

NOMBRE DEL PROYECTO.

Utilización de marcadores moleculares para identificación, caracterización genética y actualización del mapa filogeográfico de la Mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* (Wide)).

ZONA GEOGRÁFICA DE EJECUCIÓN.

El proyecto de ejecutará en el Centro de Biotecnología de la Universidad Iberoamericana de Ciencia y Tecnología, localizada en la ciudad de Santiago, Región Metropolitana.

INSTITUCIONES RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN.

AGENTE POSTULANTE. RESPONSABLE DEL PROYECTO:

NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA

RESUMEN DE COSTOS Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO (\$).

COSTO TOTAL	\$272.800.000.-	100%
APORTE FONDO	\$177.277.000.-	65%
APORTE POSTULANTE	\$95.523.000.-	35%

FECHA DE INICIO Y DURACIÓN DEL PROYECTO (EN MESES).

FECHA DE INICIO	31-MARZO-2008
FECHA DE TÉRMINO	31-MARZO-2011
DURACIÓN DEL PROYECTO (MESES)	36 MESES

PROPÓSITO, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Objetivo General:

Utilizar marcadores moleculares para la identificación, distribución filogeográfica y articulación de una red internacional de investigación en la genética de la Mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* (Wide)).

Objetivos Específicos:

1. Seleccionar y aplicar marcadores moleculares del tipo microsatélites e ISSR para desarrollar estudios genéticos en *Ceratitis capitata*.
2. Determinar aquellos genotipos y haplotipos de *Ceratitis capitata* que ingresan al territorio nacional.
3. Elaborar un mapa filogeográfico de *Ceratitis capitata* de la región
4. Determinar orígenes probables y regiones de riesgo de ingresos de *Ceratitis capitata*.
5. Desarrollar nuevos marcadores moleculares basados en PCR de tipo ISSR y SSR (microsatélites).
6. Articular un red internacional de cooperación en investigación entre laboratorios y Centros destinados a la actualización de un mapa genético de *Ceratitis capitata*.

RESULTADOS ESPERADOS AL FINALIZAR EL PROYECTO.

- Set de marcadores de microsatélites para caracterizar genéticamente (genotipificar) a *Ceratitis capitata*.
- Determinación de genotipos prevalentes en la región en base a la utilización de los marcadores moleculares seleccionados.
- Patrones de distribución de la plaga en el subcontinente (mapa filogeográfico) analizados mediante el uso de los marcadores moleculares seleccionados.
- Selección de marcadores del tipo ISSR para ser usados en *Ceratitis capitata*
- 50 nuevos marcadores de microsatélite específicos de *Ceratitis capitata*
- Generación de una Red de Colaboración Internacional tendiente a desarrollar y saturar el mapa genético de *Ceratitis capitata*.

BENEFICIOS DEL PROYECTO.

- La generación de herramientas moleculares y mayor conocimiento de los genotipos y la filogeografía de *Ceratitis capitata* en la región, permitirá determinar posibles vías de ingreso a nuestro territorio de la mosca del Mediterráneo, permitiendo reforzar los niveles de control en dichas regiones. Disminuyendo los riesgos y trabas cuarentenarias que imponen importantes mercados mundiales como América del Norte y Asia Pacífico a las exportaciones frutícolas.
- La articulación de una Red Internacional de Cooperación en Investigación entre centros de investigación y laboratorios relacionados con la investigación genética de *Ceratitis*

capitata, permitirá elaborar estrategias de estudio continuo mas allá del desarrollo de este proyecto que conduzca a la obtención de un mapa genético de la especie, con las consiguientes ventajas y posibilidades que ello conlleva.

BENEFICIARIOS(AS) DIRECTOS(AS) DEL PROYECTO

- Todo el país, porque se refuerza la imagen país a nivel de mercados extranjeros.
- Los productores y exportadores de fruta, porque ven disminuido los riesgos de tener eventos cuarentenarios producto de la aparición de brotes de la mosca del Mediterráneo.
- El Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, porque podrá contar con herramientas moleculares objetivas, muy poderosas y científicamente aprobadas por el medio científico mundial, que le permitirá reforzar sus estrategias de control y acentuar aquellos programas en regiones o áreas de mayor riesgo. Trayendo el concomitante mejor distribución de recursos económicos que para este tipo de servicios siempre resulta ser escaso.

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LA METODOLOGÍA

RECOLECCION DE MUESTRAS:

- Individuos adultos de *Ceratitis capitata* serán capturadas haciendo uso de los sistemas de trampas que forman parte del sistema normal de vigilancia que el SAG mantiene a lo largo del territorio nacional, como detección oportuna de eventuales ingresos de la plaga, (eventualmente se conseguirán muestras extranjeras). Se analizarán 20 individuos de cada población, 10 machos y 10 hembras. Los ejemplares serán preservados en etanol, para realizar con posterioridad la extracción del DNA, de acuerdo a métodos descritos basados en el uso de CTAB (Shahjahan et al. 1995).

EXTRACCION DE DNA GENOMICO

- El aislamiento y purificación de DNA se llevará a cabo según el método de Reyes y colaboradores 1997, con ligeras modificaciones. Para ello se extraerá el DNA total de individuos completos, que se utilizará para la amplificación del DNA utilizando las diferentes técnicas requeridas en el trabajo. El protocolo de extracción se basa en el uso de un buffer que contiene sacarosa (0,2M), Tris-HCl pH 8,5 (100 mM), EDTA (50mM) y SDS (0,5%), con el cual se homogenizará el tejido. La solución será incubada a 65°C durante media hora, para romper las membranas celulares. Posteriormente se añadirá acetato de potasio 3M (pH 5,2) con agitación y se mantendrá durante 10 minutos a -20°C, permitiendo la precipitación de las proteínas y los polisacáridos a bajas temperaturas.
- A continuación se centrifugará durante 20 minutos a 14.000 rpm y 4°C. Se recolectará el sobrenadante realizando una extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugará durante 5 minutos a 13.000 rpm. Se centrifugará por 5 minutos a 13.000 rpm y se recogerá la fase superior. Se precipitará el DNA añadiendo un volumen de isopropanol y se incubará toda la noche a -20°C. Tras lo cual se centrifugaba la solución durante 20 minutos a 13.000 rpm y 4°C para obtener el pellet de DNA, que se lava con etanol 70% para eliminar las sales. Se centrifuga durante 5 minutos a 13.000 rpm y 4°C, y el precipitado obtenido se

dejaba secar al aire. A continuación se resuspende el DNA extraído en buffer TE los son tratados con RNAsa. El DNA se recupera nuevamente realizando el repitiendo el procesos de precipitación con etanol. Finalmente el DNA purificado es resuspendido en 50µl de buffer TE y guardado a -20°C. Para evaluar el estado y la concentración del DNA, este se somete a un análisis electroforético en un gel de agarosa al 0,8% (Sambrook et al., 1989). En tanto que la determinación de la concentración se llevaba a cabo por medios espectrofotométricos.

PREPARACION DE DNA MITOCONDRIAL

- El DNA mitocondrial será aislado usando el método descrito por Alfonso y colaboradores (1988), con algunas modificaciones con el objetivo de aumentar el rendimiento y calidad del DNA mitocondrial extraído.

MARCADORES MOLECULARES

- Se utilizaran dos tipos de marcadores moleculares, un grupo de marcadores nucleares (microsatélites e ISSR) que entregan información completa del genoma de Ceratitis y un marcador mitocondrial que entregará información sobre procesos demográficos a través de la línea materna, ambos marcadores se complementan para tener una visión filogeográfica global.

MICROSATELITES

- Los microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR) son secuencias de DNA que presentan repeticiones de di, tri o tetra nucleótidos y que generalmente se encuentran en regiones no codificantes del genoma. El polimorfismo que generan estas secuencias se presenta producto del mayor o menor número de las unidades repetidas que la constituyen. La variación del largo de cada secuencia será detectada por amplificación del trozo de DNA portador del microsatélite recurriendo a una reacción en cadena que usa una polimerasa termoestable (PCR). De esta forma, la amplificación de los *loci* generará fragmentos de DNA, los que serán separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. El tipo de repeticiones a seleccionar serán de tipo dinucleótido en base principalmente a su abundancia en los genomas hasta ahora estudiados, y serán del tipo AT o GC. Por un lado se utilizarán microsatélites disponibles en las bases de datos del GenBank (ver Anexo 1) y por otro lado se generaran nuevos marcadores de microsatélites según se describe en los métodos. Esto último con el fin de acrecentar el número de herramientas moleculares disponibles para la caracterización genética de *C. capitata*. Los microsatélites actualmente disponibles serán previamente evaluados en una población “tipo” de Ceratitis, es decir una población completamente caracterizada en cuanto al número de individuos, nivel de consanguinidad, entre otros parámetros.

REACCIÓN DE PCR ESTANDAR PARA MICROSATELITES

- Los *loci* de microsatélite serán genotipificados usando una reacción de PCR estándar de 15 µl conteniendo 0,25 mM dNTP, 0,3 µM de los pares de partidores, Tris HCl 10 mM (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂, 1 U de Taq-polimerasa mas 7.5 ng de DNA templado. Las condiciones de PCR serán a 94°C por 4 min, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 50–58°C (dependiendo de los partidores) por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 7 min (Tautz et al., 1989).

ANALISIS CON ISSR

- Las técnicas de análisis mediante el uso del marcador ISSR son muy parecidas a las técnicas de RAPD, excepto de que las secuencias de los partidores ISSR son desarrollados a partir de regiones de microsatélites y las temperaturas de hibridación usadas son mas altas que aquellas usadas en RAPD. Basados en los estudios realizados los marcadores de ISSR,

presentan un gran potencial para el estudio de poblaciones naturales (Westman y Kresovich, 1999; Wolfe et al. 1998).

- Las bandas de ISSR son analizadas como marcadores dominantes, lo que significa que ellos son dialélicos, con bandas presentes y ausentes como los dos alelos del locus (se infiere el tamaño de las bandas en kb).

REACCIÓN DE PCR ESTANDAR PARA ISSR (25 µL)

- Los *loci* de ISSR serán genotificados usando una reacción de PCR estándar de 25 µl conteniendo 1.25 mM dNTP, 20-50 µM de los pares de partidores, Tris HCl 10 mM (pH 8.8), 50 mM MgCl₂, 5 U de Taq-polimerasa mas 7.5 ng de DNA templado. Las condiciones de PCR serán a 94°C por 1.5 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 40 seg, 44 por 45 segundos, 72°C por 45 segundos y una extensión final de 72°C por 7 min (Lian et al. 2001).

ANALISIS DNA MITOCONDRIAL

- Con el propósito de determinar la distribución de los haplotipos mitocondriales existentes en las poblaciones de *Ceratitis capitata* que ingresan a Chile y los que se encuentran representados en la región se analizarán patrones con endonucleasas de restricción (RFLP) (Shepard, et al, 1992). Además se pretende evaluar relaciones filogenéticas entre a otras especies de la familia *Tephritidae*, para lo cual se procederá a amplificar y secuenciar un fragmento de DNA mitocondrial (mtDNA).

OBTENCION DE NUEVOS MARCADORES MOLECULARES (MICROSATELITES) EN *Ceratitis capitata*

- Los microsatélites, son regiones del DNA caracterizadas por ser altamente variables, presentar amplificaciones reproducibles, herencia mendeliana, de naturaleza codominante y existentes en todos los genomas eucarióticos (Tautz y Renz, 1984). No obstante el aislamiento de microsatélites involucra la construcción de librerías génicas y la detección con sondas específicas, es decir protocolos altamente laboriosos y extensivos. Es por ello que en los últimos años se ha descrito un método para el desarrollo de microsatélites sin procedimientos de librerías génicas, que implican el uso de productos de ISSR-PCR, ya que corresponden a secuencias delimitadas por microsatélites, por tanto estas regiones genómicas son susceptibles de ser clonadas y secuenciadas, permitiendo el diseño de partidores específicos para los microsatélites que delimitan las bandas de ISSR.

DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LOS MARCADORES DE MICROSATELITES

- Los productos de PCR generados por los partidores diseñados para amplificar los marcadores seleccionados serán usados para genotipificar individuos atrapados de diferentes regiones geográficas del país. Los fragmentos amplificados de tamaño esperado serán analizados en geles de poliacrilamida (PAGE) denaturante tipo secuencia, seguido de una tinción con nitrato de plata (Manniatis, 1982).

ANALISIS ESTADISTICO

MÉTODOS DE CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

- Según Felsenstein (1988), Swofford y colaboradores (1996), Nei (1996) y Page y Holmes (1998), ninguno de los métodos actuales de reconstrucción filogenética ha probado ser el mejor en todas las situaciones. Debido a ello, en la presente trabajo se propone utilizar tres métodos de análisis filogenético: neighbor-joining o vecino más próximo (NJ, Saitou and Nei, 1987), maximum likelihood (ML, máxima verosimilitud, Felsenstein, 1981) y Máxima parsimonia (MP, Fitch, 1977). El método NJ es un método basado en distancias genéticas y los métodos ML y MP son métodos basados en caracteres, en los que cada posición de la

secuencia se considera un carácter y cada una de las cuatro bases un estado del carácter, pudiendo considerarse como quinto estado las indels (inserciones y deleciones). El método del vecino más próximo (NJ) se basa en encontrar pares de OTUs (Operational Taxonomic Units, es decir, unidades taxonómicas operativas) que minimicen la longitud total de las ramas del árbol en cada paso del agrupamiento, partiendo de un árbol en forma de estrella. La estimación de las longitudes de las ramas se obtienen por el método de los mínimos cuadrados. Los datos se suministran al programa en forma de matriz de distancias. Los estudios de simulación muestran que se trata de un método muy eficiente. Probablemente esto se deba a que en cada paso se aplica el criterio de mínima evolución, o máxima parsimonia, y la aplicación repetida de este principio reduce los efectos del error de muestreo.

- Los métodos de parsimonia (MP) operan seleccionando los árboles que minimizan la longitud total del árbol, es decir, el número de pasos evolutivos (transformaciones de un estado a otro) requeridos para explicar determinados datos. Del conjunto de sitios polimórficos presentes en la secuencia, sólo son informativos aquellos en los que están representados al menos dos nucleótidos distintos en al menos dos de los taxones estudiados. Este es uno de los pocos métodos que busca explícitamente la reconstrucción de las secuencias ancestrales. Además, los programas disponibles no son capaces de tratar los huecos como caracteres informativos en los métodos basados en modelos de evolución (métodos de distancia y máxima verosimilitud), lo que hace del método de máxima parsimonia un método más adecuado para analizar secuencias de longitud variable.
- Los métodos de máxima verosimilitud (ML) evalúan una hipótesis acerca de la historia evolutiva en términos de la probabilidad de que el modelo de proceso evolutivo que se propone y la historia que se postula den lugar a los datos observados. Se trata de métodos muy consistentes, robustos al incumplimiento de los supuestos básicos del modelo y a menudo la varianza de sus estimas es menor que la de otros métodos, es decir, se ven menos afectados por el error de muestreo.
- El problema de los modelos de cambio evolutivo (utilizados tanto en la estima de las distancias para el NJ como en el método de ML) es que asumen que todas las regiones de la secuencia presentan la misma tasa de sustitución de nucleótidos, algo que rara vez es cierto. El incumplimiento de esta condición puede tener consecuencias importantes.

CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

- Como se explicó en el apartado anterior, se utilizarán tres métodos de análisis filogenético para reconstruir las relaciones evolutivas entre las poblaciones de *Ceratitis capitata* aisladas. Se utilizarán los programas de análisis de parsimonia PAUP (Swofford, 2001); el análisis de máxima verosimilitud y vecino más próximo se llevará a cabo con el programa PHYLIP (Felsenstein, 2001). Específicamente el análisis de máxima verosimilitud se realizará con el programa DNAML, del paquete PHYLIP 3.6a2, y las distancias genéticas se calcularán con el programa denominado DNADIST, que también forma parte del paquete PHYLIP (Felsenstein, 2001). Se obtendrán los árboles por medio del programa NEIGHBOR de este paquete.
- En todos los casos se llevará a cabo un análisis de bootstrap con 1000 réplicas, para determinar el grado de soporte estadístico de los agrupamientos. Generalmente, se considera que un grupo está apoyado de forma concluyente cuando el valor de bootstrap es 90 o mayor (es decir, cuando el agrupamiento se repite en 90, o más, de cada 100 réplicas). Sin embargo, Hillis y Bull (1993) han demostrado que valores de bootstrap mayores de 70 generalmente corresponden a una probabilidad del 95% de que los datos apoyen de forma consistente el agrupamiento.

ANÁLISIS DE ISSR.

- Para llevar a cabo este análisis se estudiaron los patrones de bandas de todos los individuos, determinándose en cada uno de ellos la presencia o ausencia de bandas, codificándose como 1 la presencia de una banda y como 0 su ausencia. Sólo se tendrán en cuenta las bandas reproducibles (Stewart and Excoffier, 1996). De esta forma se construye una matriz con la cual se calcula la frecuencia de cada una de estas bandas en cada una de las poblaciones analizadas.
- Por otra parte, con el fin de cuantificar la variabilidad genética, se calculará la proporción de *loci* polimórficos o polimorfismo, considerando a cada una de las bandas como un locus. El polimorfismo de una población se estimará como el número total de loci polimórficos dividido por el número total de *loci* estudiados. La consideración de un locus como polimórfico puede basarse en diversos criterios, aunque normalmente se utiliza el criterio del 95% (o 0,95) o el menos restrictivo del 99% (o 0,99). Utilizando el criterio del 95%, se dice que un locus es polimórfico cuando la frecuencia del alelo más frecuente en la población es menor o igual a 0,95. El polimorfismo oscila entre 0 (ninguno de los *loci* es polimórfico) y 1 (todos los loci estudiados son polimórficos). Se llevó a cabo un análisis de chi cuadrado (χ^2) de cada una de estas bandas para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su frecuencia en las diferentes poblaciones. También se establecerán las diferencias estandarizadas en la frecuencia de estas bandas en cada una de las poblaciones, suponiendo que la frecuencia de cada banda se distribuye como una normal (0,1), de modo que un valor mayor de 3 en una población indica que la frecuencia en esa población de la banda estudiada es alta comparada con su frecuencia en el total de poblaciones, mientras que un valor menor de -3 indicaría que su frecuencia es baja. Las bandas obtenidas por medio de la técnica ISSR se analizarán como marcadores genéticos suponiendo que cumplen las siguientes condiciones:
 1. Se trata de marcadores dominantes que segregan de forma mendeliana.
 2. Las frecuencias genotípicas de los alelos guardan las proporciones de Hardy-Weinberg.
 3. Todos los alelos recesivos (“ausencia de banda”) son idénticos en estado (es decir, provienen de mutaciones idénticas) tanto entre individuos como dentro de individuos; lo mismo ocurre con los alelos dominantes (“presencia de banda”).

PARAMATROS POBLACIONALES

ÍNDICE DE DIVERSIDAD.

- Para estimar la diversidad genética se utilizará el índice de Shannon (Lewontin, 1972):

$$H_0 = - \sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i$$

donde p_i es la frecuencia de un determinado fragmento de ISSR. H_0 se calcula a dos niveles: la diversidad media dentro de poblaciones (H_{pop}) y la diversidad total (H_{sp}). A continuación, la proporción de la diversidad total que se encuentra dentro de poblaciones se estima como H_{pop}/H_{sp} y la proporción de diversidad entre poblaciones como $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$.

ÍNDICE DE SIMILITUD.

- El índice de similitud entre individuos se calculará a partir de la matriz de la presencia/ausencia de bandas empleando la fórmula de Nei y Li (1979):

$$S = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$$

donde N_a y N_b son el número de bandas presentes en los individuos A y B respectivamente, mientras que N_{ab} es el número de bandas compartidas por ambos individuos. Los valores así calculados oscilan entre 0 (no existen bandas compartidas por los individuos A y B) y 1 (las bandas presentes en los individuos A y B son las mismas). Los datos de similitud intrapoblacionales se calcularon promediando los coeficientes de similitud de los individuos de cada población. Los datos de similitud interpoblacionales se calcularon promediando los coeficientes de similitud entre los individuos de una población y los individuos de la población con la cual se compara.

DISTANCIA GENETICA

- Para el caso de las matrices de presencia-ausencia de bandas obtenidas por ISSR, se transformarán estas en matrices de frecuencias de estas bandas en cada una de las poblaciones. A partir de estas frecuencias se estimarán las distancias de Nei (1972) entre poblaciones. La distancia de Nei proporciona una estima del número medio de mutaciones que separa los genes de dos poblaciones. Para el caso de los análisis de microsatélites se obtendrán las matrices de distancia utilizando los programas Msat (Goldstein et. al., 1995) y Cervus (Marshall et al, 1998).

ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA).

- También se realizará un análisis de la varianza molecular (Excoffier et al., 1992). Para llevar a cabo este análisis se comparan dos a dos todos los fenotipos con el fin de obtener una matriz de distancias entre ellos. La idea central del AMOVA es utilizar la matriz de distancias para realizar un análisis de varianza de los fenotipos obtenidos que extraiga sus diferentes componentes: varianza de las distancias existentes entre los individuos de una misma población, entre los individuos de diferentes poblaciones pertenecientes a un mismo grupo y entre los individuos de poblaciones pertenecientes a diferentes grupos.

TEST DE MANTEL.

- La matriz de distancias genéticas obtenida mediante la fórmula de Nei (1972), se comparará con la matriz de distancias geográficas empleando el test de Mantel (1967). Este test mide el grado de relación, Z , entre las dos matrices, siendo:

$$Z = \sum_{ij}^n X_{ij} Y_{ij}$$

donde X_{ij} e Y_{ij} son los elementos de las matrices X e Y. Si las dos matrices contienen valores de distancia similares, Z es mayor de lo que se esperaría por azar.

- El test de significación generalmente se lleva a cabo comparando el valor de Z con su distribución permutacional, es decir, la distribución que se obtiene si se compara una matriz (por ejemplo X) con todas las posibles matrices en las que el orden de los elementos de la otra matriz (Y) se han permutado. En la práctica, el número de permutaciones posibles es tan elevado que sólo se utiliza una muestra al azar de las posibles permutaciones (en nuestro caso 10.000). El test de Mantel se realizará utilizando el paquete estadístico NTSYSp versión 2.01b (Applied Biostatistics Inc., 1997).

CÁLCULO DE F_{ST} y NM.

- El índice de subdivisión de la población (F_{ST}) fue formulado por Wright (1951) como una forma de estimar la correlación entre gametos escogidos al azar dentro de una población relativa a la correlación entre gametos escogidos al azar en el conjunto de todas las poblaciones. F_{ST} es mayor que 0 cuando las poblaciones están aisladas, debido a que la probabilidad de que gametos escogidos al azar porten alelos derivados de un antepasado común es mayor dentro de una determinada población que en el conjunto de poblaciones. Métodos alternativos para estimar este estadístico son los de Weir y Cockerham (1984) y Lynch y Milligan (1994). La corrección de estos últimos tiene en cuenta el carácter dominante de los productos de amplificación obtenidos por medio de ISSR y el pequeño tamaño de las muestras. A partir de la matriz de presencia- ausencia de bandas se estima el coeficiente F_{ST} por los tres métodos citados utilizando el programa $RAPDF_{ST}$, que también forma parte del paquete de programas RAPD-PCR (Black, 1995).
- La tasa efectiva de migración (Nm) es una medida del flujo génico entre poblaciones que se estima a partir del coeficiente F_{ST} por medio de la fórmula:

$$F_{ST} = 1 / (1 + 4 Nm)$$

donde m es la tasa media de migración en un modelo de población subdividida y N el tamaño poblacional local (Wright, 1931).

CONSTRUCCION DE DENDROGRAMAS

- La matriz de distancias genéticas de Nei se utilizará para construir dendrogramas por medio de los métodos del vecino más próximo (NJ) y UPGMA ("unweighted pair group method with arithmetic average") (Sneath y Sokal, 1973). Para la elaboración de los dendrogramas se utilizará el programa PHYLIP versión 3.6a2 (Felsenstein, 2001). En ambos árboles se llevará a cabo un análisis de bootstrap (1000 réplicas) para comprobar la fiabilidad de los agrupamientos obtenidos.

ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

- A partir de las distancias obtenidas por el método de Nei se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales (Gower, 1966) para determinar las principales tendencias de variación. De esta forma se determina el número de coordenadas necesarias para explicar el 100% de la variación, así como el porcentaje de variación que absorbe cada una de ellas. Además, el análisis de coordenadas principales permite representar de forma gráfica estas tendencias de variación, así como visualizar las relaciones entre poblaciones. Para ello se proyectan las coordenadas principales sobre un eje de dos o tres dimensiones, según si se representan las dos o tres principales tendencias de variación, sobre el que se sitúan las poblaciones. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el paquete de programas NTSYSpc versión 2.01b (Applied Biostatistics Inc., 1997).

SECUENCIACION Y DISEÑO DE PARTIDORES

- Se utilizará un procedimiento de secuenciación automática basado en el método de los didesoxinucleótidos de Sanger et al. (1977) que requiere de cuatro didesoxinucleótidos terminadores marcados con diferentes fluorocromos ("Dye-Terminator" y "Big-Dye" kits, Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos de cada reacción se resuspenderá en 4 ml de solución de carga (5:1, formamida desionizada y EDTA 50 mM, pH 8), se desnaturizará a 90°C durante 2 min, se enfriará sobre hielo y se cargará en un gel de poliacrilamida que se ha colocado previamente en un secuenciador automático. La electroforesis se realizará a 51 °C de temperatura, siguiendo las recomendaciones del fabricante para obtener la secuencia del fragmento de DNA en estudio. Se identificará las secuencia correspondiente al inserto del DNA y al plásmido y se resolverán las posibles

ambigüedades comparando las secuencias complementarias obtenidas en las dos reacciones.

- Los partidores específicos, únicos y complementarios a las regiones que flanquean la secuencia de microsatélite serán diseñado usando programas adecuados como, PRIMER v.3.0 (8), de libre disposición. El diseño de los partidores considera parámetros restrictivos para la auto hibridación, contenido de G+C, temperatura de hibridación de los partidores (entre 50-60 grados).

RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES METODOLOGICAS PROPUESTAS

- A continuación se muestra un diagrama de flujo de las diferentes etapas metodológicas a realizar en el proyecto. En rojo se enmarcan aquellas etapas críticas, las que se describen mas adelante

