

# MICROSATÉLITES

Alejandra Vázquez Lobo Yurén<sup>1</sup> y Ariadna E. Morales García<sup>2</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los microsatélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases (Hancock 1999). Este tipo de secuencias se han encontrado tanto en genomas eucariontes como procariontes e incluso se han identificado en genomas de mitocondrias y cloroplastos. Los microsatélites se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes y se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud, por lo tanto son regiones adecuadas para usarse como marcadores moleculares en el nivel poblacional (Zane *et al.* 2002). Este alto grado de polimorfismo es consecuencia de una elevada tasa de mutación (desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-2}$  mutaciones por sitio por generación; Schlötterer 2000), que se atribuye a eventos de inserción y delección durante la replicación del ADN. Debido al alto grado de polimorfismo en el tamaño, y a que estos marcadores son codominantes, pueden ser estudiados como electromorfos, lo cual reduce el tiempo y el costo de la técnica en los casos en los que es necesario estudiar numerosas muestras y múltiples loci.

<sup>1</sup> Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM. AP 70–275, México D.F. CP 04510, México. [eva@ecologia.unam.mx](mailto:eva@ecologia.unam.mx).

<sup>2</sup> Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM. AP 70–275, México D.F. CP 04510, México. [aemoga@ecologia.unam.mx](mailto:aemoga@ecologia.unam.mx).

Los microsatélites también son llamados secuencias simples repetidas (SSRs por sus siglas en inglés: *simple sequence repeats*). Pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos). Los microsatélites que están compuestos por un motivo único se consideran puros o perfectos (por ejemplo, AAAAAAAAAA o  $(A)_{11}$ ); aquellos conformados por dos o más motivos se denominan compuestos (por ejemplo, AAAAAATTTTTT o  $(A)_7(T)_7$ ) y se conocen como interrumpidos cuando un nucleótido o más se insertan en alguna parte de la repetición (por ejemplo, AAAAAAGAAAAA o  $(A)_6G(A)_6$ ) (Schlötterer 2000).

Cuando se encuentran fuera de regiones codificantes, los microsatélites suelen considerarse como regiones génicas sin función alguna. Sin embargo, se ha propuesto que en ciertos genes las regiones repetidas del extremo 5' no transcrito tienen una función reguladora y actúan como regiones de unión para factores de transcripción. También se ha propuesto que los microsatélites son regiones con alta frecuencia de recombinación (*hot spots*) (Oliveira *et al.* 2006).

El elevado polimorfismo de los microsatélites se atribuye a dos mecanismos de mutación: el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (*slippage mispairing*) y el entrecruzamiento desigual (*unequal crossing over*). En el proceso de replicación del ADN pueden ocurrir alineamientos erróneos por un deslizamiento en el apareamiento de las dos hebras, ya que durante la síntesis las dos hebras que están separadas temporalmente pueden volver a asociarse en una posición diferente, lo cual genera un apareamiento erróneo durante la extensión de la nueva cadena de ADN (Figura 1). Cuando el deslizamiento en el apareamiento ocurre en la hebra nueva hay un incremento en el número de repeticiones del microsatélite (inserción, Figura 1A). Cuando el alineamiento erróneo ocurre en la hebra parental hay un decremento (delección, Figura 1B) (Li 1997).

Otro mecanismo es el entrecruzamiento desigual durante la recombinación, lo cual da como resultado la pérdida de repeticiones en una cromátida y el incremento en la otra. Sin embargo, la ocurrencia de mutaciones en ausencia de recombinación es una evidencia de que el entrecruzamiento desigual no es el mecanismo predominante en el origen de polimorfismos de los microsatélites. Por ejemplo, las mutaciones en los genomas de cloroplasto y mitocondria pueden ocurrir en ausencia de recombinación (Oliveira *et al.* 2006).

Se ha propuesto que la tasa de sustitución de los microsatélites está influenciada por el número de repeticiones, la composición del microsatélite, la longitud de la unidad repetida, la naturaleza de las regiones flanqueantes, la interrupción del microsatélite, la tasa de recombinación, la tasa de transcripción y por supuesto, la tasa de mutación (Schlötterer 2000). Por ejemplo, se ha mostrado que los microsatélites con mayor número de repeticiones o de tipo mononucleótido tienden a presentar una mayor tasa de mutación, ya que la probabilidad de reasociación errónea aumenta con la longitud y la simplicidad del microsatélite. Por el contrario, en microsatélites interrumpidos la variabilidad de los loci es menor, ya que los nucleótidos que no corresponden al microsatélite funcionan como señal de anclaje en el momento de la reasociación. La ubicación y la tasa de transcripción del microsatélite también pueden afectar la tasa de sustitución ya que ciertas regiones génicas pueden estar bajo selección natural (principalmente en regiones codificantes) o pueden ser reparadas con mayor frecuencia cuando están cercanas a genes que se expresan de manera común.

Para las inferencias ecológicas y evolutivas a partir de loci de microsatélites es necesario contar con un modelo de mutación, es decir, una ecuación que repre-

**Figura 1. Modelo de mutación por alineamiento erróneo.** En A, la hebra nueva se alinea erróneamente causando una inserción del motivo TA. En B, la hebra parental se alinea erróneamente causando una delección del motivo TA.

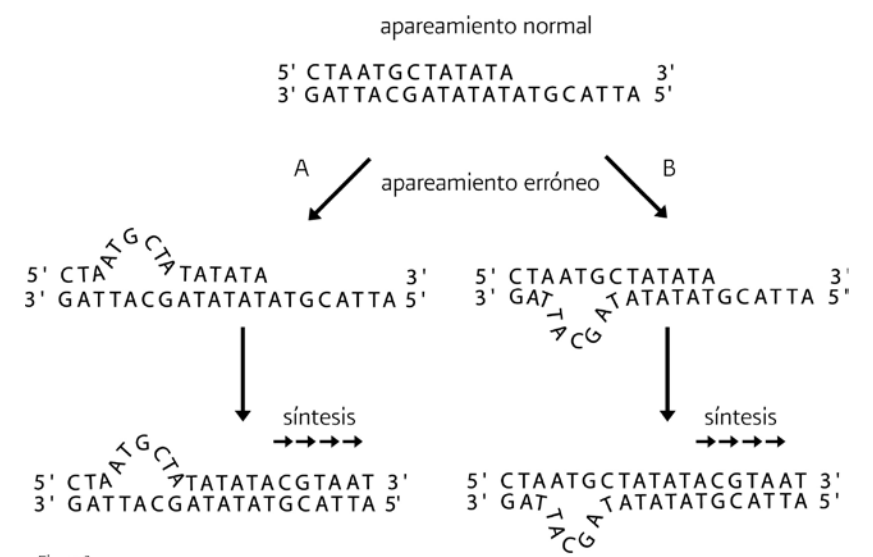


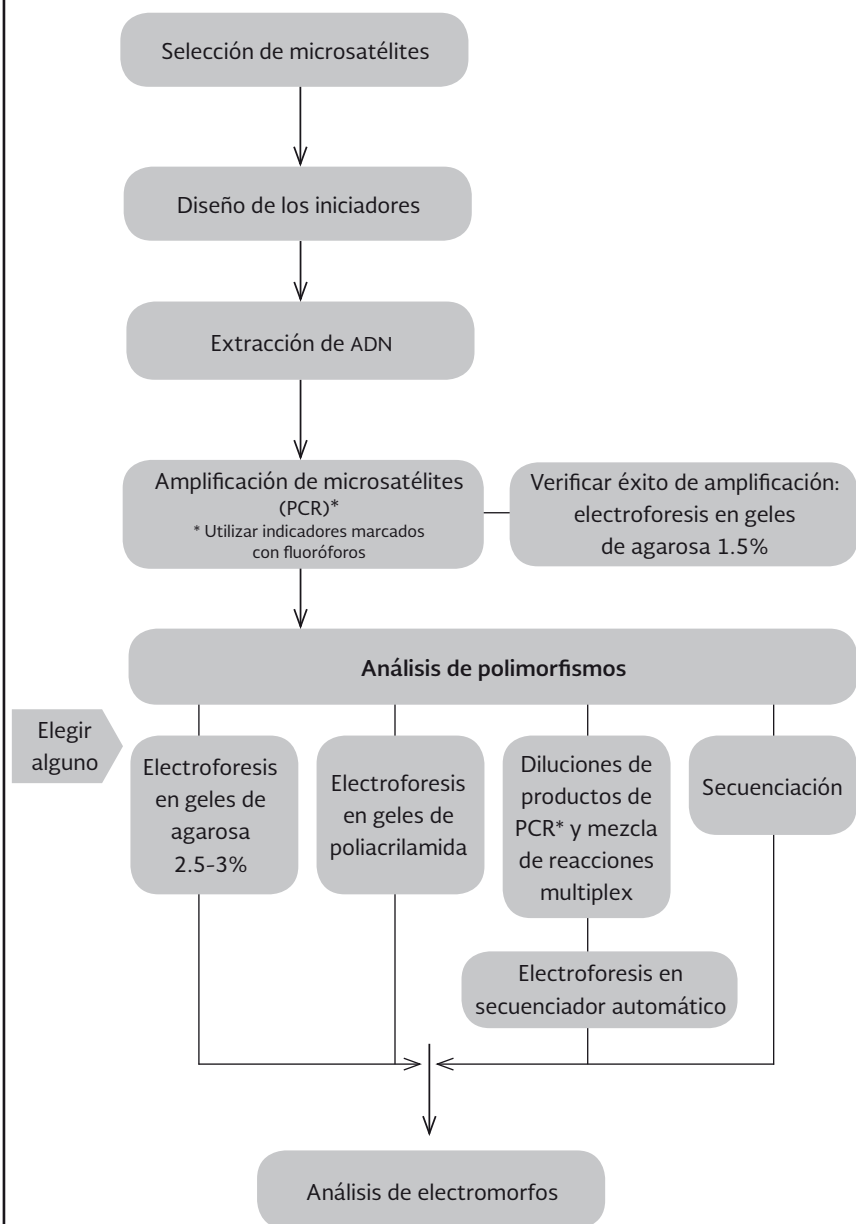
Figura 1

senta la probabilidad de cambio de una secuencia. En la literatura existen diversos modelos de mutación que parten de diferentes supuestos de la manera en que ocurren las mutaciones en una región de nucleótidos repetidos. De acuerdo con simulaciones computacionales, se ha demostrado que los loci de microsatélites pueden ajustarse al modelo de mutación por pasos (SMM, por sus siglas en inglés: *step mutation model*) (Shriver et al. 1993, Valdés et al. 1993), en el cual el proceso de mutación depende del estado ancestral, porque el tamaño del nuevo alelo producto de una mutación, depende del alelo original (Slatkin 1995). Por ejemplo, un microsatélite mononucleótido de 8 pares de bases (pb) sólo puede dar origen a través de la mutación a un microsatélite de 7 pb o a uno de 9 pb. No obstante, se han encontrado mutaciones de más de un paso, independientes del estado ancestral, que se ajustan mejor al modelo de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés: *infinite alleles model*) (Valdés et al. 1993), en el cual todos los alelos diferentes son considerados como nuevas variantes y asume que los procesos de inserción/delección pueden involucrar más de dos nucleótidos. El modelo de mutación de dos fases (TPM, por sus siglas en inglés: *two phase model*) asume que pueden ocurrir mutaciones por pasos y también mutaciones de mayor magnitud (Di Rienzo et al. 1994).

Debido a la diversidad de tipos de microsatélites y los diferentes genomas en los que se pueden localizar, estos marcadores pueden brindar información a diferentes niveles. Los microsatélites mononucleótidos y dinucleótidos son más abundantes y tienen una tasa de mutación mayor que los demás, por lo que son apropiados para detectar diferencias entre individuos de una misma población. Mientras que los microsatélites con repeticiones de tres o más nucleótidos muestran menor variabilidad y permiten la determinación de paternidad y el análisis de variación entre poblaciones e incluso entre especies.

En cuanto a los genomas en los cuales se localizan los microsatélites se debe tomar en cuenta que los genomas haploides de cloroplasto y mitocondria, así como los de cromosomas sexuales (v.gr. el cromosoma Y en mamíferos y el W en aves) son heredados uniparentalmente y no recombinan con frecuencia, por lo que permiten realizar inferencias distintas a aquellas que se basan en loci biparentales. Por ejemplo, en algunas gimnospermas el cloroplasto es heredado por vía paterna, por lo tanto los patrones de migración entre poblaciones obtenidos a través de ADN de cloroplasto (ADNcp), reflejan procesos determinados por la migración del polen, mientras que aquellos obtenidos por ADN mitocondrial (ADNmt) por el movimiento de las semillas (Neale

## Etapas de la técnica



y Sederoff 1989, Petit *et al.* 2005). En el caso de los mamíferos donde las mitocondrias son heredadas por la vía materna y el cromosoma Y es heredado por la vía paterna, los patrones de variación y dispersión inferidos a través de ADNmt indican los procesos evolutivos del linaje materno, mientras que los del cromosoma Y del linaje paterno (Boissinot y Boursot 1997).

El análisis de microsatélites para el mapeo de cromosomas y el estudio de la variación genética de poblaciones comenzó desde aproximadamente 1970. Debido al desarrollo de nuevas técnicas de análisis, su uso se ha generalizado permitiendo utilizarlos en una amplia gama de aplicaciones durante la primera década de éste siglo.

## **PROTOCOLO**

Este protocolo se aplica para el análisis de microsatélites en secuenciador automático.

### **Equipo**

- Termociclador
- Micropipetas
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Secuenciador automático de capilares

### **Material**

- Microtubos de 1.5 ml y 0.2 ml
- Placa de 96 microtubos
- Puntas con y sin filtro

### **Reactivos (sólo para las reacciones de PCR y verificación en geles de agarosa)**

- Taq ADN polimerasa
- Buffer de amplificación
- Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ )

- Mezcla de dNTP's
- Agua destilada ultrapura (ddH<sub>2</sub>O)
- Iniciadores específicos. Uno de los iniciadores debe estar marcado con un fluoróforo.
- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- Buffer TBE 10X
- Bromuro de Etidio (CAS N° 1239-45-8)

## Método

### Antes de empezar

Se deben elegir cuidadosamente los iniciadores que se utilizarán. Para ahorrar tiempo, dinero y esfuerzo debe planterase bien el trabajo en el laboratorio. Si se utiliza el método de electroforesis en secuenciador automático, la selección de los fluoróforos en los indicadores es el paso más importante.

Las condiciones de amplificación para cada locus de microsatélite son específicas y dependen de la temperatura de alineación del iniciador, la longitud del fragmento a amplificar, la naturaleza de la repetición y la marca de los reactivos de PCR. Cuando el microsatélite es transferido de una especie a otra, es recomendable usar las mismas condiciones de amplificación reportadas previamente. En otro caso, cuando los microsatélites son amplificados por primera vez, deben usarse condiciones estándar de amplificación y optimizarse posteriormente.

### 1. Selección de microsatélites y diseños de los iniciadores

1.1 Antes de empezar un estudio y seleccionar un marcador molecular debemos tener claros los objetivos de la investigación y qué queremos responder. Como se menciona en la introducción, la información que se puede obtener de un microsatélite depende de su composición y del genoma del cual proviene.

1.2 Para amplificar microsatélites mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se deben conocer las regiones flanqueantes para el diseño de los iniciadores. Sin embargo, cuando se trabaja con poblaciones naturales es posible que se desconozca esta información. Algunos iniciadores de microsatélites se alinean en regiones flanqueantes altamente conservadas entre

especies del mismo género, e incluso entre géneros de la misma familia. Por lo que en muchos casos los microsatélites pueden ser “transferidos” de una especie donde ya han sido caracterizados a una especie o un género cercano.

1.3 En la Internet existen bases de datos de microsatélites para algunas especies, de manera que se facilita la selección y la transferencia de loci para el estudio de organismos silvestres. Sin embargo, los microsatélites que son variables en un grupo pueden resultar monomórficos en otro y en muchos casos la utilización de iniciadores caracterizados para géneros diferentes al que se está analizando, conduce a amplificaciones inespecíficas o a bajas concentraciones del producto de la PCR.

1.4 En caso de no contar con información de especies o géneros cercanamente relacionados, los microsatélites pueden caracterizarse por medio del análisis de secuencias de genomas completos (Vendramin *et al.* 1996) o bien, por la exploración de bibliotecas genómicas y bibliotecas enriquecidas, lo cual implica un desarrollo experimental relativamente complejo (Zane *et al.* 2002). En contraste con las primeras, que contienen casi todo el genoma de un organismo, las segundas disponen únicamente de fragmentos que tienen segmentos con microsatélites.

1.5 Existen diferentes metodologías para el enriquecimiento de las bibliotecas, pero la más utilizada es la amplificación de segmentos por PCR a partir de iniciadores que contienen repeticiones de microsatélites. Las nuevas tecnologías de pirosecuenciación han permitido la secuenciación de genomas completos en tiempos muy cortos (ver capítulo de secuenciación). Aunque se desconozca la ubicación de estas secuencias en el genoma, esta aproximación permite encontrar los loci que contienen microsatélites así como sus regiones flanqueantes. La construcción de bibliotecas enriquecidas y la pirosecuenciación de genomas son técnicas complejas y relativamente costosas, por lo que en caso de ser necesario, es recomendable solicitar el análisis a alguna compañía o universidad que cuente con este servicio.

1.6 Una vez que se conocen las regiones flanqueantes, para el diseño de iniciadores se elige una región de aproximadamente 20 pb, que contenga aproximadamente el 50% de GCs y de preferencia sin repeticiones de nucleótidos.

## 2. Aislamiento de ADN

2.1 Existen muchos protocolos para aislar ADN y algunos de ellos han sido detallados en este libro. También pueden utilizarse kits de ciertas



compañías que simplifican el trabajo de laboratorio y optimizan el producto obtenido (ver capítulo de extracción de ADN).

2.2 En este paso es importante considerar el estado de conservación de las muestras, así como el tiempo y las condiciones en que han sido almacenadas; para darle un tratamiento adecuado a los tejidos según lo requieran. Por ejemplo, si las muestras tienen mucho tiempo desde que fueron colectadas y han sido expuestas a sustancias fijadoras (como formol), como es el caso de aquellas que se encuentran en museos o en colecciones científicas, es probable que el ADN extraído esté degradado (fragmentado) y esto influirá directamente en la obtención de productos de PCR porque será difícil amplificar fragmentos grandes (de más de 500 pb).

2.3 En algunos casos, cuando las muestras tienen poco tiempo de colecta, el ADN extraído está muy concentrado, por lo que será necesario cuantificar y hacer diluciones para estandarizar la concentración que será utilizada en las reacciones de PCR.

3. Amplificación de microsatélites (PCR)

3.1 Los microsatélites son amplificados a través de la PCR, utilizando iniciadores que se alinean en las regiones flanqueantes de la secuencia repetida. Si el análisis de polimorfismo será a través de la electroforesis en secuenciador automático deberán utilizarse iniciadores marcados con fluorescencia (mediante la adición de un fluoróforo al extremo 5' del iniciador).

3.2 Las condiciones para la amplificación por PCR son variables (tanto las concentraciones de los reactivos como el programa de amplificación), dependen de la calidad del ADN, el locus a amplificar y las condiciones del laboratorio. Sin embargo, para la optimización de la técnica se puede partir de un programa general de amplificación (Tabla 1).

Tabla 1. Programa de PCR: D=desnaturalización, A=alineación y E=extensión.

Número de ciclos	1		35		1
	D	D	A	E	E
Temperatura (°C)	95.0	95.0	Dependerá del locus que se desee amplificar		72.0
Tiempo (min: seg)	15:00	0:30	0:30	0:45	7:00

3.3 En caso de obtener productos inespecíficos pueden modificarse la concentración de  $MgCl_2$  (disminuir) y la temperatura de alineación (aumentar). Se recomienda comprobar siempre el éxito de amplificación de cada reacción de la PCR, mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1.2% en buffer TBE 0.5X, teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu g/ml$ ) (véase capítulo de electroforesis). Es importante comprobar la concentración de los productos, que sean específicos y que se encuentren dentro del rango de tamaño esperado.

4. Análisis de polimorfismos. Para determinar si los microsatélites son polimórficos se pueden emplear dos tipos de análisis: la estimación del tamaño de electromorfos y la secuenciación. Para la estimación del tamaño de electromorfos se pueden emplear la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, o bien electroforesis en secuenciador automático. Se debe elegir un método (de los cuatro mencionados en este capítulo) con el cual serán procesadas todas las muestras del estudio, ya que puede haber variaciones en los resultados obtenidos con cada método. El método recomendado en este manual es la electroforesis en secuenciador automático, por ser la técnica más rápida y con mayor resolución que existe en la actualidad. Sin embargo, en algunos casos es posible utilizar métodos menos costosos durante la implementación de la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la electroforesis en geles de agarosa para estimar la concentración de los productos de PCR y para verificar que éstos se encuentren dentro del rango de tamaño (pb) esperado. Si aún no se tienen los iniciadores marcados con los fluoróforos (necesarios para la amplificación antes de hacer la electroforesis en secuenciador automático) y se quiere estimar si el locus es o no polimórfico, se puede utilizar la electroforesis en geles de poliacrilamida. La secuenciación puede ser utilizada para corroborar que los electromorfos, de los cuales se está estimando el tamaño, correspondan a la misma secuencia de microsatélites.

En genomas diploides, al determinar el tamaño de los electromorfos también se infiere la condición homóciga o heteróciga de los alelos, ya que se pueden observar dos bandas si hay dos alelos diferentes (heterócigos) o sólo una banda si los dos alelos son iguales (homócigos). En genomas haploides sólo se observa una banda o electromorfo que corresponde a un alelo. Generalmente, las regiones que flanquean a los microsatélites tienen una menor tasa de mutación, sin embargo, cuando se presentan mutacio-

nes los iniciadores pueden no alinearse, lo que resulta en una ausencia de productos en la amplificación que se interpretan como un falso homólogo. El alelo no amplificado es un alelo nulo. Hasta la fecha hay pocos reportes del sesgo de los alelos nulos en las estimaciones de estructura genética de poblaciones (Carlsson 2008).

4.1 Electroforesis en geles de agarosa. El análisis de electromorfos o fragmentos en geles de agarosa o MetaPhor es relativamente sencillo. Sin embargo, tiene una baja resolución por lo que se recomienda únicamente para corroborar el éxito de la amplificación o para reconocer las diferencias de tamaño en microsatélites de hexanucleótidos.

Los geles de agarosa deben tener una concentración de 2.5 a 3.5%, dependiendo del tamaño de los fragmentos. En cada gel debe destinarse un pozo para un marcador de peso molecular con la resolución necesaria para el tamaño de los electromorfos que se estimarán, generalmente se utiliza un marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles pueden ser teñidos con bromuro de etidio (BrEt) o SYBR green (véase capítulo de electroforesis).

4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis en geles de poliacrilamida permite la separación de fragmentos con diferencias de tamaño de hasta un par de bases. Una vez montada es una técnica relativamente barata y con alta resolución para este tipo de marcadores. Sin embargo, es muy laboriosa y la obtención de resultados repetibles puede tomar varios días. Los fragmentos pueden ser evidenciados mediante tinción con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) o bien mediante autoradiografías, lo cual requiere incluir radiactividad durante la reacción de la PCR. El manejo de radiactividad incrementa la dificultad y el costo de la técnica, por lo que no es recomendable. Por otro lado, la acrilamida es un reactivo tóxico y explosivo que debe ser manejado con precaución, ya que tiene efectos adversos en el sistema nervioso central. Una vez que se polimeriza es aparentemente inocua, aunque se recomienda evitar el contacto directo con la piel o mucosas.

4.3 Electroforesis en secuenciadores automáticos. Cada vez es más frecuente el uso de secuenciadores automáticos en el análisis de fragmentos, porque reducen considerablemente el tiempo de obtención de datos, tienen una alta resolución y sus resultados son altamente repetibles.

Los secuenciadores automáticos son una alternativa al sistema basado en geles de poliacrilamida, la diferencia radica que en lugar de poliacrilamida se

utiliza un polímero que se inyecta de forma automática en un capilar antes de cargar la muestra de secuenciación y las muestras se van analizando una a una. En los secuenciadores automáticos se especifica el voltaje necesario para desarrollar la electroforesis de manera que los electromorfos migren y se separen en función de su tamaño. Estos equipos detectan una señal fluorescente que corresponde a cada alelo. Para que esto ocurra es necesario utilizar en la PCR iniciadores marcados con fluorescencia en alguno de sus extremos, generalmente el 5'. Sólo es necesario marcar uno de los iniciadores para cada locus, el Forward (F) o el Reverse (R).

Los fluoróforos emiten distintas señales (colores) que se detectan a diferente longitud de onda. Por tanto, es posible marcar los iniciadores con distintos fluoróforos y de este modo amplificar y leer varios loci en una sola reacción (multiplex) lo cual reduce el tiempo y el costo en las ampliificaciones y en las electroforesis en el secuenciador automático. Los fluoróforos más comunes emiten señales rojas (PET, dROX), azules (6-FAM, dR110), amarillas (NED, dTAMRA) y verdes (HEX, VIC, dR6G).

Para seleccionar el fluoróforo con el que serán marcados los iniciadores es necesario considerar el rango de tamaño en el que se encuentran los alelos de cada uno de los locus que se amplificarán. Para ejemplificar podemos imaginar un caso de siete loci de microsatélites (A, B, C, D, E, F y G, Figura 2) con diferentes rangos de tamaños reportados: en el locus A de 100 a 250 pb, en el locus B de 300 a 450 pb, en el locus C de 150 a 300 pb, en el locus D de 350 a 500 pb, en el locus E de 100 a 200 pb, en el locus F de 250 a 350 pb y en el locus G de 400 a 700 pb. Los iniciadores de los loci A y B podrían ser marcados con el mismo fluoróforo porque el rango de los alelos no se sobrepone. Mientras que los iniciadores de los loci A y C no deberían ser marcados con el mismo fluoróforo, si se quisieran analizar en la misma reacción de electroforesis porque el rango de los alelos cae dentro del mismo intervalo de tamaño, debido a que los electromorfos emitirían señales de la misma longitud de onda y no se podría diferenciar entre los alelos del locus A y el C. Por otro lado, los loci C y D, y los E, F y G podrían ser marcados con el mismo fluoróforo respectivamente porque el C y el D no se superponen en el rango de tamaño de los alelos, ni el E, el F y el G. En este ejemplo, uno de los iniciadores de los loci A y B serían marcados con NED, los iniciadores de los loci C y D serían marcados con 6-FAM, y los iniciadores de los loci E, F y G serían marcados con HEX (Figura 2A). Es recomendable hacer lecturas

multiplex de máximo cuatro loci porque un exceso de señal fluorescente puede complicar las lecturas del secuenciador automático.

Para que una reacción de PCR multiplex sea eficiente, es necesario que los iniciadores tengan temperaturas de alineación y requerimientos de  $\text{MgCl}_2$  similares. Basta con agregar los iniciadores correspondientes a cada locus en el mismo volumen total de la reacción (generalmente de 25  $\mu\text{L}$ ) y no olvidar que no deben amplificarse en la misma reacción de PCR loci que se superpongan en el rango de alelos y que hayan sido aquellos marcados con el mismo fluoróforo. Dado que en algunos casos las reacciones multiplex no son eficientes, las reacciones de PCR pueden realizarse por separado y los productos amplificados de un mismo individuo pueden ser combinados en un mismo pozo para su lectura en el capilar de secuenciación.

No existe una concentración óptima de los productos de la PCR para la lectura en secuenciador, dado que las diferentes combinaciones de productos afectan la intensidad de la lectura. Por lo tanto, es recomendable hacer una primera lectura de prueba con diferentes diluciones con base en la intensidad de los productos de la PCR observada en geles de agarosa (al 1.2%). Los productos de la PCR muy concentrados deben ser diluidos con  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Por ejemplo, los electromorfos que se observen muy tenues en los geles de agarosa deben ser diluidos 1:2 (5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR y 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{ddH}_2\text{O}$ ); mientras que los electromorfos cuyas bandas brillen más intensamente pueden ser diluidos 1:15 (1  $\mu\text{L}$  del producto de PCR y 14  $\mu\text{L}$  de  $\text{ddH}_2\text{O}$ ). Si las reacciones de la PCR en cada locus se hicieron por separado, en este paso es donde se deben mezclar los productos, considerando la concentración de cada reacción, el rango esperado de tamaño de los alelos y el fluoróforo usado para cada locus. Si no se utilizan diluciones adecuadas puede haber errores en el marco de lectura del secuenciador. Si los productos están muy concentrados puede saturarse la señal que es captada por el secuenciador y no podrá procesar la reacción. Si los productos están muy diluidos podría no detectarse ninguna señal en el secuenciador.

El tamaño de los fragmentos es determinado con un marcador de peso molecular (*size standard*, véase capítulo de electroforesis). Los marcadores de pares de bases son calibradores en cada muestra porque siempre emiten el mismo patrón de electromorfos y a cada uno se le asigna un valor constante (Figura 2A, picos en color rojo), los más utilizados se denominan LIZ y ROX. El marcador LIZ emite una señal anaranjada y se encuentra co-

mercialmente en tres rangos de lectura de que van de los 50 pb a los 600 pb (LIZ120, LIZ500 y LIZ600). Mientras que el ROX emite una señal roja y también se encuentra en tres rangos de lectura que van de los 50 pb a los 1000 pb (ROX400, ROX500 y ROX1000). Esto debe ser considerado al momento de elegir los fluoróforos con los que serán marcados los iniciadores, para que no se superpongan con el marcador. Todas las muestras deben ser leídas con el mismo marcador de pares de bases para evitar diferencias en la lectura de los tamaños de los fragmentos.

Para la corrida en secuenciador automático debe prepararse una reacción de secuenciación con formamida (Hi-Di, *Highly Deionized*), el marcador de pares de bases y la reacción multiplex previamente diluida. Las condiciones estándar de dicha reacción son: 89 % de formamida (8.9  $\mu$ L), 1% (o menos) del marcador de pares de bases (0.1  $\mu$ L) y 10% de la reacción multiplex (1  $\mu$ L). Las reacciones de secuenciación se cargan en el secuenciador automático, siguiendo las especificaciones de cada equipo y se inicia el proceso de electroforesis.

Los electromorfos migran durante la electroforesis hasta alcanzar la zona de lectura, donde el haz del láser que se desplaza horizontalmente de forma continua a lo largo del cristal, excita a los fluoróforos, los cuales emiten fluorescencia en una longitud de onda determinada. La luz emitida se proyecta hacia un espectrógrafo, dotado de una cámara CCD, donde se separan cromáticamente los electromorfos. El software del sistema contiene información sobre los fluoróforos que se están utilizando y sus longitudes de onda. Por lo tanto, proporciona los filtros adecuados para recoger las intensidades de luz que llegan a la cámara CCD. La pantalla de la computadora visualiza la información que se recibe desde el secuenciador. Esta información puede ser almacenada en archivos independientes que serán analizados a futuro.

1.4 Secuenciación de microsatélites. Los fragmentos que incluyen al microsatélite y a las secuencias flanqueantes pueden ser secuenciados directamente para su análisis. En general, los fragmentos son pequeños y por las características de las repeticiones, la secuenciación puede resultar poco eficiente. Sin embargo, este método permite analizar la composición de las secuencias e identificar la homoplasia molecularmente accesible (ver sección de ventajas y desventajas). Por tanto, cuando se analizan electromorfos en geles de agarosa, en geles de poliacrilamida o en electroforesis en secuenciador automático es recomendable secuenciar ciertos alelos para

corroborar los tamaños y para verificar que las bandas analizadas corresponden al mismo microsatélite.

Es probable que durante la PCR ocurran errores en la alineación de las hebras del ADN y se produzcan fragmentos de distinta longitud. Por lo general, los errores de alineación no afectan el resultado final de los electromorfos o en la secuenciación directa. Esto se debe a que el fragmento sin errores tendrá el mayor número de copias, por lo tanto, será el más evidente. Sin embargo, no se recomienda clonar dichos fragmentos para la secuenciación, ya que es probable seleccionar colonias que contengan el fragmento erróneo (Lielpet et al. 2001).

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

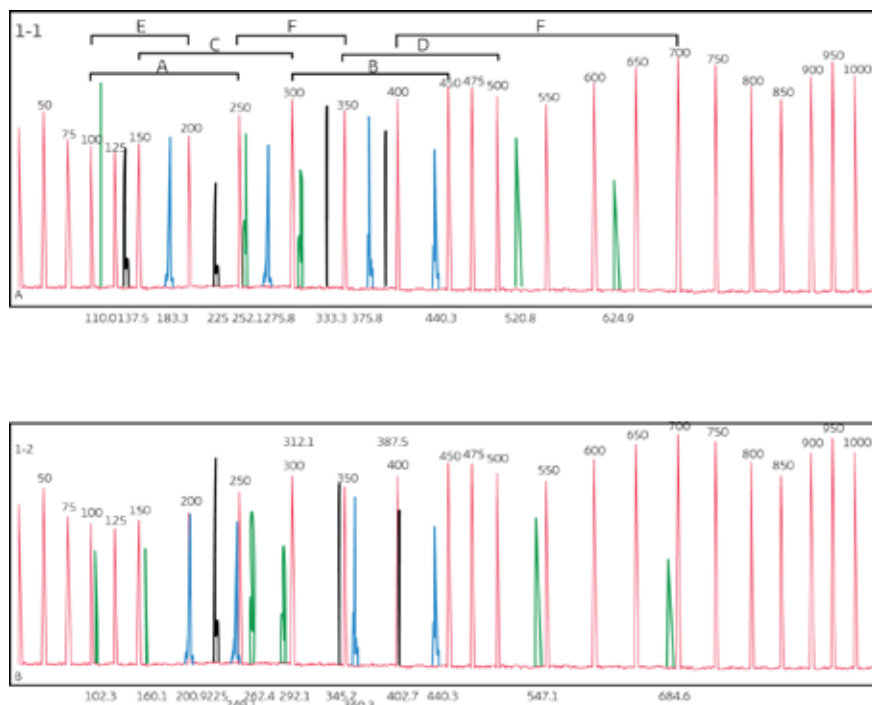
La lectura de fluorescencia puede llevarse a cabo con programas como GeneMapper o PeakScanner. Cada señal fluorescente se representa como un pico de lectura y corresponde a un alelo, cuyo tamaño es determinado por el programa con base en el marcador de pares de bases. Los programas para obtener datos de microsatélites sólo varían en las funciones que se pueden ejecutar, pero por lo general el valor de lectura de los electromorfos es el mismo.

El primer paso para el análisis de resultados es corroborar el patrón de electromorfos del marcador de pares de bases y que los valores correspondan a los indicados por el proveedor. De este modo se evitarán errores de lectura en los valores de los alelos. Por ejemplo: en la figura 2A y 2B se muestran reacciones multiplex para 7 loci. Cada pico corresponde a un alelo y se sabe a cuál locus corresponde por el color y el rango de tamaño en el que se encuentra. Los valores obtenidos de los alelos estarán en decimales, por lo que deben ser redondeados utilizando siempre el mismo criterio. En ocasiones cada locus presenta un patrón de picos en particular, que puede detectarse después de analizar a muchos individuos.

Las estimaciones de tamaño se registran en una base de datos donde se indica el individuo y los alelos encontrados para cada locus. De este modo es posible obtener los estimadores básicos de la variación poblacional, como la diversidad y la estructura genética. Para la mayoría de los análisis los alelos se registran por el tamaño que los caracteriza, pero en algunos análisis los datos deben traducirse a matrices de presencia/ausencia de los alelos o a matrices de distancia entre los alelos de un locus.

Adelante se muestra una lista de los análisis más frecuentes que se realizan con datos de microsatélites y los programas que se pueden utilizar. Posteriormente en la Tabla 2, se indica la versión más reciente del programa, el sistema operativo para el que fue diseñado, si existe una versión gráfica disponible y las referencias. Antes de empezar a utilizar un programa de análisis es necesario conocer los supuestos (principalmente el modelo de mutación en el que se basan) y estar informados sobre los algoritmos que utiliza.

**Figura 2.** Análisis de electromorfos en secuenciador automático. Este ejemplo corresponde a una reacción multiplex de una especie diploide. Muestra con 7 loci (picos en color negro, azul y verde) cuyos rangos son: A=100-250 pb, B=300-450 pb, C=150-300 pb, D=350-500 pb, E=100-200 pb, F=250-350 pb, G=400-700 pb y el marcador ROX1000 (picos en color rojo). En la parte inferior de cada electromorfo se indica su tamaño. En A, se indican los resultados de los 7 loci para el individuo 1 (I-1) y el rango en el que se encuentra cada locus. En B, se indican los resultados del individuo 2 (I-2).





**Tabla 2. Programas más comunes para el análisis de datos de microsatélites.** C=Conversión de datos, EB=estimadores básicos, DG=diversidad genética, EG-ga=estructura genética con grupos delimitados a priori, EG-gi=estructura genética basada en el genotipo multilocus de cada individuo, O=otros análisis especializados, G=indica si existe plataforma gráfica para la aplicación.

Programa versión más reciente	Tipo de análisis	Plataforma	Referencia
Arlequin 3.11	EB, DG, EG-ga	Win, G	Excoffier <i>et al.</i> 2005
BAPS 5.4	EG-gi	Win, Mac, Linux, G	Corander <i>et al.</i> 2004
BATWING	O	R: Win, Mac, Linux	Wilson <i>et al.</i> 2003
BayesAss+ 1.3	EG-gi	Win, Mac, Linux, G	Wilson y Rannala 2003
Bottleneck 1.2.02	O	Win, G	Cornuet y Luikart 1996
COLONISE 1.0	O	Win, G	Gaggiotti <i>et al.</i> 2004
Convert 1.31	C	Win, G	Glaubitz 2004
FDIST2 2.0	O	Win, G	Beaumont y Nichols 1996
FSTAT 2.9.3	EB, DG, EG-ga	Win, G	Rozas <i>et al.</i> 2003
GDA 1.1	DG, EG-ga	Win, G	Schaffner <i>et al.</i> 2005
GenAlEx 6.1	C, EB	Win, Mac, G	Peakall y Smouse 2006
GeneClass 2g.	EG-gi	Win, G	Piry <i>et al.</i> 2004
Geneland 1.05	EG-gi	R: Win, Mac, Linux	Guillot <i>et al.</i> 2005
Genepop 4.0.10	EB, DG, EG-ga	Win, Mac. Linux	Raymond y Rousset 1995
GENETIX 4.05	DG, EG-ga	Win, G	<a href="http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm">http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm</a>
IM	O	Win, Mac	Hey y Nielsen 2004
LAMARC 2.1.3	O	Win, Mac, Linux	<a href="http://evolution.gs.washington.edu/lamarc/lamarc_prog.html">http://evolution.gs.washington.edu/lamarc/lamarc_prog.html</a>
Micro-Checker 2.2.3	EB	Win, G	Van Oosterhout <i>et al.</i> 2004

**Tabla 2. Continúa.**

Programa versión más reciente	Tipo de análisis	Plataforma	Referencia
Migrate 3.1.7	O	Win, Mac, Linux	Beerli y Palczewski 2010
MSVAR 1.3	O	Win	Beaumont 1999
NewHybrids 1.1	EG-gi	Win, Mac	Anderson y Thompson 2002
Popgene 1.32	EB, DG	Win, Mac, G	<a href="http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_info.html">http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_info.html</a>
SMOGD 1.2.5	EG-ga	En línea, G	Crawford 2010
SPAGeDi 1.3	DG, EG-ga	Win, Mac, Linux, G	Hardy y Vekemans 2002
Structure 2.3.3	EG-gi	Win, Mac, Linux, G	Pritchard <i>et al.</i> 2000

### **Conversión de datos a diferentes formatos (C): Convert, GenAlEx.**

Estimadores básicos (EB): Arlequin, FSTAT, Genepop, Micro-Checker, PopGene

- Frecuencias alélicas
- Frecuencia de alelos nulos
- Equilibrio de Hardy-Weinberg
- Desequilibrio de ligamiento

Diversidad genética (DG): Arlequín, FSTAT, GDA, Genepop, GENETIX, PopGene, SPAGeDi.

- Heterocigosis observada y esperada
- Número observado y efectivo de alelos
- Número de alelos privados
- Diversidad genética de Nei

## Estructura genética

a) Grupos determinados a prior : Arlequin, FSTAT, GDA, Genepop, GENETIX, SMOGD, SPAGeDi

- Índices de fijación (FST, FIT, FIS) asumiendo diferentes modelos de mutación (IAM o SMM)
- Distancia genética entre pares de poblaciones
- Prueba de mantel
- AMOVA

b) Análisis basados en el genotipo multilocus de cada individuo: BAPS, BayesAss+, GeneClass, Geneland, NewHybrids, Structure

- Algoritmos bayesianos para identificar grupos genéticamente diferentes (*clusters*)
- Análisis de asignación de genotipos
- Relación entre genotipos y coordenadas geográficas  
Otros análisis especializados (O): BATWING, COLONISE, FDIST2, IM, LAMARC, Migrate, MSVAR
- Parámetros demográficos actuales y del pasado
- Tasa de migración
- Tiempos de divergencia
- Cuellos de botella

## APLICACIONES

A partir de los datos generados con esta técnica es posible estimar parámetros poblacionales básicos para estudios ecológico-evolutivos, como la heterocigosis, el tamaño efectivo, la distancia genética y el nivel de diferenciación de las poblaciones (Hedrick 1999, Selkoe y Toonen 2006). Además, mediante los microsatélites se pueden estimar tiempos de coalescencia y parámetros evolutivos de las poblaciones como el tiempo a la expansión poblacional y theta ( $\theta$ ) que es un estimador histórico de la variación genética (Wilson y Balding 1998). Es por esto que el análisis de microsatélites se ha generalizado para

estudios de genética de poblaciones (Hodgins y Barret 2007, Burgarella et al. 2009), filogeografía (Bucci et al. 2007, Llewellyn et al. 2009) y genética de la conservación (Chassin-Noria et al. 2004, Dionne et al. 2009).

Debido a que los microsatélites se encuentran distribuidos en todo el genoma, su análisis ha facilitado la elaboración de mapas genéticos, principalmente en organismos modelo (Wilkie et al. 1992, Bell y Ecker 1994, Knapik et al. 1998). También, se ha encontrado una estrecha relación entre la presencia de ciertos alelos de microsatélites trinucleótidos con enfermedades humanas, incluyendo ciertos tipos de cáncer y fibrosis, por lo que en la actualidad el análisis de microsatélites se emplea en la medicina para diagnosticar enfermedades (Morral et al. 1993, Halling et al. 1999).

Los altos valores de polimorfismo de los microsatélites permiten identificar genéticamente a los individuos dentro de una población. Debido a que la información de un conjunto de alelos puede ser única para cada individuo y similar entre los miembros de una familia, es posible utilizar a estos marcadores para la caracterización genética de linajes y razas. Por ejemplo, Parker y colaboradores (2004) a través del análisis de 95 loci de microsatélites de *Canis familiaris* lograron la de 85 razas de perros. La posibilidad de caracterizar genotipos ha impulsado el uso de microsatélites en pruebas de paternidad e identificación de individuos para la medicina forense como es el caso de la identificación de cadáveres en fosas comunes a partir de comparaciones con la información de los posibles parientes (Gill et al. 1996, Cerda-Flores et al. 1999).

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Debido a la alta tasa de mutación en los microsatélites, con frecuencia han sido calificados como altamente homoplásicos, porque es probable que los alelos observados sean idénticos por estado (alelos del mismo tamaño), pero que provengan de diferentes estados ancestrales. La observación directa de secuencias de los microsatélites permite en algunos casos discernir cuando hay homoplasia, particularmente cuando la mutación ocurre en las regiones flanqueantes o cuando se analizan microsatélites compuestos. Por ejemplo, los alelos  $A_7G_8$  son idénticos por estado a los alelos  $A_8G_7$ , pero tienen un origen diferente, es decir son homoplásicos. Este tipo de homoplasia se denomina “molecularmente accesible” ya que puede ser descubierta mediante secuenciación. Sin embargo, la secuenciación no siempre revela la homoplasia, por ejemplo,

para dos individuos que comparten un mismo alelo de microsatélite conformado por 8 adeninas ( $A_8$ ); si el ancestro inmediato de los dos individuos también portaba ese mismo alelo, se dice que los alelos son idénticos por descendencia y por estado. Por el contrario, si el estado ancestral de uno de ellos era  $A_7$  y por mutación se ganó una repetición, entonces los alelos en el presente son homoplásicos. La posibilidad de encontrar este tipo de homoplasia aumenta cuando se analizan especies diferentes o linajes con tiempos de divergencia profundos. Sin embargo, mediante simulaciones computacionales se ha encontrado que al incluir más loci en los análisis (seis o más), disminuye el porcentaje de homoplasia en estudios poblacionales (Alavez 2008).

Los microsatélites son marcadores con alta variación, accesibles y con diversas aplicaciones en medicina y en análisis evolutivos, ecológicos y de conservación. Las diferentes técnicas de biología molecular con las cuales pueden ser documentados, permiten el análisis de los microsatélites en diferentes tipos de laboratorios, incluso en aquellos con pocos recursos. Estos marcadores codominantes permiten hacer inferencias poblacionales y genealógicas con un gran espectro de aplicaciones, evaluando diferentes loci en poco tiempo y generando un mínimo de residuos peligrosos para el medio ambiente y la salud humana.

## PERSPECTIVAS

Probablemente los microsatélites no han sido aplicados como marcadores moleculares en muchas especies silvestres debido a que no han sido caracterizados, proceso que podría resultar laborioso y relativamente tardado. Sin embargo, hoy en día, con la gran cantidad de genomas que han sido secuenciados o que se encuentran en proceso de secuenciación y la reducción en costos y en tiempos de los métodos de caracterización de microsatélites, las posibilidades de aplicar estos marcadores en una gran diversidad de especies y grupos se han ampliado.

Debido a las diversas aplicaciones de estos marcadores y al alto grado de variación, se han establecido diferentes modelos de mutación para su análisis, como el IAM, el SMM y el TPM. También existen múltiples programas de análisis para establecer grupos de ligamento, para hacer inferencias de parentesco, estudiar la estructura genética de las poblaciones y su historia filogeográfica. El uso y caracterización de estos marcadores en diversos linajes, en un futuro permitirá la generación de bases de datos de poblaciones que puedan ser comparadas entre especies.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alavez V. 2008. Evolución de microsatélites de cloroplasto en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae*: efecto del ligamiento en la estimación de parámetros poblacionales y aplicaciones en genética de poblaciones. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Anderson E.C. y E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217-1229.
- Beaumont M. A. 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics* 153: 2013-2029.
- Beaumont M. A. y R. A. Nichols. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London* 263: 1619-1626.
- Beerli P. y J. Palczewski. 2010. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics* 185: 313-326.
- Bell C. J. y J. R. Ecker. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 191: 137-144.
- Boissinot S. y P. Boursot. 1997. Discordant phylogeographic patterns between the Y chromosome and mitochondrial DNA in the house mouse: selection on the Y chromosome? *Genetics* 146:1019-1034.
- Bucci G., S. C. Gonzalez-Martinez, G. Le Provost, C. Plomion, M. M. Ribeiro, F. Sebastiani, R. Alia y G. G. Vendramin. 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology* 16: 2137-2153.
- Burgarella C., Z. Lorenzo, R. Jabbour-Zahab, R. Lumaret, E. Guichoux, R. J. Petit, Á. Soto y L. Gill. 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity* 102: 442-452.
- Carlsson J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99:616-623.
- Cerda-Flores R. M., S. A. Barton, L. F. Marty-Gonzalez, F. Rivas y R. Chakraborty. 1999. Estimation of nonpaternity in the Mexican population of Nuevo Leon: a validation study with blood group markers. *American Journal of Physical Anthropology* 109: 281-93.
- Chassin-Noria O., A. Abreu-Grobois, P. H. Dutton y K. Oyama. 2004. Conservation genetics of the east Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacan, Mexico. *Genetica* 121:195-206.

- Corander J., P. Waldmann, P. Marttinen y M. J. Sillanpää. 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20:2363–2369.
- Cornuet J. M. y G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014.
- Crawford N. G. 2010. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources* 10: 556–557.
- Di Rienzo A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin y N. B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:3166–3170.
- Dionne M., F. Caron, J. J. Dodson y L. Bernatchez. 2009. Comparative survey of within-river genetic structure in Atlantic salmon; relevance for management and conservation. *Conservation Genetics* 10:123–133.
- Excoffier L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.
- Gaggiotti O. E., S. P. Brooks, W. Amos y J. Harwood. 2004. Combining demographic, environmental and genetic data to test hypotheses about colonization events in metapopulations. *Molecular Ecology* 13: 811–825.
- Gill P., A. Urquhart, E. Millican, N. Oldroyd, S. Watson, R. Sparkes y C. P. Kimpton. 1996. A new method of STR interpretation using inferential logic—development of a criminal intelligence database. *International Journal of Legal Medicine* 109: 14–22.
- Glaubitz J. C. 2004. Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* 4:309–310.
- Guillot G., F. Mortier y A. Estoup. 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5:712–715.
- Halling K. C., J. Harper, C. A. Moskaluk, S. N. Thibodeau, G. R. Petroni, A. S. Yustein, P. Tosi, C. Minacci, F. Roviello, P. Piva, S. R. Hamilton, C. E. Jackson y S. M. Powell. 1999. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *American Journal of Pathology* 155: 205–211.
- Hancock J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. Págs 1–10. En: D. B. Goldstein y C. Schlötter-

- rer (eds.). *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press. Oxford, Nueva York, Estados Unidos de América.
- Hardy O. J. y X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2:618-620.
- Hedrick P. W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313-318.
- Hey J. y R. Nielsen. 2004. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167:747-760.
- Hodgins K. A. y S. C. Barrett. 2007. Population structure and genetic diversity in tristylous *Narcissus triandrus*: insights from microsatellite and chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* 16: 2317-2332.
- Knapik E. W., A. Goodman, M. Ekker, M. Chevrette, J. Delgado, S. Neuhauss, N. Shimoda, W. Driever, M. C. Fishman y H. J. Jacob. 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics* 18: 338-34.
- Li W.S. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland M.A. Estados Unidos de América.
- Lielpet S., V. Kuhlenkamp, M. Anzidei, G. G. Vendramin y B. Ziegenhagen. 2001. Pitfalls in determining size homoplasy of microsatellite loci. *Molecular Ecology* 1: 332-335.
- Llewellyn M. S., M. D. Lewis, N. Acosta, M. Yeo, H. J. Carrasco, M. Segovia, J. Vargas, F. Torrico, M. A. Miles y M. W. Gaunt. 2009. *Trypanosoma cruzi* Ilc: Phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent chagas disease. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3: e510.
- Morral N., V. Nunes, T. Casals, N. Cobos, O. Asensio, J. Dapena y X. Estivill. 1993. Uniparental inheritance of microsatellite alleles of the cystic fibrosis gene (CFTR): identification of a 50 kilobase deletion. *Human Molecular Genetics* 2: 677-681.
- Neale D. B. y R. R. Sederoff. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics* 77:212-216.
- Oliveira E. J., J. G. Pádua, M. I. Zucchi, R. Vencovsky y M. L. Carneiro-Vieira. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.



- Parker H. G., L. V. Kim, N. B. Sutter, S. Carlson, T. D. Lorentzen, T. B. Malek, G. S. Johnson, H. B. DeFrance, E. A. Ostrander y L. Kruglyak. 2004 . Genetic structure of the pure bred domestic dog. *Science* 304: 1160-1163.
- Peakall R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Petit R. J., J. Duminil, S. Fineschi, A. Hampe, D. Salvini y G. G. Vendramin. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689-701.
- Piry S., A. Alapetite, J. M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin y A. Estoup. 2004. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95:536-539.
- Pritchard J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Raymond M. y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1283-1286.
- Rozas J., J. C. Sanchez-Del Barrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Schaffner S., C. Foo, S. Gabriel, D. Reich, M. J. Daly y D. Altshuler. 2005. Calibrating a coalescent simulation of human genome sequence variation. *Genome Research* 15:1576-1583.
- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Selkoe K.A. y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide for using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*: 615-629.
- Shriver M. D., L. Jin, R. Chakraborty y E. Boerwinkle. 1993. VNTR allele frequency distributions under a stepwise mutation model: A computer simulation approach. *Genetics* 134:983-993.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-462.
- Valdés A.M., M. Slatkin y N.B. Freimer. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: The stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133:737-749.
- Van Oosterhout C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.

- Vendramin G.G., L. Lelli, P. Rossi y M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5(4):595–598.
- Wilkie P. J., D. B. Krizman y J. L. Weber. 1992. Linkage map of human chromosome 9 microsatellite polymorphisms. *Genomics* 12: 607-609.
- Wilson I. J. y D. J. Balding. 1998. Genealogical inference from microsatellite data. *Genetics* 150: 499-510.
- Wilson G. A., M. Weale y D. J. Balding. 2003. Inferences from DNA data: population histories, evolutionary processes and forensic match probabilities. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A* 166: 155-188.
- Wilson G.A. y B. Rannala. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177-1191.
- Zane L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.