

## Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante **Dr. Milton Gallardo Narcisi** Instituto de Ecología y Evolución Facultad de Ciencias

## CARACTERIZACIÓN DE MICROSATELITES DEL ROEDOR TETRAPLOIDE *Tympanoctomys barrerae* (Octodontidae)

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de *Licenciado en Bioquímica* y Título Profesional de *Bioquímico* 

## CAROLINA ALEJANDRA RÍOS DEL PRADO

VALDIVIA - CHILE

2005

Por mi familia.

Me preguntas cómo me convertí en loco. Sucedió así.

Khalil Gibrán (El Loco, 1918)

#### AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se la dedico a mi familia, mi papá, mi mamá y Luis Hernán, por haberme dado todas las posibilidades del mundo, por la confianza y por todo el amor que he recibido, además de ayudarme a cumplir mis sueños. Esto es por ustedes.

A mi tía Maite y mi tío Moly, por ser mis ángeles de la guarda y siempre creer en mí, por ayudarme desde que tengo uso de razón y antes. A mi Yoyi y mi Tata, aunque ya no estén aquí conmigo yo sé que todo esto se lo debo a ustedes y a todo lo que me enseñaron.

Al Dr. Milton Gallardo, el "jefe", por ser más que un profesor, un maestro, por el apoyo constante que recibí de él. A la Dra. Gudrun Kausel, la Gudi, por su alegría y confianza sin límites y por enseñarme tanto sobre el trabajo en el laboratorio. Al Dr. Jaime Figueroa, por prestarme un rinconcito en su laboratorio, además de toda su ayuda. A mis compañeros de laboratorio, a Fredy y la Señora Nélida, gracias por todo.

Finalmente, quisiera dedicar este trabajo a mis amigos, los nuevos, los viejos y los de toda la vida. Ustedes no se imaginan lo que significan para mí y yo sé que no podría sobrevivir ni un minuto en este mundo sin ustedes.

Esta investigación fue financiada por el proyecto FONDECYT 1010727.

## ÍNDICE

Página

Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Abreviaturas	v
1. Resumen	1
1.1. Summary	2
2. Introducción	3
3. Materiales y métodos	11
3.1. Materiales	11
3.1.1. Material biológico	11
3.1.2. Enzimas	11
3.1.3. Reactivos y otros	12
3.2. Métodos	15
3.2.1. Extracción de ADN plasmidial	15
3.2.2. Análisis de secuencias génicas	16
3.2.3. Extracción de ADN genómico de tejido	16
3.2.4. Cuantificación del ADN	17
3.2.5. Amplificación de loci microsatelitales por reacción de la	
polimerasa en cadena (PCR)	18
3.2.6. Análisis de los productos de amplificación por electroforesis	
en geles de poliacrilamida	19

3.2.6.1. Preparación del gel de poliacrilamida 6% urea 7 M	19
3.2.6.2. Preparación de las muestras	19
3.2.6.3. Tinción con plata de geles de poliacrilamida	20
3.2.7. Análisis de transferencia Southern	21
3.2.7.1. Fraccionamiento y transferencia de ADN a la	
Membrana	21
3.2.7.2. Preparación de sondas microsatelitales de copia única	21
3.2.7.3. Detección molecular de secuencias específicas	22
4. Resultados	24
4.1. Aislamiento y análisis de secuencias microsatelitales	24
4.2. Determinación de las condiciones de amplificación de los loci	
microsatelitales	24
4.3. Caracterización de los alelos microsatelitales	29
4.4. Análisis de Southern Blot	36
5. Discusión	41
5.1. Características de las secuencias microsatelitales	41
5.2. Microsatélites y duplicaciones génicas	44
5.3. Duplicaciones genómicas y poliploidización	49
6. Bibliografía	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Posibles estados alélicos de un locus microsatelital en organismos	6-7
	diploides y tetraploides	
Figura 2	Secuencias genómicas de Tympanoctomys barrerae con repeticiones	25-26
	microsatelitales	
Figura 3	Caracterización de los productos de amplificación del locus Tba-201	28
	a diferentes temperaturas de apareamiento en gel de agarosa	
Figura 4	Caracterización de los productos de amplificación del locus Tba-1017	30
	con distintas cantidades de templado en gel de agarosa	
Figura 5	Caracterización del locus microsatelital Tba-1017 en gel de	33
	poliacrilamida 6% denaturante, teñido con plata	
Figura 6	Caracterización locus microsatelital Tba-206 y Tba-201 en gel de	34
	poliacrilamida 6% denaturante, teñido con plata	
Figura 7	Esquema del mapa físico de los insertos de las recombinantes utilizadas	38
	para obtener sondas para Southern blot	
Figura 8	Análisis de Southern blot de los loci Tba-6 y Tba-203	39
Figura 9	Análisis de Southern blot del locus Tba-1025	40

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I	Partidores para el análisis de loci microsatelitales de T. barrerae	27
TABLA II	Cantidad de ADN genómico templado para la amplificación de cada	31
	locus microsatelital	
TABLA III	Alelos microsatelitales en Octomys mimax y Tympanoctomys barrerae	35
TABLA IV	Diseño de obtención de secuencias genómicas únicas para análisis	37
	de Southern blot	

## ABREVIATURAS

А	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
cpm	Cuentas por minuto
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Ácido etiléndiamino tetraacético
LB	Luria-Bertani
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p/v	Peso/Volumen
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris borato EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tris EDTA
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Volts

#### 1. **RESUMEN**

Los microsatélites son marcadores moleculares codominantes, de copia única y altamente variables, que han servido para diagnóstico de cáncer, pruebas de paternidad, genética de la conservación y variabilidad intrapoblacional. Además han ayudado a establecer y corroborar los niveles de ploidía de plantas y animales, ya que existe una concordancia entre éstos y el número máximo de alelos que se pueden encontrar por locus en un individuo. Por este motivo que la caracterización microsatelital por PCR y Southern blot adquiere particular relevancia en *Tympanoctomys barrerae*, sindicado como el primer mamífero tetraploide.

Se diseñaron partidores para cinco loci microsatelitales obtenidos a partir de una biblioteca genómica parcial de *T. barrerae*. Los productos de las amplificaciones se analizaron en geles de poliacrilamida, con tinción de plata. Además, se construyeron sondas homólogas a partir de las regiones únicas que flanquean la repetición, para utilizarse en análisis de Southern Blot de ADN genómico de *T. barrerae*.

Se encontró multiplicidad alélica en tres de los loci analizados por PCR. Adicionalmente, se observaron entre dos y cuatro alelos por individuo de *T. barrerae*, cuando sólo se encontró hasta dos alelos en *Octomys mimax* (control diploide), lo que confirma la condición tetraploide de *T. barrerae* debido a que se han encontrado cuatro alelos para un marcador de copia única. Asimismo, se detectó la duplicación de estos loci por la observación de dos bandas de hibridación en los análisis de Southern blot. Éstas se interpretan como dos loci distintos que concuerdan con la duplicación genómica de la especie y aportan datos para la caracterización de estos microsatélites.

#### 1.1. SUMMARY

Microsatellites are codominant, single copy and highly variable molecular markers, which have been used for cancer diagnosis, paternity tests, conservation genetics and intrapopulational variability. Besides, they have been useful in establishing and corroborating the ploidy level of plants and animals, due to their concordance with the maximum number of alleles to be found in those organisms. For this reason, microsatellite characterisation by PCR and Southern blot is of particular relevance in *Tympanoctomys barrerae*, syndicated as the first tetraploid mammal.

Primers for five microsatellite were designed loci from a *T. barrerae* partial genomic library. The amplification products were analysed by silver stained polyacrylamide gels. Moreover, homologous probes were made from the single copy regions that flank the repeat to be used in Southern blot analyses.

Allelic multiplicity was found in three of the PCR analysed loci. Additionally, a minimum of two and up to four alleles were observed per *T. barrerae* individual, whereas only two alleles were found in *Octomys mimax* used as diploid control. This confirms the tetraploid condition of *T. barrerae*, since four alleles were found for a single copy marker. Likewise, loci duplication was detected by the observation of up to four hybridizing bands in the Southern blot analyses. These are interpreted as two distinct loci that agree with the species' genomic duplication and contribute to the characterisation of these microsatellites.

#### 2. INTRODUCCIÓN

Los microsatélites son la clase más pequeña de elementos repetitivos dentro de los genomas (Krawczak & Schmidtke, 1998; Chambers y MacAvoy, 2000) y son también conocidos como Repeticiones Cortas en Tandem (Short Tandem Repeats, STR), Secuencias Simples Repetidas (Simple Sequence Repeats, SSR) o Polimorfismos de Largo de Secuencias Simples (Simple Sequence Length Polymorphism, SSLP; Chambers y MacAvoy, 2000; Li et al. 2002). Son repeticiones de motivo simple, con unidades de iteración entre 1 y 6 pares de bases, de longitudes no mayores que 1 Kb (Chambers y MacAvoy, 2000; Li et al. 2002). Se han encontrado en todas las especies eucariontes y procariontes estudiadas y también en los genomas de cloroplastos y mitocondrias (Jarne y Lagoda, 1996; Li et al., 2002). El contenido total de microsatélites en un organismo se correlaciona de manera positiva con el tamaño de su genoma (Tóth et al., 2000). En los humanos se han encontrado alrededor de un millón de loci, lo que corresponde aproximadamente al 3% del genoma, mientras que en roedores existen dos a tres veces más loci microsatelitales que en los humanos (Ellegren, 2004).

Las unidades de repetición son las entidades más pequeñas de un microsatélite y se clasifican en mono, di, tri, tetra, penta y hexanucleotídicos según el número de bases que la componen (Goldstein y Schlötterer, 1999; Tóth et al., 2000). De acuerdo a la estructura de su repetición, un microsatélite es perfecto cuando consiste en un sólo motivo repetido y que no está interrumpido por bases que no pertenezcan al patrón de repetición. Por el contrario, un microsatélite imperfecto es aquel en que una o más repeticiones poseen una base que no se ajusta a su estructura (Goldstein y Schlötterer, 1999), mientras que los microsatélites interrumpidos tienen un pequeño número de bases distintas insertas en la repetición. Finalmente, un microsatélite se denomina "compuesto" cuando hay dos o más microsatélites adyacentes (Goldstein y Schlötterer, 1999).

El estudio de las secuencias microsatelitales es de mucha utilidad, pues son una de las más variables dentro del genoma (Ellegren, 2004). Se caracterizan por una alta heterocigocidad y la presencia de múltiples alelos que han contribuido, junto con su codominancia, a convertirlo en el marcador molecular de preferencia en la actualidad (Jarne y Lagoda, 1996; Sunnucks, 2000; Ellegren, 2004). El polimorfismo de los microsatélites se origina por cambios en el número de repeticiones, causadas por el deslizamiento de la ADN polimerasa durante la replicación, donde la mutación más común es el aumento o disminución en una sola unidad de iteración (Schlötterer, 1998; Eisen, 1999). El estado alélico del microsatélite es evaluado mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) que usa partidores que flanquean la repetición. El tamaño de los productos se determina en geles de alta resolución, permitiendo identificar el número de repeticiones de los distintos alelos (Schlötterer, 1998).

Las aplicaciones de los microsatélites son muy variadas. Permiten realizar estudios filogeográficos, estimar flujo génico o establecer los niveles de subdivisión genética de las poblaciones naturales (Sunnucks, 2000). También han tenido especial auge en la genética de la conservación debido a su facilidad para ser desarrollados en nuevas especies y por la poca cantidad de material genético que se requiere para el análisis (Beaumont y Bruford, 1999). Además, es posible analizarlos a partir de muestras colectadas por métodos no invasivos, como pelo y fecas (May et al, 1997; Beaumont y Bruford, 1999).

Los microsatélites son usados ampliamente para la identificación forense y pruebas de parentesco (Balding, 1999), así como también, en medicina, para detectar y estudiar la evolución de algunos carcinomas colorrectales, gástricos y endometriales, ya que la tasa de mutación de los microsatélites está claramente aumentada en estos cánceres (Moxon y Wills, 1999; Shibata, 1999; Yamasaki y Mironov, 2000).

Los mapas genéticos son una importante herramienta, ya que facilitan tareas como la selección y el clonamiento de genes para realizar estudios más acabados (Han et al., 2004). Los microsatélites han sido los marcadores de preferencia para esta tarea por su alto polimorfismo, su gran abundancia y su distribución azarosa en los genomas eucariontes (Serikawa et al., 1992; Menotti-Raymond et al., 1999; Han et al., 2004).

Los microsatélites también se han aislado y caracterizado en organismos poliploides, principalmente en especies de importancia económica como el trigo (*Triticum aestivum L.*; Bryan et al., 1997), la batata (*Ipomoea batatas*; Buteler et al., 1999), la caña de azúcar (*Saccharum* sp.; Cordeiro et al., 2000) o la papa (*Solanum tuberosum*; Raker y Spooner, 2002). También se han utilizado para corroborar niveles de ploidía pues los microsatélites muestran concordancia entre el número de alelos por locus por individuo y el nivel de ploidía estimado para la especie (Ludwig et al., 2001; Segarra-Moragues et al., 2004). A continuación, en la figura 1 se muestran los posibles estados alélicos microsatelitales de un organismo diploide y uno tetraploide.



Figura 1

#### Figura 1:

**Posibles estados alélicos de un locus microsatelital en organismos diploides y tetraploides.** La parte superior muestra un esquema de la secuencia de cada alelo, donde los cuadros grises representan las unidades de repetición. La parte inferior muestra como se verían los alelos en un gel. (A) y (B) corresponden a los estados alélicos de un diploide que puede poseer dos alelos microsatelitales iguales (homocigosis) o distintos (heterocigosis). Estos se observan como una (A) o dos bandas (B), respectivamente, en un gel de alta resolución. (C)-(F) corresponden a los estados alélicos de un tetraploide que tiene cuatro posible combinaciones en un gel: una banda, o sea, cuatro alelos iguales (C); dos bandas, que puede corresponder a tres alelos iguales y uno distinto (no mostrado) o dos pares de alelos (D); tres bandas, tres alelos distintos (E); y cuatro bandas, que equivalen a cuatro alelos distintos (F). Por ejemplo, en los árboles poliploides castaño de la India (*Acer pseudoplatanus L.*) y sauce (*Salix reinii*) se han observado hasta cuatro y seis alelos por individuo por locus microsatelital, respectivamente (Pandey et al., 2004; Lian et al., 2001). Estos marcadores también se han utilizado para investigar el nivel de ploidía de 20 especies de esturión que, en concordancia con los números cromosómicos de las especies, se clasificaron en diploides, tetraploides y octoploides funcionales (Ludwig et al., 2001). En la carpa *Cyprinus carpio*, la duplicación de su genoma se corroboró analizando distintos loci microsatelitales que indican multiplicidad alélica (Crooijmans et al., 1997, David et al., 2003).

Los poliploides se originan de dos maneras distintas: la alopoliploidía proviene de la fusión de dos genomas de distintas especies parentales para formar un híbrido, en cambio la autopoliploidía es la duplicación del genoma de una misma especie (Wolfe, 2001). Establecer si el linaje es auto o alopoliploide es de gran relevancia para los estudios filogenéticos en especies poliploides, ya que si el origen es a través de hibridación, las relaciones de parentesco de estas especies no son descritas apropiadamente por los métodos convencionales (Chenuil et al., 1999). En general, es posible utilizar microsatélites para diferenciar si el organismo es auto o alopoliploide, al analizar las proporciones alélicas en cruzamientos controlados. Así se puede determinar si existe herencia multisómica -múltiples alelos en un locus- o disómica -dos alelos en varios loci distintos- (Chenuil et al., 1999; Wolfe, 2001; David et al., 2003). En este contexto y basándose en estudios microsatelitales y citogenéticos, ha sido posible establecer que los peces del género *Barbus* (Cyprinidae; Chenuil et al., 1999) y la carpa (*Cyprinus carpio L.*) tienen un origen híbrido (David et al., 2003). La determinación del origen de la poliploidía también se ha realizado en vegetales como *Sorbus arranensis*, un híbrido triploide, *Sorbus rupicola*, un

autotetraploide y *Sorbus pseudofennica*, un alotetraploide. En este caso se utilizaron marcadores especie-específicos para determinar su origen (Robertson et al., 2004).

En mamíferos, la tetraploidía es un evento raro, que en humanos termina, en la mayoría de los casos, en abortos espontáneos durante el primer trimestre de embarazo (Guc-Scekic et al., 2002; Baumer et al., 2003). Sin embargo, algunos casos reportados de niños nacidos con esta condición han sobrevivido algunos meses después del nacimiento, pero siempre presentan malformaciones y retraso en el desarrollo neurológico (López Pajares et al., 1990; Guc-Scekic et al, 2002; Nakamura et al., 2003). En estos casos, los análisis moleculares microsatelitales han permitido determinar el posible origen de los juegos cromosómicos adicionales (Guc-Scekic et al., 2002; Baumer et al., 2003).

Por lo anteriormente expresado, la identificación y caracterización de loci microsatelitales en la corroboración de la tetraploidía en el roedor *Tympanoctomys barrerae*, el primer mamífero tetraploide descrito, adquiere un carácter relevante (Gallardo et al., 1999). Este roedor octodóntido endémico de las regiones áridas del centro-oeste de Argentina (Díaz et al., 2000) tiene un complemento cromosómico de 2n = 102 cromosomas bibraquiados (Contreras et al., 1990). El contenido de ADN de sus células somáticas es  $16.8 \pm 0.5$  pg y de los espermios  $8.7 \pm 0.4$  pg (Gallardo et al., 2003). Posee una meiosis con formación estricta de bivalentes (Gallardo et al., 2004)

Los antecedentes entregados acerca de los microsatélites y de la condición tetraploide de *T. barrerae* permiten postular las siguientes hipótesis de trabajo:

H1<sub>0</sub>: Si se identifica como máximo dos alelos microsatelitales por individuo por locus, *T*. *barrerae* es diploide.

 $H1_A$ : Si se identifican más de dos alelos microsatelitales por individuo por locus, *T*. *barreare* posee un nivel de ploidía superior al diploide.

Para evaluar el número de copias de los loci microsatelitales, se puede realizar ensayos de hibridación Southern. El número de bandas de hibridación se toma como una estimación del número de loci génicos usando sondas específicas para el locus y enzimas que no tengan sitios de reconocimiento de esta sonda (Small y Wendel, 2000). Estas sondas específicas se obtienen de las regiones únicas que flanquean a la repetición microsatelital (Schlötterer, 1998).

Para el análisis de Southern las hipótesis planteadas son:

H2<sub>0</sub>: Si se observa sólo una banda de hibridación por individuo, se reconoce un sólo locus microsatelital. Tal resultado indicaría la condición diploide de *T. barrerae*.

H2<sub>A</sub>: Si se observan dos bandas de hibridación por individuo, existe duplicación del locus y por lo tanto, *T. barrerae* posee condición tetraploide.

El objetivo de este trabajo es identificar y caracterizar loci microsatelitales que puedan ser utilizados para corroborar el nivel de ploidía de *T. barrerae* y para realizar posteriormente análisis de variabilidad poblacional.

Para lograr dichos objetivos se procedió a:

- Caracterizar secuencias microsatelitales de *Tympanoctomys barrerae* clonadas en vectores plasmidiales.
- Diseñar partidores homólogos a T. barrerae, específicos para estas regiones.
- Amplificar los loci microsatelitales mediante la técnica de PCR.
- Caracterizar estos loci utilizando geles de secuenciación con tinción de plata.
- Diseñar sondas de copia única a partir de las regiones que flanquean los microsatélites.
- Utilizar estas sondas en análisis de Southern Blot de ADN de Tympanoctomys barrerae.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **3.1. MATERIALES**

#### 3.1.1. Material biológico

Células E. coli "XL1Blue" (Promega)

Se utilizaron 20 ejemplares de *Tympanoctomys barrerae*. Cinco ejemplares de *Octomys mimax* y uno de *Octodontomys gliroides* fueron usados como controles diploides dada su cercanía filogenética con *T. barrerae* (Gallardo y Kirsch, 2001). Los especímenes fueron colectados en su ambiente natural y se encuentran ingresados en la Colección de Mamíferos del Instituto de Ecología y Evolución de la Universidad Austral de Chile.

Reactivo	Empresa	Número de catálogo
ARNasa A	Invitrogen	12091-039
BamHI	Promega	R6021
EcoRI	Promega	R6011
HindIII	Promega	R6041
Proteinasa K	Invitrogen	25530-015
SacI	Promega	R6061
Taq polimerasa	Invitrogen	11615-010

#### 3.1.2. Enzimas

## 3.1.3. Reactivos y otros

Reactivo	Empresa	Número de catálogo
1 Kb DNA ladder	Invitrogen	15615-016
100 bp DNA ladder	Invitrogen	15628-019
Acetato de amonio	Winkler	AM-0280
Acetato de potasio	Fluka	60034
Ácido acético glacial	Winkler	AC-0030
Ácido bórico	Sigma	B7901
Ácido cítrico	Sigma	C7129
Ácido clorhídrico	Winkler	AC-0065
Ácido etilendiaminotetraacético	Sigma	ED2SS
Ácido tricloroacético	Winkler	AC-0170
Acrilamida	GibcoBRL	15512-023
ADN de esperma de salmón	GibcoBRL	15632-011
Agar agar	Winkler	101150
Agarosa	Invitrogen	15510-019
Agua estéril filtrada	Sigma	W3500
Alcohol etílico	Winkler	AL-0205
Alcohol isoamílico	Winkler	AL-0190
Ampicilina	Sigma	A9393
Azul de bromofenol	Fluka	18030
Bromuro de etidio	Sigma	E7637

Carbonato de sodio	Merck	6392
Citrato de Sodio	Winkler	BM-1610
Cloroformo	Winkler	BM-0630
Cloruro de magnesio 50 mM	Invitrogen	Y02016b
Cloruro de sodio	Winkler	BM-1630
dNTP set PCR grade 100mM	Invitrogen	10297-018
Dodecil sulfato de sodio	Invitrogen	15525-017
Fragmentos λ DNA/ <i>Hin</i> dIII	Invitrogen	15612-013
Fenol saturado básico	Winkler	BM-0740
Filtro N°2	Whatman	1002185
Formaldehído	Winkler	BM0780
Formamida	Winkler	BM-0790
γ-metacriloxipropiltrimetoxisilano	Sigma	M6514
GeneClean Kit	Qbiogene	1001-200
Glicerol	Merck	K25144694
Hidróxido de sodio	Winkler	SO-1510
Isopropanol	Winkler	AL-0220
Medio LB	GibcoBRL	12780-029
Membrana de nitrocelulosa 0,45µm	Bio-Rad	162-0094
Nitrato de plata	Fluka	85230
N,N'-Metilenbisacrilamida	Sigma	M7256
Papel de transferencia extra grueso	Bio-Rad	170-3966

Película X-OMAT AR	Kodak	150 6955
Persulfato de Amonio	Winkler	BM-0250
pGEM-3Zf(+)	Promega	P2271
Random Primers DNA Labeling System	Invitrogen	18187-013
Sigmacote	Sigma	SL2
Tampón de PCR 10X	Invitrogen	Y02028b
TEMED	Winkler	BM-1970
Tris base	Invitrogen	15504-020
Urea	Promega	V3171
Xilencianol FF	Sigma	X4126

#### 3.2 MÉTODOS

#### 3.2.1. Extracción de ADN plasmidial

Se cultivaron bacterias recombinantes, almacenadas a -80°C en glicerol 50%, Tris 10 mM [pH 7.5], MgCl<sub>2</sub> 10 mM, en placas de medio LB-Agar ampicilina 100 µg/ml, por una noche, a 37°C. Se seleccionó una colonia aislada y se inoculó en 20 ml de medio LB ampicilina 50 µg/ml. El cultivo se incubó una noche a 37°C con agitación constante (200 rpm). Se obtuvo ADN plasmidial por lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). Para esto, el cultivo fue centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos en un tubo Eppendorf, descartando el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 300 µl de solución S1 (Tris/HCl 50 mM [pH 8.0], EDTA 10 mM [pH 8.0], 400 μg/μl ARNasa A), se agregó 300 μl de solución S2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezcló por inversión e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se adicionó 300 µl de solución S3 (KAc 2.55 M [pH 4.8]), mezclando por inversión suave y se incubó en hielo por 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos en una centrífuga (Eppendorf 5415 C) y el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf limpio. Se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1), se mezcló por agitación fuerte y se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se adicionó al menos 1 volumen de isopropanol frío. Para precipitar el ADN, el tubo se mantuvo a -20°C por 3 horas; luego se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C para colectarlo. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar al aire. Finalmente, se resuspendió el ADN en 30 µl de tampón TE/ARNasa (Tris/HCl 10 mM [pH 8.0], EDTA 1 mM [pH 8.0], ARNasa 20 µg/ml).

#### 3.2.2. Análisis de secuencias génicas

La identificación de las secuencias microsatelitales se realizó mediante secuenciación con los partidores T7 y M13 Reverse, presentes en los plasmidios. Las secuencias fueron comparadas con la base de datos de libre acceso GenBank mediante la herramienta de búsqueda de homologías BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

El diseño de partidores para amplificar los distintos loci microsatelitales se realizó con el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Para seleccionar los partidores se consideró el tamaño óptimo de producto (180 pb), el tamaño óptimo de partidores (22 bases), Tm óptima para los partidores (60°C) y porcentaje GC de partidores (entre 30% y 70%). Los otros parámetros se mantuvieron por defecto. Los partidores obtenidos se revisaron con el programa OLIGO (http://www.oligo.net/), seguido de inspección visual.

Con el fin de obtener sondas microsatelitales de copia única para análisis de transferencia Southern, se realizó un mapa de restricción de estas secuencias utilizando el programa Webcutter 2.0 (http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html).

#### 3.2.3. Extracción de ADN genómico de tejido

Para el aislamiento de ADN genómico de *T. barrerae* y sus especies relacionadas se siguió la metodología de Sambrook et al. (1989). Para ello, se trituró 0.5 g de tejido hepático en nitrógeno líquido. Se colocó el tejido pulverizado en un tubo con 10 volúmenes de tampón de extracción (Tris/HCl 10 mM [pH 8.0], EDTA 0.1 M [pH 8.0], SDS 0.5%, ARNasa pancreática 20 µg/ml); se incubó por 1 hora a 37°C con agitación ocasional. Luego se le incorporó proteinasa K a concentración final de 100 µg/ml y se mantuvo a 50°C por tres horas, agitando periódicamente. A esta solución se le agregó un volumen de fenol equilibrado con 0.5 M Tris/HCl [pH 8.0],

mezclando las dos fases por inversión suave. Luego se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio con una pipeta de punta ancha y se repitió la extracción con fenol. A la fase acuosa obtenida se le agregó un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y se separaron las fases por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos. La última fase acuosa fue rescatada en un tubo limpio y se le agregó 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M [pH 5.2] y 2 volúmenes de etanol 100% enfriado a -20°C. El precipitado de ADN se removió con una pipeta Pasteur en forma de gancho y fue lavado 2 veces con etanol 70% frío. Se dejó secar al aire. En seguida se resuspendió el ADN en 1 ml de tampón TE pH 8.0 (Tris/HCl 10 mM [pH 8.0], EDTA 1 mM [pH 8.0]) y se almacenó a 4°C.

#### 3.2.4. Cuantificación del ADN

Se estimó la concentración del ADN midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Genesys 5 (Spectronic). Su pureza se evaluó a través de la razón  $A_{260}/A_{280}$ , que para un ADN puro, fluctúa entre 1.7 y 1.85. Para calcular la concentración se consideró que una unidad de absorbancia a 260 (1 D.O.) equivale a 50 µg/ml de ADN de dos hebras (Sambrook et al., 1989). La calidad de los ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz UV.

A su vez, los ADN plasmidiales también se cuantificaron. Para ello, 5  $\mu$ l de ADN se digirió con enzimas de restricción que liberan el inserto. Los productos de la digestión se fraccionaron en un gel de agarosa 1% y se identificaron los fragmentos esperados por comparación con un estándar de peso molecular conocido y se estimó su concentración.

# 3.2.5. Amplificación de loci microsatelitales por reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

En cada tubo de polipropileno estéril se agregó, en un volumen final de 50 µl, ADN templado de *T. barrerae*, en general 20 µg, partidor sentido 0.15 µM, partidor antisentido 0.15 µM, tampón de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs (0.2 mM cada uno) y agua destilada desionizada estéril. Con el fin de descartar la contaminación por ADN exógenos, se utilizó como control negativo un tubo conteniendo todos los reactivos excepto el templado. El protocolo de amplificación en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) consistió en una denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, adición de 1 U de *Taq* polimerasa y denaturación por 2 minutos más. Después le siguieron 30 ciclos de tres pasos: denaturación (94°C por 45 segundos), apareamiento a temperatura específica de la reacción (entre 50 y 60°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos). El proceso se finalizó con una extensión de 7 minutos a 72°C.

Cada amplificación con un par de partidores se optimizó en los parámetros de temperatura de apareamiento y cantidad de ADN templado. Los productos de amplificación obtenidos se caracterizaron en geles de agarosa 2% con tinción de bromuro de etidio, utilizándose 5 µl de producto de PCR por carril.

3.2.6. Análisis de los productos de amplificación por electroforesis en geles de poliacrilamida.

#### **3.2.6.1.** Preparación del gel de poliacrilamida 6% urea 7 M

Los vidrios para el gel de secuenciación de 37 cm x 31.5 cm x 0.06 cm se lavaron con agua y etanol 95%. A la parte interna del vidrio corto se le agregó 1 ml de una solución de  $\gamma$ -metacriloxipropiltrimetoxisilano 0.3%, ácido acético 0.5% en etanol 100%. Esta solución une covalentemente el gel de poliacrilamida a las placas de vidrio. Al vidrio largo se le agregó 1 ml de Sigmacote, que repele el agua y permite que el gel se despegue fácilmente del vidrio.

El gel de secuenciación se preparó con una solución de acrilamida: bisacrilamida 50:1, TBE 5x (Concentración final Tris-borato 0.045 M, EDTA 0.001 M) y urea 7 M, que se calentó, filtró con doble filtro y se almacenó a 4°C. Para su polimerización se agregó persulfato de amonio 0.8% y TEMED 0.08%. El gel fue pre-corrido a 1500 V por 30 minutos para eliminar el persulfato de amonio presente en su parte superior y calentar el gel a una temperatura óptima para la electroforesis de ADN (Sambrook et al., 1989).

#### **3.2.6.2.** Preparación de las muestras

Las muestras se mezclaron con tampón de carga (formamida 50%, xilencianol 0.1%, azul de bromofenol 0.1%, EDTA 0.01 M [pH 8.0]) en una relación 1:1. Se cargaron 3.6 µl de muestra por carril, previamente denaturadas a 95°C por 5 minutos y enfriadas en hielo para evitar su renaturación. Como estándar se utilizó la reacción de secuenciación del

vector pGEM-3Zf (+), resultante en cuatro patrones de bandas, para adenina, timina, citosina y guanina respectivamente, que se utilizaron como marcador de tamaño molecular en el gel de poliacrilamida. Cada producto de la reacción de secuenciación se mezcló en una relación 1:1 con el buffer de carga, se denaturó por 2 minutos a 70°C y se colocó en hielo. Se cargó al gel 2.5 µl de cada mezcla denaturada.

#### **3.2.6.3.** Tinción con plata de geles de poliacrilamida.

El gel con los ADN fraccionados, que durante todo el proceso permaneció adherido a la placa de vidrio, se fijó con etanol 10% por 5 minutos. Luego se oxidó con ácido nítrico 1% por 3 minutos y se lavó dos veces con agua ultra pura por 5 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó la tinción con nitrato de plata 0.1% (p/v) durante 20 minutos, en oscuridad, y se realizaron dos lavados por 5 minutos a temperatura ambiente con agua ultra pura. El gel se reveló con una solución de carbonato de sodio 3% (p/v) y formaldehído 0.02%. Se le agregó al gel 200 ml de la solución, la que se eliminó al tornarse negra, repitiendo el procedimiento 4 veces. El gel se mantuvo con el último volumen de solución por 10 a 15 minutos o hasta que las bandas fueran visibles. Finalmente el gel se fijó con ácido acético 10% durante 10 minutos, se lavó con agua ultra pura por 5 minutos y se dejó secar toda la noche antes de ser analizado.

#### 3.2.7. Análisis de Southern blot

#### **3.2.7.1.** Fraccionamiento y transferencia de ADN a la membrana

El ADN genómico, no degradado, se digirió completamente con enzimas de restricción por una noche a 37°C. Posteriormente se fraccionó en un gel de agarosa 0.8%, teñido con bromuro de etidio y se fotografió con regla. Para transferir el ADN digerido se utilizó un electrotransfer (Bio-Rad). Para ello se saturaron en TAE 1x (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA) dos trozos de papel de transferencia y uno de membrana de nitrocelulosa, del mismo tamaño del gel, por al menos 10 minutos. El primer trozo de papel de transferencia se ubicó sobre el ánodo, sobre el papel se colocó la membrana y sobre ésta se colocó el gel. El último trozo de papel de transferencia se ubicó sobre el gel, eliminando las burbujas en cada paso. Luego se conectó el cátodo y la fuente de poder y se dejó transferir por 3.5 horas a 120 volts. Una vez terminada la transferencia, se recuperó la membrana, se marcó los pocillos y se enjuagó en SSC 2x (NaCl 0.3 M, citrato de sodio 0.03 M [pH 7.0]). La eficiencia de la transferencia se evaluó mirando el gel con luz UV. El ADN se denaturó colocando la membrana sobre papel de transferencia saturado con NaOH 0.4N por 5 minutos, se enjuagó nuevamente la membrana en SSC 2x. El ADN se fijó secando la membrana a 37°C por 3 horas.

#### **3.2.7.2.** Preparación de sondas microsatelitales de copia única

Se digirió ADN plasmidial con enzimas de restricción elegidas según el mapa de restricción de cada secuencia. El ADN digerido se fraccionó por electroforesis en un gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio. Se removió del gel el trozo conteniendo el

fragmento de interés y se purificó utilizando el Kit GeneClean (Qbiogene), según las instrucciones del fabricante. Se disolvió la agarosa con 3 volúmenes NaI 4 M, se agregó matriz de sílica GlassMilk que une el ADN, se sedimentó mediante centrifugación y se lavó con la solución New Wash del kit; finalmente el ADN se eluyó con TE. La eficiencia de la purificación se estimó fraccionando una alícuota correspondiente al 10 % del total en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, por comparación con un estándar de concentración conocida. El fragmento de ADN purificado fue marcado radioactivamente  $con^{32}P-\alpha$ -dCTP con el KIT Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen), según el protocolo estándar entregado por el fabricante. Éste consiste en un marcaje del fragmento de interés utilizando hexámeros al azar y fragmento Klenow, que incorpora dATP, dGTP, dTTP fríos y dCTP radiactivo. La eficiencia del marcaje fue estimada precipitando la muestra en TCA 10% por 10 minutos en hielo y se filtró en un filtro 0.22 µm. Se lavó el filtro 3 veces con 5 ml de TCA 10% enfriado en hielo con pirofosfato de sodio 1% (p/v) y una vez con 5 ml de etanol 50% a temperatura ambiente. Se dejó secar el filtro y se determinó la radioactividad precipitable con un contador de centelleo líquido. Para ello se colocó el filtro en frasco con 3.5 ml de solución de centelleo (PPO 4g/l, POPOP 0.1 g/l en tolueno). En general se logró una actividad específica de  $5.6 \times 10^8$  cpm/µg.

#### **3.2.7.3.** Detección molecular de secuencias específicas

El filtro de nitrocelulosa se sumergió en SSC 6x por 2 minutos y se colocó en una bolsa plástica sellable con calor. Se agregó 0.2 ml de solución de prehibridación (SSC 6x, formamida 50%, solución de Denhardt 5x (Ficoll 0.1% p/v, polivinilpirrolidona 0.1% p/v, albúmina de suero bovino 0.1% p/v), SDS 0.5%, ADN de salmón fragmentado 100  $\mu$ g/ml)

por cada centímetro cuadrado de membrana para bloquear los sitios inespecíficos y se incubó 2 horas a 42°C. La sonda radiomarcada fue denaturada a 100°C por 5 minutos y enfriada en hielo para evitar su renaturación. Se agregó 1 millón cpm/ml de sonda marcada a la solución de prehibridación y se incubó a 42°C toda la noche. Terminada la incubación, se descartó la solución de hibridación de forma adecuada y se removió el filtro. Éste se sumergió en una bandeja con SSC 2x y SDS 0.5% a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego fue transferido a una bandeja con SSC 2x y SDS 0.1% y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se descartó esa solución y se le agregó SSC 0.1x y SDS 0.5%, incubando por 30 minutos a 37°C con agitación lenta. Se monitoreó la radioactividad con un contador Geiger y se colocó la membrana en un envoltorio plástico sellado para evitar la desecación. Se expuso durante toda la noche con película X-OMAT AR (Kodak) en un cassette con pantalla intensificadora.

#### 4. **RESULTADOS**

#### 4.1. Aislamiento y análisis de secuencias microsatelitales

Para la obtención de secuencias microsatelitales de *T. barrerae* se rastrearon 1800 recombinantes de una biblioteca genómica parcial en el vector pGEM-3Zf con una sonda oligonucleotídica (CA)<sub>10</sub> y se aislaron 10 clones positivos, de los cuales, cinco contenían repeticiones (CA/GT)n (Paredes, 1998). En la figura 2 se muestra la secuencia de los cinco loci microsatelitales *Tba*-201, *Tba*-203, *Tba*-206, *Tba*-1017 y *Tba*-1025, que se analizaron en el presente estudio. El análisis de la secuencias reveló que *Tba*-1017 posee un microsatélite perfecto de 23 repeticiones, mientras que *Tba*-201, *Tba*-203, *Tba*-206 y *Tba*-1025 contienen repeticiones imperfectas, con el tramo perfecto más largo de 12 a 13 repeticiones (Figura 2). En la Tabla I se presenta un resumen de los loci microsatelitales y los partidores utilizados para su amplificación, su secuencia y su Tm.

#### 4.2. Determinación de las condiciones de amplificación de los loci microsatelitales

Se determinó las condiciones de amplificación por PCR para cada locus microsatelital con respecto a dos parámetros necesarios para obtener un producto específico y en una cantidad detectable en un gel de poliacrilamida con tinción de plata: temperatura de apareamiento y cantidad de ADN genómico utilizado como templado. La figura 3 muestra la amplificación del locus *Tba*-201 a diferentes temperaturas de apareamiento. En el carril 6 se observa un producto único, mientras que en los otros carriles se aprecian bandas extras de mayor tamaño que el producto esperado, además de una cantidad menor de producto. Por lo tanto se eligió 57°C como temperatura de apareamiento para el análisis de este locus. Las temperaturas seleccionadas para

#### >pTy(CA)-201 (348bp)

#### >pTy(CA)-203 (456bp)

#### >pTy(CA)-206 (496bp)

#### >pTy(CA)-1017 (295bp)

#### >pTy(CA)-1025 (796bp)

#### Figura 2

#### Figura 2:

Secuencias genómicas de *Tympanoctomys barrerae* con repeticiones microsatelitales. Se presentan las secuencias de las recombinantes pTy(CA)-201, pTy(CA)-203, pTy(CA)-206, pTy(CA)-1017 y pTy(CA)-1025, aisladas de una biblioteca genómica parcial de *T. barrerae*. La repetición se muestra en cursiva y los oligonucleótidos diseñados para las amplificaciones a partir de ADN genómico se encuentran subrayados. Las flechas indican la orientación del producto de amplificación. Las secuencias destacadas en gris corresponden a los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas para preparar sondas, que no contenían la repetición, para Southern blot. E: *Eco*RI. S: *Sac*I. Sm: *Sma*I.

Locus	Repetición	Nombre Partidores	Secuencia Partidores (5'-3')	Tm (°C)	Tº de Annealing (°C)	Tamaño Producto Esperado (pb)
		TyMS 201 forward	tgtaactgagaatcaaagctg	58	57	148
<i>Tba</i> -201	$(CA)_{12}CTCATA(CA)_4$	TyMS 201 reverse	agccataagtttggtttctgt	58	57	140
	(CA) <sub>12</sub> TACATA(CA) <sub>4</sub>	TyMS 203 forward	cacctaacggagcaaagagact	66	55	176
<i>Tba</i> -203		TyMS 203 reverse	ctccccgggactttacaatta	62	55	170
<i>Tba</i> -206	(CA) <sub>5</sub> TA(CA) <sub>2</sub> TA(CA) <sub>13</sub>	TyMS 206 forward	attcagtcacctttgacccatt	62	60	142
		TyMS 206 reverse	ctctgtgattatcttgctgtgga	66	00	143
<i>Tba</i> -1017	(CA) <sub>23</sub>	TyMS 1017 forward	agagccttcgtgagagcttg	62	50	192
		TyMS 1017 reverse	caggtgctttagcccactgag	66	50	162
Tba-1025	(CA)5TA(CA)13	TyMS 1025 forward	tccaccttgttttgctattcctc	66	60	178
		TyMS 1025 reverse	ggttcaatctcccagcactaca	66	00	170

## Tabla I:

Partidores para el análisis de loci microsatelitales de T. barrerae. Para cada locus se indica la repetición, los oligonucleótidos

sentido y antisentido y el tamaño del producto esperado.



#### Figura 3:

**Caracterización de los productos de amplificación del locus** *Tba-201* **a diferentes temperaturas de apareamiento en gel de agarosa.** Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa 1.5%. Carril 1: estándar de peso molecular 100 bp (Invitrogen; 0.25 μg). Carril 2: 50°C. Carril 3: 52°C. Carril 4: 54.5°C. Carril 5: 55.5°C. Carril 6: 57°C. Carril 7: 60°C. Carril 8: control negativo sin templado de la reacción de PCR. Los números en el costado izquierdo indican los tamaños del estándar de peso molecular. La flecha indica el producto del tamaño esperado: 148 pb. Xc: Xilencianol.

la amplificación de cada locus se muestran en la Tabla I. En la figura 4 se observa los productos de amplificación del locus *Tba*-1017 con distintas cantidades de templado. Para este locus la cantidad de templado seleccionada fue 20 ng por reacción (Figura 4, carril 5). La cantidad de ADN genómico utilizado para cada locus se indica en la Tabla II.

#### 4.3. Caracterización de los alelos microsatelitales.

En la caracterización de los loci microsatelitales se analizaron para los loci *Tba*-201 y *Tba*-206 cinco individuos de *O. mimax* y 14 de *T. barrerae* y para los loci *Tba*-203, *Tba*-1017 y *Tba*-1025, uno y 12 respectivamente (Tabla III).

Los cinco loci se amplificaron según las condiciones estandarizadas. Los loci *Tba*-201, *Tba*-206 y *Tba*-1017 fueron polimórficos. En los individuos de *T. barrerae* analizados, *Tba*-201 presenta un total de 16 alelos en un rango de tamaño entre 138 y 163 pb; *Tba*-206 presenta 12 alelos entre 151 y 162 pb; y *Tba*-1017, 8 alelos entre 179 y 191 pb. Los loci *Tba*-1025 y *Tba*-203 mostraron dos alelos en todos los individuos analizados (Tabla III).

Se observó un mínimo de dos y un máximo de cuatro alelos en cada individuo de *T. barrerae*, mientras que en *O. mimax*, todos los individuos analizados poseían uno o dos alelos, como máximo (Tabla III). En general, para el locus *Tba*-201 se encontraron 6 individuos de *T. barrerae* con cuatro alelos (42.86 %), 2 con tres (14,29 %) y 6 con dos alelos (42.86 %). Para el locus *Tba*-206, 3 individuos de *T. barrerae* con cuatro alelos (21.43 %), 3 con tres (21.43 %) y 8 con dos (57.14 %). Y para el locus *Tba*-1017, 5 individuos de *T. barrerae* con cuatro alelos (41.67 %), 2 con tres (16.67 %) y 5 con dos alelos (41.67 %).

La figura 5 muestra un fraccionamiento electroforético de los productos de amplificación del locus *Tba*-1017 en 12 individuos. En el carril 1, se aprecia un individuo de *O. mimax* que



#### Figura 4:

Caracterización de los productos de amplificación del locus *Tba*-1017 con distintas cantidades de templado en gel de agarosa. Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa 2%. Carril 1: Control negativo de la reacción sin templado. Carril 2: 200 ng. Carril 3: 100 ng. Carril 4: 50 ng. Carril 5: 20 ng. Carril 6: 10 ng. Carril 7: 5 ng. Carril 8: 2 ng. Carril 9: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen; 0.5 µg). La flecha indica el producto del tamaño esperado: 182 pb. Los números de la derecha indican los tamaños del estándar de peso molecular. Xc: Xilencianol.

Locus	Cantidad de ADN genómico templado
<i>Tba</i> -1017	20 ng
<i>Tba</i> -1025	20 ng
<i>Tba</i> -201	40 ng
<i>Tba</i> -203	20 ng
<i>Tba</i> -206	20 ng

Tabla II:

Cantidad de ADN genómico templado para la amplificación de cada locus microsatelital.

posee dos alelos. En los carriles 2, 3, 4 y 6 se observan distintos individuos de *T. barrerae* con dos alelos, en los carriles 5 y 7, individuos con 3 alelos y en los carriles 8, 9, 10, 11 y 12, individuos con cuatro alelos. En la figura 6 se observa los perfiles electroforéticos de 14 individuos para los loci *Tba*-201 y *Tba*-206. En la figura 6, en el carril 6 se observa un individuo de *O. mimax* con un alelo para el locus *Tba*-206, en el carril 7 un *O. mimax* con dos alelos. En los carriles 16, 19 y 12 se aprecian dos, tres y cuatro alelos en los individuos de *T. barrerae*, respectivamente. Finalmente, para el locus *Tba*-201, se observa un individuo de *O. mimax* con un alelo en el carril 21 y otro con dos alelos en el carril 22 (Figura 6). En los carriles 29 y 31, para el mismo locus en *T. barrerae*, se observan individuos con dos y cuatro alelos, respectivamente. El análisis de todos los individuos analizados se presenta en la Tabla III.

Estos resultados muestran una concordancia entre el número de alelos por individuo y el nivel de ploidía de las especies en estudio, así como un alto polimorfismo de estos loci microsatelitales.



#### Figura 5:

**Caracterización del locus microsatelital** *Tba***-1017 en gel de poliacrilamida 6% denaturante, teñido con plata.** Los números de los animales analizados son los siguientes: Carril 1: *O. mimax* 1539. Carriles 2-12: *T. barrerae* 1481, 1623, 1624, 1626, 1633, 1648, 1652, 1675, 1700, 1702, 1716. Carriles 13-16: Estándar pGEM-3Zf(+). Los asteriscos negros indican los alelos y las cruces blancas indican el estándar. Los números en costado derecho indican los tamaños del estándar de peso molecular.



#### 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34

#### Figura 6:

Caracterización locus microsatelital *Tba*-206 y *Tba*-201 en gel de poliacrilamida 6% denaturante, teñido con plata. Carriles 1-4: Estándar pGEM-3Zf(+). Carril 5: control negativo *Tba*-206. Carril 6-9: *O. mimax* 1130, 1161, 1487, 1536, *Tba*-206. Carriles 10-19: *T. barrerae* 1481, 1484, 1623, 1624, 1633, 1648, 1675, 1700, 1714, 1716, *Tba*-206. Carril 20: control negativo *Tba*-201. Carril 21-24: *O. mimax* 1130, 1161, 1487, 1536, *Tba*-201. Carriles 25-34: *T. barrerae* 1481, 1484, 1623, 1624, 1633, 1648, 1675, 1700, 1714, 1716, *Tba*-201. Los puntos rojos muestran las bandas del estándar y los números en el costado izquierdo indican sus tamaños. Los puntos azules muestran las bandas alélicas del locus *Tba*-206 y los amarillos, las bandas alélicas del locus *Tba*-201.

Individuo	Locus						
	<i>Tba</i> -201	<i>Tba</i> -203	<i>Tba</i> -206	<i>Tba</i> -1017	Tba-1025		
<i>O. m.</i> 1130	146		152				
<i>O. m.</i> 1161	148/150		153/155				
<i>O. m.</i> 1487	153/157	175/177	153/157		152/156		
<i>O. m.</i> 1536	148/150		153/158				
<i>O. m.</i> 1539	155/158		156/160	179/181			
<i>T. b.</i> 1481	142/146	175/177	151/153/156/158	179/181	165/169		
<i>T. b.</i> 1484	146/150	175/177	151/153/156/158		165/169		
<i>T. b.</i> 1623	141/146/150/156	175/177	151/154/158/160	179/181	165/169		
<i>T. b.</i> 1624	141/146/156/160	175/177	155/158	179/181	165/169		
<i>T. b.</i> 1626	143/146/155/163	175/177	153/155/156	181/183/185	165/169		
<i>T. b.</i> 1633	141/146	175/177	152/155	183/185	165/169		
<i>T. b.</i> 1648	138/140/142/146	175/177	152/154	181/183/185	165/169		
<i>T. b.</i> 1652	141/145	175/177	155/157	185/187/189/191	165/169		
<i>T. b.</i> 1656	141/143/147	175/177	155/157	181/184	165/169		
<i>T. b.</i> 1675	142/146/152/155	175/177	161/165	181/183/185/187	165/169		
<i>T. b.</i> 1700	140/146	175/177	155/157	181/183/185/187	165/169		
T. b. 1702	142/144/145	175/177	155/157/161	181/183/185/187	165/169		
<i>T. b.</i> 1714	138/140/142/148		154/156				
<i>T. b.</i> 1716	145/147		155/157/162	183/185/189/191			

#### Tabla III:

Alelos microsatelitales en *Octomys mimax* y *Tympanoctomys barrerae*. Número y tamaño (pb) de los alelos identificados en los individuos de *O. mimax* y *T. barrerae* analizados. Los guiones indican ausencia del dato. *O. m.: Octomys mimax. T. b.: Tympanoctomys barrerae*.

#### 4.4. Análisis de Southern Blot

Para corroborar la duplicación de los loci microsatelitales en el genoma tetraploide de *T. barrerae* con respecto al diploide *O. gliroides*, se realizó un análisis de Southern blot con las secuencias genómicas flanqueantes al microsatélite. A partir del mapa físico de la secuencia de la recombinante se eligieron las enzimas de restricción. Estas enzimas permitieron obtener fragmentos de ADN plasmidial con secuencias únicas que no contenían la repetición. En la Figura 7 se indican la ubicación y el tamaño de los fragmentos aislados del ADN plasmidial de las recombinantes que se utilizaron como sonda en el análisis de Southern blot del ADN genómico de *T. barrerae*. Se obtuvieron sondas a partir de cuatro recombinantes: pTy(CA)-203, pTy(CA)-206, pTy(CA)-1025 y pTYM-6. El ADN genómico se digirió con enzimas de restricción que no presentan sitios de reconocimiento en estas sondas (Tabla IV).

En la figura 8 se observan los fraccionamientos electroforéticos del ADN genómico completamente digerido con *Eco*RI y *Hin*dIII (A y C) y su hibridación con dos sondas, Ty-6 y Ty-203 (B y D), respectivamente. En ellos se aprecian entre dos (Figura 8D, carriles 3, 4 y 5) y cuatro bandas discretas (Figura 8B, carriles 3, 4 y 5) en el ADN genómico de *T. barrerae*, lo que sugiere la presencia de más de una copia de esta secuencia en el genoma de *T. barrerae*. La ausencia de señal en el ADN genómico de *O. gliroides* podría ser por el uso de una sonda heteróloga y la estringencia de la s condiciones de hibridación. En la figura 9 se observa que las digestiones con *Eco*RI y *Hin*dIII presentan distintos número de bandas de hibridación con la sonda Ty-1025. El ADN digerido con *Eco*RI presenta dos, tres y cuatro bandas (Figura 9A), mientras que el digerido con *Hin*dIII presenta sólo una banda en todos los individuos (Figura 9B). La presencia de más de dos bandas, y hasta cuatro, en los individuos de *T. barrerae* concuerda

con una duplicación de sus loci *Tba*-6, *Tba*-1025, *Tba*-203. No se pudo detectar una posible duplicación del locus *Tba*-206 con las enzimas utilizadas.

Recombinante	Vector	Enzimas para liberar el fragmento	Tamaño del Fragmento (pb)	Enzima digestión ADN genómico
pTy(CA) - 203	pBluescript	SmaI	245	HindIII
pTy(CA) - 206	pBluescript	SacI	250	<i>Eco</i> RI
pTy(CA) - 1025	pGEM3Zf	<i>Eco</i> RI	360	<i>Eco</i> RI/ <i>Hin</i> dIII
pTYM - 6	pBluescript	SmaI EcoRI	205	EcoRI

#### Tabla IV:

**Diseño de obtención de secuencias genómicas únicas para análisis de Southern blot.** Enzimas utilizadas para generar las sondas de los análisis de Southern blot y su tamaño (pb). En al última columna se detallan las enzimas utilizadas para digerir el ADN genómico con el cual fueron hibridadas las sondas.



Figura 7:

Esquema del mapa físico de los insertos de las recombinantes utilizadas para obtener sondas para Southern blot. (A) pTy(CA)-203. (B) pTy(CA)-206. (C) pTy(CA)-1025. (D) pTYM-6. La línea negra representa el inserto y los bloques amarillos, la repetición. Las líneas transversales de colores representan los sitios de cortes de las enzimas de restricción. Sm: *Sma*I. S: *Sac*I. E: *Eco*RI. Los números indican el tamaño del fragmento liberado al realizar la digestión.



#### Figura 8:

Análisis de Southern blot de los loci *Tba-6* y *Tba-203*. (A) Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa 1% de ADN genómico digerido con *Eco*RI. (B) Southern Blot del gel en (A) con la sonda Ty-6. C) Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa 1% de ADN genómico digerido con *Hin*dIII. D) Southern blot del gel en (C) con la sonda Ty-203. Carril 1: Marcador de peso molecular ADN  $\lambda$ /*Hin*dIII (0.5 µg). Carril 2: *O. gliroides* 1209. Carril 3: *T. barrerae* 1643. Carril 4: *T. barrerae* 1648. Carril 5: *T. barrerae* 1651. Carril 6: *T. barrerae* 1688. Carril 7: *T. barrerae* 1689. Los números a la izquierda indican los tamaños del estándar de peso molecular. Las flechas indican las bandas de hibridación.



#### Figura 9:

Análisis de Southern blot del locus *Tba-* 1025. (A) Análisis de Southern blot con la sonda Ty-1025 de ADN genómico digerido con *Eco*RI. (B) Análisis de Southern blot con la sonda Ty-1025 de ADN genómico digerido con *Hin*dIII. Carril 1: Marcador de peso molecular ADN  $\lambda$ /*Hind*III (0.5 µg). Carril 2: *O. gliroides* 1209. Carril 3: *T. barrerae* 1643. Carril 4: *T. barrerae* 1648. Carril 5: *T. barrerae* 1651. Carril 6: *T. barrerae* 1688. Carril 7: *T. barrerae* 1689. Las flechas indican las bandas de hibridación.

#### 5. DISCUSIÓN

#### 5.1. Características de las secuencias microsatelitales

Los microsatélites son los marcadores moleculares de preferencia en la actualidad por su alta variabilidad, pero también por su herencia codominante y porque los ensayos realizados con ellos son de alta sensibilidad y replicabilidad (Jarne y Lagoda, 1996; Sunnucks, 2000; Ellegren, 2004). Tales características se presentan como una herramienta útil para corroborar el nivel de ploidía del roedor tetraploide *Tympanoctomys barrerae*.

Los microsatélites son secuencias repetidas en tandem muy variables, de iteraciones cortas y simples de entre 1 y 6 pares de bases, que alcanzan tamaños de hasta un megabase y son muy abundantes en la mayoría de los genomas (Chambers y MacAvoy, 2000; Li et al., 2002). Su nombre surgió en los años sesentas, cuando en centrifugaciones de ADN por gradientes de densidad se observó una fracción menor, de distinta densidad, que contenía grandes repeticiones centroméricas y se le llamó ADN satelital (Britten y Kohne, 1968). Actualmente el término se aplica a grandes regiones de familias de elementos repetitivos, de varios megabases de tamaño. Cuando se identificaron iteraciones en tandem más pequeñas (entre 10 y 30 pares de bases) que alcanzan tamaños de 30 kilobases o más, se les llamó minisatélites (Nakamura et al., 1987; Chambers y MacAvoy, 2000). Finalmente, al descubrimiento de repeticiones en tandem de motivo simple se les dio el nombre de microsatélites (Krawczak & Schmidtke, 1998; Chambers y MacAvoy, 2000).

Los microsatélites caracterizados en *T. barrerae* son dinucleotídicos, siendo este tipo de repetición la más abundante en los genomas de los roedores. Además la unidad (CA)n es la más

frecuente en todos los vertebrados y presenta altos valores de expansibilidad en las regiones intergénicas e intrónicas de los roedores (Tóth et al., 2000).

Las búsquedas con BLAST no reconocieron ningún marco de lectura abierto en las secuencias adyacentes a los microsatélites de *T. barrerae*. Esta característica concuerda con que la mayor parte de los microsatélites se encuentran en regiones no codificantes del ADN, como las regiones intergénicas o los intrones. Al respecto, la selección contra las mutaciones que generan desplazamientos en el marco de lectura impide la expansión de cualquier repetición excepto las trinucleotídicas en el ADN codificante (Ellegren, 2004; Li et al., 2004). En humanos, el aumento excesivo en el número de repeticiones de los motivos trinucleotídicos está asociado a enfermedades como el síndrome del X frágil, la distrofia miotónica y la enfermedad de Huntington (Rubinsztein, 1999).

En sistemas *in vivo*, la tasa de mutación de los microsatélites es de  $10^{-2}$  eventos por locus por replicación en *Escherichia coli*. Esta tasa es de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  eventos por locus por replicación en levaduras. Estimaciones basadas en análisis de pedigrí humanos señalan una tasa de aproximadamente  $10^{-3}$  eventos por locus por generación, mientras que los estudios en ratones indican una tasa de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  eventos por locus por generación. La tasa más baja (6 x  $10^{-6}$  eventos por locus por generación) se registra en *Drosophila*. Aun así, esta tasa es varios órdenes de magnitud mayor que la tasa de mutaciones puntuales, que está en el orden de  $10^{-9}$  a  $10^{-10}$  eventos por locus por generación (Hancock, 1999). Esta diferencia se debe a una inestabilidad propia de las secuencias microsatelitales, que es consecuencia del tamaño de la unidad de repetición, del número de éstas, de la presencia de variantes en las repeticiones y de la tasa transcripcional de la región donde se ubica el locus (Eisen, 1999; Schlötterer, 2000). Por lo tanto, se espera un mayor polimorfismo en los microsatélites perfectos (como *Tba*-1017) que en los

imperfectos (como *Tba*-203 o *Tba*-206). Pero en el caso de *T. barrerae* esta condición no se presentó en todos los loci, ya que dos loci con repeticiones imperfectas presentan un mayor número de alelos por locus que el locus perfecto (Schlötterer, 1998).

La factibilidad de observar hasta cuatro alelos en cada individuo de *T. barrerae*, a través de una reacción de PCR con partidores locus-específicos y electroforesis en geles de alta resolución teñidos con plata, se debe a que las mutaciones más abundantes en los microsatélites corresponden a cambios en el número de copias de la unidad básica de la repetición (Eisen, 1999). El principal mecanismo mutacional por el cual ocurre esta variación, es el apareamiento incorrecto por corrimiento de hebra o SSM ("Slip-Strand Mispairing"), que consiste en una disociación transiente de las hebras durante la replicación del ADN, seguido de un apareamiento incorrecto durante la reasociación (Levinson y Gutman, 1987; Schlötterer y Tautz, 1992). Al reiniciarse la replicación se producen deleciones o inserciones de unidades de repetición completas debido a la formación de asas. Cuando el asa se forma en la hebra hija se produce una inserción con respecto a la hebra templado. Por el contrario, si el asa se forma en la hebra parental, como resultado se produce una deleción (Eisen, 1999; Moxon y Wills, 1999; Ellegren, 2004).

A nivel individual, los microsatélites se podrían utilizar para detectar migraciones o grados de parentesco y medir los niveles de endogamia (Sunnucks, 2000). En general, los altos niveles de endogamia tienen un efecto nocivo sobre los rasgos relacionados con la adecuación biológica y se pueden inferir conociendo los tamaños de los alelos microsatelitales para un locus (Hedrick y Kalinowski, 2000). A su vez, la adecuación biológica de una población natural se puede calcular midiendo, por ejemplo, el peso de los individuos al nacer y su sobrevivencia (Luikart y England, 1999; Goudet y Keller, 2002).

Así, la caracterización de microsatélites provee de una poderosa herramienta para estudiar principalmente las regiones no codificantes del genoma. En algunos casos se han utilizado para la investigación de las duplicaciones genómicas en plantas y animales (Angers et al., 2002; David et al., 2003).

#### 5.2. Microsatélites y duplicación génica

La amplificación *in vitro* de los marcadores microsatelitales permite una observación directa aunque parcial del genoma, ya que su herencia codominante revela concordancia entre el número máximos de alelos observados por individuo en cada locus y el nivel de ploidía de la especie en cuestión (Ludwig et al., 2001). Así, en animales y plantas poliploides, los microsatélites han servido, tanto para estudiar casos individuales, como especies, géneros y familias poliploides (Ludwig et al., 2001).

Mis estudios revelaron hasta cuatro alelos por individuo en tres loci microsatelitales de *T. barrerae* (*Tba*-1017, *Tba*-201 y *Tba*-206). Sin embargo, en los controles diploides se observa sólo hasta dos alelos. Tal resultado revela correspondencia entre lo observado con estos marcadores y lo esperado de acuerdo a la hipótesis alternativa, que predice un máximo de dos alelos de diferente tamaño para los controles diploides y para un tetraploide, un máximo de cuatro alelos. Aunque en los otros loci analizados (*Tba*-203 y *Tba*-1025) se observan sólo dos alelos, fijados en todos los individuos analizados (tanto diploides como tetraploides). No obstante, este resultado no contradice la naturaleza poliploide del roedor, debido a que la homocigosis puede explicar tal condición (Ludwig et al., 2001).

Inicialmente *T. barrerae* fue descrito como tetraploide por su cariotipo, el contenido de ADN de sus células somáticas y germinales y el tamaño de la cabeza de sus espermios (Gallardo et al., 1999). Evidencias recientes de estudios moleculares en regiones codificantes del genoma de esta especie apoyan esta condición. Por ejemplo, en estudios de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con sondas para el gen *Hoxc8* se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa en la distribución del número de señales fluorescentes entre *T. barrerae* (una a cuatro señales) y los diploides utilizados (*Octomys mimax* y *Spalacopus cyanus*), en los cuales se observaron una y dos señales únicamente (Cebrián, 2004). También los resultados de PCR *in situ* del gen receptor de andrógeno, ligado al cromosoma X, apoyan la condición tetraploide de *T. barrerae*. Así, en los núcleos del control diploide *Mus musculus* se observaron dos señales en las hembras y una señal en los machos, mientras que en los núcleos de machos. Este resultado permite suponer que *T. barrerae* posee un complemento XXXX las hembras y XXXY los machos (Gallardo et al., 2004).

Un organismo poliploide se puede originar por dos vías. Si se trata de autopoliploidía, existe una duplicación genómica dentro de una misma especie. Si es por alopoliploidía, la duplicación se produce por hibridación de dos especies distintas (Wolfe, 2001). A nivel cromosómico, las especies diploides tienen dos juegos de cromosomas estructuralmente similares, llamados cromosomas homólogos, y los autotetraploides poseen cuatro juegos (Wolfe, 2001; Ramsey y Schemske, 2002). A diferencia de los autopoliploides, los alopoliploides poseen complementos cromosómicos provenientes de dos o más linajes evolutivos y se conoce como homeólogos a los cromosomas equivalentes, heredados de diferentes especies ancestrales (Pikaard, 2001; Moore, 2002). Los cromosomas homólogos en los autoploiploides se aparean al azar, formando variados arreglos (bi-, tri-, cuadrivalentes, etc.), por lo que la segregación también es al azar, caracterizándose entonces por poseer más de dos alelos en un locus (herencia

multisómica; Soltis y Soltis, 2000; Pikaard, 2001; Ramsey y Schemske, 2002). Por el contrario, los cromosomas en los alopoliploides no se aparean al azar. Sus homólogos se aparean entre sí y rara vez se aparean los homeólogos. Por lo tanto, forman sólo bivalentes durante la metafase de la meiosis (Soltis y Soltis, 2000; Moore, 2002; Ramsey y Schemske, 2002). La formación estricta de bivalentes en los alopoliploides permite la segregación independiente de los alelos en los homeólogos, lo que conlleva a una "heterocigosidad fija" heredada de manera disómica (un locus con dos alelos; Pikaard, 2001; Ramsey y Schemske, 2002). Dentro de este contexto, la escasa presencia de homocigotos en los loci microsatelitales estudiados podría ser consecuencia de un origen híbrido. Al respecto, se espera una mayor heterocigosidad en un alopoliploide que en un autopoliploide, debido a los distintos tipos de herencia que muestran unos y otros. Al tratarse de un organismo autopoliploide, los individuos con una sola banda alélica son, probablemente, consecuencia de la segregación aleatoria de los alelos. En contraste, los alopoliploides, una banda única sólo puede ser explicada por la coexistencia de alelos con distinta secuencia, pero de tamaños iguales (homoplasía; Estoup et al., 2002), o por la presencia de alelos nulos en uno o ambos loci (Segarra-Moragues et al., 2004).

La presencia de hasta cuatro alelos por individuo en los loci *Tba*-1017, *Tba*-201 y *Tba*-206 nos induce a pensar en una herencia de tipo tetrasómica para *T. barrerae*, que no concuerda con la hipótesis de su origen alopoliploide. Sin embargo, la presencia de estos cuatro alelos puede deberse a la cercanía filogenética de las especies involucradas en su origen (*O. mimax* y *P. aureus*; Honeycutt et al., 2003; Gallardo et al., 2004). Cabe destacar que los mismos juegos de partidores para la amplificación de loci microsatelitales de *T. barrerae* pueden ser utilizados en especies cercanas (Schlötterer et al., 1991; FitzSimmons et al., 1995). De este modo, los

oligonucleótidos pueden aparearse a las secuencias y amplificar los cuatro alelos presentes en el genoma de *T. barrerae*, provenientes de cada progenitor.

Originalmente se propuso que el origen de T. barrerae resultó por un fenómeno de autotetraploidía con eliminación selectiva de cromosomas (Gallardo et al., 1999). Estudios moleculares posteriores indican un origen alotetraploide mediante hibridación entre las especies Octomys mimax y Pipanacoctomys aureus (Gallardo et al., 2004). Esta proposición es apoyada por la formación exclusiva de bivalentes en la meiosis, rasgo que en el caso de la carpa (Cyprinus carpio) permitió establecer su origen híbrido (May et al., 1997; Ludwig et al., 2001). El origen híbrido también ha sido apoyado por estudios de alozimas, ya que el análisis de diecinueve loci presuntivos revelaron una herencia disómica en T. barrerae (Köhler et al., 2000). Asimismo, estudios en ARN ribosomal mostraron dominancia nucleolar (González et al., 2004). Este mecanismo de silenciamiento génico ha sido descrito únicamente en alopoliploides e híbridos interespecíficos y consiste en el silenciamiento completo de los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S provenientes de un progenitor, transcribiéndose sólo los del otro progenitor (Pikaard, 2000; Pikaard, 2001). Al igual que los diploides cercanos, T. barrerae posee sólo un par cromosómico que da señal positiva a la tinción de plata, que marca los genes ribosomales transcripcionalmente activos (Zavala-Guillén et al., 2004). Al utilizar la técnica de hibridación fluorescente in situ para detectar todos los loci ribosomales 18S, 5.8S y 28S, se observa una señal hasta en cuatro cromosomas distintos. Esto indica que existen cuatro copias del locus NOR, pero sólo dos son funcionales, lo que apoya el origen híbrido de T. barrerae (González et al., 2004).

Los estudios realizados con microsatélites en otras especies poliploides han sido de utilidad en el conocimiento y compresión de sus niveles de ploidía. Por ejemplo, en la carpa, *Cyprinus carpio*, los microsatélites se encuentran en loci duplicados que presentan segregación disómica (Crooijmans et al., 1997). La alta proporción de genes parálogos encontrados en el genoma de la carpa, que corresponden a genes homólogos originados por duplicaciones génicas, sumado al corto tiempo de origen y sin pérdida de cromosomas sugiere un origen alotetraploide para este pez (David et al., 2003). Además, al igual que en *T. barrerae*, no se forman cuadrivalentes en la meiosis (Crooijmans et al., 1997; David et al., 2003).

Los esturiones poliploides (géneros Acipenser, Huso y Scaphirhynchuus) son especies que tienen gran importancia económica y se encuentran en peligro de extinción (May et al., 1997; Ludwig et al., 2001). Los microsatélites han permitido conocer su dinámica poblacional, para llevar a cabo mejores programas de recuperación de las distintas especies (May et al., 1997). Los primeros estudios mostraron la utilidad de estos marcadores en el estudio de este Acipenser y Scaphirhynchus (May et al., 1997). Posteriormente, fue posible determinar que Acipenser fulvescens posee herencia tetrasómica en algunos loci, lo que concuerda con una condición tetraploide (Pyatskowit et al., 2001). Mediante el estudio de la relación entre el número cromosómico, el contenido de ADN y el número de alelos observados, se pudo identificar que en los esturiones existen especies diploides, tetraploides y octoploides funcionales (Ludwig et al., 2001).

Si bien la poliploidía en humanos es una condición letal que genera abortos durante el primer trimestre de embarazo, en pocos casos los fetos sobreviven al nacimiento (Guc-Scekic et al., 2002; Baumer et al., 2003). Los análisis microsatelitales han permitido aclarar el origen de esta aberración genómica en humanos. Por ejemplo, un feto abortado a las 8 semanas de gestación y una niña de 26 meses de edad presentaban tetraploidía, encontrándose cuatro alelos en múltiples loci analizados (dos provenientes de la madre y dos del padre). El resultado del análisis de "*fingerprinting*" de estos alelos descarta la causa más frecuente de tetraploidía en los

humanos, que es la falla en la finalización de la primera división cigótica. Así, el resultado obtenido permitió sugerir que la mutación sería por un error meiótico materno combinado con dispermia, o bien mediante una fusión de dos óvulos fertilizados normalmente (Guc.Scekic et al., 2002; Baumer et al., 2003).

#### 5.3. Duplicaciones genómicas y poliploidización

La caracterización de microsatélites implica el estudio de las secuencias génicas flanqueantes, que son únicas dentro del genoma. Esto es importante en el caso de los octodóntidos, las secuencias flanqueantes de *Spalacopus cyanus* no reconocen las secuencias de *T. barrerae*, a pesar de ser especies cercanas (Tabla II, Schroeder et al., 2000).

La duplicación génica ha sido ampliamente comprobada a través de la duplicación de bandas de hibridación. Por ejemplo, en las especies de algodón de la subsección *Erioxylum* se observaron bandas duplicadas del locus *AdhA*, indicadoras de la duplicación del locus (Small y Wendel, 2000). En los estudios de Southern blot en el trigo hexaploide *Triticum aestivum* han permitido detectar hasta tres copias del gen acetil-CoA carboxilasa que reflejan la dosis génica de la especie en cuestión (Gornicki et al., 1997).

El aislamiento de fragmentos que contienen sólo las regiones flanqueantes a la repetición microsatelital permite su análisis como secuencia de copia única y permite evaluar la duplicación de los loci microsatelitales en *T. barrerae* a través de ensayos de Southern blot. Estos análisis permitieron determinar el número de copias de un locus inferido por el número de bandas de hibridación (Small y Wendel, 2000). En los casos que se observan más de dos bandas, se deduce que son dos loci con sus respectivos alelos por la escasa diferencia de tamaños entre las bandas consideradas como alélicas.

Los análisis de Southern blot de ADN genómico de *Tympanoctomys barrerae* con sondas de copia única muestran la duplicación de los loci *Tba*-203 y *Tba*- 1025. Teniendo en cuenta que la sonda no posee sitios de restricción de las enzimas utilizadas para digerir el ADN genómico, se infiere que cada banda observada corresponde a un locus (Small y Wendel, 2000).

La duplicación génica en esta especie también se ha mostrado mediante el análisis de Southern blot utilizando como sonda un fragmento del gen Receptor de Andrógeno (Gallardo et al., 2004). Estos ensayos permitieron observar dos bandas por individuo evidenciando duplicación de este locus, tal como se ha evidenciado en este trabajo con microsatélites (Gallardo et al., 2004). Ambos marcadores, receptor de andrógeno y microsatélites, muestran duplicación (en regiones codificantes y no codificantes, respectivamente) siendo consistentes entre sí y además con el origen propuesto para la especie (Gallardo et al., 1999; Gallardo et al. 2004).

La duplicación genómica por poliploidía ha sido una de las principales fuerzas evolutivas en la historia de los eucariotas (Soltis y Soltis, 1995; Soltis y Soltis, 1999; Wolfe, 2001; Zhang, 2003). La poliploidía ha sido especialmente importante en plantas, donde se estima que el 70% de todos las angiospermas y hasta el 95% de los pteridofitos han sufrido al menos una ronda de duplicación total de su genoma (Soltis y Soltis, 1999; Mable, 2003). Los poliploides generalmente se diferencian de sus progenitores en sus características morfológicas, ecológicas, fisiológicas y citológicas (Ramsey y Schemske, 2002). Ello contribuye a que estén reproductivamente aislados de sus progenitores y sean capaces de ocupar nuevos habitats (Soltis y Soltis, 2000; Ramsey y Schemske, 2002). Es por esto que la poliploidía se considera uno de los principales mecanismos de adaptación y especiación en plantas (Otto y Whitton, 2000; Ramsey y Schemske, 2002), de las cuales, muchas de las especies de cultivo son poliploides, como el trigo, el maíz, la caña de azúcar, el café, el algodón, el tabaco, etc. (Otto y Whitton, 2000). La poliploidía es un evento mucho más común en plantas que en animales, aunque hay ejemplos de animales poliploides en insectos, peces, anfibios y reptiles (Otto y Whitton, 2000). Esta diferencia se debe, probablemente, a la disrupción del mecanismo de compensación de dosis en los organismos dioicos con cromosoma Y degenerado (Orr, 1990).

En vertebrados, se ha propuesto dos rondas de duplicación genómica para explicar la redundancia génica existente y donde se ha observado la presencia de cuatro genes parálogos en mamíferos en relación a uno en invertebrados (Ohno, 1999; Wolfe, 2001). Esta formulación se conoce con el nombre de hipótesis 2R (Spring, 1997; Ohno, 1999; Zhang, 2003; Furlong y Holland, 2004). Dentro de las evidencias que apoyan esta hipótesis está el número total de genes de los vertebrados con relación a los invertebrados. Los invertebrados poseen menos de 20.000 genes, mientras que los vertebrados (como Homo sapiens, Mus musculus y Fugu rubripes) poseen genomas con más de 30.000 genes, lo que sugiere que las duplicaciones génicas fueron cuantiosas en los cordados, después de divergir de los urocordados (Furlong y Holland, 2004). Una segunda evidencia la entregan los conglomerados Hox, duplicados en los mamíferos con respecto a Amphioxus -un céfalocordado- (Holland y Garcia-Fernández, 1996). Estos eventos de duplicación coinciden con la expansión de varias familias génicas en los vertebrados. Entre ellos se cuentan los genes homeóticos ParaHox, los NK homeobox, los receptores de tirosina kinasa y colágeno (Spring, 2002; Furlong y Holland, 2004). Una tercera fuente de evidencia en el estudio de las duplicaciones génicas la constituyen las regiones de paralogía (o paralogones), que son grupos ubicados en cuatro regiones cromosómicas distintas; con composición génica similar y que están en número mayor que lo esperado por azar. (McLysaght et al., 2002; Furlong y Holland, 2004).

La duplicación genómica lleva indudablemente a un aumento del número de genes y existen pocas formas para crear nuevos genes más eficientes que ésta (Furlong y Holland, 2004). Estos nuevos genes pueden tener varios destinos: la pseudogenización, la mantención de la función, la subfuncionalización o la neofuncionalización (Wendel, 2000; Zhang, 2003). Esta dinámica constituye un punto crucial en la regulación génica, ya que una vez que los genomas poseen mayor tamaño, la aparición de nuevos fenotipos podrían resultar de la alteración de los mecanismos de control de la maquinaria genética preexistente (Gallardo, 2003; Osborn et al., 2003).

La existencia de *T. barrerae* brinda una oportunidad única para el estudio de estas mutaciones y su importancia en la evolución de los vertebrados. La reciente descripción de un segundo mamífero tetraploide, *Pipanacoctomys aureus*, señalado como una de las especies que habría dado origen a *T. barrerae* (Gallardo et al., 2004), nos presenta un panorama único para estos estudios.

Los microsatélites han probado ser una herramienta útil en el estudio de la tetraploidía de *Tympanoctomys barreae*. Por esta razón, se presentan como una alternativa para comprender su dinámica genética y poblacional y la de sus especies cercanas. Este acercamiento permitirá entender de mejor forma los procesos por los cuales se dio origen a este mamífero tetraploide. Es así que esta caracterización inicial de microsatélites, con un mayor número de loci, permitirían reconstituir genealogías a nivel poblacional de *T. barrerae*, estudiar su filogeografía intraespecífica y su historia poblacional (Sunnucks, 2000).

#### 6. BIBLIOGRAFÍA

- Angers, B., Gharbi, K., Estoup, A. (2002) Evidence of gene conversion events between paralogous sequences produced by tetraploidization in Salmoninae fish. Journal of Molecular Evolution, 54: 501-510.
- Balding, D. (1999) Forensic applications of microsatellite markers. En: Goldstein D.B. y
  Schlötterer C. (Eds.) Microsatellites, Evolution and Applications: 198-210. Oxford
  University Press, Oxford.
- Baumer, A., Dres, D., Basaran, S., ICSI, H., Dehgan, T., Schinzel, A. (2003) Parental origin of the two additional haploid sets of chromosomes in an embryo with tetraploidy. Cytogenetics and Genome Research, 101: 5-7.
- Beaumont, M.A., Bruford, M.W. (1999) Microsatellites in conservation genetics. En: GoldsteinD.B. y Schlötterer C. (Eds.) Microsatellites, Evolution and Applications: 165-182. OxfordUniversity Press, Oxford.
- Britten, R.J., Kohne, D.E. (1968) Repeated sequences in DNA. Science, 161: 529-540.
- Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J.B., Gale, M.D. (1997) Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. Theoretical and Applied Genetics, 94: 557-563.
- Buteler, M.I., Jarret, R.L., LaBonte, D.R. (1999) Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploidy *Ipomoea*. Theoretical and Applied Genetics, 99: 123-132.
- Cebrián, J.I. (2004) Aislamiento y caracterización molecular y citogenética del enhancer temprano del gen *Hoxc8*, en el roedor tetraploide *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia,

Octodontidae). Tesis, Licenciatura en Genética. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones, Argentina. 64 pp.

- Chambers, G.K., MacAvoy, E.S. (2000) Microsatellites: consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 126: 455-476.
- Chenuil, A., Galtier, N., Berrebi, P. (1999) A test of the hypothesis of an autopolyploid vs. allopolyploid origin for a tetraploid lineage: application to the genus *Barbus* (Cyprinidae). Heredity, 82: 373-380.
- Contreras, L.C., Torres-Mura, J.C., Spotorno, A.E. (1990) The largest known chromosome number for a mammal in a South American desert rodent. Experientia, 46: 506-509.
- Cordeiro, G.M., Taylor, G.O., Henry, R.J. (2000) Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploidy species. Plant Science, 155: 161-168.
- Crooijmans, R.P.M.A., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., Van der Poel, J.J., Groenen, M.A.M. (1997) Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Animal Genetics, 28: 129-134.
- David, L., Blum, S., Feldman, M.W., Lavi, U., Hillel, J. (2003) Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. Molecular Bilogy and Evolution, 20: 1425-1434.
- Díaz, G.B., Ojeda, R.A., Gallardo, M.H., Giannoni, S.M. (2000) *Tympanoctomys barrerae*. Mammalian Species, 646: 1-4.
- Eisen, J.A. (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability. En: Goldstein D.B. y Schlötterer C. (Eds.) Microsatellites, Evolution and Applications: 34-48. Oxford University Press, Oxford.

- Ellegren, H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, 5: 435-445.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.M. (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. Molecular Ecology, 11: 1591– 1604.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C., Moore, S.S. (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. Molecular Biology and Evolution, 12: 432-440.
- Furlong, R.F., Holland, P.W.H. (2004) Polyploidy in vertebrate ancestry: Ohno and beyond.Biological Journal of the Linnean Society, 82: 425-430.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Köhler, N. (1999) Discovery of tetraploidy in a mammal. Nature, 401: 341.
- Gallardo, M.H., Kirsch, J.A.W. (2001) Molecular relationships among Octodontidae (Mammalia: Rodentia: Caviomorpha). Journal of Mammalian Evolution, 8: 73-89.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Kausel, G., Köhler, N., Honeycutt, R.L. (2003) Gradual and quantum genome size shifts in the hystricognath rodents. Journal of Evolutionary Biology, 16: 163-169.
- Gallardo, M.H. (2003) Genome dynamics, genetic complexity and macroevolution. Revista Chilena de Historia Natural, 76: 717-724.
- Gallardo, M.H., Kausel, G., Jiménez, A., Bacquet, C., González, C., Figueroa, J., Köhler, N.,Ojeda, R. (2004) Whole-genome duplications in South American desert rodents (Octodontidae). Biological Journal of the Linnean Society, 82: 443-451.

- Goldstein D.B. y Schlötterer C. (1999) Microsatellites, Evolution and Applications. Oxford University Press, Oxford. 352 pp.
- González, C., Gallardo, M., Cebrián, J.I., Kausel, G. (2004) Dominancia nucleolar en *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia: Octodontidae). XXXVII Reunión Anual Sociedad de Genética de Chile. Viña del Mar, Chile.
- Gornicki, P., Faris, J., King, I., Podkowinski, J., Grill, B., Haselkorn, R. (1997) Plastid-localized acetyl-CoA carboxylase of bread wheat is encoded by a single gene on each of the three ancestral chromosome sets. Proceedings of the National Academy of Science USA, 94: 14179-14184.
- Goudet, J., Keller, L. (2002) The correlation between inbreeding and fitness: does allele size matter? Trends in Ecology and Evolution, 17: 201-202.
- Guc-Scekic, M., Milasin, J., Stevanovic, M., Stojanov, L.J., Djordjevic, M. (2002) Tetraploidy in a 26-month-old girl (cytogenetic and molecular studies). Clinical Genetics, 61: 62-65.
- Han, Z.G., Guo, W.Z., Song, X.L., Zhang, T.Z. (2004) Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreumin* allotetraploid cotton. Molecular Genetics and Genomics, 272: 308–327.
- Hancock, J.M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D.B. y Schlötterer C. (Eds.) Microsatellites, Evolution and Applications: 1-9. Oxford University Press, Oxford.
- Hedrick, P.W., Kalinowski, S.T. (2000) Inbreeding depression in conservation biology. Annual Review of Ecology and Systematics, 31: 139-162.
- Holland, P.W.H., Garcia-Fernández, J. (1996) Hox genes and chordate evolution. Develomental Biology, 173: 382-395.

- Honeycutt, R.L., Rowe, D.L., Gallardo, M.H. (2003) Molecular relationships of the South American caviomorph rodents: relationships among species and genera in the family Octodontidae. Molecular Phylogenetics and Evolution, 26: 476-489.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution, 11: 424-429.
- Köhler, N., Gallardo, M.H., Contreras, L.C., Torres-Mura, J.C. (2000) Allozymic variation and systematic relationships of the Octodontidae and allied taxa (Mammalia, Rodentia). Journal of Zoology, 252: 243-250.
- Krawczak, M. y Schmidtke, J. (1998) DNA Fingerprinting. 2<sup>a</sup> Ed. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 113 pp.
- Levinson, G., Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular Biology and Evolution, 4: 203-221.
- Li, Y.C., Korol, A.B, Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanism: a review. Molecular Ecology, 11: 2453-2465.
- Li, Y.C., Korol, A.B, Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2004) Microsatellites within genes: structure, finction and evolution. Molecular Biology and Evolution, 21: 991-1007.
- Lian, C., Nara, K., Nakaya, H., Zhou, Z., Wu, B., Miyashita, N., Hogetsu, T. (2001) Development of microsatellite markers in polyploidy *Salix reinii*. Molecular Ecology Notes, 1: 160-161.
- López Pajares, I., Delicado, A., Díaz de Bustamante, A., Pellicer, A., Pinel, I., Pardo, M., Martin,M. (1990) Tetraploidy in a liveborn infant. Journal of Medical Genetics, 27: 782-3.

- Ludwig, A., Belfiore, N.M., Pitra, C., Svirsky, V., Jenneckens, I. (2001) Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). Genetics, 158: 1203-1215.
- Luikart, G., England, P.R. (1999) Statistical analysis of microsatellite DNA data. Trends in Ecology and Evolution. 14: 253-256.
- Mable, B.K. (2003) Breaking down taxonomic barriers in polyploidy research. Trends in Plant Science, 8: 582-590.
- May, B., Krueger, C.C., Kincaid, H.L. (1997) Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54: 1542-1547.
- McLysaght, A., Hokamp, K., Wolfe, K.H. (2002) Extensive genomic duplication during early chordate evolution. Nature Genetics, 31: 200-204.
- Menotti-Raymond, M., David, V.A., Lyons, L.A., Schäffer, A.A., Tomlin, J.F., Hutton, M.K., O'Brien, S.J. (1999) A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). Genomics, 57: 9-23.
- Moore, G. (2002) Meiosis in allopolyploids- the importance of 'Teflon' chromosomes. Trends in Genetics, 18: 456-463.
- Moxon, E.R., Wills, C. (1999) DNA microsatellites: Agents of evolution? Scientific American, January: 72-77.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R. (1987) Variable number of tandem repeats (VNTR) markers for human gene mapping. Science, 235: 1616-1622.

- Nakamura, Y., Takaira, M., Sato, E., Kawano, K., Miyoshi, O., Niikawa, N. (2003) A tetraploid liveborn neonate. Cytogenetic and autopsy findings. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 127: 1612–1614.
- Ohno, S. (1999) Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. Cell and Developmental Biology, 10: 517-522.
- Orr, H.A. (1990) "Why polyploidy is rarer in animals than in plants" revisited. The American Naturalist, 136: 759-770.
- Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H., Comai, L., Madlung,A., Doerge, R.W., Colot, V., Martiessen, R.A. (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics, 19: 141-147.
- Otto, S.P., Whitton, J. (2000) Polyploid incidence and evolution. Annual Review of Genetics, 34: 401-437.
- Pandey, M., Mailing, O., Fischer, D., Hattemer, H.H., Finkeldey, R. (2004) Characterization of microsatellite markers in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). Molecular Ecology Notes, 4: 1-3.
- Paredes, M. (2002) Caracterización de ADN microsatelital y su utilización en la demostración de tetraploidía en *Tympanoctomys barrerae* (Octodontidae). Tesis, Magíster en Ciencias.
  Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 56 pp.

Pikaard, C.S. (2000) The epigenetics of nucleolar dominance. Trends in Genetics, 16: 495-500.

- Pikaard, C.S. (2001) Genomic change and gene silencing in polyploids. Trends in Genetics, 17: 675-677.
- Pyatskowit, J.D., Krueger, C.C., Kincaid, H.L., May, B. (2001) Inheritance of microsatellite loci in the plyploid lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Genome, 44: 185-191.

- Raker, C.M., Spooner, D.M. (2002) Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data. Crop Science, 42: 1451-1458.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. (2002) Neopolyploidy in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 33: 589-639.
- Robertson, A., Newton, A.C., Ennos, R.A. (2004) Multiple hybrid origins, genetic diversity and population geneic structure of two endemic *Sorbus taxa* on the Isle of Arran, Scotland. Molecular Ecology, 13: 123-134.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology: 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- Rubinsztein, D.C. (1999) Trinucleotide expansion mutations cause diseases which do not conform to classical Mendelian expectations. En: Goldstein D.B. y Schlötterer C. (Eds.)
  Microsatellites, Evolution and Applications: 80-97. Oxford University Press, Oxford.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning-A laboratory manual. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schlötterer, C., Amos, B., Tautz, D. (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. Nature, 354: 63-65.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Reasearch, 20: 211-215.
- Schlötterer, C. (1998) Microsatellites. En: Hoelzel, R.A. (Ed.) Molecular Genetic Analysis of Populations: A practical approach: 237-261. 2<sup>a</sup> ed. Oxford University Press.
- Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma, 109: 365-371.

- Schroeder, J.W., Honeycutt, R.L., Rooney, A.P., Han, G., Begall, S., Gallardo, M.H. (2000)
  Microsatellites from the South American coruro, *Spalacopus cyanus*. Molecular Ecology, 9: 1447-1449.
- Segarra-Moragues, J.G., Palop-Esteban, M., González-Candelas, F., Catalán, P. (2004) Characterization of seven (CTT)n microsatellite loci in the pyrenean endemic *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae): remarks on ploidy level and hybrid origin assessed through allozymes and microsatellite analyses. Journal of Heredity, 95: 177-183.
- Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P., Mori, M., Yamada, J., Dubay, C.J., Lindpainter, K., Ganten, D., Guhnet, J.L., Lathrop, G. M., Beckmannt, J.S. (1992) Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. Genetics, 131: 701-721.
- Shibata, D. (1999) Microsatellite analysis of human tumours. En: Goldstein D.B. y Schlötterer C.(Eds.) Microsatellites, Evolution and Applications: 266-274. Oxford University Press, Oxford.
- Small, R.L., Wendel, J.F. (2000) Phylogeny, duplication, and intraspecific variation of Adh sequences in New World diploid cotton (Gossypium L., Malvaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 16: 73-84.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. (1995) The dynamic nature of polyploid genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 92: 8089-8091.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. Trends in Ecology and Evolution, 14: 348-352.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97: 7051-7057.

- Spring, J. (1997) Vertebrate evolution by interspecific hybridisation- are we polyploids?. FEBS Letters, 400: 2-8.
- Spring, J. (2002) Genome duplication strikes back. Nature Genetics, 31: 128-129.
- Sunnucks, P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology and Evolution, 15: 199-203.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Research, 10: 967-981.
- Wendel, W.F. (2000) Genome Evolution in polyploids. Plant Molecular Biology, 42: 225-249.
- Wolfe, K.H. (2001) Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. Nature Reviews, 2: 333-341.
- Yamasaki, H., Mironov, N. (2000) Genomic instability in multistage carcinogenesis. Toxicology Letters, 112-113: 251-256.
- Zavala-Guillén, A.K., Hirai, Y., Tanque, T., Iría, H. (2004) Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpancés. Chromosome Research, 12: 225-237.
- Zhang, J. (2003) Evolution by gene duplication: an update. Trends in Ecology and Evolution, 18: 292-298.