

Simulación de la capacidad de DGGE y PCR-RFLP para detectar variación genética en secuencias de ADN

Daisy Janet Palacios Martínez y Omar Chassin-Noria

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Francisco J. Múgica S/N, Morelia Michoacán, México. 58030

Resumen

En décadas recientes se ha incrementado el uso de la información genética para analizar procesos evolutivos. Sin embargo, la capacidad de laboratorios modestos para generar esta información es limitada. En el presente trabajo desarrollamos una estrategia que permite dirigir esfuerzos de secuenciación de ADN de manera eficiente, para analizar un elevado número de muestras con recursos limitados. La estrategia se basa en el uso eficiente de la información genética disponible en las bases de datos de acceso libre y simulaciones *in silico* de la PCR-RFLPs y DGGE.

Palabras clave: DGGE, PCR-RFLPs y simulación *in silico*.

Abstract

In recent decades the use of genetic information to analyze evolutionary processes has increased. However, austere laboratories capacity to generate this information is limited. We show a strategy that allows to guide efficiently the DNA sequencing efforts, in order to examine a large amount of samples with limited resources. The strategy is based on the efficient use of genetic information available in databases and open access *in silico* simulations of the PCR-RFLP and DGGE.

Keywords: DGGE, PCR-RFLP and *in silico* simulations

Introducción

Una de las principales fuentes de información para discernir preguntas de carácter evolutivo se encuentra en el genotipo de los organismos. Este recurso ha sido objeto de análisis empleando distintas técnicas moleculares, particularmente en las últimas décadas (Hillis *et al.*, 1996). Sin embargo, una limitante para la obtención de esta información es el acceso a laboratorios especializados para desarrollar técnicas de biología molecular.

Las técnicas para evaluar los niveles de variación dentro de poblaciones, pueden ser clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo al nivel de cobertura del genoma: las técnicas que tienen una cobertura amplia al azar sobre el genoma completo del organismo (RAPD, AFLP, ISSR) y técnicas que enfocan el análisis a regiones particulares del genoma (secuenciación de ADN, PCR-RFLP, DGGE, SSCP, Isoenzimas, Micro y Minisatélites). Mientras que la secuenciación del ADN es la técnica que permite detectar la totalidad de la variación entre los organismos (sustituciones, inserciones o deleciones), requiere el acceso a laboratorios de primer nivel y/o el envío de muestras a laboratorios especializados en servicios (ej www.macrogen.com).

Una manera de analizar un gran número de muestras sin requerir el uso de laboratorios especializados consiste en la combinación de técnicas simples con la secuenciación. Bajo esta estrategia se realiza la secuenciación en una sub-muestra para clasificar e identificar los distintos haplotipos, y posteriormente se aplica una técnica sencilla que permita diferenciar los haplotipos detectados con las secuencias, para aplicarse al resto de la muestra (Fig. 1).

La estrategia planteada es posible por la existencia de algoritmos que permiten predecir a partir de una secuencia

específica su comportamiento en el laboratorio. Este es el caso de las técnicas DGGE y PCR-RFLPs que pueden simularse *in silico*.

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis o Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante) es un tipo de electroforesis para ácidos nucleicos de doble cadena que permite detectar diferencias entre secuencias debido a las variaciones que estas diferencias provocan en la T_m de la molécula. La T_m se define como la temperatura a la que el 50% de las moléculas de ADN se encuentran en estructura de doble cadena unida por puentes de hidrogeno (Fig. 2). Este valor depende de la proporción de bases púricas y pirimídicas de la secuencia, debido a que la unión entre A-T (dada por dos puentes de hidrógeno) es más lábil que la unión G-C (con tres puentes de hidrógeno). Por esto, la composición del ADN afecta el patrón de desnaturalización, siendo posible distinguir entre moléculas con diferentes secuencias de ADN, debido a su movilidad diferencial en geles con un gradiente de concentración de un compuesto desnaturalizante (ej. urea). El ADN desnaturalizado tiene una velocidad de migración menor que el ADN de doble cadena, diferenciando dos o más fragmentos del mismo tamaño en pares de bases pero con distinta composición. Empleando este método es posible identificar sustituciones, inserciones y deleciones en una o más bases, en moléculas de 150 a 1000 pb, lo que permite diferenciar secuencias de ADN Myers *et al.* (1987).

Se ha observado que la desnaturalización del ADN se presenta con el cambio de estado de dominios (doble cadena-cadena sencilla) de un número considerable de pares de bases (50 a 300) de manera simultánea. Esto debido a que los dominios responden a cambios de una sola base generando efectos en las bases vecinas. Se sabe que la desnaturalización de 90 bases de

un fragmento de 500 pb puede generar la reducción de velocidad de migración en un 20 % con respecto a una secuencia con sus 500 bases en estructura de doble cadena Myers *et al.* (1987).

Al describirse la técnica DGGE por primera vez se requería el uso de sondas marcadas radiativamente para detectar las cadenas de DNA Fischer & Lerman (1980), pues aun no se describía ningún método para la amplificación dirigida *in vitro*, pero después de la descripción de la PCR Saiki *et al.* (1985) fue posible generar diversos fragmentos para su análisis directamente sin la necesidad de usar una sonda marcada.

La estrategia para distinguir los distintos alelos de una población consiste en realizar un corrimiento preliminar que se denomina “DGGE perpendicular”. Este consiste en correr las muestras en un gel con un gradiente perpendicular del agente desnaturizante con respecto a la dirección de la electroforesis, para evaluar el rango de concentración del desnaturizante (generalmente de 25 a 30% del punto medio de desnaturización) en el que se puede resolver los distintos alelos de una muestra (Fig. 3).

La técnica de RFLPs (Restriction Fragments of Length Polymorphism) permite detectar diferencias entre genomas de distintos organismos con base en la pérdida o ganancia de sitios de restricción (secuencias específicas que son reconocidas por endonucleasas de restricción). Existen varios protocolos, todos tienen como objetivo identificar la variación en tamaño de los fragmentos que permitan diferenciar a las entidades de estudio (individuos, poblaciones, especies, y *taxa* supra-específicos) Hillis *et al.* (1996).

Posterior al desarrollo de la PCR es posible dirigir los análisis de RFLP’s hacia regiones específicas del genoma de un organismo Saiki *et al.* (1985). Los fragmentos amplificados con PCR son sometidos a restricción (corte) con endonucleasas, para posteriormente visualizar los fragmentos de restricción con métodos sencillos de tinción (bromuro de etidio o tinción con plata) en geles de agarosa o poliacrilamida.

La combinación de PCR con RFLP es útil, pues permite detectar diferencias en secuencias de distintos individuos aprovechando la sensibilidad de PCR para amplificar regiones específicas de un genoma y la resolución de RFLP para comparar secuencias. Este método ha sido empleado previamente en tortugas marinas con buenos resultados Avise & Karl (1993).

En el presente trabajo se realizó una simulación *in silico* del comportamiento de 17 haplotipos de la región control del ADNmt, de *Chelonia mydas* (Encalada, 1996), evaluando la capacidad de los DGGE y PCR-RFLPs para diferenciar haplotipos.

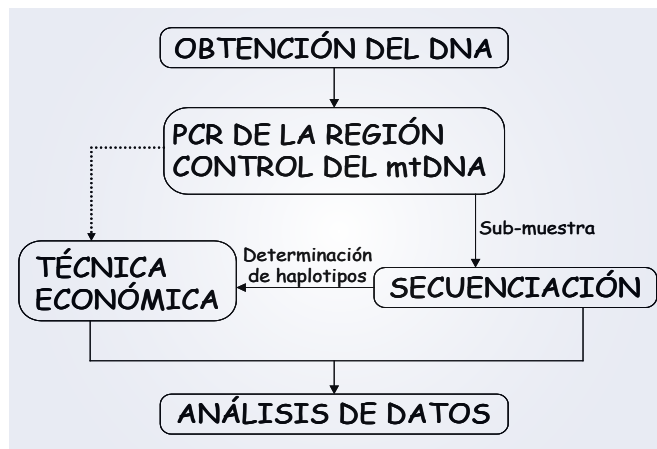


Figura 1. La línea punteada representa que este paso es posterior a la secuenciación y determinación de los distintos haplotipos detectados con la secuenciación

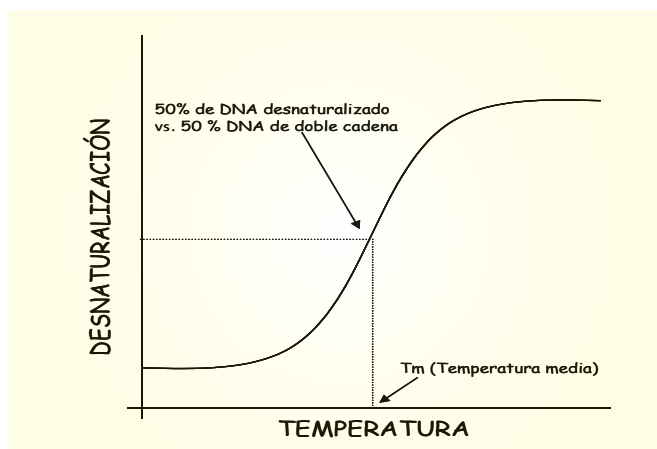


Figura 2. Comportamiento sigmoideo del ADN en distintas temperaturas, con respecto al porcentaje de desnaturización, y el punto en el que se establece el valor de Tm.

Materiales y métodos

Previo a las simulaciones *in silico* se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas por Encalada *et al.* (1996); Genbank Z50131.1 “Cm 9”, Z50130.1 “Cm 8”, Z50126.1 “Cm 4”, Z50125.1 “Cm 2”, Z50140.1 “Cm 18”, Z50139.1 “Cm 17”, Z50138.1 “Cm 16”, Z50137.1 “Cm 15”, Z50136.1 “Cm 14”, Z50135.1 “Cm 13”, Z50134.1 “Cm 12”, Z50133.1 “Cm 11”, Z50132.1 “Cm 10”, Z50129.1 “Cm 7”, Z50128.1 “Cm 6”, Z50127.1 “Cm 5”, Z50124.1 “Cm 1” con ClustalV para PC versión 1.7 Thompson *et al.* (1994) y revisado a ojo empleando GeneDoc para PC versión 2.2.0 Nicholas *et al.* (1997) para verificar que los 17 haplotipos fueran diferentes en al menos una posición (Fig. 4).

Para obtener una simulación *in silico* de la respuesta bajo condiciones desnaturizantes de secuencias de la región control del ADNmt, emulando su comportamiento al someterse a DGGE se sometió a las secuencias obtenidas por Encalada *et al.* (1996) al programa Poland disponible en línea donde se calculó la Tm de las 17 secuencias empleando el algoritmo descrito por Steger (1994) en donde se asume que secuencias con diferente Tm dada una concentración de sales, generan diferente velocidad de migración en un sistema de DGGE.

Los mapas de restricción (patrones de fragmentos obtenidos con las endonucleasas disponibles comercialmente) de las 17 secuencias fueron obtenidos con el programa Webcutter 2.0

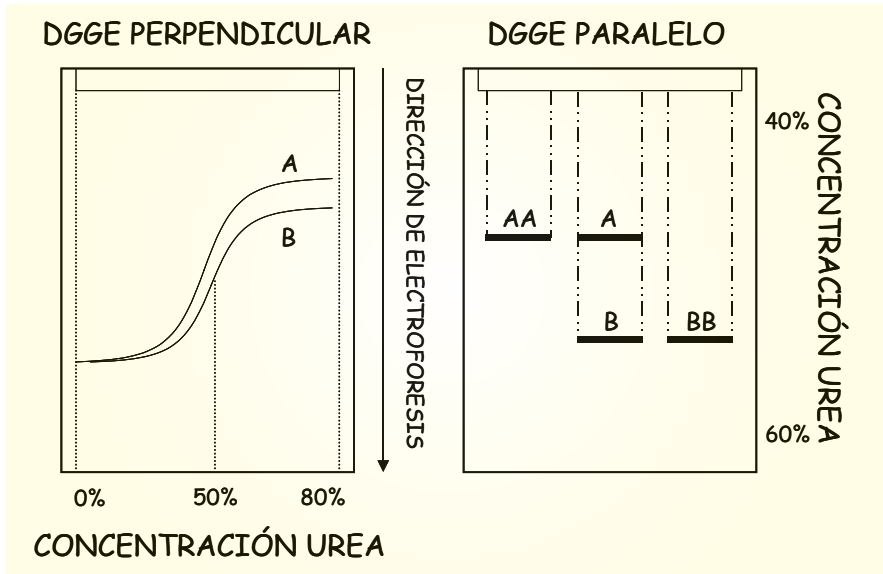


Figura 3. En el gel perpendicular se somete a electroforesis una muestra y se observa que en el lado izquierdo del gel con menor concentración de urea no hay diferencia en la migración de los dos alelos, y en el extremo derecho, en el que las concentraciones de urea son altas se observa el distinto patrón de migración del alelo A más lento, con respecto al alelo B. En el DGGE paralelo se realiza con un gradiente del 40 al 60% que cubre un rango de 20% con respecto al 50% de concentración de urea que se observa en el gel perpendicular es el punto en el que ambos alelos pueden distinguirse. En el gel paralelo se muestra en tres carriles el comportamiento de los alelos de 3 individuos diferentes, dos homocigotos AA y BB y un heterocigoto AB (Modificado de Lessa 1992).

Heiman (1997).

Resultados

Con la técnica de PCR-RFLPs se identificaron 42 enzimas que tienen sitios de restricción dentro de las secuencias. Sin embargo, sólo 19 de estas podrían generar cortes informativos (que permitan diferenciar las secuencias), el resto (23 enzimas) generarían el mismo patrón de corte (enzimas sombreadas en la

Tabla 2).

A partir del análisis teórico de restricción, se agruparon las enzimas que generaron un mismo patrón. Por ejemplo, la enzima *Alu I*, tiene la capacidad de distinguir dos grupos en los haplotipos empleados; el primero constituido por las secuencias 1, 2, 3, 4, 9, 13, 14, 17, 15, 16, 18 y el segundo por las secuencias 5, 6, 8, 10, 11, 12. La enzima *Mwo-I* agrupa a las mismas secuencias y por esta razón se le agrupó con la enzima *Alu I* (Tabla 1).

Haplotipo	Enzima de restricción																		
	<i>AluI</i>	<i>MwoI</i>	<i>ApoI</i>	<i>CgeI</i>	<i>MaellI</i>	<i>CvIRI</i>	<i>MsII</i>	<i>HaellI</i>	<i>Sau96I</i>	<i>HincII</i>	<i>HpaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>SfaNI</i>	<i>BstGI</i>	<i>Tsp509I</i>	<i>SspI</i>	<i>Psp1406I</i>	<i>SimI</i>	<i>TaI</i>
Cm 1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Cm 2	1	0	2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1
Cm 3	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
Cm 4	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
Cm 5	2	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0	2	1	0	0	2	1	0	0
Cm 6	2	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0	2	1	0	0	2	1	0	0
Cm 8	2	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1
Cm 9	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	1	0	1
Cm 10	2	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	1	0	1
Cm 11	2	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	1	0	1
Cm 12	2	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	3	1	0	1
Cm 13	1	0	1	1	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
Cm 14	1	0	1	1	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
Cm 17	1	0	1	1	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
Cm 15	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	4	0	0	0
Cm 16	1	0	1	1	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	3	0	0	0
Cm 18	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	2	1	0	0	1	0	0	0

Tabla 1. Patrones de restricción esperados. Se presenta en columnas (verticales) de distinto tono (gris o blanco) las enzimas que generan la misma asociación de grupos de las secuencias analizadas. 0 indica que la enzima no tiene sitios de restricción, 1, 2, 3, 4 indican el número de cortes esperados. Las líneas (horizontales) en distintos tonos agrupan las secuencias que no son distinguibles (3, 4; 5, 6; 10, 11; 13, 14 y 17).

Tabla 2. En la primera Columna están los nombres de enzimas de restricción, En la primera fila están las secuencias analizadas, en la intersección de la primera fila y columna están la posición de los distintos sitios de corte separados por una diagonal. Se muestra en sombreado las enzimas no informativas para las 17 secuencias.

	cm1	cm2	cm3	cm4	cm5	cm6	cm8	cm9	cm10	cm11	cm12	cm13	cm14	cm15	cm16	cm17	cm18
AcII	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423	63/423
AluI	191/295	191/295	191/295	191/295	83/108/295	83/108/295	83/108/295	195/295	83/108/295	83/108/295	83/108/295	191/295	191/295	191/295	191/295	191/295	191/295
ApoI	5/32/133/316	5/32/449	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316	5/32/133/316
BceII	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458	28/458
BmgI	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440	46/440
BsII	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449	37/449
BspI2	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438	48/438
BsrI	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223	117/146/223
BssSI	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301	185/301
CjeI	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254	232/254
CjePI	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366	120/366
DpnI	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382	104/382
DraI	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447
EcoNI	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447	39/447
FauI	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416	70/416
HaeI	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392	33/61/392
Hae3	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249	33/61/143/249
Hinc2	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357
HpaI	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357	129/357
Mae3	65/155/266	65/155/266	65/155/266	65/155/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	65/155/266	65/155/266	65/155/266	65/155/266	65/155/266	65/155/266
Mn1I	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207	83/196/207
NdeI	113/373	113/373	113/373	113/377	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373	113/373
Nla3	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226	68/192/226
RsaI	89/115/282	89/115/282	89/115/282	89/115/282	115/371	115/371	115/371	115/371	115/371	115/371	115/371	89/115/282	89/115/282	89/115/282	89/115/282	89/115/282	115/371
Sau96	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344	142/344
Sau3A	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380	106/380
SspI	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/52/126/291	17/52/126/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291	17/178/291
StuI	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453	33/453
TaiI	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431	55/431
Tsp45	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266	220/266

Tabla 2. (continuación).

	cm1	cm2	cm3	cm4	cm5	cm6	cm8	cm9	cm10	cm11	cm12	cm13	cm14	cm15	cm16	cm17	cm18
Tsp4c	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214	133/139/214
XcmI	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361	125/361
XmnI	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467	19/467
BsrGI			87/399											87/399			
CviR				90/396	90/396	90/396	90/396	90/396	90/396	90/396	90/396						
MspI				213/273	213/273	213/273	213/273	213/273	213/273	213/273	213/273						
MwoI				77/409	77/409	77/409	77/409	77/409	77/409	77/409	77/409						
Psp14:				58/428	58/428	58/428	58/428	58/428	58/428	58/428	58/428						
Simi:												144/342	144/342			144/342	
SfaNI							99/387	99/387	99/387	99/387	99/387						58/99/387
TatI																	
Tsp50		5/32/39/101/106/203		89/397	89/397												

De este análisis se identificaron 11 enzimas de las 19 seleccionadas previamente con las cuales es posible distinguir 12 de las 17 secuencias sometidas al análisis (70 % de los haplotipos analizados).

Con respecto a las simulaciones del comportamiento de las mismas 17 secuencias en un DGGE, los valores de T_m obtenidos (Tabla 3) sugieren que sólo sería posible detectar ocho secuencias diferentes (47% de las secuencias).

Los valores de T_m se ven afectados por la concentración de sales y ADN de una solución determinada, por lo que se buscó aumentar la capacidad de resolución de la técnica empleando distintos valores de la concentración de sales y ADN para detectar diferencias entre dos secuencias que en un principio fueron indistinguibles. Si bien el cambio de las variables afectó los valores de T_m este cambio fue uniforme para todas las secuencias, lo que impidió aumentar la resolución (Tabla 4).

Discusión

En los resultados se observa que cada técnica por separado genera datos con menor discriminación que un análisis con ambas técnicas ya que permiten diferenciar más secuencias. Por ejemplo, las secuencias 3 y 4 son indistinguibles empleando RFLP con las enzimas seleccionadas, pero estas mismas secuencias presentan diferente valor de T_m , por lo que su comportamiento en un DGGE sería diferente. Sin embargo, las secuencias cm17 y 14 muestran un comportamiento homogéneo frente a ambas simulaciones, por lo que son indistinguibles. Con este análisis concluimos que no es posible distinguir con las dos técnicas la variación genética de los 17 haplotipos. Sin embargo, este tipo de simulaciones son recomendables como estudios preliminares que permiten potenciar la capacidad de análisis de muestras en un proyecto.

Particularmente la técnica PCR-RFLPs es más simple que la secuenciación, que ofrece la máxima resolución para detectar la variación genética de la región control, pero desafortunadamente no permite detectar toda la variación presente.

Si se logra a partir de un primer esfuerzo de secuenciación de ADN identificar los sitios polimórficos que distinguen haplotipos y las simulaciones particularmente de RFLP permiten distinguirlos, detectando enzimas de restricción diagnósticas, es posible entonces, analizar en el laboratorio, un gran número de muestras en las que se requerirá la amplificación de la región de análisis mediante PCR seguida de una reacción de restricción y electroforesis, para estimar la frecuencia de cada uno de los haplotipos detectados con RFLPs previamente asociados a las secuencias de ADN previamente analizadas.

Este tipo de simulaciones son útiles particularmente si consideramos que las bases de datos como el Genbank tienen, gracias a los avances de la tecnología de secuenciación un crecimiento notable que se reporta cada dos meses. Este crecimiento es particularmente importante con respecto al número de especies. En el 2001 existían secuencias de 14,068 especies y hasta el 2010 hay información de 226,024 especies. Esto representa que la base de datos ha duplicado la cobertura de especies cada ocho meses en promedio, contando hasta el 15 de abril de 2010 con 119, 112, 251 *loci*, y un total de 114, 348, 888 y 771 bases secuenciadas.

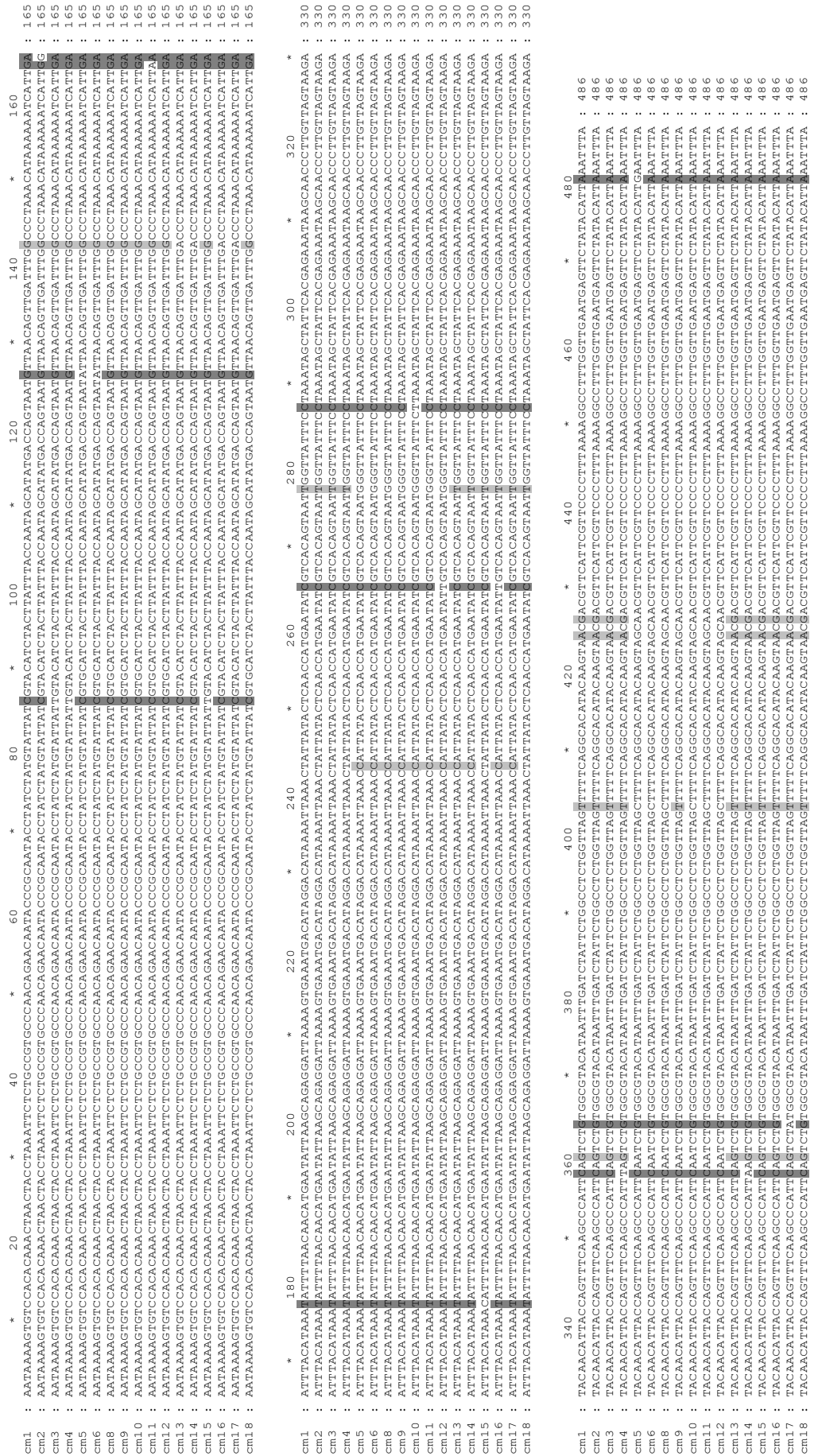


Figura 4. Alineamiento de los 17 haplotipos (secuencias) empleados en las simulaciones de RFLP y DGGE.

Tabla 3. Valores de T_m . se presentan los distintos valores obtenidos de T_m y entre líneas se presentan los grupos de secuencias que se pueden distinguir.

Secuencia	Tamaño pb.	T_m esperada*
CM4	486	90.4
CM14	486	90.6
CM17	486	90.6
CM3	486	90.6
CM1	486	90.7
CM16	486	90.7
CM13	486	90.8
CM15	486	90.8
CM2	486	90.8
CM18	486	90.9
CM11	486	91.1
CM6	486	91.1
CM10	486	91.2
CM12	486	91.2
CM9	486	91.2
CM5	486	91.3
CM8	486	91.3

Esta cobertura de especies permite tener acceso a secuencias de múltiples grupos de organismos que pueden no corresponder con nuestra especie de interés pero probablemente sea de una categoría taxonómica cercana y pueda emplearse como experimento piloto para estimar la capacidad de las técnicas empleadas en el presente trabajo como alternativa con respecto a la obtención de secuencias de ADN. Identificando incluso para la región del genoma que presente el nivel de diversidad genética necesario para el nivel de universalidad de la investigación (infraespecífico, intraespecífico, géneros, familias).

Agradecimientos

Agradecemos a CONACyT ciencia básica por el apoyo al proyecto ECOLOGÍA MOLECULAR DE TORTUGAS MARINAS: SISTEMA DE APAREAMIENTO Y GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN, 79857CB-2007-01.

Referencias

- Avise CJ, Karl AS.** 1993. PCR-based assays of mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: and applications for population genetics. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 342-361.
- Encalada SE.** 1996. Conservation genetics of Atlantic and Mediterranean green turtles: inferences from mtDNA sequences. In BW Bowen, WN Witzell (eds), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*, pp. 33-40. Miami,

Tabla 4. Comportamiento de T_m . variando la concentración de sal y DNA tiene el mismo efecto para las dos secuencias impidiendo diferenciarlas.

Concentración de ADN nM	Concentración de Sales en mM	T_m observada °C	
		cm10	cm12
50	1	63.0	63.0
50	200	101.2	101.2
50	500	107.8	107.8
50	1000	112.8	112.8
1	50	90.9	90.9
50	50	91.2	91.2
200	50	91.3	91.3
500	50	91.4	91.4
1000	50	91.5	91.5
1000	1	63.3	63.3
1	1000	112.5	112.5

Florida, 12-14 September 1995. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396, Miami, USA.

- Encalada SE, Lahanas PN, Bjordnal KA, Bolten AB, Miyamoto MM, Bowen BW.** 1996. Phylogeography and population structure of Atlantic and Mediterranean green turtle (*Chelonia mydas*): a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology*, 5: 473-484.
- Fischer SG, Lerman LS.** 1980. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77: 4420-4424.
- Steger G.** 1994. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 22: 2760-2768.
- Heiman M.** 1997. Webcutter 2.0, disponible de manera gratuita en internet <http://www.ccsi.com/firstmarket/firstmarket/cutter/cut2.html>.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK.** 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, pp. 655.
- Lessa EP.** 1992. Rapid surveying of DNA Sequence variation in natural populations. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 323-330.
- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS.** 1987. Detection and localization of single base change by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzimol.*, 155: 501-527.
- Nicholas KB, Nicholas HB.** 1997. *GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. Distribuido por el autor.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim H.** 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.