amaré, porque contigo aprendí a levantarme muchas veces. Gracias preciosa. Te amo.

Fernando Rondón, profe gracias por la paciencia, conocimientos enseñados y los concejos que siempre tendré presentes. Dios lo bendiga.

Arnulfo Ñañez y **Olga Zuleta**, Gracias por la hospitalidad, cariño y apoyo. Son grandes personas.

Daniel Fernando Calero y compañeros de laboratorio, los cuales fueron excelentes y aportaron de alguna manera a esta tesis.

A cada uno de los integrantes de mi familia, por su cariño, a los Docentes de la carrera de Biología, por el conocimiento brindado y a todos lo que aportaron su granito de arena.

Muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN	16
2. OBJETIVOS DE LA PASANTÍA	17
2.1 OBJETIVO GENERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Área de Estudio	18
3.2 Fase de Campo	19
3.3 FASE DE LABORATORIO	21
3.3.1 Extracción de ADN	21
3.3.2 Amplificación de los sistemas microsatelites	21
3.3.3 Separación y visualización de productos de PCR	22
4. RESULTADOS	23
4.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES EN CAMPO	23
4.2 AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES	24
4.3 VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	25
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES	31
7. RECOMENDACIONES	32

BIBLIOGRAFÍA

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Zonas de muestreos de <i>R. dimidiatus</i> y <i>R. icteronotus</i> en el Departamento de Santander	19
Figura 2. Toma de muestra de sangre a partir de la vena braquial	20
Figura 3. Etiqueta para muestras tomadas	20
Figura 4. <i>Ramphocelus icteronotus</i> (Hembra): A. Vista posterior; B. Vista lateral; C. Vista frontal	23
Figura 5. <i>Ramphocelus dimidiatus</i> : A. Macho; B. Hembra	24
Figura 6. Gel de poliacrilamida de muestras amplificadas con los iniciadores del sistema microsátelite Asp15. C1, C2 y C4: muestras de <i>R. dimidiatus</i> ; C5, C6 y C8 a C10: muestras de <i>R. icteronotus</i> ; C11: Marcador de Peso Molecular de 100pb (Thermo Scientific)	26
Figura 7. Gel de agarosa al 2% de muestras amplificadas con los iniciadores del sistema microsátelite RCAAAG14. C1: Marcador de Peso Molecular de 100pb (Thermo Scientific); C2 a C9: muestras de <i>R. dimidiatus</i> .	27

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cebadores empleados en la amplificación de dos sistemas de microsatélites	21
Tabla 2. Reactivos requeridos para amplificar los sistemas microsatélites RcAAAG14 y Asμ15	22
Tabla 3. Condiciones iniciales de amplificación de los microsatélites RcAAAG14 y Asμ15	22

RESUMEN

Título: ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS SISTEMAS MICROSATÉLITES RCAAAG14 Y AS μ 15 EN AVES DEL GENERO *Ramphocelus* PRESENTES EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER, COLOMBIA*

Autores: JOSÉ PABLO CORNEJO BAUTISTA**

Palabras claves: PCR, Poliacrilamida, temperatura de hibridación, MgCl₂.

Descripción:

La biología molecular y las herramientas estadísticas permiten la posibilidad de identificar y utilizar la variación genómica, la cual puede explorarse a partir del uso de marcadores moleculares tipo microsatélites dado el elevado nivel de polimorfismo que estos detectan. El genotipado de estos marcadores ayuda a cuantificar la diversidad genética y a definir el grado de subdivisión presente en poblaciones de organismos, entre otros aspectos. El objetivo de la presente pasantía de trabajo de grado fue estandarizar la amplificación mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los microsatélites RCAAAG14 y AS μ 15 en dos especies de Aves del género *Ramphocelus* (*Ramphocelus icteronotus* y *R. dimidiatus*), presentes en el departamento de Santander (Colombia). Estos marcadores fueron caracterizados originalmente en *Ramphocelus costaricensis* (RCAAAG14) y *Ammodramus savannarum* (AS μ 15) y han sido utilizados para estudiar la diversidad genética de especies simpátricas de *Ramphocelus* en otras regiones de Colombia. Los dos marcadores amplificaron en muestras de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*. Se concluye que los productos de PCR de ambos sistemas estuvieron mejor definidos con 2,5mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de cebadores, 0,2U de Taq DNA polimerasa, 52°C de temperatura de hibridación y 10 minutos de extensión final a 72°C.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón González

ABSTRACT

Title: STANDARDIZATION OF THE AMPLIFICATION BY PCR OF THE MICROSATELLITES SYSTEMS RCAAAG14 AND A μ 15 IN BIRDS OF THE *Ramphocelus* GENUS LOCATED IN COLOMBIA'S SANTANDER DEPARTMENT*

Authors: JOSE PABLO CORNEJO BAUTISTA**

Key words: PCR, polyacrylamide hybridization temperature, MgCl₂.

Description:

Molecular biology and statistical tools allow the possibility of identifying and utilizing the genomic variation, which can be explored by the use of microsatellite-type molecular markers, given the elevated level of polymorphism that these detect. The genotyping of this markers help quantify the genetic diversity and to define the subdivision grade present in organism populations, among other aspects. The objective of the present internship was to standardize the amplification via the chain-reaction use of the RCAAAG14 and A μ 15 microsatellites Polymerase (PCR) in two species of birds of the *Ramphocelus* genus (*Ramphocelus icteronotus* y *R. dimidiatus*), located in Colombia's Santander department. This marker was originally characterized in *Ramphocelus costaricensis* (RCAAAG14) and *Ammodramus savannarum* (A μ 15) and have been used for studying the sympatric species of *Ramphocelus* genetic diversity in other regions of Colombia. The two markers increasingly amplified in *R. icteronotus* and *R. dimidiatus* samples. It is concluded that the PCR products of both systems were better defined using these parameters: 2,5mM of MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de cebadores, 0,2U de Taq DNA polymerase, 52°C hybridization temperature; 10 minutes of final extension at 72°C.

* Degree work, Research internship

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

INTRODUCCIÓN

Actividades humanas tales como la destrucción del hábitat y fragmentación de los bosques, han influido en la distribución, estructura y la diversidad genética de la fauna natural durante los últimos años (Frankham, 1998; Saccheri et al., 1998; Lee et al., 2015), siendo considerada la razón principal de la extinción de numerosas especies de aves (Anciaes & Marini, 2000).

Según Medina et al., (2007) en el territorio colombiano se han estimado unas 1.800 especies de aves aproximadamente, las cuales equivalen al 20% del total de las registradas para todo el mundo ocupando así, el primer lugar en riqueza de las mismas (Hilty & Brown, 2001). Dentro del orden Passeriformes que comprende el 60% de todas las aves actuales (Machado & Peña, 2000), las tangaras, pertenecientes a la familia Thraupidae, son las más abundantes en el neotrópico (Skutch, 1989; Isler e Isler, 1999). Dentro de este grupo se encuentra el género *Ramphocelus*, del cual en Colombia se han registrado poblaciones de cinco especies, a saber: *R. flammigerus*, *R. nigrogularis*, *R. dimidiatus*, *R. carbo* y *R. icteronotus* (Hilty & Brown, 1986).

Ramphocelus dimidiatus es una especie que habita claros con matorrales, áreas cultivadas y bordes de selva (Hilty & Brown, 1986). Su rango de distribución en Colombia comprende la vertiente oriental de los Andes Orientales en Norte de Santander, zonas tropicales y subtropicales bajas al oeste de los Andes orientales exceptuando el valle del alto Magdalena y Nariño (Meyer de Schauensee, 1951). *Rhamphocelus icteronotus*, por su parte, habita matorrales, bordes de bosque espeso, claros, pastos, arbustos y su distribución va por toda la costa del pacífico, al este, a través del Atrato y los valles del alto Sinú y bajo Cauca (Meyer de Schauensee, 1951), además en algunas zonas del valle del Magdalena medio (McMullan et al., 2011).

En el departamento de Santander, se han reportado a *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* coexistiendo simpátricamente (McMullan et al., 2011; obs per), posiblemente como consecuencia de la ampliación de la frontera agrícola, ganadera y minera (obs per). Según Carreño (2013) el deterioro gradual del hábitat natural de *R. dimidiatus* podría conducir, a la ampliación del rango de distribución de *R. icteronotus*. Esta situación puede conllevar a contacto secundario, fenómeno que implicaría la reducción del tamaño de las poblaciones y de la diversidad genética (Confer, 2006) de *R. dimidiatus*, por ser la especie residente en Santander, a pesar de la tolerancia mutua general (Confer & Pascoe, 2003) que se pueda presentar entre las dos especies.

Los avances en biología molecular han producido técnicas que permiten examinar la variación genética intra e inter poblacional (Haig, 1998; Aranguren et al., 2005), dado que a medida que las poblaciones divergen, los individuos comienzan a acumular cambios genéticos que eventualmente las caracterizarán (Boecklen & Howard, 1997; Rhymer & Simberloff, 1996; Bedoya & Murillo, 2012). Estos cambios son registrados en el genoma y pueden ser analizados a partir de tipificar marcadores moleculares de naturaleza neutral como los microsatélites (Yinhua et al., 2005), útiles al momento de establecer la cantidad de divergencia, el nivel de diferenciación genética (Loyau & Schmeller, 2009), examinar relaciones entre poblaciones de diferentes especies de aves (Haig et al., 2011), entre otros aspectos.

Teniendo en cuenta el evidente comportamiento invasor de *R. icteronotus* en el departamento de Santander, además del hecho que se requiere el uso de marcadores que permitan acceder al estudio de la variación genética de poblaciones de Aves, esta 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. Para esto se buscó estandarizar la amplificación por PCR de los sistemas de marcadores

microsatélites RcAAAG14, aislado de *Ramphocelus costaricensis* (Krueger & Williams, 2006), y Asμ15, aislado de *Ammodramus savannarum* (Bulgin et al., 2003). Estos sistemas STR's han sido utilizados en estudios de diversidad genética de poblaciones de *R. flammigerus* y *R. icteronotus* de la cordillera occidental y el pacífico colombiano (Ocampo, 2008).

La ejecución de la presente pasantía de investigación hace parte de los objetivos propuestos en el marco del proyecto VIE-UIS 1351, el cual está dirigido a establecer la diversidad y la estructura genética de dos especies de Aves del género *Ramphocelus* en el departamento de Santander.

1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN

La pasantía estuvo dirigida a estandarizar en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación (LGPC-UIS), adscrito a la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander, dos sistemas de marcadores microsatélites los cuales pueden ser útiles en estudios genéticos poblacionales de Aves del género *Ramphocelus*.

Al concluir la pasantía el estudiante:

1. Identifica en campo los individuos de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*.
2. Extrae ADN a partir de muestras sanguíneas de individuos de las especies consideradas en el estudio.
3. Amplifica segmentos de ADN que contienen microsatélites dirigidos al estudio de la genética poblacional en las especies consideradas.
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. OBJETIVOS DE LA PASANTÍA

2.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar el uso de marcadores moleculares microsatélites dirigido a estudios genético poblacionales de Aves en el LGPC-UIS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Estandarizar los sistemas microsatélites RcAAAG14 y As μ 15 en muestras de *Ramphocelus icteronotus* y *R. dimidiatus* del departamento de Santander, Colombia.
- ❖ Establecer las condiciones de separación del polimorfismo que se detecte en los sistemas microsatelites RcAAAG14 y As μ 15 a partir del uso de matrices de poliacrilamida.

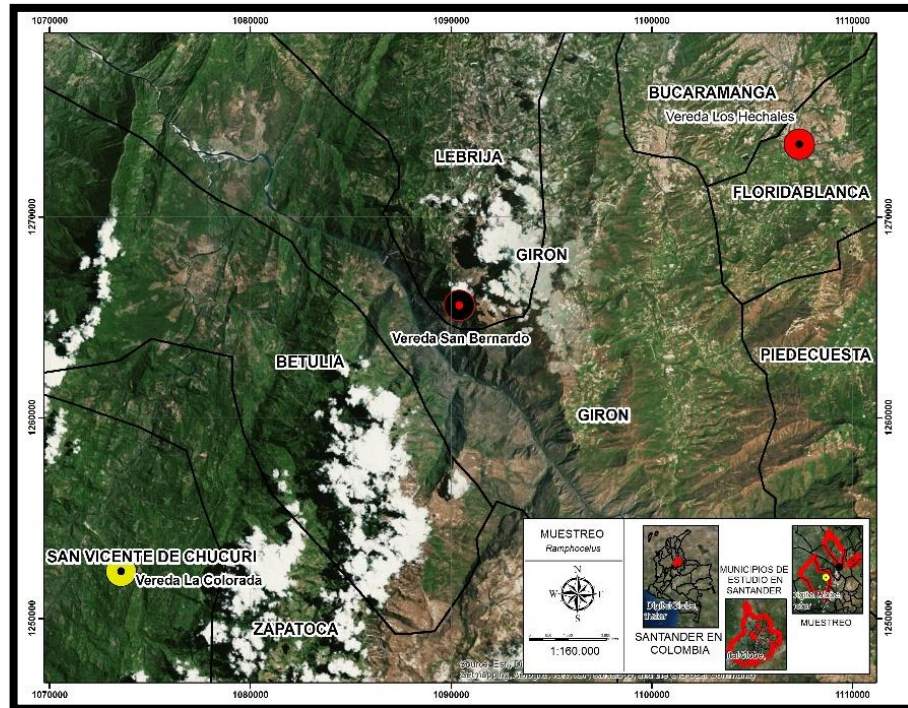
3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de grado, en modalidad pasantía de investigación, hace parte del macroproyecto: “Diversidad y estructura genética de poblaciones de dos especies de aves del género *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), registrado bajo el código VIE-UIS 1351.

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras fueron obtenidas en el marco del proyecto VIE-UIS 5188 en el cual se realizaron los primeros estudios de diversidad genética en poblaciones simpátricas de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* presentes en el departamento de Santander (Carreño, 2013; Archila, 2014). Las zonas de los muestreos se encuentran en el costado occidental de la cordillera Oriental (Figura 1) y fueron escogidas por que en ellas se ha avistado *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* coexistiendo simpátricamente, las mismas se encuentran reportadas en el informe final de los trabajos de grado de Carreño (2013), Archila (2014) y Noriega (2015).

Figura 1. Zonas de muestreos de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* en el Departamento de Santander



3.2 FASE DE CAMPO

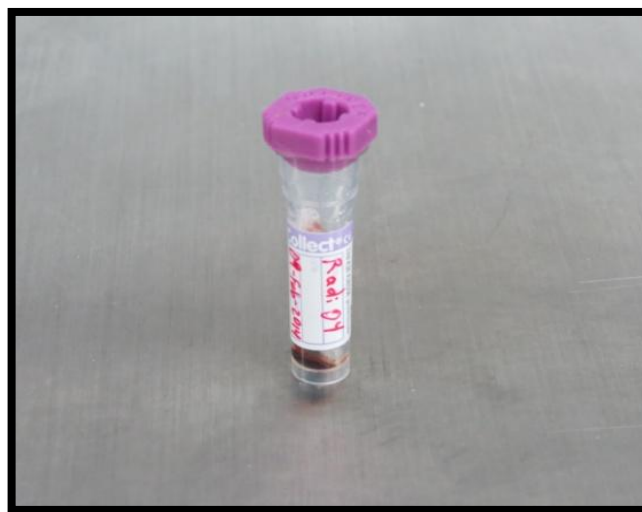
Se utilizaron en total seis redes de niebla con dimensiones de 12m de largo x 3m de ancho y cinco de 9m de largo x 3m de ancho, todas con ojo de malla de 20 mm. Las redes se ubicaron en ecotonos de bosque, zonas de rastrojo, entre otros y permanecieron abiertas entre las 5:00 y las 17:00 horas. Los especímenes capturados fueron mantenidos en bolsas de tela para posteriormente tomar datos morfométricos, muestras de sangre y fotografías. En la toma de sangre se utilizaron jeringas de 1mL. De cada ave se extrajo 50 μ L de sangre a partir de la vena braquial (Figura 2).

Figura 2. Toma de muestra de sangre a partir de la vena braquial



Se utilizaron tubos de 1,5mL con EDTA 0,05M para almacenar cada muestra, también se destinó una gota de sangre para depositarla en una tarjeta estéril. Las muestras se etiquetaron con las iniciales del género, epíteto específico y su respectivo número de captura (Figura 3).

Figura 3. Etiqueta para muestras tomadas



Cada individuo capturado fue anillado en el tarso izquierdo para evitar obtener muestras a partir de recapturas. El almacenamiento de las muestras se realizó en frío, para luego ser procesadas en LGPC-UIS.

3.3 FASE DE LABORATORIO

3.3.1 Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó con el Kit DNeasy Blood & Tissue™ (Qiagen, Maryland), utilizando 5 a 15 µl de sangre y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó modificación propia del laboratorio consistente en ampliar el período de incubación a objeto de obtener una concentración de 40ng/µl de ADN. Para verificar el éxito de la extracción, se corrió 1µl del ADN extraído en geles de agarosa al 1% teñido con EZvision (Amresco).

3.3.2 Amplificación de los sistemas microsatélites. En la amplificación de los sistemas microsatélites considerados se utilizaron los cebadores descritos por Krueger & Williams (2006) (Tabla 1).

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

Cebadores	Secuencias
RcAAAG14	Forward: 5' AAAGGACCAGAGAAAAAGAGAA 3'
	Reverse: 5' TCAGAACTGCTAAATCAAAGTGT 3'
Asµ15	Forward: 5' AATAGATTCAGGTGCTTTTTTC 3'
	Reverse: 5' TAGCACATGTTGGTTTTTG 3'

La estandarización de la PCR de cada sistema se inició a partir de los reactivos (Tabla 2) y condiciones de amplificación descritos por Krueger & Williams (2006) y Ocampo (2008) (Tabla 3).

Tabla 2. Reactivos requeridos para amplificar los sistemas microsátélites RcAAAG14 y Asp15

Reactivos	Concentración	
	Krueger & Williams (2006)	Ocampo (2008)
PCR Buffer	1X	1X
MgCl ₂	No reportado	2mM
dNTP´s	200µM	200mM
Cebadores	0,5µM	0,5mM
Taq	0,2U	0,2U
ADN	50ng/µL	Variable

Tabla 3. Condiciones iniciales de amplificación de los microsátélites RcAAAG14 y Asp15

PCR	Krueguer & Williams (2006)	Ocampo (2008)
Desnaturalización	94oC x 2 min	94oC x 2 min
Desnaturalización	94oC x 10s	94oC x 10s
Hibridación	50 oC x 10s	55oC x 10s
Extensión	72 oC x 20s	72 oC x 20s
Extensión final	72 oC x 5 min	72 oC x 5 min

* Reporta 30 ciclos de PCR.

3.3.3 Separación y visualización de productos de PCR. Para visualizar los productos amplificados, estos fueron separados en matrices de poliacrilamida 19:1 al 7%. La tinción de los geles se realizó con AgNO₃ siguiendo el protocolo propuesto por Santos et al. (1993) y modificaciones propias del laboratorio sugeridas por Noriega (2015).

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES EN CAMPO

El avistamiento de las especies de Aves *Ramphocelus icteronotus* y *R. dimidiatus*, se llevó a cabo con el uso de binoculares (Bushnell Legend), teniendo presente las características fenotípicas de los animales descritas por Hilty & Brown (1986).

La coloración de las hembras de *Ramphocelus icteronotus* está dentro del rango de amarillo y marrón ocre, con pico perlado azul (Figura 4) al igual que los machos. Estos últimos son negros con plumaje color amarillo limón en la rabadilla (Hilty & Brown, 1986).

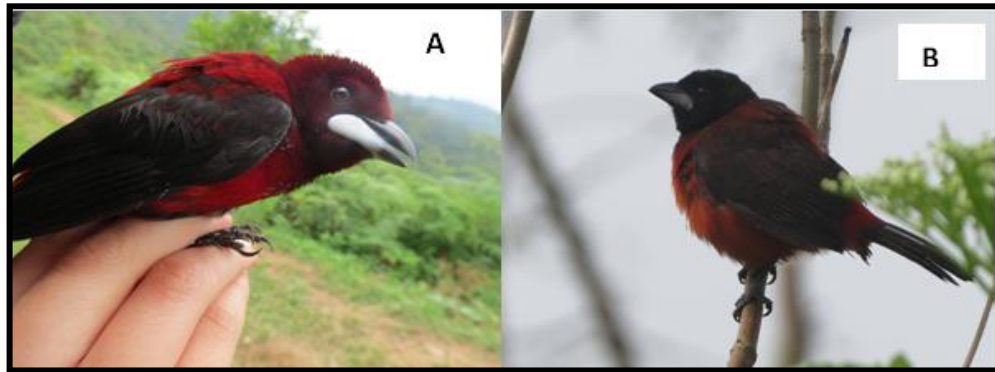
Figura 4. *Ramphocelus icteronotus* (Hembra): A. Vista posterior; B. Vista lateral; C. Vista frontal



Para el caso de *Ramphocelus dimidiatus*, los machos presentan coloración rojo escarlata en la mayor parte del cuerpo, excepto en las alas y la cola, las cuales son negras, su pico es plateado mientras que en las hembras es diferente (Figura 5). El color del plumaje de estas últimas es negro y presenta un tono rojo menos

intenso (Hilty & Brown, 1986), característica que también se observa en los individuos juveniles.

Figura 5. *Ramphocelus dimidiatus*: A. Macho; B. Hembra



4.2 AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES

La estandarización de los sistemas microsatélites RCAAAG14 y As μ 15 se llevó a cabo a partir de los reactivos y condiciones reportados por Kruger & Williams (2006) (Tablas 2 y 3).

En la presente pasantía se determinó para un volumen final de 20 μ L de reacción por individuo: 30ng/ μ L de ADN, 1X de buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de cebadores y 0,2U de Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific).

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador AB 2720 (Applied Biosystems) y se determinaron los siguientes parámetros: 94°C por 2min, seguido por 30 ciclos de 15s a 94°C, 15s a 52°C y 30s a 72°C y una extensión final a 72°C por 10min.

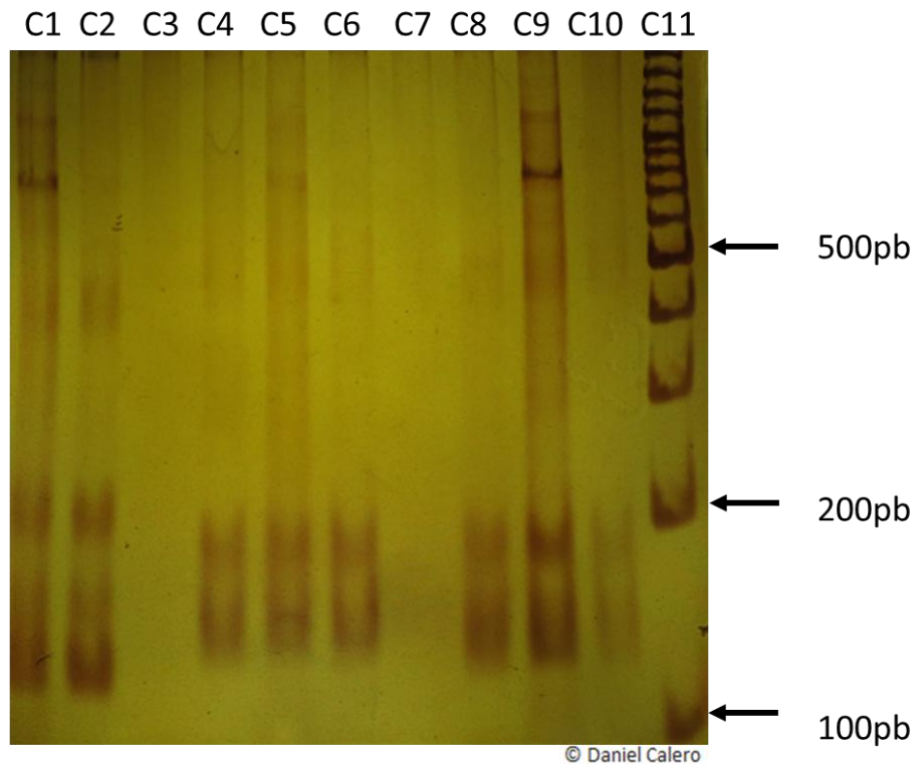
Los sistemas STR's RCAAAG14 y As μ 15 pese a ser heterólogos, amplificaron en 28/30 muestras de *R. icteronotus* y en 25/30 muestras de *R. dimidiatus*, lo cual corresponde al 88,33% del total de las muestras consideradas y en el caso particular de *R. icteronotus*, el 93,33%.

4.3 VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Mediante el uso electroforesis vertical realizada en geles de poliacrilamida al 30%, concentración 19:1 (Acrilamida:Bisacrilamida), se separaron los productos de PCR a partir de 6 μ l del amplificado junto con 3 μ l de Buffer de corrida 2X. Dado el tamaño de las cámaras (7,5cm de ancho, 10cm de alto y 0,09cm de grosor), en todos los casos se llevó a cabo precorrida a 40V, 94mA y 15W por 15min y la corrida se realizó a 60V, 150mA y 60W por 90min. Finalmente los geles fueron teñidos siguiendo a Santos et al., (1993). Básicamente los geles son puestos en una solución fijadora de etanol absoluto y ácido acético durante 20min, luego en una solución de tinción basada en nitrato de plata por 20min y se revelan en una solución de hidróxido de sodio y formaldehído al 37% por 20 min.

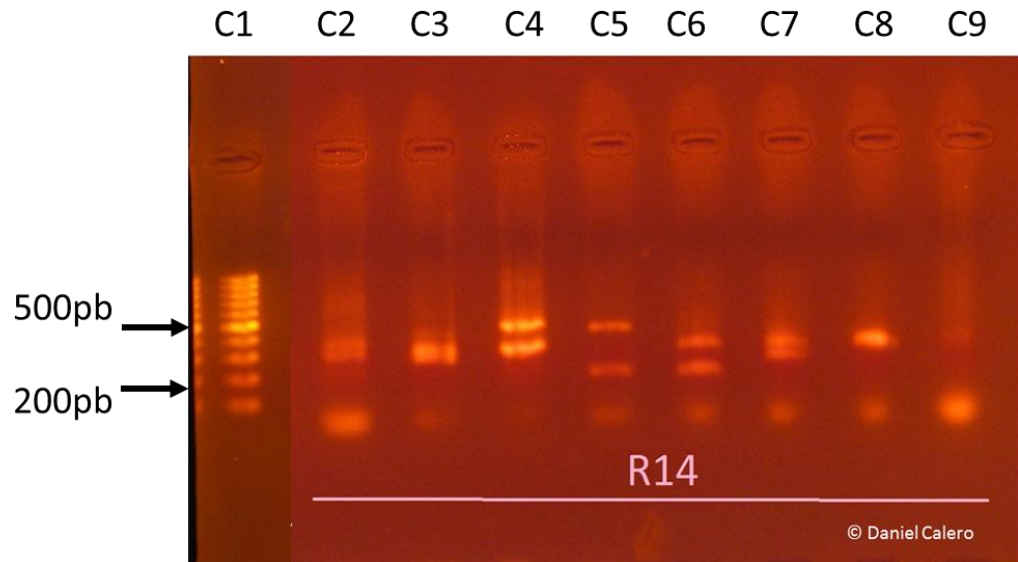
Según Krueger & Williams (2006) el sistema As μ 15 presenta un rango alélico entre 111 y 149pb. El producto amplificado en las dos especies consideradas en el presente estudio, se ubicó en el rango comprendido entre 100 y 200pb (Figura 6).

Figura 6. Gel de poliacrilamida de muestras amplificadas con los iniciadores del sistema microsatélite Asp15. C1, C2 y C4: muestras de *R. dimidiatus*; C5, C6 y C8 a C10: muestras de *R. icteronotus*; C11: Marcador de Peso Molecular de 100pb (Thermo Scientific)



Todas las muestras de las dos especies que amplificaron para el sistema microsatélite RCAAAG14, exhibieron producto de PCR en el rango comprendido entre 200 y 350pb (Figura 7). Respecto a dicho sistema, Krueger & Williams (2006) habían reportado un rango alélico en *R. costaricensis* entre 190 y 355pb.

Figura 7. Gel de agarosa al 2% de muestras amplificadas con los iniciadores del sistema microsatélite RcAAAG14. C1: Marcador de Peso Molecular de 100pb (Thermo Scientific); C2 a C9: muestras de *R. dimidiatus*.



5. DISCUSIÓN

Para obtener una reacción óptima de PCR se deben tener en cuenta factores como la concentración de $MgCl_2$, esta, según Castro (2005), debe encontrarse entre 1,5mM a 4,5mM. En el desarrollo de la presente pasantía de investigación se determinó que los productos de PCR para los dos marcadores microsátélites estudiados, estuvieron mejor resueltos cuando la concentración de $MgCl_2$ fue de 2,5mM. Este resultado es idéntico a lo obtenido por Noriega (2015) (Figura 6) y difiere de lo reportado por los autores en los que se basó la estandarización inicial (Tabla 2). Dado el hecho que la concentración de $MgCl_2$ hallada fue diferencial, esto se puede dar debido a que el ión Mg^{+2} es un cofactor esencial para la ADN polimerasa y por tanto su concentración debe ser optimizada para cada iniciador por separado (Avisé, 1994).

En cuanto a la concentración de dNTPs y cebadores, se encontró que los valores de concentración de estos compuestos de la PCR fueron similares a los propuestos por Krueger & Williams (2006) y difieren de lo reportado por Ocampo (2008). Estos componentes de la reacción se unen al ión Mg^{+2} y el principal aglutinante o secuestrador del mismo la alta concentración de nucleótidos, por lo que la concentración total del ión Mg^{+2} debe exceder la concentración total de dNTPs (Avisé, 1994), aspecto que se tuvo en cuenta en la estandarización.

Un resultado relevante de la pasantía fue estandarizar la reacción de PCR cuando la temperatura de hibridación de los cebadores fue de 52°C en ambos sistemas estudiados. Este resultado difiere de los hallados por Krueger & Williams (2006) y Ocampo (2008), sin embargo se encuentra en el rango de valores de dicha temperatura establecida por ellos (50°C - 55°C, Tabla 3). El incremento de la temperatura de hibridación permite aumentar la astringencia de la reacción (Málaga, 2010), además favorece la especificidad porque disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde (Peirson et al., 2003).

En la estandarización de la PCR de ambos sistemas, se encontró que se obtenían mejores productos de PCR cuando se incrementó la extensión final a 10 minutos. El incremento del tiempo en este paso de la PCR permite que se terminen de polimerizar todos los fragmentos que puedan haber quedado incompletos (Díaz et al., 2014) y mejora la sensibilidad de los productos de PCR (Narina, 2011), lo cual se evidencia en bandas visualizadas con grosor óptimo para diferenciar alelos en los individuos (Figuras 6 y 7).

Noriega (2015) recomendó que para visualizar los productos amplificados por PCR para sistemas microsátelites en LGPC-UIS, se debía optimizar, según el caso, el uso de matrices de poliacrilamida. En el desarrollo de la presente pasantía se siguió dicha recomendación, pese a esto productos amplificados del sistema RcAAAG14 se pudieron apreciar en matrices de agarosa al 2% (Figura 7) de forma confirmatoria, dado que este tipo de matrices no separan adecuadamente perfiles alélicos que evidencien valores muy próximos en su peso molecular (Sánchez et al., 2014).

A pesar que RcAAAG14 y Asp15 son sistemas microsátelites heterólogos, en la presente pasantía se obtuvo productos amplificados en el 93,33% de las muestras de *R. icteronotus* y en el 83,33% de las muestras de *R. dimidiatus*. Este resultado se puede explicar por qué las zonas flanqueantes de los cebadores se encuentran conservadas entre especies filogenéticamente relacionadas (Hancock, 1999). Cabe resaltar que la estrategia de amplificación cruzada no es la única alternativa, se puede optar también por construir librerías genómicas especie específicas, sin embargo la clonación de las mismas requiere experiencia importante además de tiempo y dinero (Castro, 2005).

Otro hecho relevante que se deduce a partir de los resultados obtenidos es que estos marcadores pueden ser utilizados en el estudio encaminado a estimar la diversidad e identificar la estructura genética de poblaciones de las especies

consideradas. Ocampo (2008) había mostrado el uso de estos marcadores en el estudio de la diversidad genética en poblaciones de *R. flammigerus* y de *R. icteronotus* presentes en la cordillera occidental y el pacífico colombiano, encontrando valores de heterocigosidad promedio superiores a 0,95 y diversidad alélica importante, especialmente en *R. icteronotus*.

6. CONCLUSIONES

- En la estandarización de los marcadores microsatélites RCAAAG14 y Asμ15 en muestras de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* se determinó que la concentración de MgCl₂ debe ser superior a la de los dNTP's. El valor de concentración en donde se aprecian mejores productos amplificados equivale a 2,5mM de MgCl₂.
- Los microsatelites RCAAAG14 y Asμ15, pese a ser heterólogos, amplificaron en un 86% en promedio de las muestras de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*, potenciando el uso de estos marcadores en estudios que permitan dilucidar preguntas relacionadas con la diversidad y la estructura genética de poblaciones de estas especies de Aves.

7. RECOMENDACIONES

Los marcadores microsatélites estandarizados en el desarrollo de la presente pasantía de investigación, exhibieron productos de PCR en las dos especies consideradas. En la separación de dichos productos se utilizaron matrices de agarosa y de poliacrilamida, siendo esta última más resolutive. Pese a esto la identificación de alelos puede ser problemática sino se cuenta con escaleras alélicas propias de cada especie. En el sentido expuesto se recomienda realizar la estandarización de escaleras alélicas de cada marcador microsatélite a utilizar en el estudio de la diversidad genética de las especies de Aves consideradas en el macroproyecto VIE-UIS 1351.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Ancaes, 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.
- ❖ Avise J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman y Hall. New York, Estados Unidos de América.
- ❖ Bedoya, M. J., & Murillo, O. E. 2012. Evidencia morfológica de hibridación entre las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Passeriformes: Thraupidae) en Colombia. *Rev. Biol. Trop*, 60(1), 75-85.
- ❖ Boecklen, W. & Howard, D. 1997. Genetic analysis of hybrid zones: number of markers and power of resolution. *Ecology*. 78: 2611-2616.
- ❖ Bulgin, N. L., Gibbs, H. L., Vickery, P., & Baker, A. J. 2003. Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct

populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). *Molecular Ecology*, 12(4), 831-844.

- ❖ 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.
- ❖ Castro, J. E. Z. 2005. Manual de técnicas básicas de Biología Molecular (Vol. 7). UADY.
- ❖ Confer, J.L. & M. Pascoe. 2003. Avian communities on utility rights-of-ways and other managed shrublands in the northeastern United States. *Forest Ecology and Management* 185:193–205.
- ❖ Confer, J.L. 2006. Secondary Contact and Introgression of Golden-Winged Warblers (*Vermivora chrysoptera*): Documenting the Mechanism. *The Auk*. 123: 958-961.
- ❖ Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., & Palacios, E. S. 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 53.
- ❖ Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: island populations. *Conserv Biol* 12:665–675.
- ❖ 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.

- ❖ Hancock, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. 1999. In "Microsatellites: Evolution and Applications" (D.B. Goldstein & C. Schlotterer, eds) (Oxford University Press) pp.1-9.

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

- ❖ Hilty, S. & B. WILLIAM. 2001. Guía de Aves de Colombia. Princeton University Press, 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.

- ❖ Lee, Y. S., Markov, N., Voloshina, I., Argunov, A., Bayarlkhagva, D., Oh, J. G., & Kim, K. S. 2015. Genetic diversity and genetic structure of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) populations from Asia. *BMC Genetics*, 16:100. doi:10.1186/s12863-015-0244-6.

- ❖ 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.

- ❖ Machado M., Peña G., 2000. Estructura numérica de la comunidad de aves del orden passeriformes en dos bosques con diferentes grados de intervención antrópica en los corregimientos de Salero y San Francisco de Icho, Tesis de pregrado Chocó- Colombia, U.T.CH, Facultad de Ciencias Básicas.
- ❖ Málaga, B. D. E. R. 2010. Evaluación de marcadores moleculares ILPs y STRs heterólogos en *Engraulis ringens*.
- ❖ Medina, O. R., Torres, I. H. G., & Mosquera, J. T. R. 2007. Inventario de aves Passeriformes en áreas de expansión urbana en el municipio de Quibdó, Chocó, Colombia: Orfelina Ríos Medina. Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó, 26(1), 79-89.
- ❖ 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
- ❖ Noriega, L. 2015. Estandarización del genotipado de marcadores moleculares microsatélites para estudios poblacionales de aves del genero *Ramphocelus* en el departamento de santander, Colombia. [Tesis de pregrado]. [Santander (Colombia)]: Universidad Industrial de Santander.

- ❖ Ocampo, I.C. 2008. Caracterización de dos subespecies de *Ramphocelus flammigerus* a partir de marcadores moleculares microsatélites [Tesis de pregrado]. [Cali (Colombia)]: Universidad del Valle. p. 51.

- ❖ Peirson S. N., J. N. Butler y R. G. Foster. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research* 31: e73.

- ❖ 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. doi: 10.1016/j.scienta.2006.02.004

- ❖ Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanskil. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392:491–494

- ❖ 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.

- ❖ Meyer de Schauensee, R. 1951. The birds of the Republic of Colombia. *Caldasia*. Vol V 25: 873-1112.

- ❖ Skutch AF. 1989. *Life of the Tanager*. Cornell University Press, Ithaca, NY.

- ❖ Yinhua, H., Jianfeng, T., Xuebo, C., Bo, T., Xiaoxiang, H., Zhaoliang, L., & Yulong, Z. 2005. Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. *Genet. Sel. Evol*, 37, 455-472.