

# Diversidad Genética, Marcadores Moleculares y PCR



**Dra. Verónica Gutiérrez**

Departamento de Biodiversidad y Genética – IIBCE - MEC

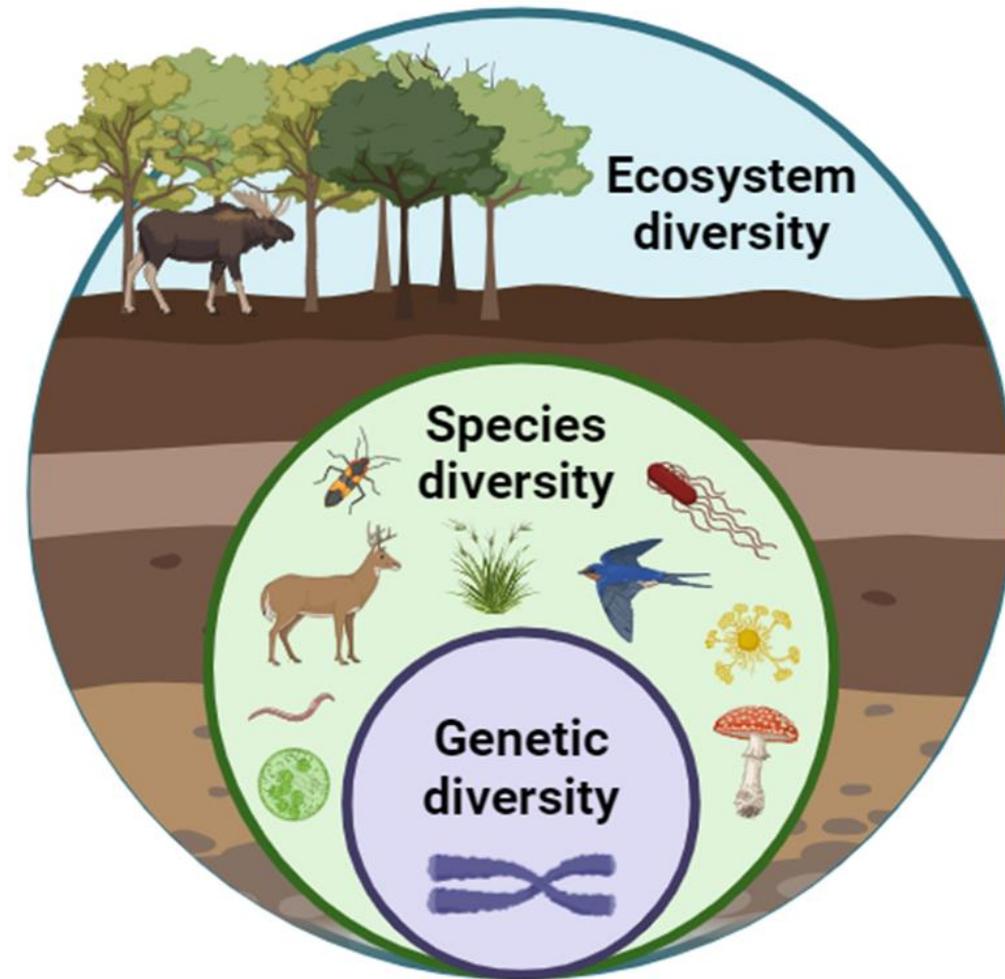
Lab. Biología Molecular de Organismos Acuáticos – Fac. Ciencias – UdelAR



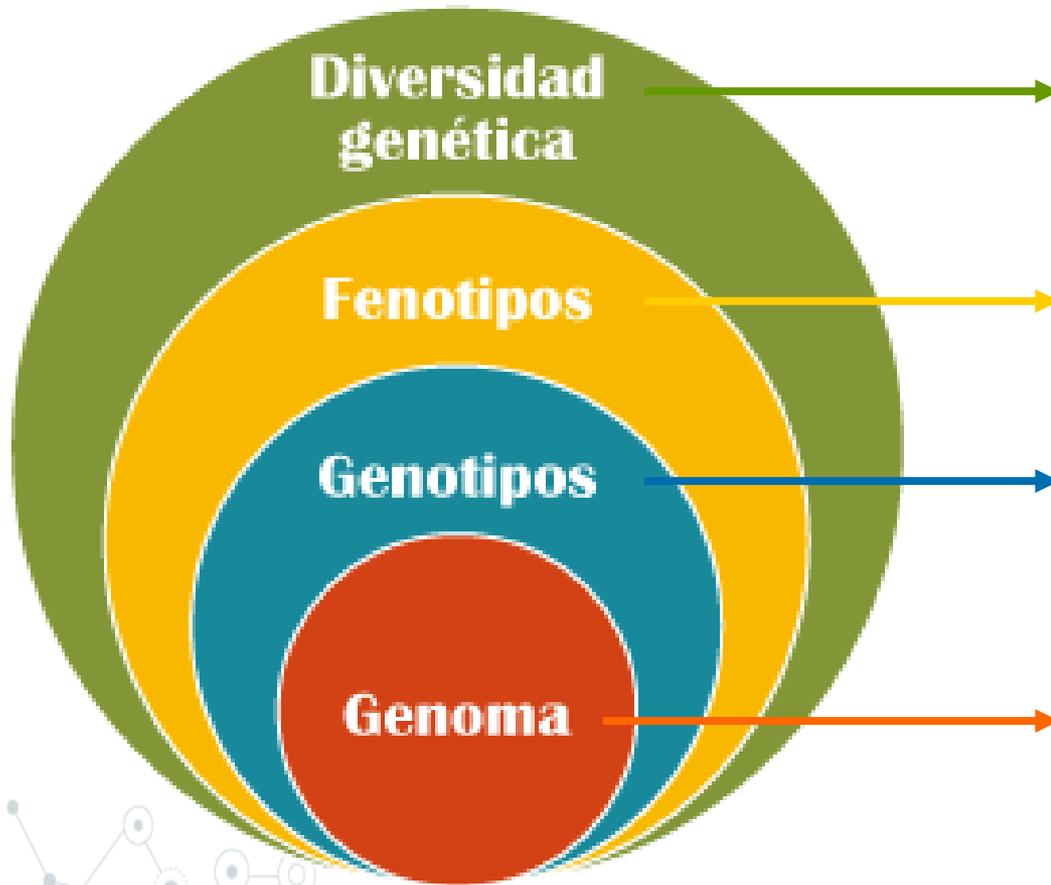
Ministerio  
de Educación y Cultura



# Biodiversidad



# Diversidad genética



**Mayor** diversidad genética en la especie, **mayor** potencial de evolución presentará y esa especie tendrá **más posibilidades de supervivencia**

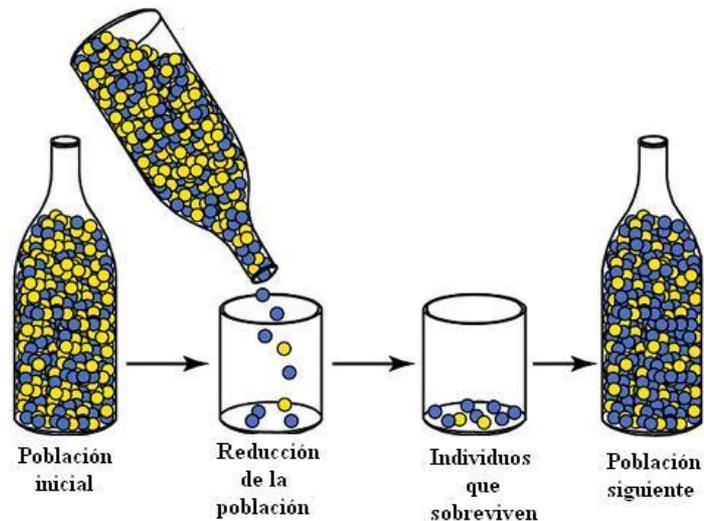
Expresión de cada genotipo

Genoma de cada individuo de la misma especie

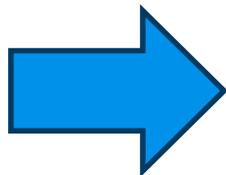
Variedad de genes que existen en los miembros de la misma especie

# Diversidad genética

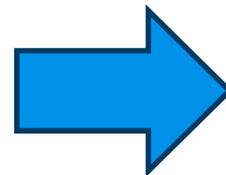
- **Disminuye** cuando hay un “**cuello de botella**”



*Disminuye  
sustancialmente el  
tamaño de la  
población*

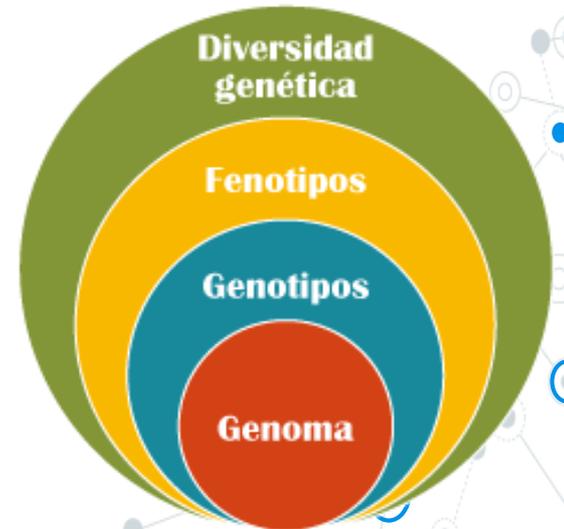


Aumenta la reproducción  
entre organismos  
emparentados

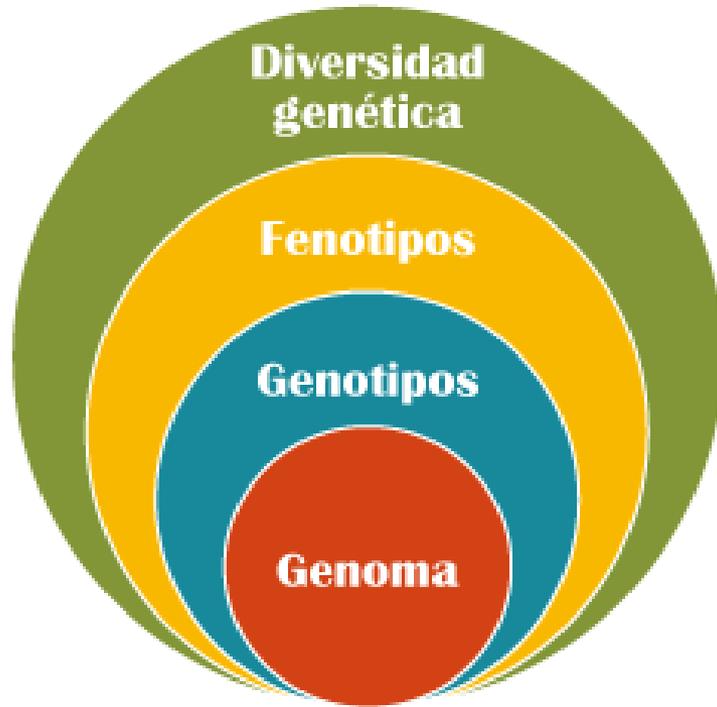


Disminuye la  
diversidad  
genética

# ¿Cómo se determina la diversidad genética?



## Muestreo



- Recolectar **muestras biológicas** de individuos de una o más poblaciones.
- Es importante cubrir una **cantidad suficiente de individuos** y poblaciones para una **buena representación**.
- **Registrar datos:**
  - localización,
  - fecha,
  - características del hábitat

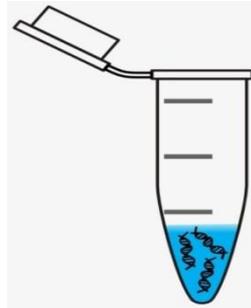
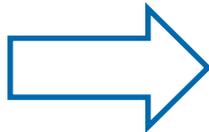




# Extracción de ADN



- Alcohol 70%
- Heladera (4°C)



Medir la **Concentración** (ng/μl)



Nanodrop



# Marcadores moleculares

- ◎ Son **secuencias de ADN** que permiten **identificar variaciones genéticas** entre individuos, poblaciones o especies.
- ◎ Tienen una **ubicación física identificable** en el genoma.
- ◎ El fragmento de ADN debe mostrar una **variación experimentalmente detectable** entre los individuos de la población.



# Características de un marcador molecular ideal

- ⦿ Altamente **variable** dentro y entre las especies.
- ⦿ Alto grado de **polimorfismo**: existencia en una población de múltiples alelos de un gen
- ⦿ **Codominante**: permite distinguir homocigotas/heterocigotas.
- ⦿ Heredable.
- ⦿ **Neutro**: no estar sometido a selección (insensible a los efectos ambientales).
- ⦿ De **rápida identificación**.
- ⦿ Simple análisis.



# Tipo de Marcadores moleculares

- **Marcadores clásicos:**
  - Alozimas/aloenzimas (en desuso)
- **Marcadores basados en ADN:**
  - AFLP y RAPD (en desuso)
  - Secuencias mitocondriales (COI, Cytb, D-loop)
  - Microsatélites (SSR)
  - SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)
  - Marcadores genómicos modernos

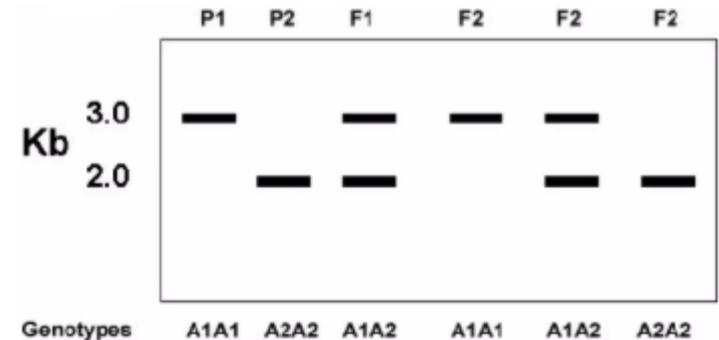
# Tipo de Marcadores moleculares

## ➤ Marcadores clásicos:

### ○ **Alozimas/aloenzimas** (en desuso)

*Electroforesis de alozimas*

- Para estudiar **la variación genética** dentro y entre poblaciones.
- Separación de **diferentes formas de enzimas** (alozimas) que están codificadas por distintos alelos en el mismo locus génico.
- Alozimas suelen **diferir ligeramente en su carga eléctrica** debido a sustituciones de aminoácidos causadas por mutaciones genéticas.



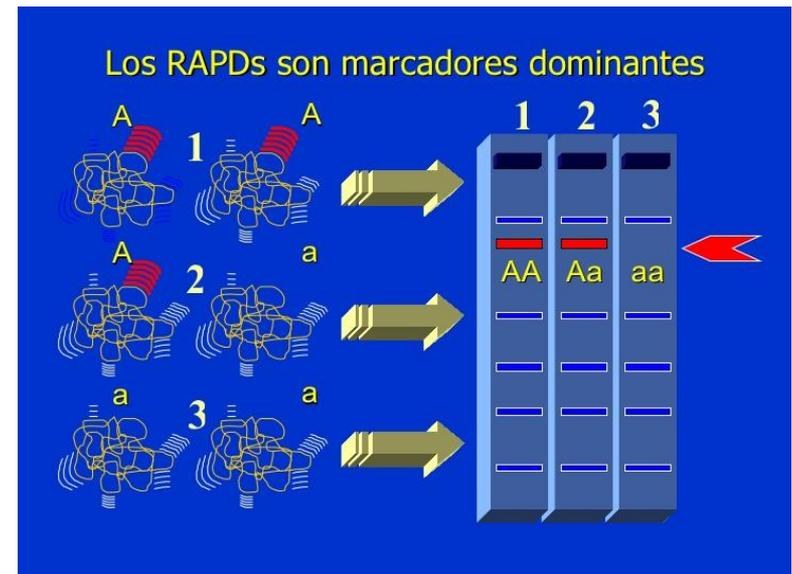
# Tipo de Marcadores moleculares

- **Marcadores clásicos:**
  - Alozimas/aloenzimas (en desuso)
- **Marcadores basados en ADN:**
  - AFLP y RAPD (**en desuso**)
  - Secuencias mitocondriales (COI, Cytb, D-loop)
  - Microsatélites (SSR)
  - SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)
  - Marcadores genómicos modernos

# AFLP y RAPD

- ⊙ **AFLP** ("Amplified fragment length polymorphism")
- ⊙ **RAPD** ("Random Amplified Polymorphic DNA")

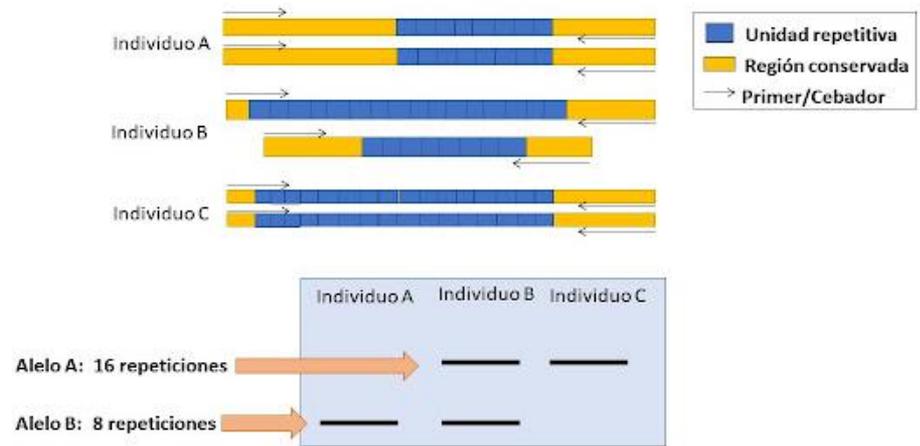
- ⊙ **Actualmente NO se usan**
- ⊙ Marcaron una etapa en la **genómica de conservación**
- ⊙ Basados en fragmentos de ADN amplificados **sin conocimiento previo de la secuencia**





# Microsatélites (SSR “Simple Sequence Repeat”)

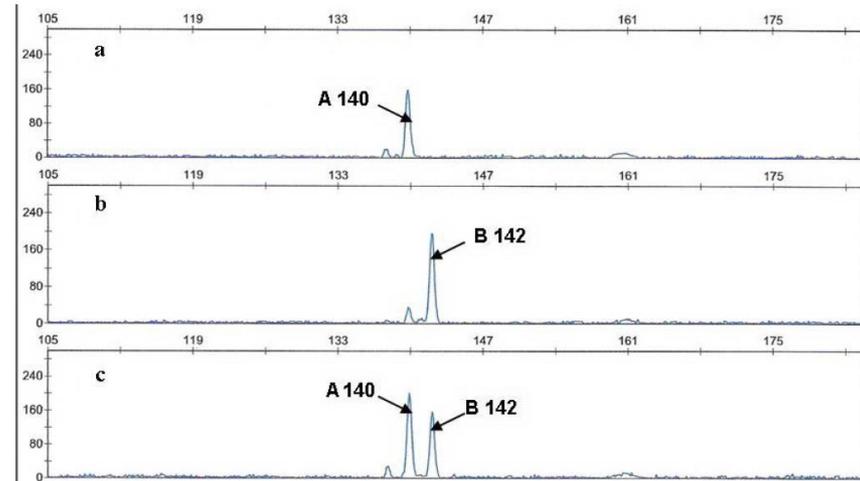
- **ADN repetido en tándem** (2-6pb).
- Se encuentran en regiones **NO codificantes**
- **Neutros**
- **Codominantes**
- Muy **polimórficos**  
(poseen una alta tasa de mutación)



**Polimorfismo** = diferentes números de repeticiones (fragmentos amplificados por PCR de distinto tamaño)  
Alelos con mayor número de repeticiones, tendrán mayor tamaño y correrán más retrasados en una corrida electroforética.

# Microsatélites (SSR “Simple Sequence Repeat”)

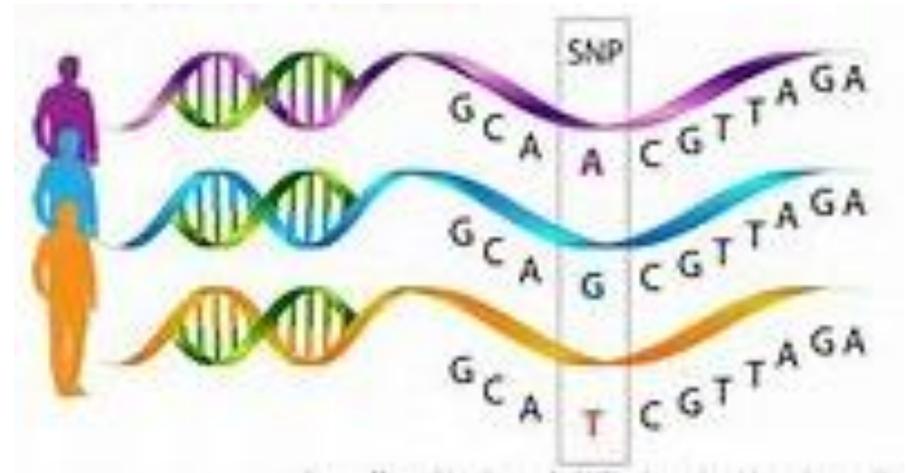
**Genotipado de microsatélites**  
(electroforegrama)  
Peak Scanner™ Software



- ⊙ **Aplicaciones:** estudios de parentesco, estructura poblacional, variabilidad genética.
- ⊙ **Desventajas:** desarrollo laborioso, homoplasia.

# Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP)

- Variaciones que afecta a **1 solo nucleótido**.
- Al menos en el **1% de la población**
- Muy abundantes (en todo el genoma)
- La mayoría se localizan en las **regiones NO codificantes** (no tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo)
- Algunos introducen **mutaciones en secuencias expresadas** o en regiones que influyen en la expresión génica: pueden inducir cambios en la estructura o regulación de las proteínas (**variación genética funcional**)



- Alta resolución: potencial para **genómica de conservación**.
- **Detectados mediante secuenciación masiva** (RAD-seq, GBS, WGS)

# Marcadores genómicos modernos

- ◎ **RAD-seq** (*Restriction site Associated DNA sequencing*):
  - Permite identificar y genotipar miles de SNPs a lo largo del genoma.
  - No necesita un genoma de referencia completo.
  - Combina el uso de enzimas de restricción con secuenciación masiva (NGS).
  - Secuencia reducida del genoma alrededor de sitios de restricción.
  - Altamente reproducible
- ◎ **GBS** (*Genotyping-by-Sequencing*):
  - Enfoque similar , pero más económico que RAD-seq.
- ◎ **WGS** (*Whole Genome Sequencing*):
  - Secuenciación completa del genoma de un organismo.
  - Permite detectar todo tipo de variantes genéticas (no solo SNPs).
  - Mucho más costosa que RAD-seq o GBS.

**Aplicaciones en especies/poblaciones no modelo**

# Marcadores genómicos modernos

	<b>RAD-seq</b>	<b>GBS</b>	<b>WGS</b>
<b>Qué secuencia?</b>	Regiones asociadas a sitios de corte	Fracción simplificada del genoma	Todo el genoma
<b>Costo</b>	Moderado	Bajo	Alto
<b>Necesita genoma de referencia</b>	Opcional, pero útil	Opcional	No, pero ayuda mucho
<b>Complejidad de análisis</b>	Media	Media-Baja	Alta

# Tipo de Marcadores moleculares

- **Marcadores clásicos:**
  - Alozimas/aloenzimas (en desuso)
- **Marcadores basados en ADN:**
  - AFLP y RAPD (en desuso)
  - Secuencias mitocondriales (COI, Cytb, D-loop)
  - Microsatélites (SSR)
  - SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)
  - Marcadores genómicos modernos

# Aplicaciones de los marcadores moleculares en conservación

- a. Diversidad genética intra e interpoblacional
- b. Estructura poblacional y conectividad
- c. Identificación de especies crípticas
- d. Hibridación y detección de introgresión
- e. Monitoreo genético en programas de reintroducción



## Técnicas de Biología Molecular

- ⊙ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- ⊙ Enzimas de restricción
- ⊙ Sondas marcadas/hibridizaciones

Permiten obtener **muchos marcadores moleculares** para detectar **variabilidad** en casi todo el genoma de un organismo

## Técnicas de Biología Molecular

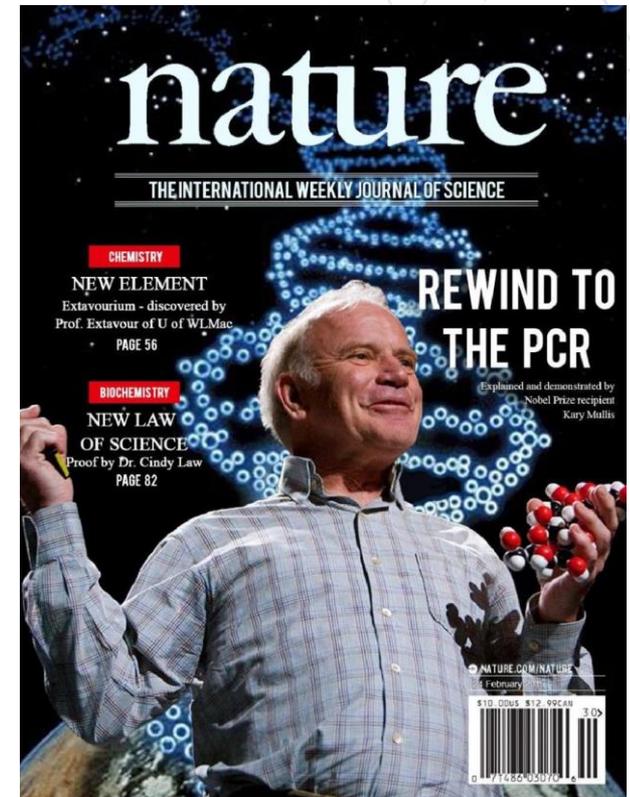
- ◎ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**
- ◎ Enzimas de restricción
- ◎ Sondas marcadas/hibridizaciones

# Reacción en Cadena de la Polimerasa

- **PCR** “**P**olimerase **C**hain **R**eaction”
- Desarrollada por **Kary Mullis** (1986)  
1993: Premio Nobel de Química
- Permite obtener **muchas copias** de una región elegida dentro de una molécula de ADN

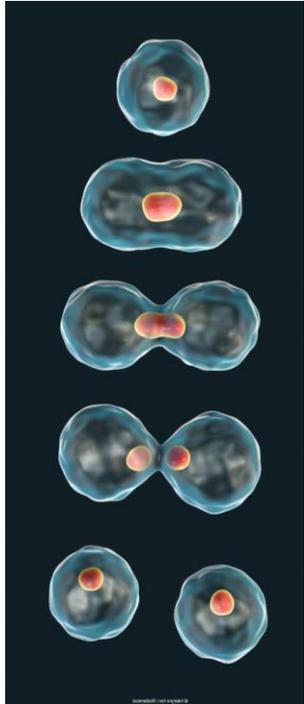


**AMPLIFICACIÓN**

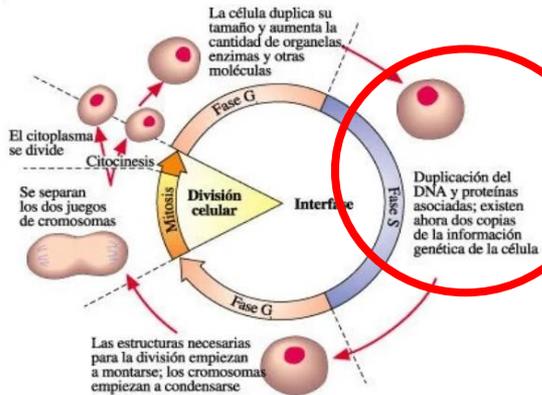


- Permite el copiado *in vitro* de ADN y ADNc

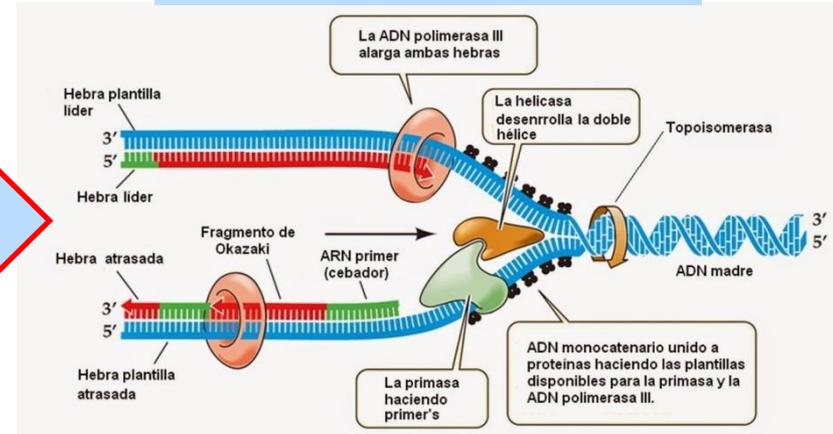
# PCR: Replicación del ADN



## Ciclo celular

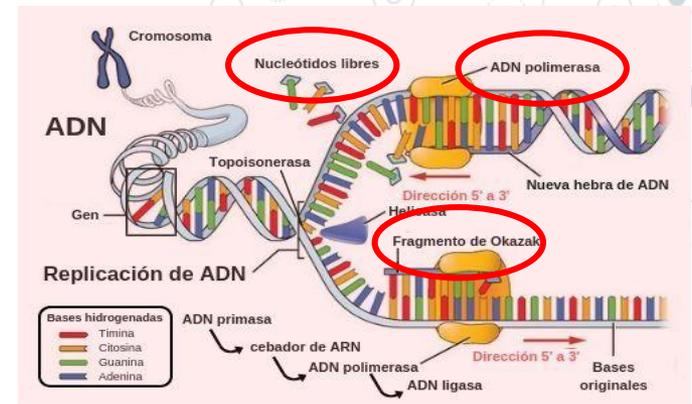


## Replicación del ADN

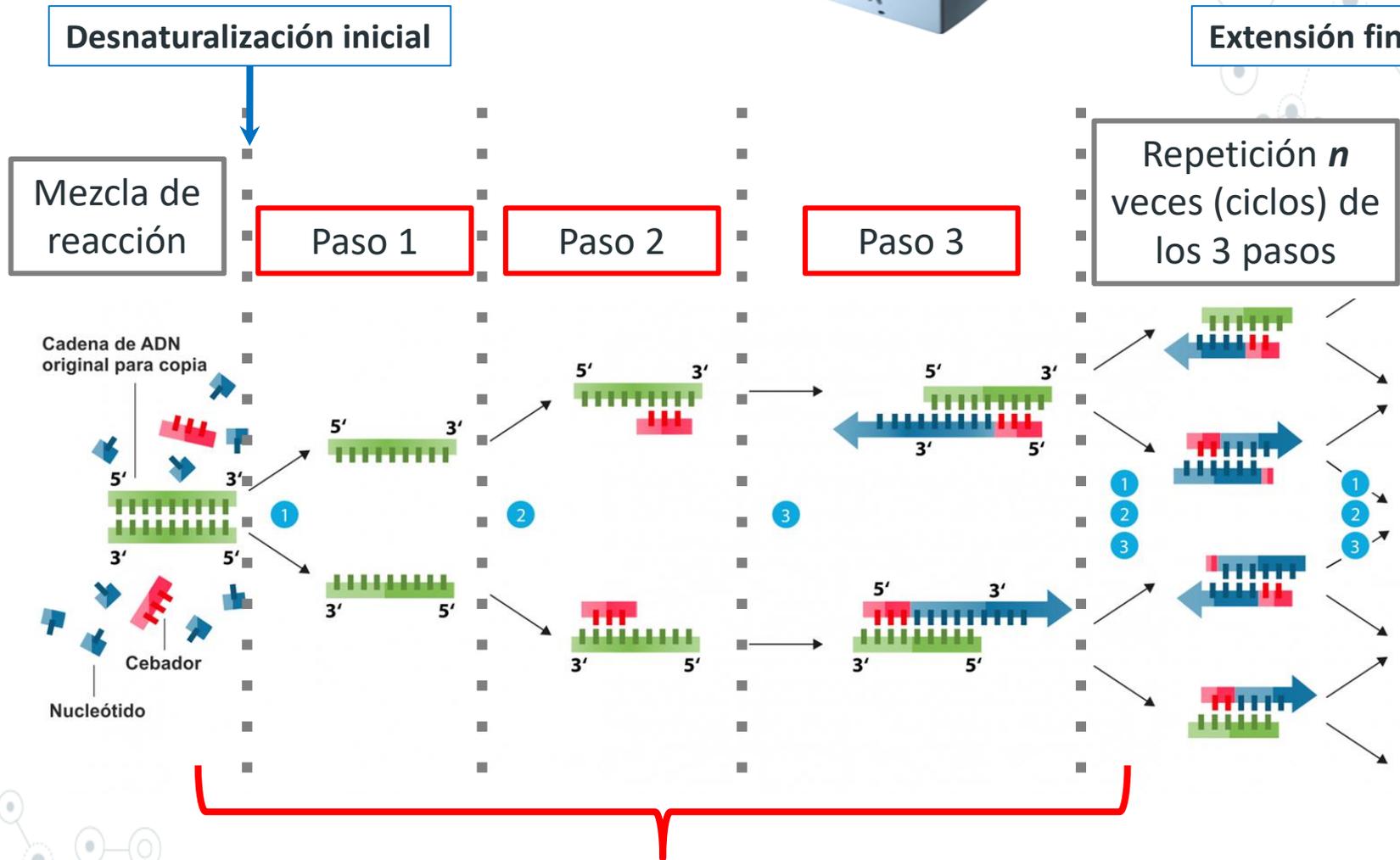


# PCR: Reactivos necesarios

- Agua libre de nucleasas (DNAsas y RNAsas)
- Solución amortiguadora (buffer): mantiene el pH óptimo para que actúe la enzima
- Cation divalente ( $MgCl_2$ ): magnesio ( $Mg^{2+}$ ) estimulan a la enzima *Taq polimerasa* para que incorpore los dNTPs
- **4 Desoxirribonucleótidos** (dNTPs): **dATP** / **dTTP** / **dGTP** / **dCTP**: proveen los nucleótidos (base + azúcar + fosfato)
- **2 Oligonucleótidos** (cebadores o “primers”)
- **Enzima ADN polimerasa** (*Taq DNA polimerasa*)  
“1969: aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* en un manantial del parque nacional de Yellowstone”
- ADN molde
  - $\leq 100ng$  ADN.
  - Pureza ( $Abs_{260}/Abs_{280}$ )  $\geq 1,7$



# PCR: Etapas del ciclado



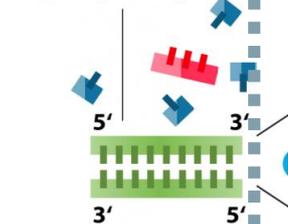
Se repiten n veces (30 – 40 ciclos)

# PCR: Etapas del ciclado

## DESNATURALIZACIÓN inicial

Mezcla de reacción

Cadena de ADN original para copia

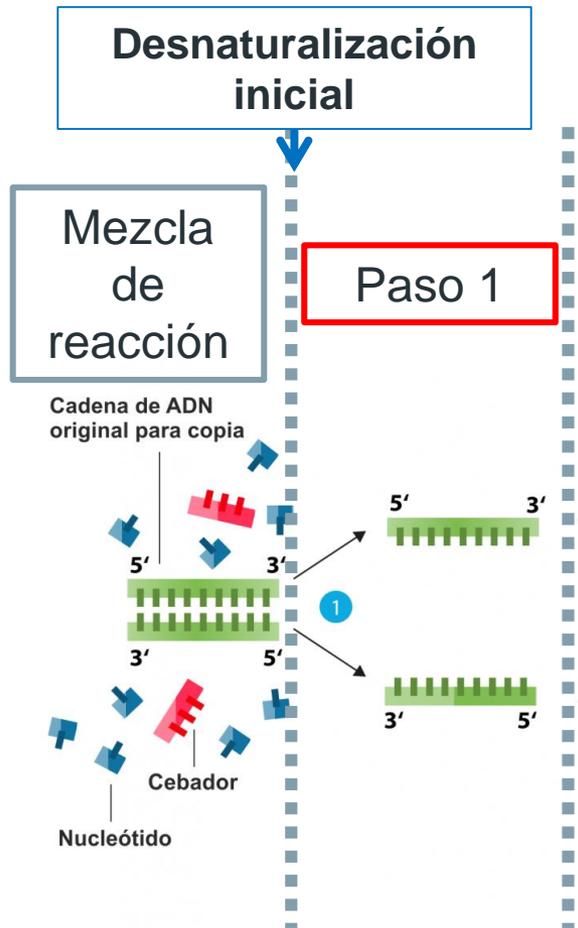


Cebador

Nucleótido

- 94-95°C / 5 min.
- Inactivación de nucleasas y proteasas.
- Separación de las hebras del ADN.

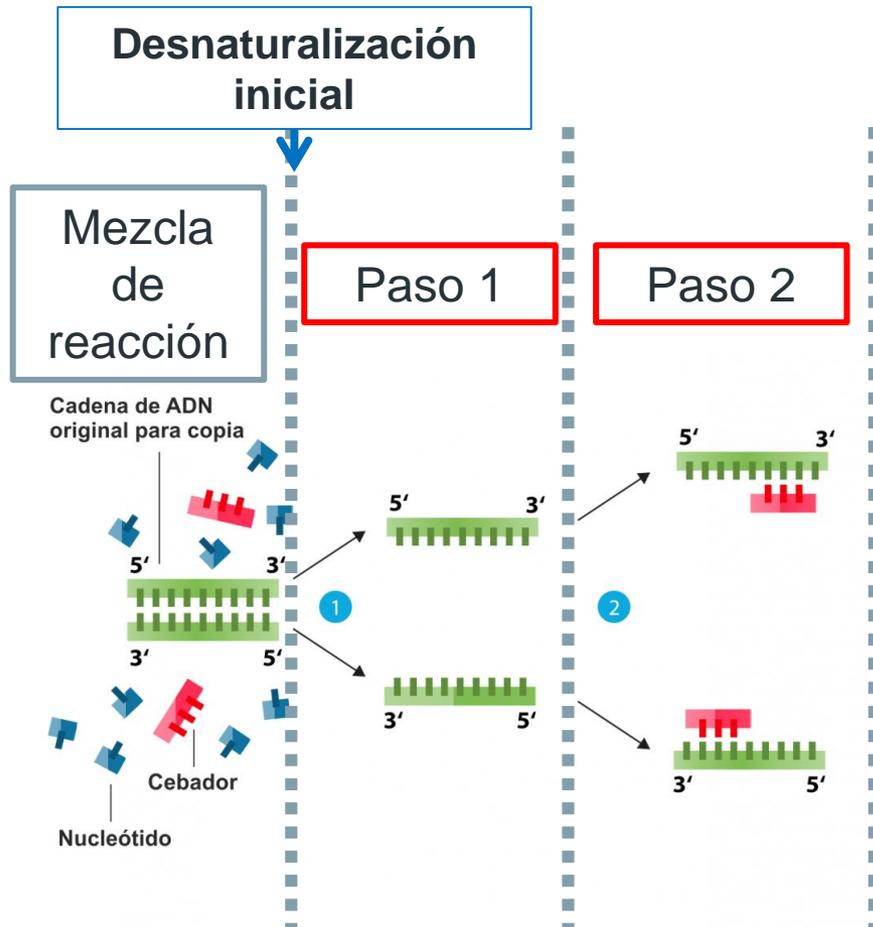
# PCR: Etapas del ciclado



## DESNATURALIZACIÓN del ADN dc

- 94-95°C / 30 seg-1min.
- Separación **completa** de las hebras del ADN.

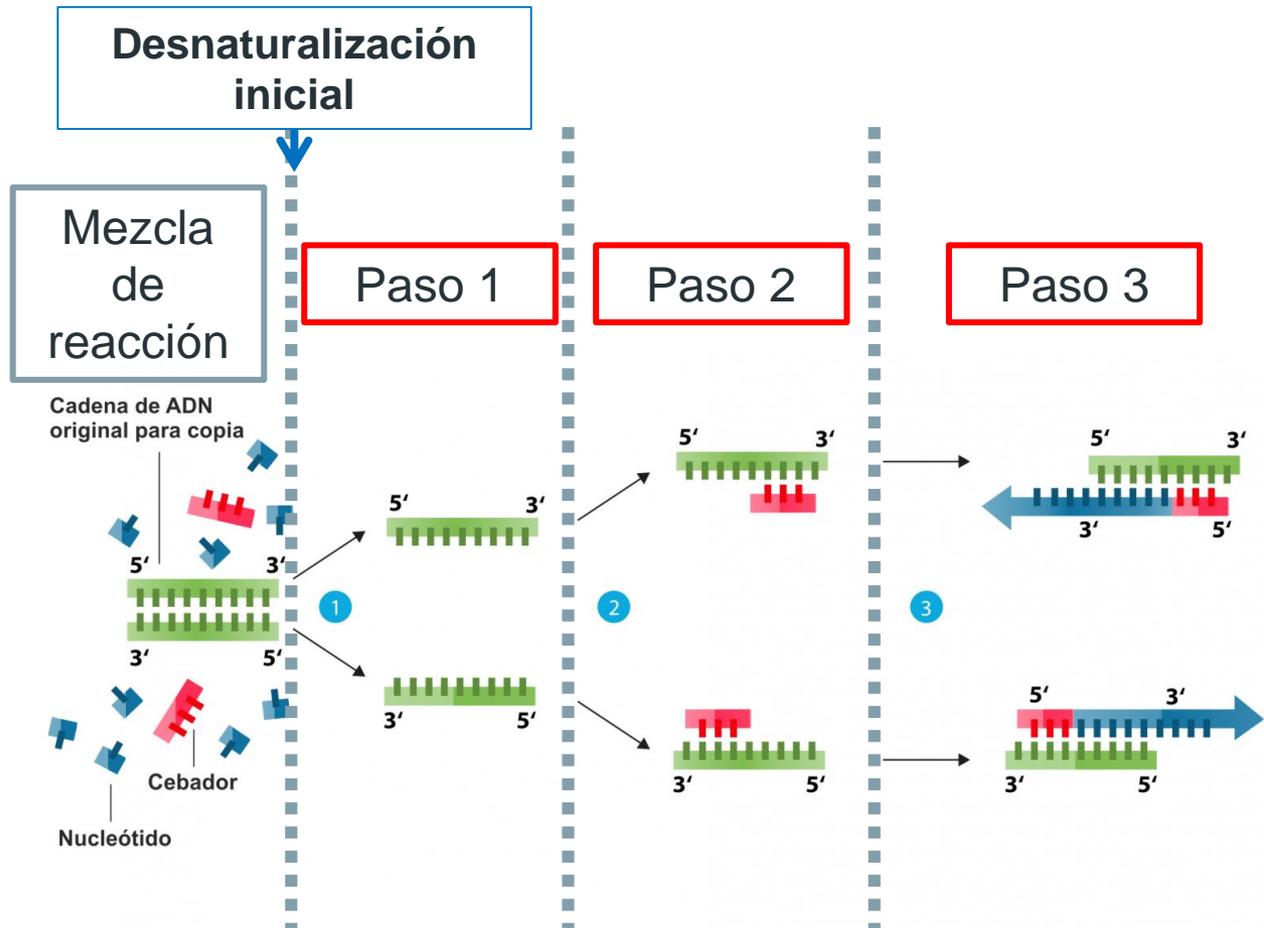
# PCR: Etapas del ciclado



## Pegado de los primers

- 3-5°C menos que  $T_m$  / **30seg-1min.**
- Los oligonucleótidos se hibridan a su secuencia complementaria “ANNEALING”

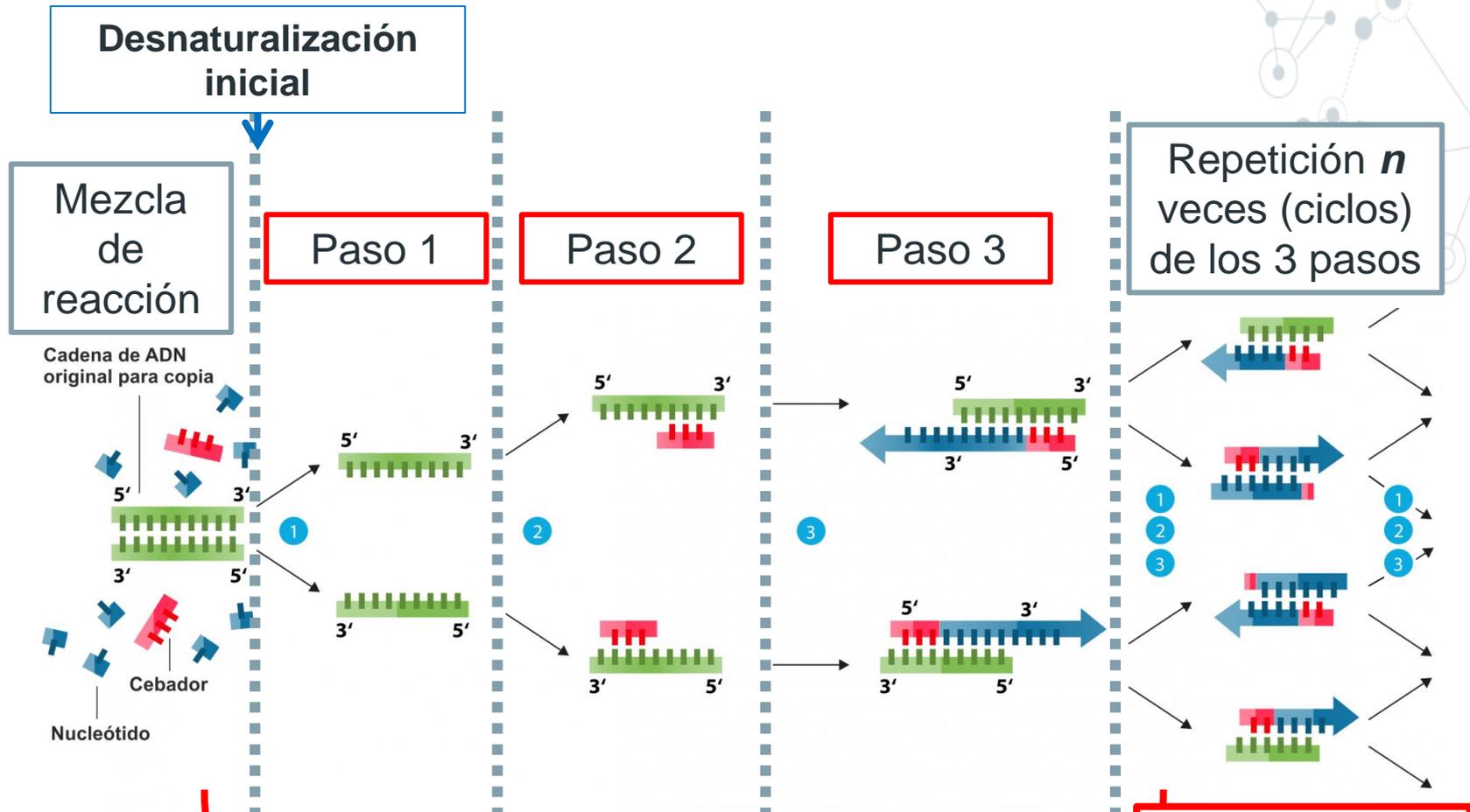
# PCR: Etapas del ciclado



## EXTENSIÓN

- 72°C / 1min.
- La *Taq* polimerasa comienza a adicionar los nucleótidos.
- Replicación del ADN

# PCR: Etapas del ciclado



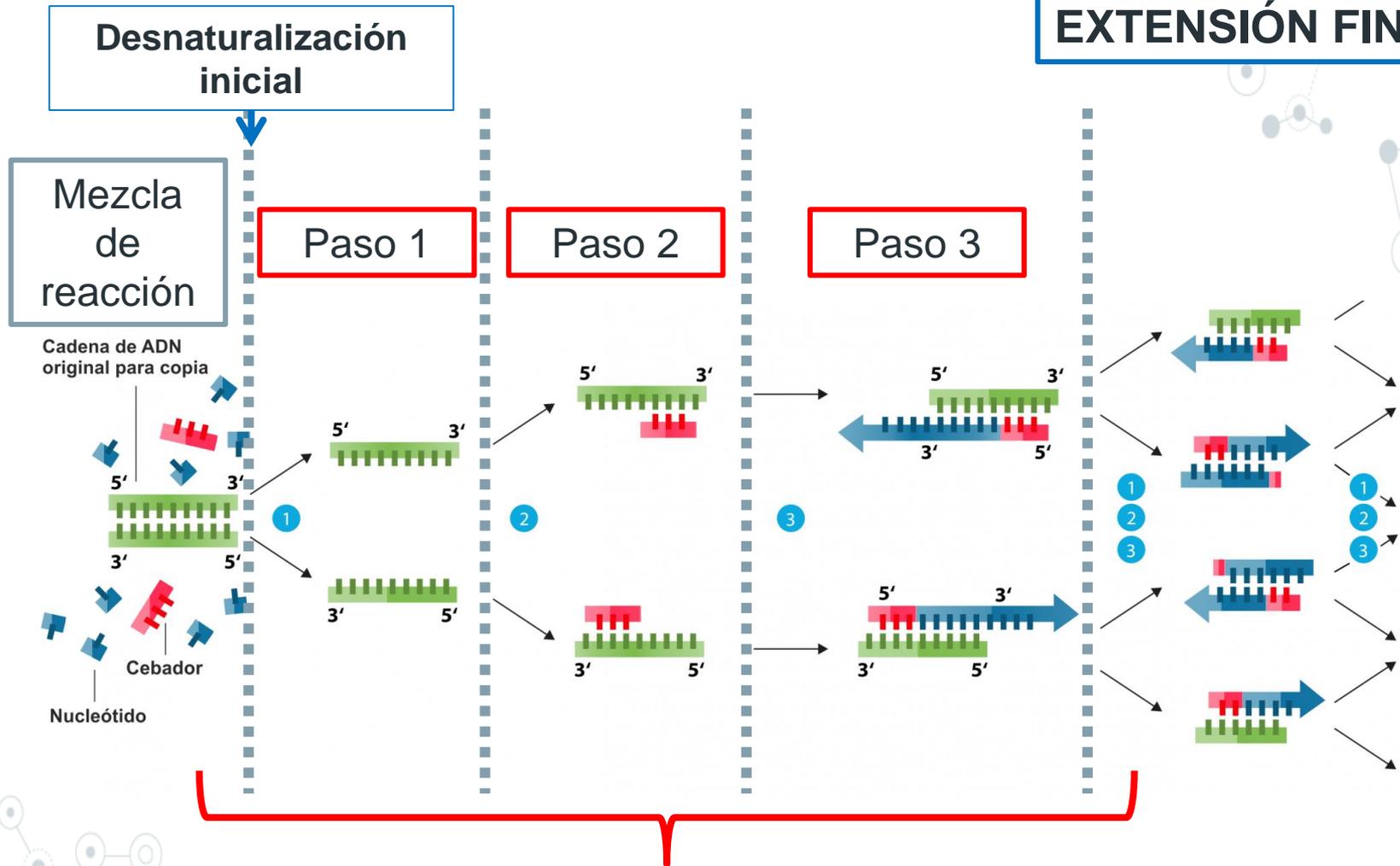
Se repiten n veces (30 – 40 ciclos)

Se obtienen  $2^n$  moléculas de producto amplificado

# PCR: Etapas del ciclado

- 72°C / 10 min.
- Se completan los fragmentos.

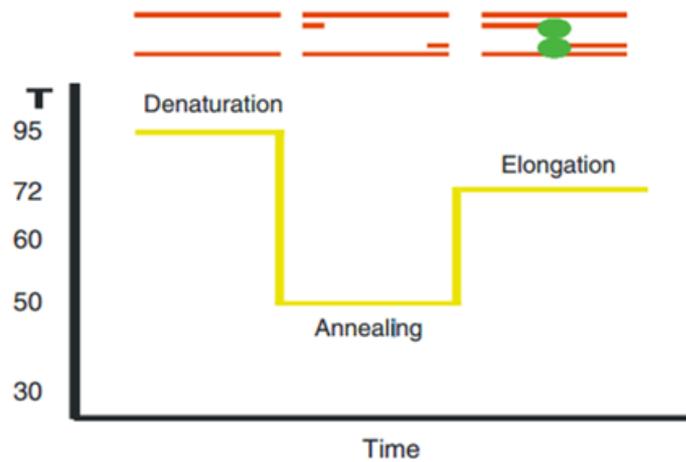
## EXTENSIÓN FINAL



Se repiten n veces (30 – 40 ciclos)

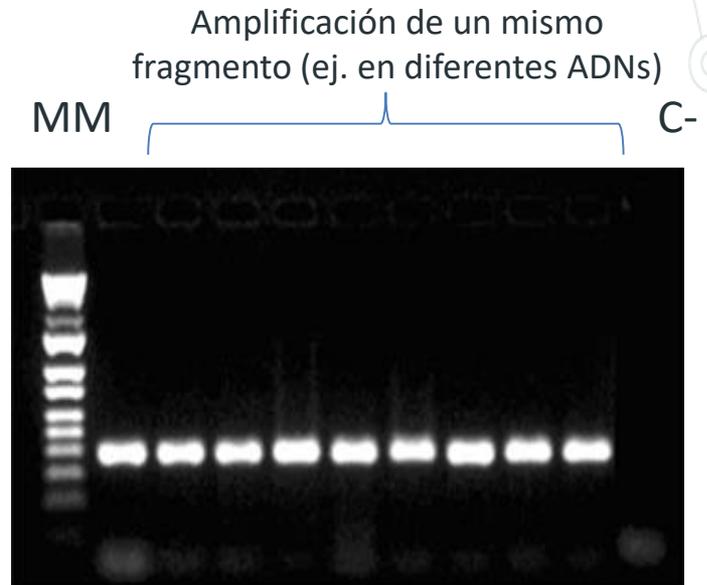
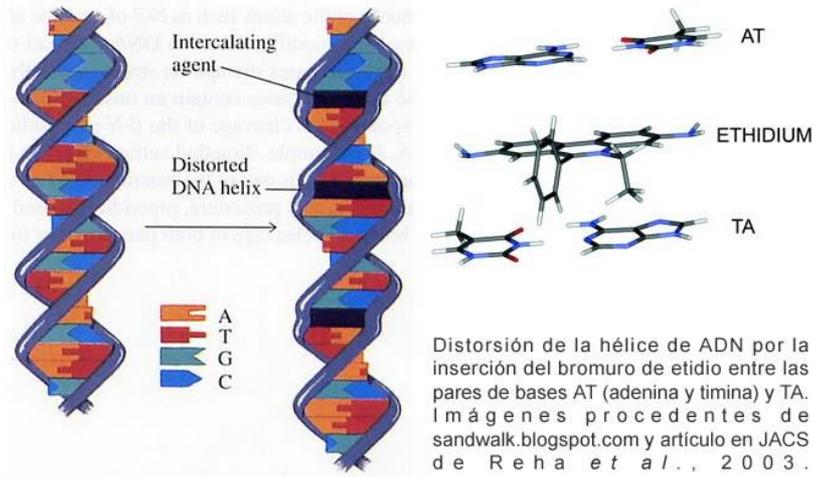
# PCR: Etapas del ciclado

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial:	94-95°C	5 min	
Desnaturalización:	94-95°C	30 seg-1 min	30 - 40
“Annealing” de los primers:	3-5°C menos que T <sub>m</sub>	30 seg-1 min	
Extensión:	72°C	1 min	
Extensión final:	72°C	10 min	



## PCR: Análisis del producto amplificado (tiempo final)

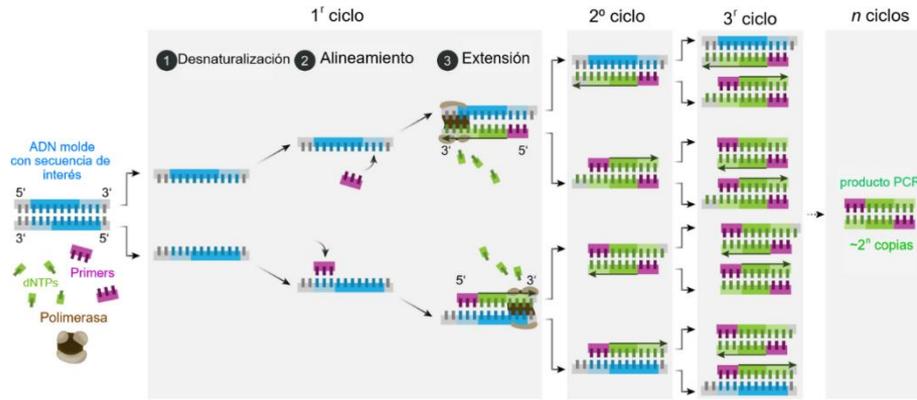
- Visualización de los fragmentos amplificados en un **gel de agarosa** teñido con un agente intercalante (bromuro de etidio, GelRed, SybrGreen).



Medir la **Concentración** (ng/ $\mu$ l)

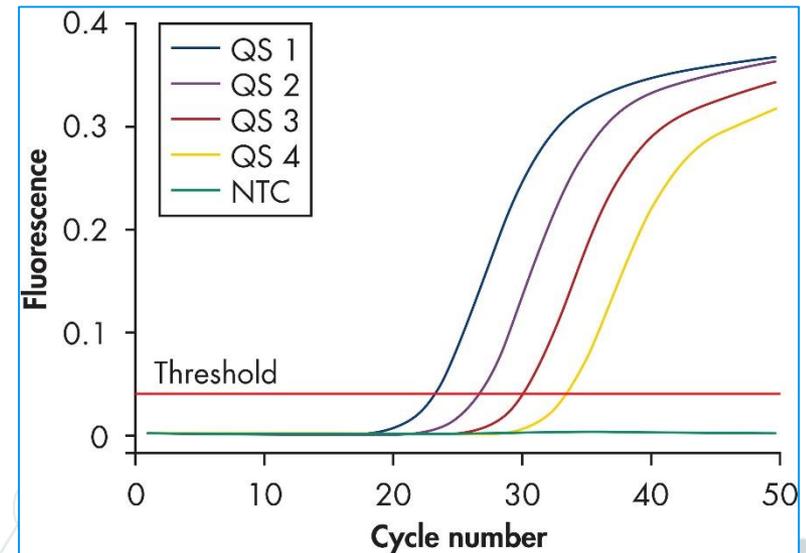
Nanodrop

# Real-time PCR ("qPCR")



La **cantidad** de **producto formado** se controla durante el curso de la **reacción** mediante la **fluorescencia** emitida por el/los fluorocromo/s introducido/s en la reacción

La **intensidad de la fluorescencia** es proporcional a la **cantidad** de ADN amplificado



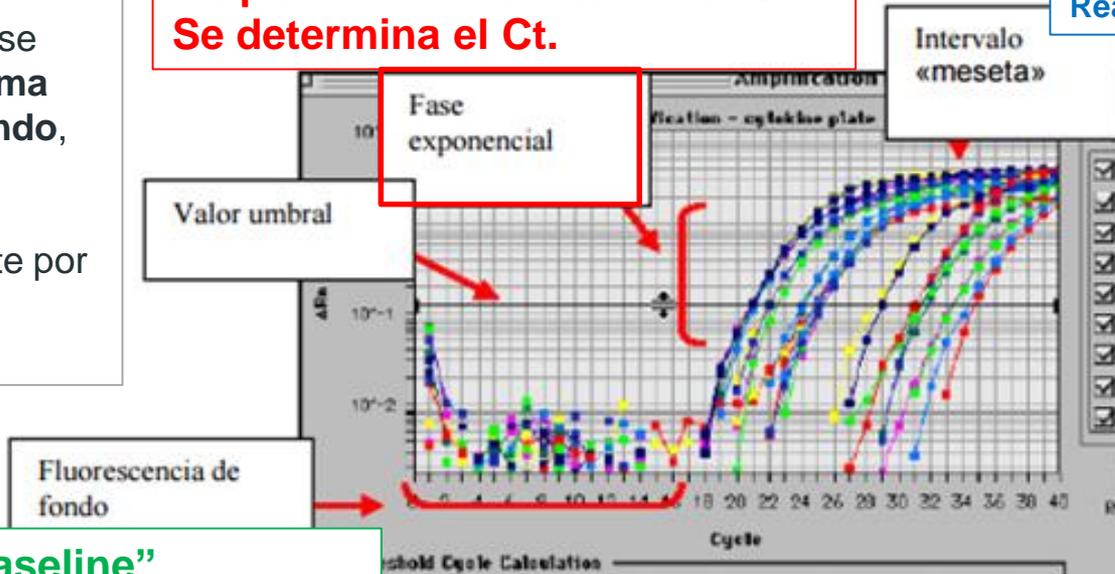
# qPCR: Curva de amplificación

Umbral de fluorescencia (threshold):

- Es una línea horizontal que se coloca por encima del ruido de fondo,
- Puede definirse manualmente o automáticamente por el software del equipo.

**Amplificación eficiente del ADN.  
Se determina el Ct.**

Sin aumento de producto.  
Reacción agotada.

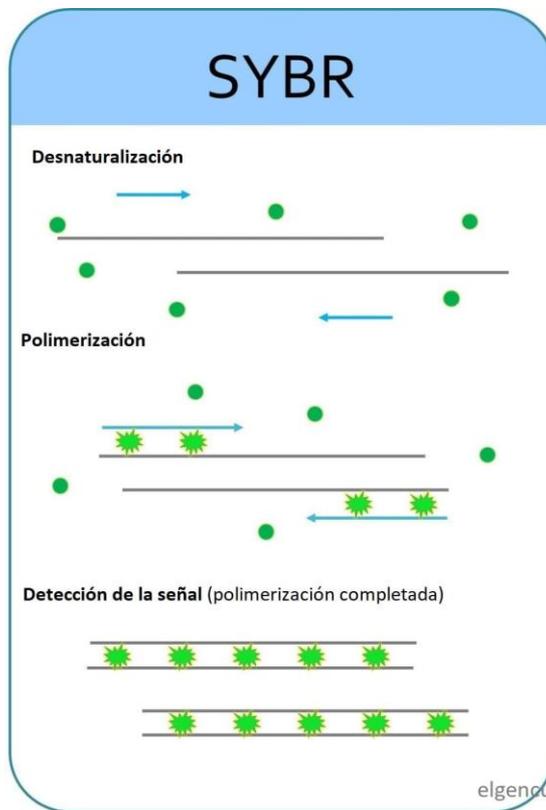


“Baseline”  
Ciclos iniciales (~1–15).  
Señal indistinguible del fondo.

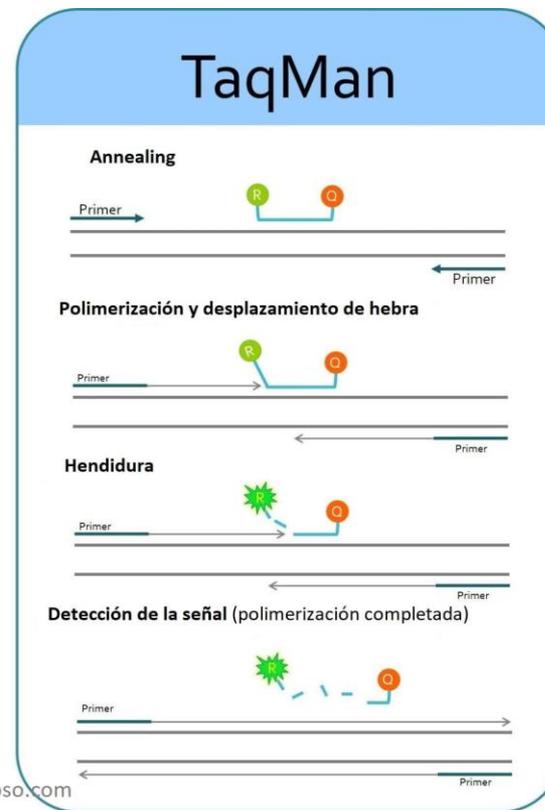
El Ct (Cycle Threshold) es el número de ciclo en el cual la fluorescencia de la reacción supera un umbral preestablecido.

# qPCR: Química de detección

Tinciones no específicas:  
**SYBR Green**

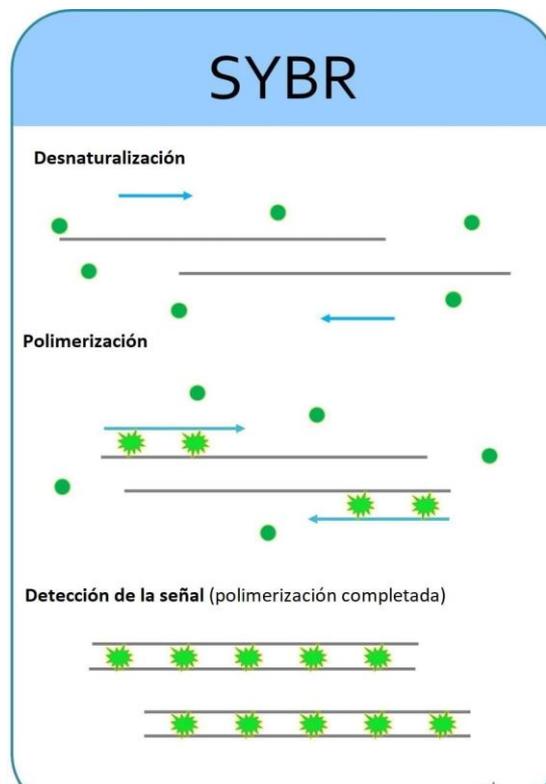


Sondas específicas:  
Ej. **TaqMan**



# qPCR: Química de detección

Tinciones no específicas:  
**SYBR Green**

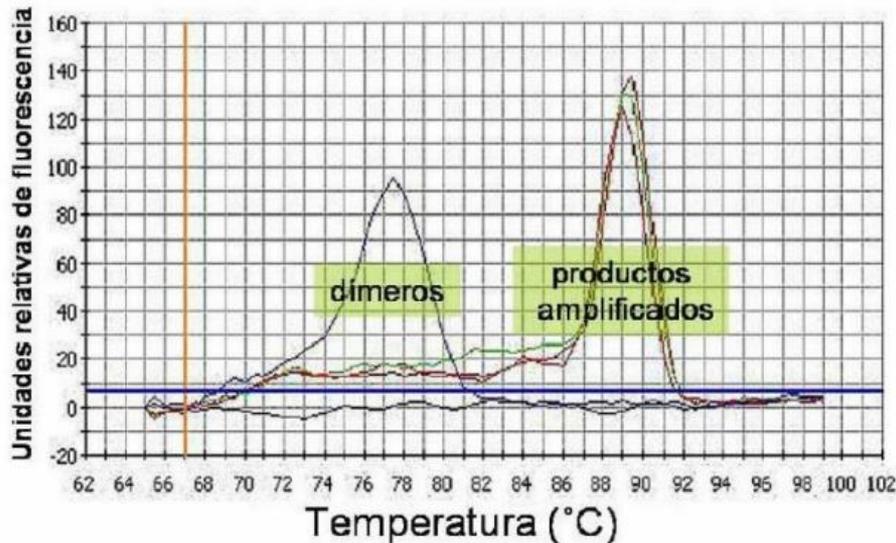


## SYBR Green

- Agente intercalante que se une al **surco menor del ADN** doble cadena (ADNdc)
1. Desnaturalización:
    - El SybrGreen está presente en el mix de reacción.
    - Hay poco o nada de ADNdc y la fluorescencia es baja.
  2. Amplificación:
    - Se generan productos de ADNdc.
    - El SybrGreen se **intercala** entre las bases del ADNdc
  3. Detección de la señal:
    - El SybrGreen emite una señal fluorescente intensa al ser **excitado** por el láser del equipo de qPCR.

**La detección de productos amplificados se realiza al final de cada ciclo**

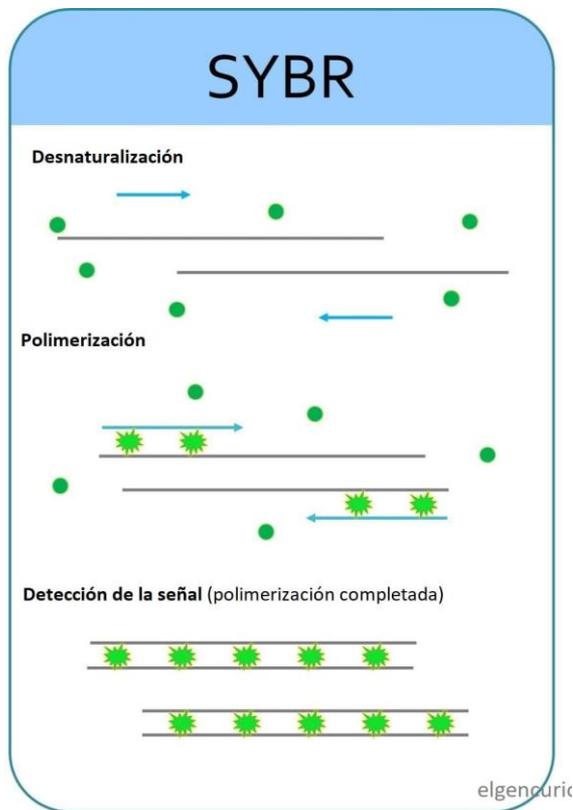
# Curva de Disociación (Melting Curve)



- ❖ Es esencial en ensayos con **SybrGreen**, ya que no distingue entre productos específicos e inespecíficos.
- ❖ Permite **verificar la especificidad** del producto amplificado.
- ❖ Después de la amplificación, se calienta lentamente el producto.
- ❖ La fluorescencia disminuye cuando el ADNdc se separa (desnaturaliza).
- ❖ Se mide la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ).
- ❖ **Un solo pico definido**: un solo producto específico.
- ❖ **Múltiples picos**: productos inespecíficos o dímeros de primers.

# qPCR: Química de detección

Tinciones no específicas:  
**SYBR Green**



## ♥ Ventajas

- ✓ Bajo costo
- ✓ No requiere sondas especiales
- ✓ Fácil implementación y diseño
- ✓ Bueno para estudios exploratorios
- ✓ Compatible con la mayoría de los termocicladores

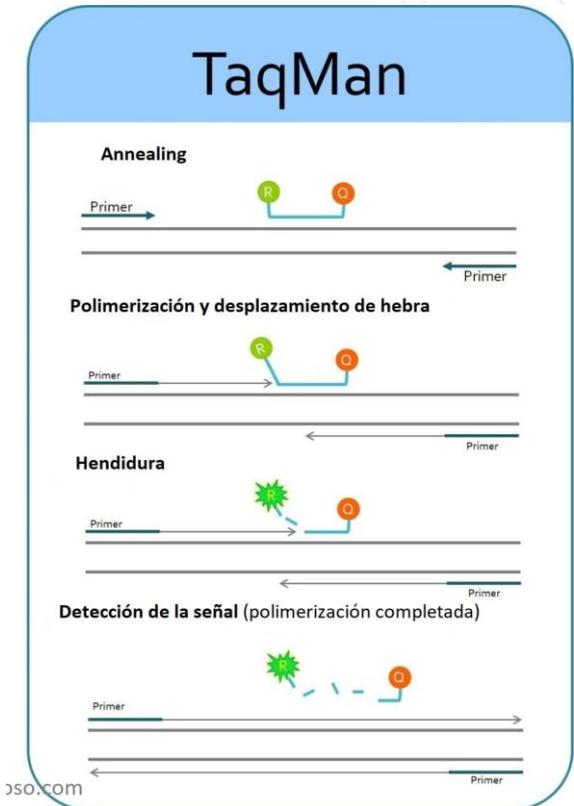
## ⚠ Limitaciones

- ✗ No es específico (se une a cualquier ADN de doble hebra)
- ✗ Detecta productos inespecíficos y dímeros de primers
- ✗ Requiere curva de disociación (melting curve) para validar especificidad
- ✗ No permite ensayos multiplex
- ✗ Menor precisión en cuantificación absoluta frente a sondas

# qPCR: Química de detección

## Sondas

- Sonda fluorescente que se **une específicamente** a una **secuencia** diana de ADN **entre los dos cebadores**.
- La sonda está **marcada** con un **fluoróforo** (molécula que **emite** fluorescencia) en un extremo y un **quencher** (molécula que **absorbe** la fluorescencia) en el otro extremo.
- **Amplificación:**
  - La sonda se hibrida con la secuencia diana.
  - La **polimerasa** provoca la **desnaturalización de la sonda**, separando el fluoróforo y el quencher (emisión de fluorescencia).

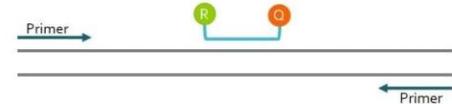


# qPCR: Química de detección

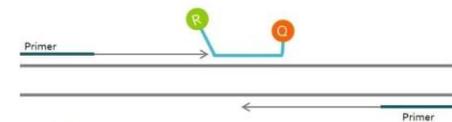
Ventaja	Descripción
Alta especificidad	La sonda TaqMan se une de manera específica a la secuencia diana, lo que mejora la precisión y reduce los falsos positivos.
Cuantificación en tiempo real	Permite la cuantificación del ADN o ARN en tiempo real, lo que facilita el análisis sin necesidad de etapas posteriores como la electroforesis.
Alta sensibilidad	La detección de la fluorescencia en cada ciclo de amplificación permite detectar incluso cantidades mínimas de ADN o ARN.
No requiere separación posterior	A diferencia de otros métodos, no es necesario realizar electroforesis o análisis de gel después de la PCR, lo que reduce el riesgo de contaminación.
Fácil de automatizar	Las sondas TaqMan pueden ser fácilmente integradas en sistemas automatizados, lo que facilita el manejo de grandes volúmenes de muestras.
Versatilidad	Son ideales para aplicaciones de cuantificación absoluta y relativa, y también se pueden usar para la detección de mutaciones.

## TaqMan

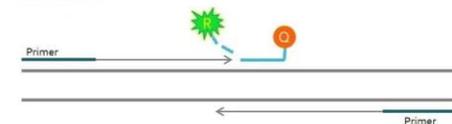
### Annealing



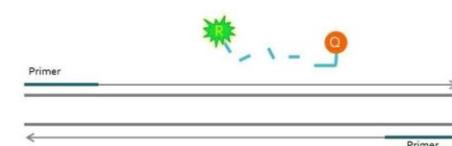
### Polimerización y desplazamiento de hebra



### Hendidura



### Detección de la señal (polimerización completada)



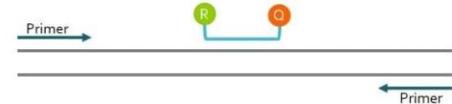
DSO.COM

# qPCR: Química de detección

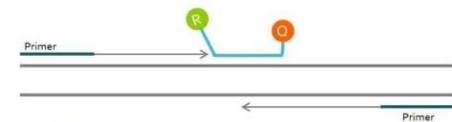
Desventaja	Descripción
Costo elevado	Las sondas TaqMan son más caras en comparación con otros métodos de detección, como los basados en intercalantes de ADN (ej. SYBR Green).
Requiere diseño específico	El diseño de sondas TaqMan es más complejo, ya que deben ser específicas para la secuencia diana, lo que puede llevar tiempo y ser costoso.
Limitaciones en secuencias complejas	Puede haber dificultades en la detección de secuencias muy similares o altamente variables debido a la necesidad de una unión específica entre la sonda y la secuencia de interés.
Posible interferencia con la fluorescencia	La emisión de fluorescencia puede verse afectada por la calidad de los reactivos, la contaminación de la muestra o la eficiencia del sistema de detección.
Puede ser menos eficiente en muestras muy complejas	En muestras con una alta carga de ADN o ARN no específico, puede haber interferencia que afecte la precisión de la cuantificación.

## TaqMan

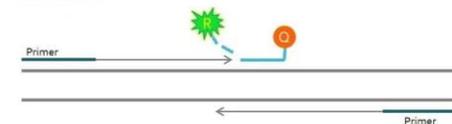
### Annealing



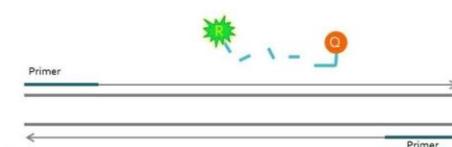
### Polimerización y desplazamiento de hebra



### Hendidura



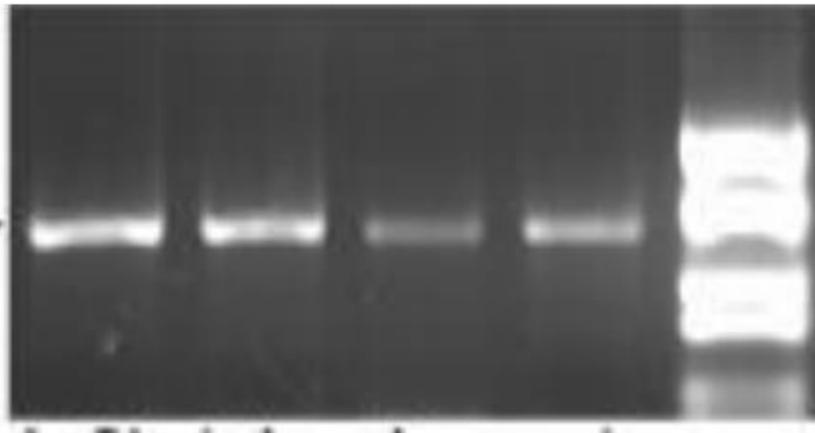
### Detección de la señal (polimerización completada)



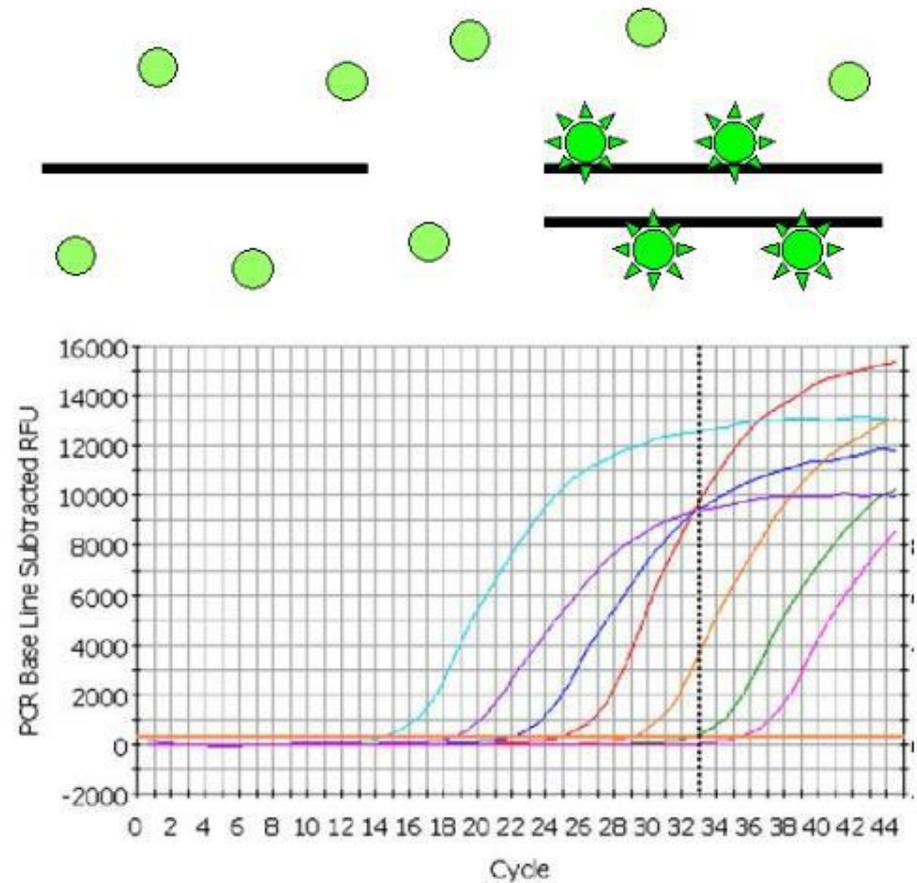
DSO.COM

# PCR en Tiempo Real vs. PCR convencional.

## PCR convencional.



## PCR en Tiempo Real.

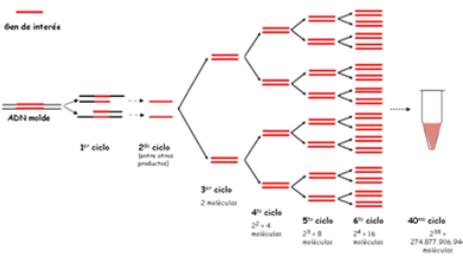




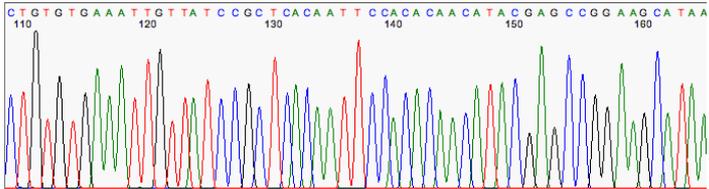
Extracción de ADN



Selección y amplificación de marcadores moleculares

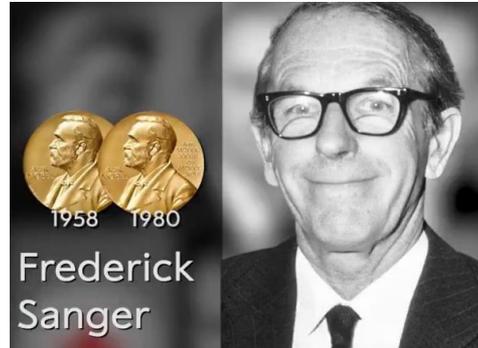


Secuenciación



# Secuenciación de Ácidos Nucleicos

- Frederick Sanger (1975)



- Único objetivo: *establecer la secuencia de bases nitrogenadas (A, C, G, T) que conforman una determinada molécula de ADN.*



# Secuenciación de Ácidos Nucleicos

## Método Sanger:

- Utiliza “terminadores de cadena” (dideoxinucleótidos (ddNTPs)) que al incorporarse a una cadena que se está sintetizando, detienen la elongación realizada por la ADN polimerasa.
- ddNTPs: carecen del grupo 3' hidroxilo (OH).

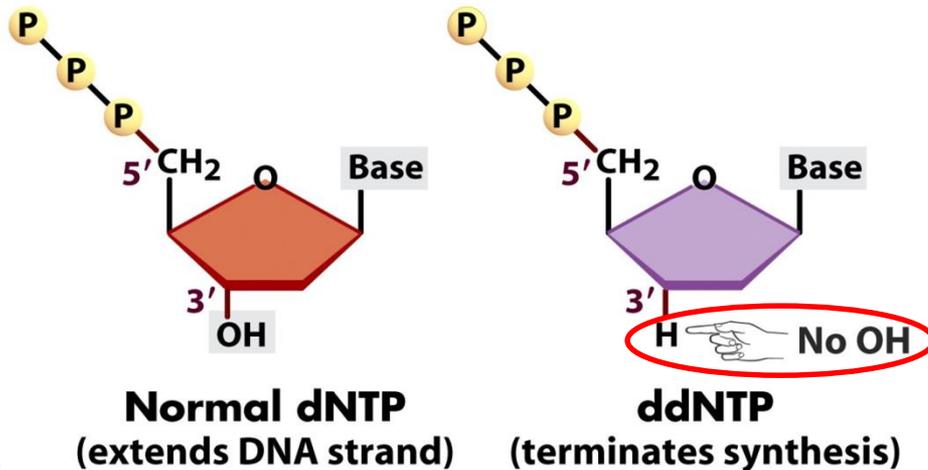
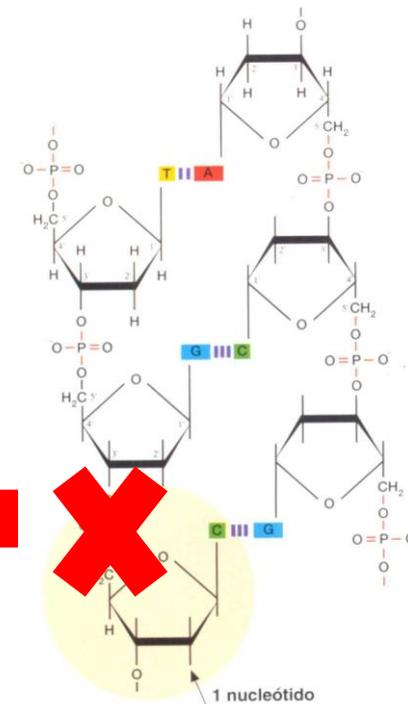


Figure 19-6a Biological Science, 2/e

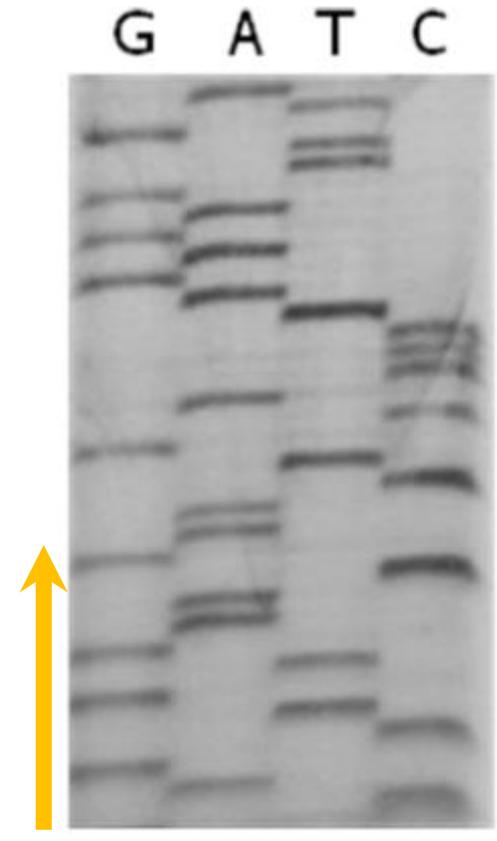
© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.



# Comenzó como “Secuenciación manual”

## Método Sanger:

- **Reacción de secuenciación:** ADN molde (amplicón) + “primers” + dNTPs
- Esta mezcla es dividida en 4 tubos / a cada tubo se le agrega un ddNTP diferente (**ddATP**, **ddTTP**, **ddGTP**, **ddCTP**) marcado “radioactivamente”.
- Por último se agrega la **ADN polimerasa** que comienza la reacción de síntesis.
- Los productos de las 4 reacciones son cargados en un **gel desnaturalizante** de acrilamida-bisacrilamida y sometidos a electroforesis.

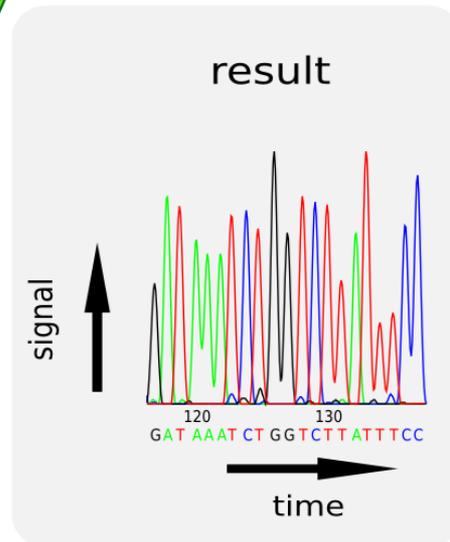
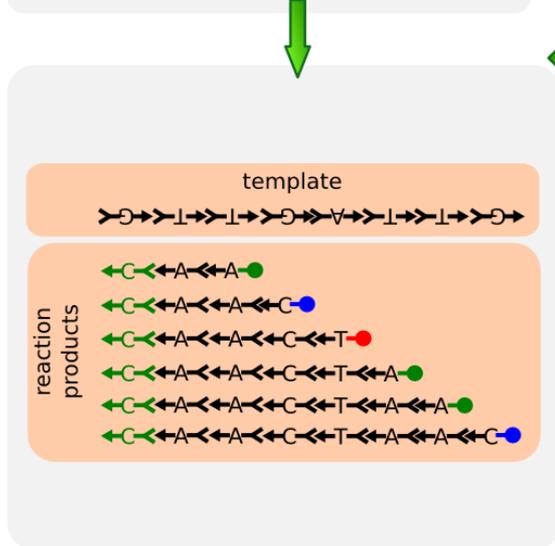
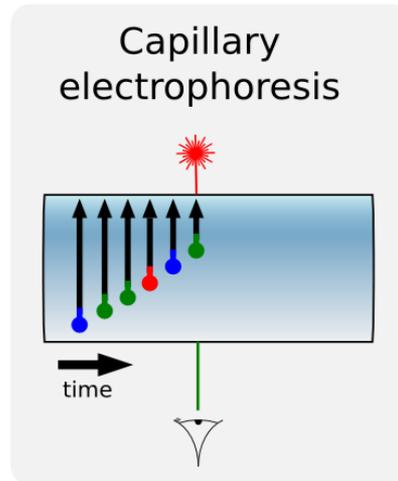
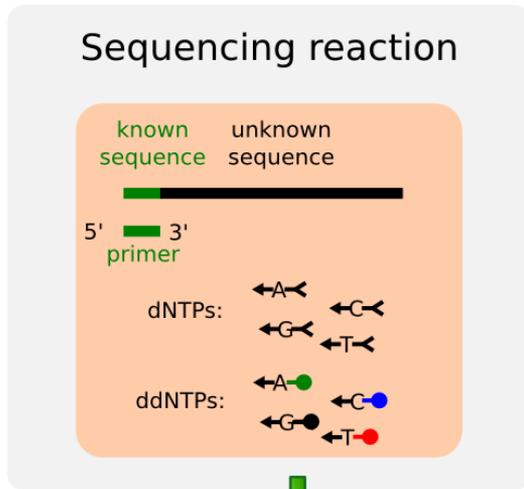


# Hoy... “Secuenciación automática”

## Método Sanger:

- Es la empleada actualmente.
- Fue desarrollada a finales de la década ´80.
- Emplean ddNTPs modificados: **cada ddNTP lleva un fluoróforo acoplado.**
- Los productos de reacción se detectan directamente al pasar por un **láser** que al **excitar los fluoróforos** permite detectar la fluorescencia emitida.

# Secuenciación "automática"



➤ **Cromatograma**  
(A, T, G, C)





# Edición de las secuencias

- **MEGA X** (<http://www.megasoftware.net/>)
  - Alineamiento múltiple.



- Edición de las secuencias.



# Análisis de las secuencias nts

- **MEGA X** (<http://www.megasoftware.net/>)
  - Secuencia final → **BLASTn** (buscar secuencias homólogas en **GenBank**)



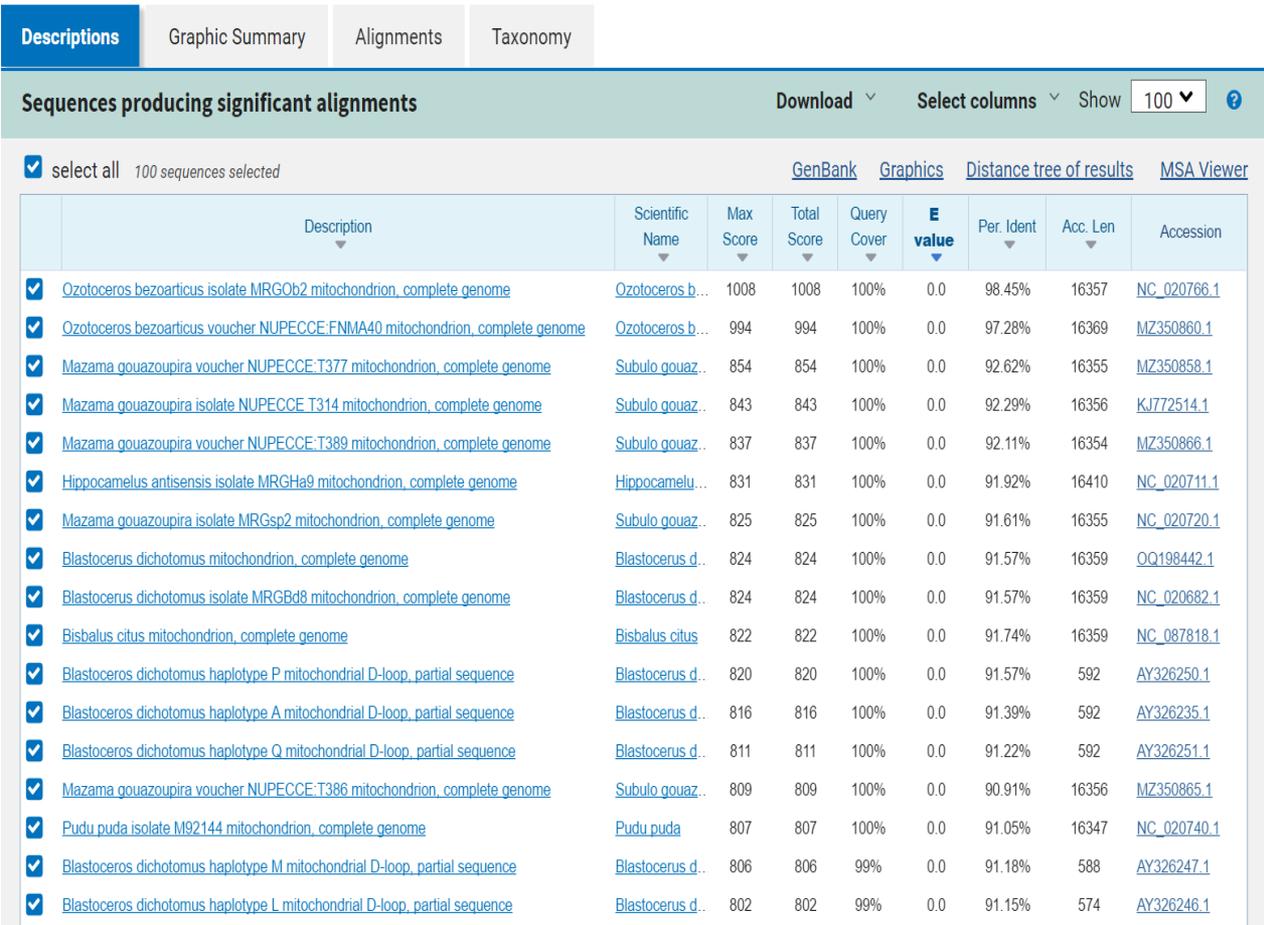
- **Se hace para cada una de las secuencias obtenidas!**



*Corroborar que corresponden al gen o región del ADN que estamos estudiando.*

# Blastn: secuencias de nucleótidos homólogas

- MEGA X (<http://www.megasoftware.net/>)
  - Secuencia final → **BLASTn** (buscar secuencias homólogas en GenBank)



The screenshot displays the 'Sequences producing significant alignments' section of a BLASTn search. The interface includes tabs for 'Descriptions', 'Graphic Summary', 'Alignments', and 'Taxonomy'. The 'Descriptions' tab is active, showing a table of 17 sequences. The table has columns for 'Description', 'Scientific Name', 'Max Score', 'Total Score', 'Query Cover', 'E value', 'Per. Ident', 'Acc. Len', and 'Accession'. All sequences have a Max Score equal to the Total Score and a Query Cover of 100%. The E values range from 0.0 to 0.0, and the Per. Ident values range from 91.15% to 98.45%. The Accession numbers are provided for each sequence.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Ozotoceros bezoarticus isolate MRGOb2 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Ozotoceros b...</a>	1008	1008	100%	0.0	98.45%	16357	<a href="#">NC_020766.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Ozotoceros bezoarticus voucher NUPECCE:FNMA40 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Ozotoceros b...</a>	994	994	100%	0.0	97.28%	16369	<a href="#">MZ350860.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Mazama gouazoupira voucher NUPECCE:T377 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Subulo gouaz...</a>	854	854	100%	0.0	92.62%	16355	<a href="#">MZ350858.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Mazama gouazoupira isolate NUPECCE:T314 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Subulo gouaz...</a>	843	843	100%	0.0	92.29%	16356	<a href="#">KJ772514.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Mazama gouazoupira voucher NUPECCE:T389 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Subulo gouaz...</a>	837	837	100%	0.0	92.11%	16354	<a href="#">MZ350866.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Hippocamelus antisensis isolate MRGHa9 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Hippocamelu...</a>	831	831	100%	0.0	91.92%	16410	<a href="#">NC_020711.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Mazama gouazoupira isolate MRGSp2 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Subulo gouaz...</a>	825	825	100%	0.0	91.61%	16355	<a href="#">NC_020720.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Blastoceros dichotomus mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Blastoceros d...</a>	824	824	100%	0.0	91.57%	16359	<a href="#">OQ198442.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Blastoceros dichotomus isolate MRGBd8 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Blastoceros d...</a>	824	824	100%	0.0	91.57%	16359	<a href="#">NC_020682.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bisbalus citus mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Bisbalus citus</a>	822	822	100%	0.0	91.74%	16359	<a href="#">NC_087818.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Blastoceros dichotomus haplotype P mitochondrial D-loop, partial sequence</a>	<a href="#">Blastoceros d...</a>	820	820	100%	0.0	91.57%	592	<a href="#">AY326250.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Blastoceros dichotomus haplotype A mitochondrial D-loop, partial sequence</a>	<a href="#">Blastoceros d...</a>	816	816	100%	0.0	91.39%	592	<a href="#">AY326235.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Blastoceros dichotomus haplotype Q mitochondrial D-loop, partial sequence</a>	<a href="#">Blastoceros d...</a>	811	811	100%	0.0	91.22%	592	<a href="#">AY326251.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Mazama gouazoupira voucher NUPECCE:T386 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Subulo gouaz...</a>	809	809	100%	0.0	90.91%	16356	<a href="#">MZ350865.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pudu puda isolate M92144 mitochondrion, complete genome</a>	<a href="#">Pudu puda</a>	807	807	100%	0.0	91.05%	16347	<a href="#">NC_020740.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Blastoceros dichotomus haplotype M mitochondrial D-loop, partial sequence</a>	<a href="#">Blastoceros d...</a>	806	806	99%	0.0	91.18%	588	<a href="#">AY326247.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Blastoceros dichotomus haplotype L mitochondrial D-loop, partial sequence</a>	<a href="#">Blastoceros d...</a>	802	802	99%	0.0	91.15%	574	<a href="#">AY326246.1</a>

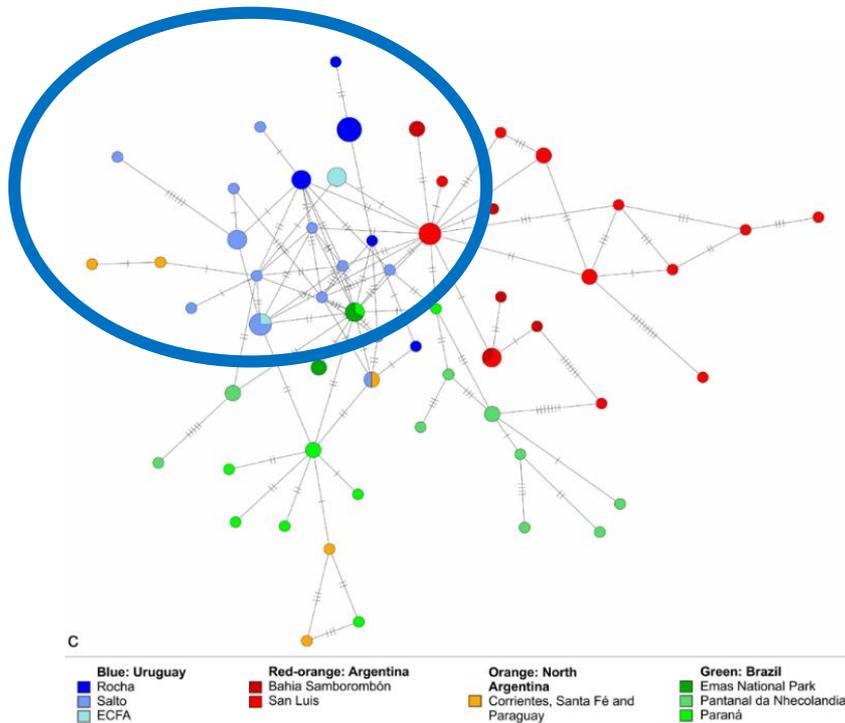




# Análisis de las secuencias: análisis de Diversidad Genética



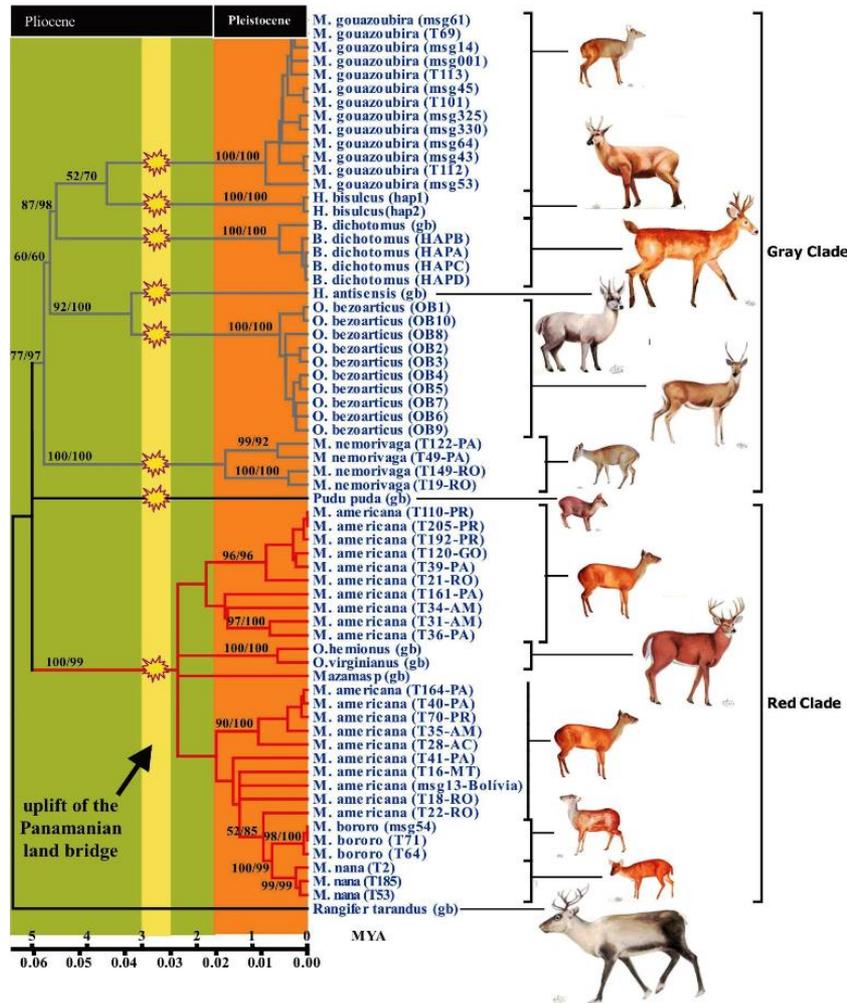
Hembras de venado de campo en la ECFA



## ➤ Análisis de Genética poblacional

- Definir los haplotipos por especie
- Construcción de red de haplotipos
- Estructura poblacional:
  - AMOVA

# Análisis de las secuencias: análisis de Diversidad Genética

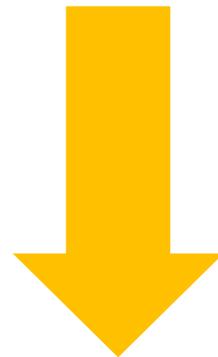


## ➤ Análisis filogenéticos

- Métodos basados en modelos de evolución molecular
  - Método de distancias: algoritmo de NJ
  - Método de Máxima verosimilitud (ML)
- Métodos **no basados** en modelos de evolución molecular
  - Maximum parsimony (MP)



Si nuestro hallazgo es “original” y/o se va a publicar en una revista científica



**Ingresar la/s  
secuencia/s en  
el GenBank**

# ¿Qué es el GenBank?

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

GenBank Nucleotide Search

GenBank Submit Genomes WGS HTGs EST/GSS Metagenomes TPA TSA INSDC

## GenBank Overview

### What is GenBank?

GenBank<sup>®</sup> is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences (*Nucleic Acids Research*, 2013 Jan;41(D1):D36-42). GenBank is part of the **International Nucleotide Sequence Database Collaboration**, which comprises the DNA DataBank of Japan (DDBJ), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and GenBank at NCBI. These three organizations exchange data on a daily basis.

The complete release is available every 2-3 months. GenBank provides access to the data in a variety of formats. An annotated sample format is available.

### Access to GenBank

There are several ways to access GenBank data:

- Search GenBank
- Search and align GenBank data
- Search, link, and download GenBank data
- The ASN.1 and flatfile formats

### GenBank Data Usage

The GenBank database is designed to provide and encourage access within the scientific community to the most up to date and comprehensive DNA sequence information. Therefore, NCBI places no restrictions on the use or distribution of the GenBank data. However, some submitters may claim patent, copyright, or other intellectual property rights in all or a portion of the data they have submitted. NCBI is not in a position to assess the validity of such claims, and therefore cannot provide comment or unrestricted access to such data.

### GenBank Resources

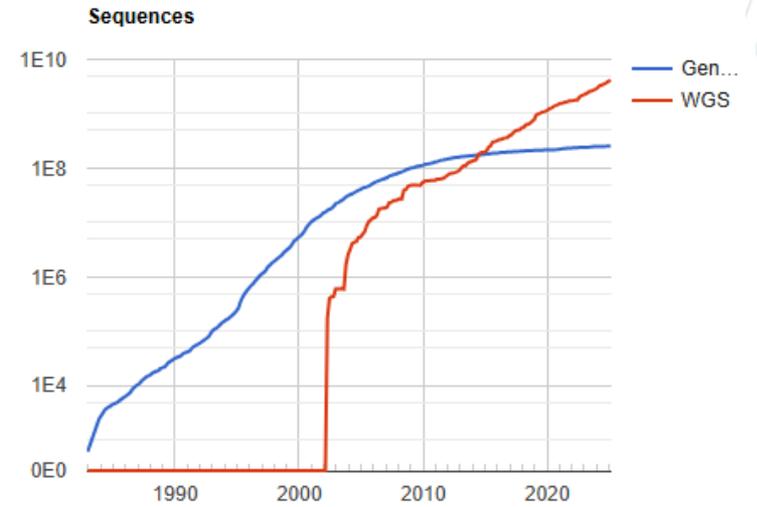
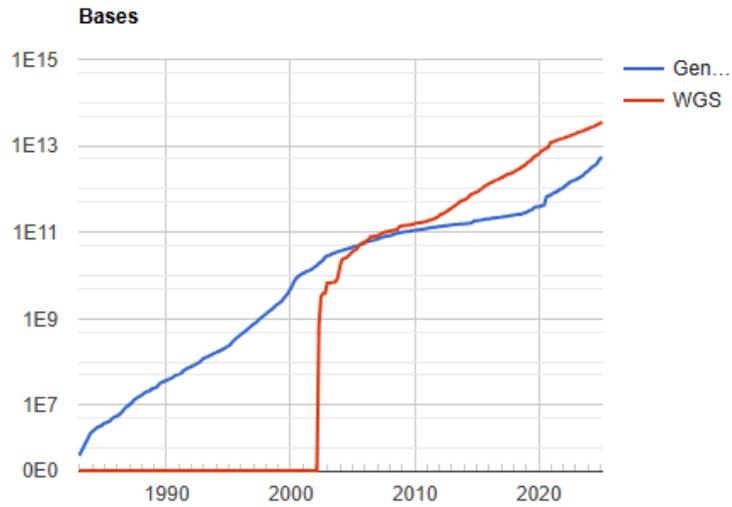
- [GenBank Home](#)
- [Submission Types](#)
- [Submission Tools](#)
- [Search GenBank](#)
- [Update GenBank Records](#)

## International Nucleotide Sequence Database Collaboration

- **GenBank – NCBI (The National Center for Biotechnology Information)**
- **DNA DataBank of Japan (DDBJ)**
- **The European Molecular Biology Laboratory (EMBL)**

# GenBank

## GenBank and WGS Statistics



# Subir secuencias al GenBank

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank//submit/>

GenBank

GenBank ▾ Submit ▾ Genomes ▾ WGS ▾ Metagenomes ▾ TPA ▾ TSA ▾ INSDC ▾ Documentation ▾ Other ▾

## How to submit data to GenBank

The most important source of new data for GenBank® is direct submissions from scientists. GenBank depends on its contributors to help keep the database as comprehensive, current, and accurate as possible. NCBI provides timely and accurate processing and biological review of new entries and updates to existing entries, and is ready to assist authors who have new data to submit.

## Receiving an Accession Number for your Manuscript

Most journals require DNA and amino acid sequences that are cited in articles be submitted to a public sequence repository (DDBJ/ENA/GenBank - INSDC) as part of the publication process. Data exchange between DDBJ, ENA and GenBank occurs daily so it is only necessary to submit the sequence to one database, whichever one is most convenient, without regard for where the sequence may be published. Sequence data submitted in advance of publication can be kept confidential if requested. GenBank will provide accession numbers for submitted sequences, usually within two working days. This accession number serves as an identifier for your submitted your data, and allows the community to retrieve the sequence upon reading the journal article. The accession number should be included in your manuscript, preferably in a footnote on the first page of the article, or as required by individual journal procedures.

## Submissions to GenBank

There are several options for preparing and submitting data to GenBank.

Web-based submission tools that are automatically submitted to GenBank:

- [BankIt](#), a WWW-based submission tool with wizards to guide the submission process.
- [Submission Portal](#), a unified system for multiple submission types. Currently only ribosomal RNA (rRNA), rRNA-ITS, metazoan mitochondrial COX1, eukaryotic nuclear mRNA, Influenza, Norovirus, Dengue or SARS-CoV-2 sequences can be submitted with the GenBank component of this tool. Genome and Transcriptome Assemblies can be submitted through the Genomes and TSA portals, respectively. This will be expanded in the future to include other types of GenBank submissions.

## GenBank Resources

[GenBank Home](#)

[Submission Types](#)

[Submission Tools](#)

[Search GenBank](#)

[Update GenBank Records](#)

# Estudio de diversidad genética en venado de campo

Therya, 2024, Vol. 15(1):5-16

DOI:10.12933/therya-24-5379 ISSN 2007-3364

## Revisiting the conservation genetics of Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*)

SUSANA GONZÁLEZ<sup>1,2\*</sup>, LETICIA REPETTO<sup>1</sup>, VERÓNICA GUTIÉRREZ<sup>1</sup>, MARÍA EUGENIA OLIVERA<sup>1</sup>, CLAUDIA CORBI BOTTO<sup>1</sup>, YANINA LEONE<sup>1</sup>, MARIANO L. MERINO<sup>3</sup>, FERNANDA GOSS BRAGA<sup>1</sup>, JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE<sup>4</sup>, JESÚS E. MALDONADO<sup>5</sup>, AND MARIANA COSSE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-Ministerio de Educación y Cultura. (IIBCE-MEC). Av. Italia 3318. 11600 Montevideo 11100, Uruguay. Email: [sgonzalez@iibce.edu.uy](mailto:sgonzalez@iibce.edu.uy) (SG), [leticiairepetto@gmail.com](mailto:leticiairepetto@gmail.com) (LR), [verogcoppetti@gmail.com](mailto:verogcoppetti@gmail.com) (VG), [maeugeniaolivera@gmail.com](mailto:maeugeniaolivera@gmail.com) (MEO), [claucorbi@gmail.com](mailto:claucorbi@gmail.com) (CCB), [yanileone11@gmail.com](mailto:yanileone11@gmail.com) (YL), [fgbbio@hotmail.com](mailto:fgbbio@hotmail.com) (FGB), [mcosse@iibce.edu.uy](mailto:mcosse@iibce.edu.uy) (MC).

<sup>2</sup> Deer Specialist Group, IUCN Species Survival Commission, Rue Mauverney 28, 1196. Gland, Switzerland. Email: [sgonzalez@iibce.edu.uy](mailto:sgonzalez@iibce.edu.uy) (SG).

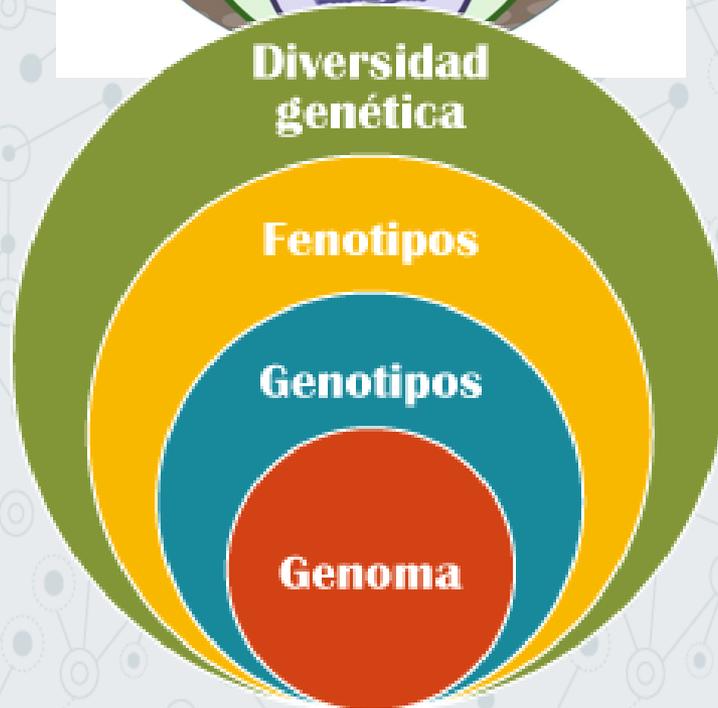
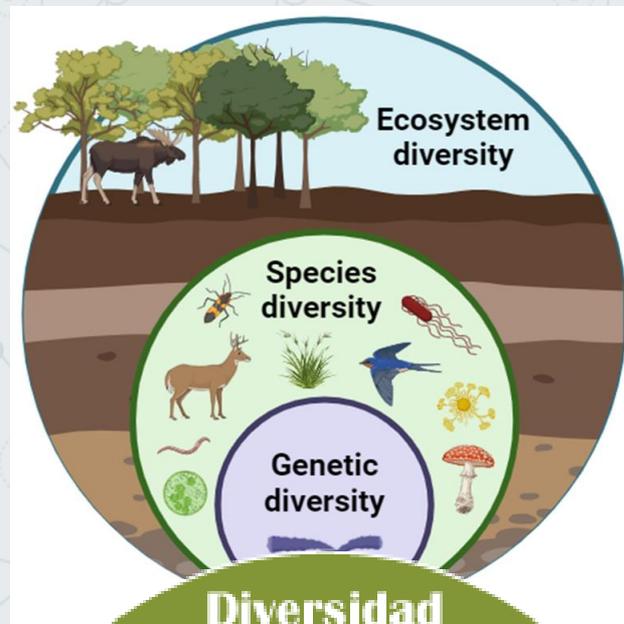
<sup>3</sup> Centro de Bioinvestigaciones, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Pergamino. Buenos Aires, Argentina. Email: [mariano.merino@nexo.unnoba.edu.ar](mailto:mariano.merino@nexo.unnoba.edu.ar) (MLM).

<sup>4</sup> Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) Departamento de Zootecnia Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista (UNESP) Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n CEP: 14884-900. Sao Paulo, Brazil. Email: [mauricio.barbanti@unesp.br](mailto:mauricio.barbanti@unesp.br) (JMBD).

<sup>5</sup> Center for Conservation Genomics, Smithsonian National Zoo and Conservation Biology Institute. Washington D. C., U.S.A. Email: [maldonadoj@si.edu](mailto:maldonadoj@si.edu) (JEM).

\*Corresponding author: <https://orcid.org/0000-0001-6470-6182>.

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-33642024000100005&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-33642024000100005&script=sci_arttext&tlng=en)



¡Muchas gracias por su atención!