

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN DE MICROSATÉLITES EN LA ORQUÍDEA TERRESTRE *PHRAGMIPEDIUM*
LONGIFOLIUM (RCHB. F. & WARSC.) ROLFE (ORCHIDACEAE)

TESIS SOMETIDA A LA CONSIDERACIÓN DE LA COMISIÓN DEL PROGRAMA DE ESTUDIOS DE
POSGRADO EN BIOLOGÍA PARA OPTAR AL GRADO Y TÍTULO DE MAESTRÍA ACADÉMICA EN
BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

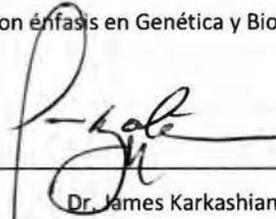
FERNANDO ESTEBAN FLORES MORA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2013

Agradecimientos: A mi madre, Federico, Walter y amigos del laboratorio que me han apoyado a lo largo del camino...

“Este trabajo final de investigación aplicada fue aceptado por la
Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como
requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en
Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular”



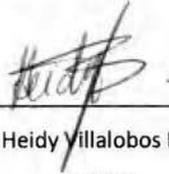
Dr. James Karkashian

Representante de la Decana, Sistema de Estudios de Posgrado



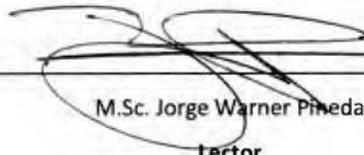
Dr. rer. nat. Federico José Albertazzi Castro

Profesor Guía



M.Sc. Heidy Villalobos Barrantes

Lectora



M.Sc. Jorge Warner Pineda

Lector



M.Sc. Andrés Gatica Arias

Representante del Programa de Posgrado



Fernando Esteban Flores Mora

Candidato

Tabla de contenidos

Portada	i
Agradecimientos	ii
Hoja de aprobación	iii
Tabla de contenidos	iv
Resumen	v
Lista de cuadros	vii
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix
Antecedentes	1
Justificación	7
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
Materiales y métodos	8
Resultados	12
Discusión	19
Anexos	22
Literatura citada	31

Caracterización de microsatélites en la orquídea terrestre *Phragmipedium longifolium* (Rchb. f. & Warsc.) Rolfe (Orchidaceae)

Fernando Flores¹, Federico Albertazzi^{1,2}, Heidy Villalobos^{1,2} & Jorge Warner^{1,3}

¹Universidad de Costa Rica, ²Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, ³Jardín Botánico Lankester.

Antecedentes:

Dentro de los marcadores moleculares, los microsatélites (SSR, por sus siglas en inglés) destacan por su utilidad y popularidad, ya que su versatilidad los hace la primera opción en muchos estudios. A pesar de sus múltiples ventajas, su mayor problema es la dificultad de su aislamiento y transferibilidad, lo cual reduce su uso en muchas especies, por lo que muchas veces estos marcadores deben aislarse *de nava* para cada especie. Con cerca de 30 000 especies y 5 subfamilias, Orchidaceae es tal vez la familia más grande de plantas con flor. Una de sus subfamilias mejor caracterizadas es Cypripedioideae, en la cual se encuentra el género *Phragmipedium*. Este trabajo se centra en el aislamiento de SSR para la especie amenazada *P. langifolium* y la evaluación de la transferibilidad de estos marcadores en *P. pearcei*, con el objeto de disponer de valiosos marcadores moleculares como los SSR para futuros estudios en esta especie.

Resultados y discusión:

De los 13 imprimadores específicos generados para esta especie, solamente tres pasaron las pruebas de amplificación y búsquedas por polimorfismos. Estos tres SSR mostraron un nivel bajo de polimorfismo, comparable a SSR provenientes de ESTs y una heterozigocidad baja (H_o media: 0,125), posiblemente debido a la naturaleza de las poblaciones a las cuales fue sujeta su obtención y posterior prueba. A pesar de esto, su transferencia fue exitosa, observándose que para la mayoría de muestras de *P. pearcei* hubo una amplificación positiva y dentro del rango de pares de bases esperado. Contrariamente a su poco número, estos SSR aislados tienen el potencial de ser bastante informativos y pueden ser utilizados en estudios de diversidad genética y estructura poblacional en el género *Phragmipedium*.

Characterization of microsatellites in the terrestrial orchid *Phragmipedium longifolium* (Rchb. f. & Warsc.) Rolfe (Orchidaceae)

Fernando Flores¹, Federico Albertazzi^{1,2}, Heidy Villalobos^{1,2} & Jorge Warner^{1,3}

¹Universidad de Costa Rica, ²Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, ³Jardín Botánico Lankester.

Background:

Within molecular markers, microsatellites (SSR) stand out for their usefulness and popularity and their versatility makes them the first choice among others by researchers. Their major drawbacks are the difficult isolation and cross-amplification between species, so SSR have to be developed *de novo* for many species. With nearly 30 000 species and 5 subfamilies, Orchidaceae is the largest flowering plant family. One of the best characterized subfamilies is Cypridioideae, being *Phragmipedium* one of the most known genera. The main goal of this work was to develop SSR markers for *P. longifolium* and evaluate their cross-amplification in *P. pearcei*, so future researchers would have powerful markers like the SSR for this species.

Results and Discussion:

Of the 13 specific primers developed, only 3 of them met the requirements for amplification and polymorphism assessment. Those SSR show a low level of polymorphism, similar to SSR isolated from ESTs and low observed heterozygosities (H_o mean: 0,125) perhaps due to the nature of the population from which the SSR were isolated and tested. Regardless of this, the cross-amplification was successful for most samples of *P. pearcei* and the amplicon lies between the expected base pair range. Despite their low number, these markers have the potential to be informative and become useful for genetic diversity and population structure studies in the *Phragmipedium* genera.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Lista de las poblaciones silvestres de <i>Phragmipedium langifalium</i> en Costa Rica usadas en este estudio.	25
Cuadro 2. Lista de imprimadores y adaptadores usados durante el aislamiento de los microsatélites	26
Cuadro 3. Lista de imprimadores específicos para cada locus	18

Lista de figuras

Figura 1. Barridos obtenidos durante la amplificación del ADN digerido / ligado.	14
Figura 2. A) Placa LB ampicilina con <i>E. coli</i> transformadas (SSR8). B) Amplificación de insertos de la lisis de bacterias	15
Figura 3. A) Secuencia (5'-3' Sentido) correspondiente a uno de los insertos del SSR9. B) Eluciones de insertos del SSR9.	16
Figura 4. Microsatélites correspondientes al SSR2.15.	16
Figura 5. Transferencia de SSR a <i>P. pearcei</i> en geles 1,2% agarosa	17
Figura 6. Experimento donde se evalúa la presencia del adaptador	17
Figura 7. Posibles mecanismos de la formación de artefactos durante la amplificación.	27
Figura 8. Comparación de ADN extraídos de hojas (A) y de flores (B) en <i>P. langifalium</i>	28
Figura 9. Especies de <i>Phragmipedium</i> sometidas al estudio.	29
Figura 10. Resumen del protocolo de aislamiento de SSR	30

Lista de abreviaturas

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Persulfato de amonio
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADRP	Atrofia Dentato-Rubro-Pallidolusian
AEC	Ataxia Espino-Cerebelar
AMPE	Atrofia Muscular Progresiva Espinobulbar
ARN	Ácido Ribonucleico
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BES	BAC-End Sequences
Bis	N-N-Metileno –Bis-Acrilamida
Btb	Río Cuarto
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DL	Desequilibrio de Ligamiento
DMI	Distrofia Miotónica tipo I
dNTPs	Deoxirribonucleósidos Trifostatados
EDTA	Etilendiaminotetraacetato de Sodio
EH	Enfermedad de Huntington
EHW	Equilibrio Hardy-Weinberg
ESH2	Enfermedad Similar a Huntington 2
EST	Expressed Sequence Tag
FIASCO	Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats

H _E	Heterocigocidad esperada
H _O	Heterocigocidad observada
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Mva	Tilarán I
Mvb	Tilarán II
PBC	Paraíso
PIMA	PCR-based Isolation of Microsatellite Arrays
PCR	Polymerase chain reaction
pb	Pares de bases
RA	Rara Avis
RAD	Restriction-site Associated DNA
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNAsa	Ribonucleasa A
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBE	Tris-HCl / Ácido Bórico / EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetrametiletilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) amoniometano
Tris-HCl	Trizma Base Equilibrado con Ácido Clorhídrico

Descriptores: Orquídea zapatilla, *Phragmipedium langifalium*, Orchidaceae, microsatélites compuestos, aislamiento SSR, SSR, marcadores moleculares, conservación.

Antecedentes

Los marcadores genéticos son polimorfismos que se observan en los organismos vivos. Algunos están basados en caracteres físicos y visibles que se pueden medir o detectar a simple vista, estos son conocidos como morfológicos. Además existen los marcadores moleculares dentro de los cuales están los bioquímicos (isoenzimas, metabolitos) y los basados en el ADN. Estos últimos permiten ver diferencias a nivel del ADN y están situados en posiciones discretas en el genoma y están sujetos a las mismas leyes de la herencia que los genes, no obstante generalmente no tienen efectos en el valor adaptativo de los organismos, siendo neutrales en la mayoría de los casos (Vignala *et al.* 2002; Semagn *et al.* 2006). Hay una gran variedad de marcadores moleculares, cada uno con características que los hacen más o menos eficientes para diversas tareas. Algunas funciones que se les acreditan son por ejemplo: mapeo genético, paternidad, estudios poblacionales, mejoramiento genético y selección asistida de loci de rasgos cuantitativos (Vignala *et al.* 2002; García *et al.* 2004; Rudd *et al.* 2005; Hu *et al.* 2008). Entre algunos de los marcadores moleculares más conocidos están los microsatélites, RAPD, RFLP, AFLP y SNP, sin embargo la cantidad de marcadores basados en ADN es mucho más amplia (para ver una lista más completa de marcadores basados en ADN ver Semagn *et al.* 2006). Muchos marcadores basados en ADN se pueden clasificar según el método de obtención de los polimorfismos, algunos usan las técnicas de hibridación (RFLP), otros la técnica del PCR (Park *et al.* 2009).

Los microsatélites o *simple sequence repeats* (SSR) son marcadores moleculares de ADN que se caracterizan por ser secuencias formadas por la repetición consecutiva de un motivo corto de nucleótidos (1 a 6 nucleótidos) (Hu *et al.* 2008). Algunos de los motivos más comunes son di, tri y tetranucleótidos (Semagn *et al.* 2006). Ciertos motivos como los dinucleótidos AT, GA, AG son encontrados más frecuentemente en plantas, los trinucleótidos AAG, AGA, GGA y GAA son también los más comunes, mientras que las repeticiones AC se observan más en animales (Rakoczy & Bolibok, 2004; Li *et al.* 2004; Victoria *et al.* 2011). Estudios realizados en *Phalaenopsis equestris* por Hsu y colaboradores en el 2011 muestran que la mayoría de los SSR encontrado en el

genoma (almacenados en dos librerías de BACs) corresponden a las repeticiones A/T y AT/AT y la frecuencia es de un SSR por cada 4,8 kb, la más alta en plantas analizadas hasta la fecha.

No solamente el número de nucleótidos en los motivos de los SSR constituye la única forma de clasificarlos; estos a su vez se clasifican según su composición, defectos en las secuencias que los conforman y valor informativo. Aquellos SSR que no tienen interrupciones durante las repeticiones se conocen como microsatélites perfectos o puros y los que si las poseen debido a inserciones o deleciones, se les conoce como imperfectos y finalmente los del tipo compuestos, que poseen dos o más repeticiones distintas en tándem (Bull *et al.* 1999; Rakoczy & Bolibok, 2004). Adicionalmente, según su valor informativo, también se pueden clasificar en dos tipos, los de clase I (altamente variables) que tienen una repetición de más de 20 pares de bases y los de clase II (potencialmente variables) con repeticiones entre los 12 y 20 pares de bases (Kumar *et al.* 2009).

Los SSR están ampliamente distribuidos en el genoma de los eucariotas. Se han encontrado microsatélites en secuencias codificantes y no codificantes (Park *et al.* 2009; Victoria *et al.* 2011). La frecuencia de secuencias de SSR en regiones codificantes del genoma parece ser mayor que en regiones no codificantes, sin embargo los SSR derivados del ARN (EST, expressed sequence tag) tienden a mostrar menos polimorfismos (debido a presión selectiva) pero tienen una mayor posibilidad de ser transferibles entre especies (Morgante *et al.* 2002; Rakoczy & Bolibok, 2004; Park *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2009). Los motivos de las repeticiones pueden variar según la localización de los SSR, siendo trinucleótidos ricos en GC u otros motivos grandes los más frecuentes en regiones regulatorias de los genes, debido a una selección en contra de mutaciones de desfase (Kumar *et al.* 2009).

Con frecuencia se piensa que los microsatélites son "ADN basura" ya que parecen no tener una función aparente, pero esta visión ha cambiado considerablemente a lo largo del tiempo, ya que su presencia en sitios codificantes les puede conferir propiedades importantes en la regulación de genes y ser causantes de enfermedades en los seres humanos (Rakoczy & Bolibok, 2004; Tranbarger *et al.* 2012; Liu & Leffak, 2012). Incluso algunos SSR son transcritos y traducidos en forma de "filas de aminoácidos" en las proteínas (Lawson & Zhang, 2006). Algunas de las enfermedades en seres humanos como la distrofia miotónica tipo I (DMI), enfermedad de Huntington (EH), enfermedad similar a Huntington 2 (ESH2), atrofia dentato-rubro-pallidoluisian (ADRP), atrofia muscular progresiva espinobulbar (AMPE) y varias formas de ataxia espino-cerebelar (AEC) están asociadas a la inestabilidad de SSR. Las enfermedades poliglutamínicas como

EH, ADPRP, AMPE y AEC 1, 3, 6, 7, 17 son producidas por la expansión de los trinucleótidos CAG en la cadena codificante durante la síntesis del ARN mensajero (ARNm) produciendo proteínas poliglutamínicas con actividad tóxica. Expansiones de estos mismos trinucleótidos en las regiones 3' UTR de la proteína quinasa de la distrofia miotónica producen alteraciones en la estructura de la cromatina en la región, causando una disminución en la transcripción en DMI y en el gen JPH3 produciendo pre-ARNm con multicopias de CUG en ESH2. Este ARN no es traducido y tiene efectos tóxicos al secuestrar el reguladores de corte alternativo similar a *muscleblind* tipo 1 (Kozlowski *et al.* 2010; Liu & Leffak, 2012).

Además de su papel de causantes de enfermedades, los SSR pueden tener un papel activo en la regulación de genes (región 5'UTR), deslizamientos en la transcripción (región 3'UTR) o cambios en la secuencia de las proteínas (Li *et al.* 2004; Lawson & Zhang, 2006; Chen *et al.* 2008; Tranbarger *et al.* 2012). En plantas las funciones de los SSR no han sido tan estudiadas como en animales, sin embargo Lawson & Zhang (2006) encontraron que la distribución de SSR en las regiones 5'UTR en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* tienen un patrón distinto a la distribución del resto de SSR en el genoma lo cual puede indicar algún rol de estas secuencias en esos sitios. Resultados similares se han encontrado en otros estudios previos (Morgante *et al.* 2002). Otro estudio similar en plantas apunta a la conservación de estos SSR en genes ortólogos en especies distintas de plantas, los autores encontraron varios SSR que están conservados entre especies y localizados en genes correspondientes a proteínas cinasas transmembranas. Estos y otros SSRs están asociados a funciones reguladoras de la expresión, donde el número de repeticiones juega un papel importante en genes que responden a luz y a ácido salicílico (Zhang *et al.* 2006). Otros trabajos se enfocan también en la conservación de estas secuencias repetitivas en genes ortólogos para localizar SSR con funciones reguladores en varias especies (Chen *et al.* 2008). En bacterias, la presencia de SSR en regiones codificantes de variedades patogénicas se ha asociado con su capacidad adaptativa (Li *et al.* 2004). Actualmente los SSR no solamente sirven como excelentes marcadores moleculares sino también se les estudia como secuencias que tienen alguna función biológica importante en los organismos vivos.

El proceso de formación y crecimiento de los microsatélites es debido principalmente a un proceso de deslizamiento y reacomodación por complementariedad de las cadenas de ADN durante la duplicación del ADN. Durante el proceso de alineamiento de las hebras estas pueden formar horquillas que permite al SSR crecer (la hebra sintetizada forma la horquilla) o encogerse (la hebra molde forma la horquilla). Cuál de las hebras forma la horquilla depende principalmente

de la secuencia en particular y si la cadena procesada en cuestión es la hebra líder o la rezagada (Semagn *et al.* 2006; Park *et al.* 2009). Otros métodos de crecimiento descritos para minisatélites son el entrecruzamiento desigual durante la meiosis, donde parecen también jugar un papel importante en la dinámica de crecimiento en los SSR, aunque estos sean más estables durante la meiosis (Kelly *et al.* 2007; Park *et al.* 2009). Los SSR no son las únicas secuencias repetitivas en el genoma, los satélites (>100) y minisatélites o VNTR (*variable number tandem repeats*, siglas en inglés para número variable de repeticiones en tándem, usualmente usado como sinónimo de los minisatélites) (6-100 nucleótidos por motivo) conforman junto a los SSR los ADN satélite (Vergnaud & Denoeud, 2000; Zakrzewski *et al.* 2010).

Debido a su utilidad como marcadores moleculares, se han desarrollado marcadores SSRs en muchas especies. Paralelamente, el desarrollo de técnicas para aislarlos ha aumentado también (Zane *et al.* 2002). Muchos protocolos involucran gran variedad de técnicas como por ejemplo librerías genómicas, EST, bases de datos de secuencias (búsquedas asistidas con algoritmos), RADs, BES, métodos asistidos con RAPD (PIMA) y AFLP (FIASCO), imprimadores de repeticiones con anclas y métodos que involucran SSR compuestos (Fisher *et al.* 1996; Hayden & Sharp, 2001; Zane *et al.* 2002; Rakoczy & Bolibok, 2004; Bohra *et al.* 2011; Dutta *et al.* 2011; Barchi *et al.* 2011). No obstante, la obtención de imprimadores sigue siendo una tarea laboriosa y frecuentemente requieren ensayos de prueba y error. Muchas de las secuencias con SSR fallan en los procesos de amplificación o no tienen sitios favorables para el diseño de imprimadores, lo que hace que la tasa de éxito sea variable. Incluso si la amplificación es exitosa el nivel de polimorfismo puede ser poco o nulo (Zane *et al.* 2002). Muchas veces los microsátélites deben aislarse *de nava*, ya que usualmente las secuencias que los flanquean no están muy conservadas entre especies debido a su localización en secciones no codificantes o variables, lo cual no permite su transferibilidad a otras especies produciendo alelos nulos (PCR falla en amplificar el SSR por su ausencia o falta de complementariedad de las secuencias donde hibridan los imprimadores) (Varshney *et al.* 2005; Ellis & Burke, 2007; Dakin & Avise, 2004). Es importante considerar que el grado de transferibilidad depende de la distancia filogenética entre los organismos, por lo que especies cercanas tienen una mayor probabilidad de obtener resultados positivos a la hora de transferir los SSR (Pinheiro *et al.* 2008; Pinheiro *et al.* 2009; Abasolo *et al.* 2009). La transferibilidad puede mejorar incluso más, cuando los SSR son derivados de ESTs ya que estos están ubicados frecuentemente en secuencias conservadas de los genes. A pesar de esta ventaja, usualmente los SSR de este tipo suelen

presentar bajos niveles de polimorfismo comparados con SSR genómicos (Ellis & Burke, 2007; Dutta *et al.* 2011).

Los SSR son marcadores moleculares multialélicos y confiables los que los ha convertido en una herramienta poderosa (Zane *et al.* 2002). Dentro de las ventajas se puede mencionar que son marcadores codominantes (lo cual permite identificar los heterocigotos), son muy abundantes y distribuidos uniformemente en el genoma, no se requieren de mucho ADN para la amplificación, altos niveles de polimorfismos, alta reproducibilidad, dificultad de uso baja y es una técnica sujeta a la automatización. A pesar de sus muchas ventajas, esta técnica tiene sus desventajas como lo es el conocimiento previo de la secuencia lo cual lleva a desarrollarlos en las especies a utilizar, el costo y trabajo de desarrollarlos suele ser alto y muchas veces se deben aislar *de nava* (Park *et al.* 2009). Gracias a las ventajas mencionadas anteriormente los microsatélites son usados en mapeo genético, estudios de variabilidad genética, mejoramiento genético, análisis de paternidad y análisis forenses (Zane *et al.* 2002; Park *et al.* 2009).

Los usos de los SSR en conservación y manejo de recursos naturales son amplios (Kwapata *et al.* 2007; Van Zonneveld *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012; Ueno *et al.* 2012; Hippolyte *et al.* 2012; Li *et al.* 2012). En orquídeas, el uso de SSR es la elección cuando se dispone de ellos en investigaciones de variabilidad genética y conservación (Gustafsson & Sjögren, 2002; Forrest *et al.* 2004; Pellegrino *et al.* 2006; Fay *et al.* 2009). Además muchos esfuerzos relativos al desarrollo de SSR han llevado a cabo actualmente en esta familia de plantas (Huang *et al.* 2011; Crichton *et al.* 2012; Kartzinel *et al.* 2012; Tang *et al.* 2012; López *et al.* 2012).

Orchidaceae es una de las familias más grandes y diversas de Angiospermas con cerca de 30000 especies descritas (Mondragón & Theißen, 2009). Parecen tener un linaje antiguo y posiblemente surgieron en el Cretáceo tardío hace 77 millones de años (Gustafsson *et al.* 2010) sin embargo la radiación de la mayoría de los clados actuales ocurrió en el Terciario (Guo *et al.* 2012). La diversidad observada en esta familia se refleja principalmente a su capacidad de colonizar múltiples hábitats que van de estepas o planicies a bosques tropicales y pueden ser epífitas o terrestres, no obstante su distribución puede limitarse a la presencia del hongo simbiótico, que en muchas especies resulta crucial durante la germinación (Atwood 1984; Swarts *et al.* 2007; Huynh *et al.* 2009). Las causas de la alta diversidad de especies en Orchidaceae no han sido esclarecidas; sin embargo se piensa que su carácter epífita, estrategias de polinización, selección natural y deriva génica como posibles factores determinantes (Aceto & Gaudio, 2011).

Los trabajos realizados en esta familia se centran más en variabilidad genética, estructura poblacional, patrones de hibridación y conservación (Forrest *et al.* 2004; Chung *et al.* 2005; Campbell *et al.* 2007; Kennedy & Walker 2007). No obstante otros estudios que involucran análisis filogenéticos, tamaños del genoma y mecanismos moleculares del desarrollo floral también han sido efectuados (Cox *et al.* 1998; Mondragón & Theißen, 2009; Aceto & Gaudio, 2011; Guo *et al.* 2012). Es sabido que en las orquídeas la variabilidad genética depende de sus polinizadores, pero sobre todo en la distribución de las semillas, asimismo en las especies terrestres la diferenciación y estructura genética suele ser alta en las poblaciones debido a un efecto de aislamiento, producto de que sus poblaciones suelen formar parches pequeños y espaciados (Chung *et al.* 2005; Alcantara *et al.* 2006; Chung & Park 2008).

Esta familia se divide en cinco subfamilias de origen monofilético, Apostasioideae, Vanilloideae, Cypridioideae, Orchidoideae y Epidendroideae (Mondragón *et al.* 2009). Las orquídeas zapatillas, como comúnmente se conocen a los miembros de la subfamilia Cypridioideae, son de las mejor caracterizadas de la familia, ya que se cuenta con una gran cantidad de material vegetal disponible para la investigación que junto a su importancia en la horticultura, han logrado mantener el interés de los científicos en ellas, siendo los géneros *Cypripedium*, *Paphiopedilum* y *Phragmipedium* los mejor estudiados y los dos restantes *Selenipedium* y *Mexipedium*, los menos conocidos (Cox *et al.* 1998). *Mexipedium* y *Phragmipedium* son géneros cercanos del nuevo mundo que tienen relaciones cercanas con el género del viejo mundo *Paphiopedilum*, siendo *Cypripedium* el género que divergió primero (Li *et al.* 2011; Guo *et al.* 2012). Esta subfamilia es fácilmente distinguible por su flor particular; esta posee un sinsépalo, un labelo sacciforme, un estaminodio conspicuo y dos estambres fértiles. Están ampliamente distribuidas, excepto en África y Australia, su hábitat comprende una gran variedad de ambientes desde pasturas, sitios pedregosos, orillas de ríos, caminos, bosques, habitando también en ambientes alterados, convirtiéndolas en grandes colonizadoras (Atwood 1984).

Cypridioideae es una subfamilia de origen monofilético con cerca de 200 especies descritas. Esta variabilidad de especies y su amplia distribución actual, se pueden deber probablemente a la adaptación de estas orquídeas a la gran variedad de nichos formados por las oscilaciones de los microclimas durante el Cenozoico tardío. Posiblemente surgieron durante el Eoceno en el nuevo mundo o posiblemente los ancestros de Cypridioideae ya tenían una amplia distribución en el nuevo y viejo mundos (Guo *et al.* 2012). Se ha encontrado que el genoma de las orquídeas zapatilla es muy variable, desde pequeños genomas como el de *Phragmipedium*

langifalium (4C = 24,4 pg) hasta los más grandes como *Paphiopedilum wardii* (4C = 138,1 pg), el tamaño del genoma puede jugar un papel en la capacidad adaptativa de estas especies de orquídeas (Cox *et al.* 1998).

Existen dos especies del género *Phragmipedium* en Costa Rica, *P. humboldtii* y *P. langifalium*. Las dos especies reportadas para Costa Rica se encuentran en la lista roja de especies en peligro de extinción de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), además, este género está incluido en el Apéndice I de CITES (Muñoz & Warner 2007). La especie *P. langifalium* es una orquídea terrestre y una de las mejor conocidas en la subfamilia, con inflorescencias de hasta un metro de altura, con flores grandes de color verde y con puntos y líneas cafés y hojas largas (de ahí su epíteto específico) (Koopowitz 2008). Su hábitat abarca los países de Costa Rica, Panamá, Colombia y Ecuador (Muñoz & Warner 2007; Koopowitz 2008), suele encontrarse en las riberas altas de los ríos, no obstante se adapta bien a la intervención del paisaje por parte del hombre y a los pastizales (Atwood 1984). En Costa Rica forman parches pequeños generalmente, (9-2500 m²) lo que las hace vulnerables a la actividad humana (Muñoz y Warner 2007). Estudios realizados por Muñoz *et al.* (2010) evaluaron la diversidad genética de *P. langifalium* en Costa Rica empleando la técnica de AFLP. Los autores encontraron que la diversidad genética en general es baja, pero más alta de la esperada para el tipo de poblaciones del estudio. Estas poblaciones en general son parches pequeños y aislados, donde la diversidad genética suele ser baja. En ese estudio no se encontró correlación entre un tamaño de población grande con una variabilidad mayor, encontrándose que ciertos parches más pequeños tienen una mayor variabilidad que los parches más grandes.

Justificación

Es bien sabido que las orquídeas en general tienen un valor ornamental muy apreciado por los botánicos y entusiastas de las orquídeas (Guo *et al.* 2012). Además, sus poblaciones son frecuentemente víctimas de recolectas indiscriminadas y a la pérdida de hábitat, sobre todo en las orquídeas terrestres, cuyas poblaciones usualmente son pequeñas y aisladas, lo cual las hace vulnerables a la extinción, por lo que es de suma importancia implementar medidas para su conservación (Chung *et al.* 2005; Muñoz & Warner 2007;). La especie *P. langifalium* es una especie de orquídea nativa de Costa Rica, lo que hace de suma importancia tener a la disposición marcadores moleculares de ADN como los SSR, que permitan visualizar de forma precisa el estado

de estas poblaciones silvestres y en consecuencia, poder tomar las medidas necesarias para su protección en nuestro país. Ya que las isoenzimas, RAPD o los AFLP no son tan informativos como los SSR, se espera que esta investigación, ponga a disposición de futuros investigadores, un marcador molecular con las ventajas de los SSR.

Objetivo General

Aislar microsatélites en la especie *Phragmipedium langifalium* con el objeto de obtener al menos de 5 a 10 microsatélites polimórficos.

Objetivos específicos

- Obtención de una muestra representativa de *P. langifalium* en Costa Rica con el objetivo de tener material genético para posterior evaluación de los imprimadores.
- Evaluar cuáles de los imprimadores diseñados son polimórficos para una muestra seleccionada de esta orquídea.
- Probar la transferibilidad de los imprimadores SSR diseñados para esta especie a *P. pearcei*

Materiales y Métodos

Material vegetal y ADN

Muestras de *P. langifalium* y *P. pearcei* fueron colectadas en el campo y en el Jardín Botánico Lankester de la Universidad de Costa Rica (JBL) respectivamente. Especímenes de *P. langifalium* provienen de la zona de Monteverde (Mvb). El material a utilizar constó de las flores, ya que se espera que la cantidad de polisacáridos en los tejidos sea mucho menor que en las hojas en el caso de *P. langifalium* y hojas jóvenes para *P. pearcei*. Una muestra representativa de ADN de *P. langifalium* de un estudio previo realizado por Muñoz *et al.* (2010) almacenada a -20 °C en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (CIBCM), fue utilizada en el desarrollo de los SSR y posterior prueba y optimización de los imprimadores y condiciones del PCR respectivamente (Anexo 2 - cuadro 1).

Protocolo Aislamiento de SSR

Extracción de ADN

Para las muestras de flores que se procedió a utilizar el protocolo de extracción CTAB 2% modificado (Doyle & Doyle, 1990) (Anexo 1A). Debido a que las plantas de *P. pearcei* no estaban floreciendo en el momento de la colecta, se procedió a coleccionar las hojas jóvenes y de mejor calidad. El tejido vegetal constó de los pétalos de la flor obviando el labelo sacciforme. Para verificar la calidad de los ácidos nucleicos totales obtenidos de la extracción, 8 µl de muestra más 3 µl de solución de carga (50% glicerina, 0.25% Azul de bromofenol, y 0.25% Xilen Cianol FF.), fueron sometidos a una electroforesis en agarosa 0,8% en una solución amortiguadora de TBE 1X, a un voltaje constante de 90 V. Posteriormente se procedió con la tinción con bromuro de etidio por 10 min (10 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml diluidos en 100ml de H₂O bidestilada) y a continuación se observó el gel en un transiluminador. Si el ADN estaba en buenas condiciones se continuó con el proceso de eliminar el ARN de la muestra aplicando RNasa 20 µg/ml (Anexo 1C). Terminado el proceso de la RNasa, los ADN fueron precipitados (1/10 volumen de acetato de sodio 3 M más 2,5 volúmenes de etanol absoluto) para su almacenamiento a -20 °C.

Localización de los SSR

La técnica utilizada en este estudio es una versión modificada utilizada por Keiper y colaboradores en el 2006. A continuación se escogió una muestra representativa de ADN de las poblaciones para generar una "única muestra" fruto de la mezcla de ADN de 2 individuos escogidos al azar de cada población (100 ng de ADN por muestra) (Anexo 2 - cuadro 1). Se procedió a digerir el ADN de la mezcla. Se verifica *a priori* que todo el ADN haya sido digerido, antes de seguir con la ligación de los adaptadores en una electroforesis (5 µl de reacción más 2 µl de solución de carga; 1,2% agarosa; TBE 1X; 90 V) (anexo 1B). Una vez que se ha realizado la ligación se sometió a un PCR (reacción: 0,4 µl 10 mM dNTPs, 2 µl de buffer 10X PCR, 0,6 µl MgCl₂ 50 mM; 1 µl Ndel AdapPrim; 1 µl imprimador SSR (12 de ellos, 1 por reacción, contienen secuencias repetidas correspondientes a los SSR a amplificar); 10uM 2 µl de ADN digerido/ligado y 0,2 µl 5 U de polimerasa *Taq* volumen final 20 µl; programa: 10 min a 95°C; 20 ciclos: 30 s a 94°C, 60 s a 60°C y 60 s a 74°C, 25 ciclos: 30 s a 94°C, 60 s a 56°C y 60 s a 74°C; 10 min a 74°C). Los 12

imprimadores de las secuencias de SSR se pueden observar en el anexo 3. Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis (20 μ l de reacción más 4 μ l de solución de carga; 1,2% agarosa; TBE 1X; 90 V) junto a un marcador de 100 pares de bases (pb) (GeneRuler™ de Fermentas) por aproximadamente una hora para lograr una buena separación de los productos. Se sometió a tinción con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador; los barridos que estuviesen en el rango de los <100 - >200 pb y >600 fueron seccionados del gel y desechados. Una vez realizadas las modificaciones al gel, solo los barridos de entre 200-600 pb se conservaron y las incisiones se rellenan con la misma agarosa que con la que se realizó el gel (preferiblemente desde el principio no se deja que gelifique la agarosa para mantener su concentración constante y poder usarla para rellenar los agujeros). Una vez gelificados los agujeros se colocó el gel nuevamente en la cámara de electroforesis, se invirtió la polaridad del voltaje y se corre nuevamente por una hora. Haciendo esto, se concentró el barrido nuevamente en una "banda" en la región del pozo facilitando en gran medida el proceso de purificación de la banda del gel. Para la elución de bandas se usó *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* de Fermentas® y se siguió todos los pasos recomendados por el fabricante.

Una vez que se obtuvieron las eluciones, se observaron en un gel de agarosa 1,2% para ver el ámbito de pb del barrido y cantidad del ADN. Si la recuperación de ADN no fue el suficiente efectivo para la ligación (razón de 3:1 con el vector), un paso adicional de reamplificación fue realizado bajo las mismas condiciones de amplificación anterior. El ADN reamplificado se observó nuevamente en un gel para confirmar el peso molecular y la intensidad del barrido, adicionalmente se observa la concentración del ADN en un espectrofotómetro (*NanoDrap 2000 UV-Vis Spectrophotometer* de Thermo Scientific®). Con el ADN listo, se ligó el producto de PCR con un vector pTZ57R de Fermentas® (11 μ l H₂O (se aforó dependiendo del ADN), 6 μ l buffer de ligación 5X, 3 μ l vector, 9 μ l elución (se ajustó según la cantidad de ADN), 1 μ l T4 ligasa, volumen final 30 μ l), el mismo día se preparó medio LB con ampicilina para unas 12 placas (Fermentas® * FastMedia* LB Agar Amp IPTG/X-Gal) y una placa LB para la propagación de bacterias para la transformación al día siguiente (*E. coli* sepa JM107, anexo 1E). A continuación se transformaron las bacterias con el protocolo kit TransformAid de Fermentas®; se siguen todos los pasos recomendados por el fabricante. Las placas se dejan en una incubadora a 37 °C toda la noche. De las colonias, se escogieron únicamente las blancas (20 por SSR) y se colocaron en tubos de 500 ml individuales con 20 μ l de Tris-HCl (10mM pH 8.0). Se efectuó un PCR para ver que colonias tienen un inserto de tamaño aceptable (250-600 pb), esto se observa en un gel de agarosa 1.2%

(reacción: 16,7 µl H₂O; 3 µl buffer 10X PCR; 2,5 µl MgCl₂ 2,5 mM; 2,5 µl dNTPs 10mM; 1,2 µl M13F/M13R 10mM; 0,2 µl *Taq* polimerasa; 3 µl lisis bacteriana, volumen final 30 µl; programa: 2 min 95 °C; 34 ciclos: 30 s a 94 °C, 45 s a 52,6 °C y 30 s a 74 °C; 10 min a 74 °C). Los insertos con las características deseadas son secuenciados para su posterior análisis y diseño de los imprimadores.

Síntesis de los imprimadores

Para el diseño de los imprimadores se utilizó con el programa en línea *Primer3* (Rozen & Skaletsky, 2000) usando los parámetros estándar del programa, pero con temperaturas de alineamiento (T_m) que fueran similares a los imprimadores SSR con los que forman pareja (ver resultados), 18-24 nucleótidos y contenido de pares GC óptimo de 50%, bajo ciertas circunstancias estos y otros valores estándar se tuvieron que relajar para la obtención de los imprimadores. Los imprimadores recibieron la designación *Pr1a*, seguido del número de identificación de la repetición y el número de la colonia del que fueron aislados (cuadro 3).

Evaluación de SSR

Una vez obtenidos los imprimadores específicos, se probaron de tres a dos individuos escogidos al azar de al menos cinco poblaciones junto a dos individuos de colecta reciente de la zona de Monteverde (RA, Mva, Mvb, Pbc, Bi). Inicialmente un PCR estándar para cada uno de los SSR fue efectuado (reacción: 2,5 µl buffer 10X PCR 2,5 mM; 3 µl MgCl₂ 2,5 mM; 2,5 µl dNTP 2,5 mM; 1 µl imprimador específico Pr1o 10µM; 1 µl imprimador SSR; 2 µl ADN; programa: 3 min a 95 °C; 25 ciclos: 30 s a 94 °C, 35 s a T_m específica, 45 s a 74 °C) y a partir de ahí se empezó a estandarizar las condiciones del mismo para cada SSR en particular. Una reacción similar a la usada en el aislamiento también fue usada y mostró rendimientos similares a la anterior. El uso de gradiente de temperatura, *touch down* y *touch up* fue indispensable para la optimización y amplificación de algunos de los SSR aislados.

Una vez estandarizadas las condiciones del PCR, se realizaron pruebas en búsqueda de polimorfismos en geles de poliacrilamida y si visualizaron con tinción con nitrato de plata (Anexo D).

Análisis estadísticos

Se utilizó *Arlequin* versión 3.5 (Excoffier *et al.* 2005) para el cálculo de la heterozigocidad observada (H_o) y heterozigocidad esperada (H_e), Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), Desequilibrio de Ligamiento (DL) y número de alelos por locus.

Resultados

En general las extracciones de las flores produjeron una calidad y cantidad similar a las extracciones de las hojas para *P. langifalium*. Las extracciones en *P. pearcei* generalmente fueron de alta calidad y cantidad. No obstante es generalmente aceptado que ciertos tejidos suculentos y hojas, suelen producir ADN de menor calidad que los extraídos de las flores (Ibrahim, 2011). La calidad del ADN se estimó con geles de agarosa 0,8% y con el espectrofotómetro (Anexo 5 – figura 8).

De la búsqueda de SSR solo cuatro de los imprimadores evaluados: 2, 6, 8 y 9 generaron barridos lo suficientemente intensos para proseguir en el aislamiento (figura 1). No obstante todos necesitaron de una reamplificación para su correcto clonaje en el vector. El barrido del SSR2 tenía la particularidad de formar un patrón de bandas más marcado que el resto, el SSR7 mostraba una única banda muy marcada y no se utilizó, resultados similares se han observado en barridos generados por técnicas similares (Fisher *et al.* 1996). La forma en que se concentraba el barrido generado (corrida hacia atrás) anteriormente en una banda discreta, permitió en gran medida la recuperación exitosa del producto de PCR del gel. En el proceso de clonación se obtuvieron muchas colonias y en general crecieron solamente colonias blancas, de las cuales produjeron insertos de tamaños aceptables (figura 2). Es importante destacar que aunque el número de colonias fue aceptable (la media estaba en alrededor de 50 colonias por placa), la variedad de insertos no lo fue, siendo común la presencia de 4 a 5 clases de insertos, definidos por tamaños discretos y no una variedad de insertos con una distribución más uniforme de tamaños (dentro del rango especificado en el aislamiento) como se esperaba (figura 3B). Otro aspecto interesante de estos insertos es que la mayoría no presentaba en uno de sus extremos el imprimador adaptador, si no que se observaba la presencia del complemento del imprimador SSR respectivo. En otras

palabras el imprimador adaptador no tuvo ningún papel en la amplificación, probablemente siendo el imprimador SSR el que funcionaba como iniciador hacia adelante y reverso. En algunas raras ocasiones se observaba el imprimador adaptador “embebido” entre la secuencia generada por los SSR (figura 3A). Esto dificultaba en gran medida el número de secuencias disponibles para el diseño de iniciadores. Para la síntesis de los imprimadores se escogía la sección más cercana al SSR compuesto más grande para evitar problemas causados por la formación de quimeras o un mal alineamiento (durante el PCR) de alguno de los SSR flanqueantes, ya que con frecuencia uno de los SSR era idéntico al imprimador SSR. A menudo otros SSR se encontraban en las regiones internas de los insertos; sin embargo, muchas veces no fue un inconveniente en la síntesis de imprimadores.

Se generaron 13 imprimadores específicos de los 80 clones aislados (5 para SSR9, 5 para SSR2, 2 para SSR6 y 1 para el SSR8). De estos imprimadores solamente tres correspondientes al SSR2 pasaron las pruebas de amplificación, produciendo una banda que correspondía con el peso esperado y a veces una banda inespecífica de alto peso molecular común a los 3 loci (figura 4A). A pesar de que los SSR aislados en este estudio fueron pocos, la amplificación interespecífica fue exitosa para los tres, produciendo productos dentro del rango esperado en *P. pearcei*, lo cual sugiere secuencias conservadas en el género (figura 5). Esto motivó el uso de BLAST-n del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para buscar asociaciones positivas, sin embargo no fue posible encontrar alguna significativa. Las pruebas por polimorfismos en la muestra global de *P. langifalium* mostraron que los SSR son relativamente polimórficos, no obstante la presencia de heterocigotos fue rara o no identificable (figura 4B). Debido a características de la técnica la producción de bandas inespecíficas fue observada, no obstante solo se observaron en las tinciones con AgNO_3 las cuales tienen un alto grado de sensibilidad, ya que en agarosa generalmente se distingue solo una banda. Se observó desviaciones en el EHW ($P < 0,05$) y un desequilibrio de ligamiento en los tres loci analizados ($P > 0,05$). Estos tres imprimadores que pasaron las pruebas de amplificación y polimorfismo, se muestran en el cuadro 3 junto a algunos estadísticos. La transferencia a *P. pearcei* fue exitosa para estos tres loci (figura 5)

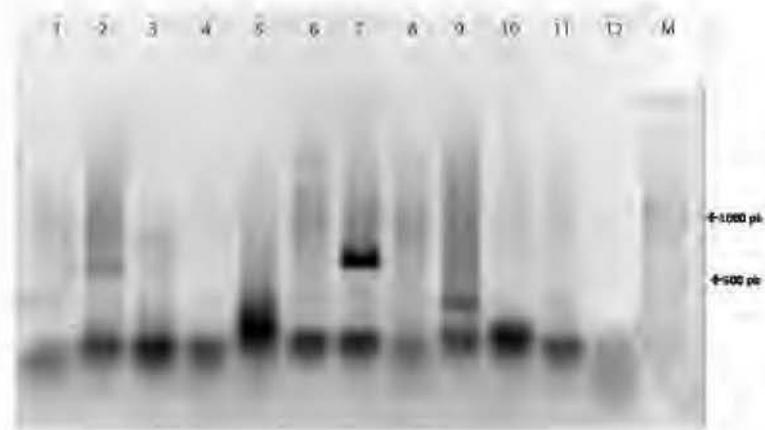


Figura 1. Barridos obtenidos durante la amplificación del ADN digerido / ligado. Nótese los patrones de bandas en algunos de los barridos, los barridos corresponden a aquellos generados por los imprimadores SSR del 1 al 12 y adaptador, seguidos del marcador de 100 pb (M, Fermentas®).

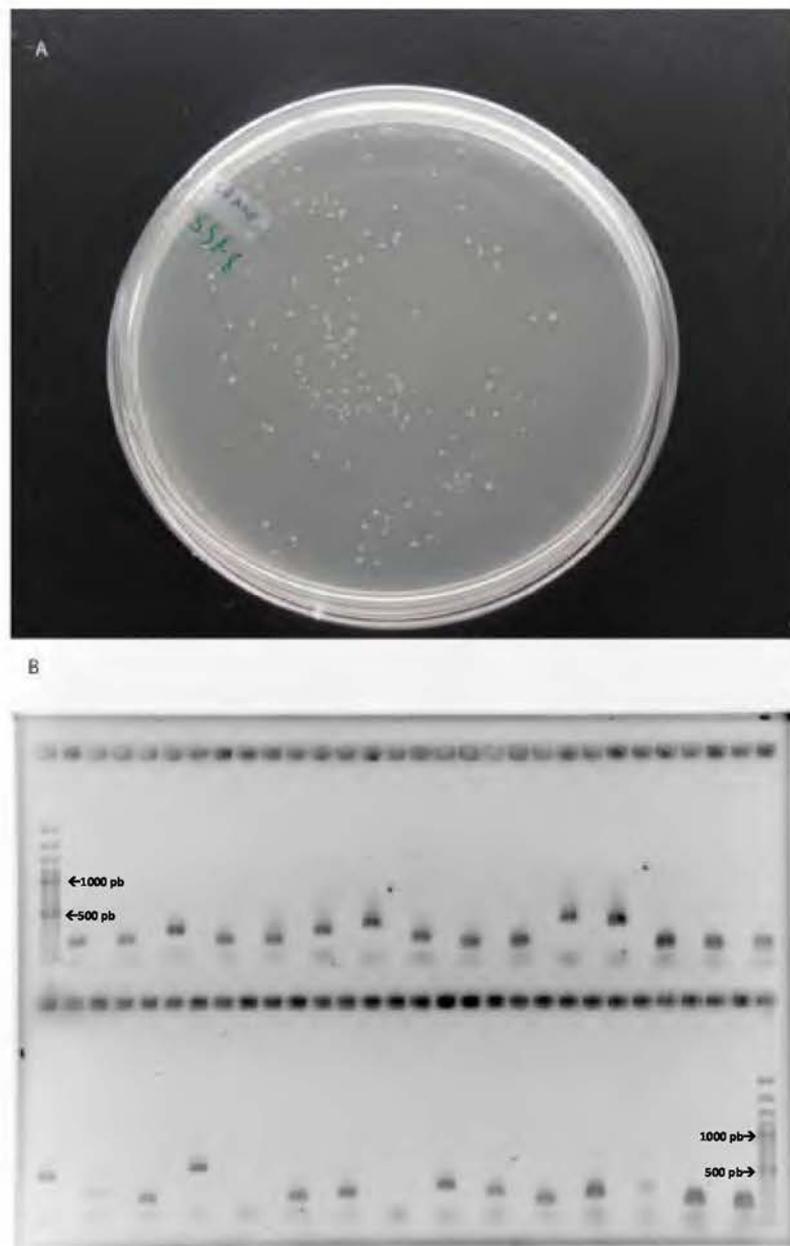


Figura 2. A) Placa LB ampilicina con *E. coli* transformadas, estas contienen plásmidos con el inserto correspondiente a secuencias con repeticiones del SSR8. B) Amplificación de insertos de la lisis de bacterias transformadas. El panel superior corresponde a insertos que poseen el motivo SSR9 y el panel inferior corresponde a insertos con el motivo SSR8.



Figura 3. A) Secuencia (5'-3' Sentido) correspondiente a uno de los insertos del SSR9, la secuencia en naranja denota el plásmido, la verde las repeticiones y la azul el imprimador adaptador, que en este caso queda en el medio de la secuencia (ver texto para mayor detalles). B) Eluciones de insertos del SSR9 que fueron aislados, de los más de 20 insertos obtenidos pocos fueron diferentes, observándose frecuentemente de 3 a 4 clases discretas por placa.

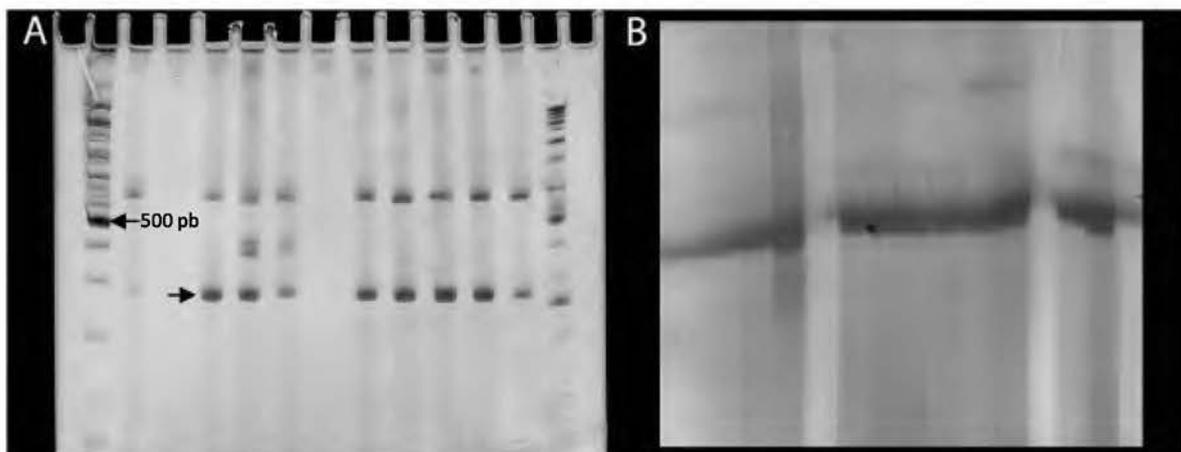


Figura 4. Microsatélites correspondientes al SSR2.15. A) Se observa un gel de poliacrilamida 6% pequeño (15 cm), el SSR corresponde a la banda señalada con la flecha de abajo, además se observa una banda inespecífica de alto peso molecular en todas las muestras, el marcador de la izquierda es 100 pb y el de la derecha 50 pb. (Fermentas®) B) Mismas muestras pero en un gel grande de poliacrilamida 6% (45 cm), los carriles vacíos corresponden a muestras que no amplificaron bien debido a problemas de la muestra y no a la secuencia.

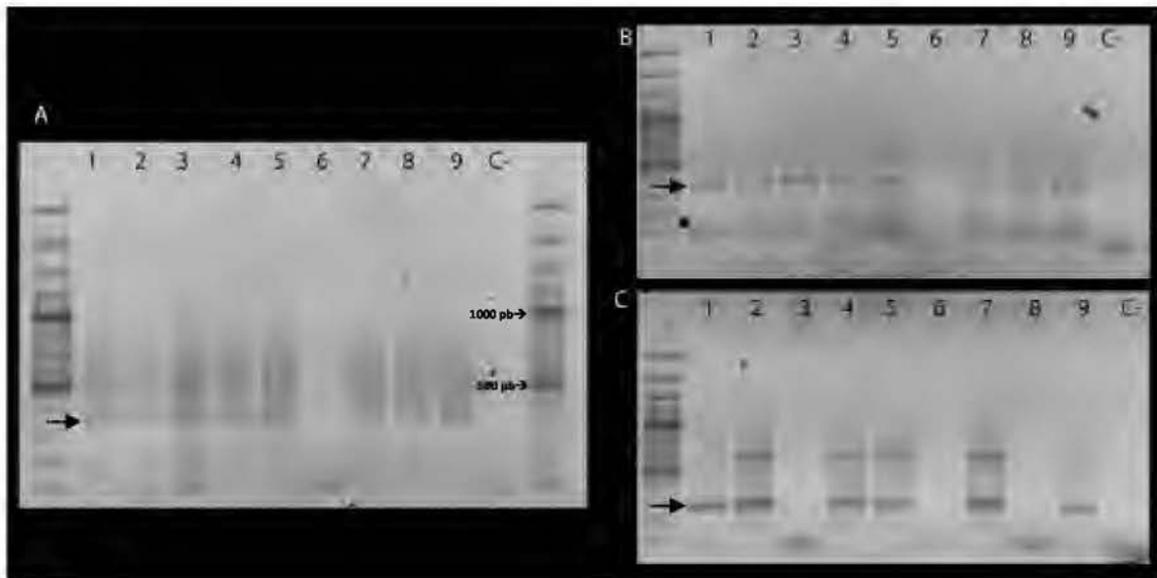


Figura 5. Transferencia de SSR a *P. pearcei* en geles 1,2% agarosa. A) Phlo2.7 B) Phlo2.15 C) Phlo2.5. Todas las muestras son las mismas, el marcador es 100 pares de bases y al final un control negativo. El SSR se señala con una flecha negra.

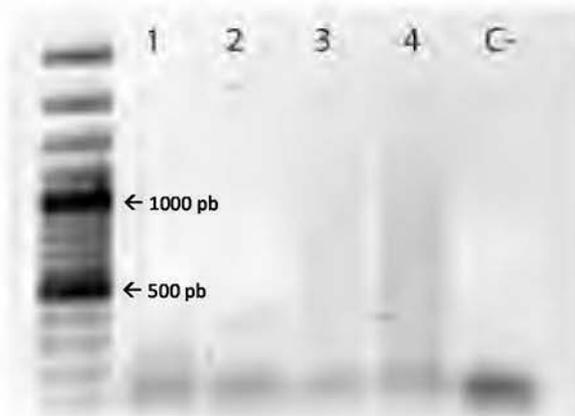


Figura 6. Gel de agarosa 1,2% donde se muestra para los carriles 1 y 2 un producto de PCR usando solamente el imprimador adaptador y los carriles 3 y 4 en conjunto con el imprimador SSR9. El marcador es 100 pb y el carril 5 un control negativo.

Cuadro 3. Lista de imprimadores específicos para cada locus. Heterozigocidad observada (H_O), heterozigocidad esperada (H_E), número de alelos por locus (A), Temperatura de hibridación (T_m).

Locus	Imprimador 5'-3'	Repetición	H _O	H _E	Tamaño pb	A	T _m °C
Phlo2.5	R: TGCAAGGCATGTAACAATA	(AC) ₄ (TC) ₇ (AC) ₅	0,18750	0,67944	330-320	6	51,7
Phlo2.7	F: GTACTCAATAATTTCTCAAAGACA	(TG) ₆ (AG) ₆ (TG) ₄	0,12500	0,78629	350-320	8	51,1
Phlo2.15	R: CTTAATCACAGTTGTAGATGCTCAC	(AC) ₅ (TC) ₇	0,16667	0,73016	256-244	5	53,7

Discusión

Los 3 SSR aislados con éxito mostraron un nivel de polimorfismo relativamente bajo a excepción del locus Phlo2.7 que tuvo un rendimiento normal, esto puede ser un resultado de la técnica, en la cual se aislaron SSR relativamente pequeños, o debido a que los microsatélites son derivados y probados en individuos con una baja variabilidad genética (Hayden *et al.* 2006; Muñoz *et al.* 2010). No obstante los niveles de polimorfismos observados son comparables a los observados en SSR aislados de ESTs (Ellis & Burke, 2007; Dutta *et al.* 2011) y en otras especies de orquídeas (Phuekvilai *et al.* 2009; Huang *et al.* 2011; Tang *et al.* 2012). Esto también puede explicar el bajo número de heterocigotos para los 3 loci, típico de poblaciones con alto nivel de endogamia o que están aisladas (Chung & Park, 2008; Muñoz *et al.* 2010; Kartzinel *et al.* 2012). Otro factor determinante en el alto nivel de homocigosis observado, es posiblemente debido a una subestructura ya establecida para cada uno de los sitios de colecta, que en el análisis global se ve reflejado como en una deficiencia en el número de heterocigotos, lo cual es típico del efecto Wahlund (Gaudeul *et al.* 2011). En plantas se puede generar estructura genética más fácilmente por la capacidad de dispersión de las semillas que la de polen (Buzatti *et al.* 2012). Aunque esto no parece ser el caso en las orquídeas donde las semillas tienen una dispersión amplia debido a su pequeño tamaño (Campbell *et al.* 2007). No obstante estudios realizados con AFLP en esta especie muestran un mayor grado de diferenciación dentro de las poblaciones lo cual sugiere que hay flujo génico entre los sitios analizados, reduciendo si la hay, subestructuras genéticas en los mismos (Muñoz *et al.* 2010). No obstante estas evidencias, no se puede descartar el efecto Wahlund como una de las posibles causas en las desviaciones en el EHW. Los 3 loci parecen estar en desequilibrio de ligamiento, no obstante este puede ser un artefacto producto de la estructura genética de la población estudiada, que en este caso particular también puede estar sujeto a deriva genética que también se sabe, aumenta el DL (Pfaff *et al.* 2001). Debido a que posiblemente la mayoría de estos individuos están relacionados, la proporción de falsos positivos en análisis de DL y EHW puede ser mayor debido a que dos loci pueden estar asociados porque comparten un ancestro común y no por ligamiento. (Terwilliger, 2000). Se sabe que las mezclas entre diferentes poblaciones pueden producir DL, ya sea verdadero o artefactos y estos dependen de las frecuencias alélicas de las poblaciones padre, la cantidad de flujo entre las poblaciones, la forma en que se mezclaron las poblaciones y el tiempo que duro el flujo entre las mismas (Pfaff *et al.* 2001). Resultados similares se han visto en SSR en orquídeas para desviaciones en EHW (Pinheiro *et al.* 2008; Rodrigues &

Kumar, 2009; Kartzinel *et al.* 2012) y para DL (Hopkins & Taylor, 2011), donde se atribuyen las causas a estos resultados a la endogamia, aislamiento de las poblaciones y a la autopolinización. La amplificación en *P. pearcei* fue exitosa para los 3 loci lo que sugiere que se encuentran regiones relativamente conservadas lo cual es apoyado por la cercanía filogenética de estas dos especies en estudios previos realizados por Cox y colaboradores en 1997. No obstante algunas muestras fallaron en amplificar posiblemente por fallas en el PCR o alelos nulos, sin embargo fue un número bajo y su transferibilidad exitosa los hace marcadores útiles al estudiar taxas similares y por lo tanto ahorrar recursos (Pinheiro *et al.* 2009).

Hay varias técnicas de aislamiento de microsatélites descritas en la literatura (Zane *et al.* 2002). Muchos de estos protocolos son utilizados en el aislamiento de SSR en orquídeas (Phuekvilai *et al.* 2009; Rodrigues & Kumar, 2009; Huang *et al.* 2011; López *et al.* 2012). A pesar de que se hizo una búsqueda intensiva, no se encontró en la literatura ningún artículo de orquídeas que use la técnica de aislamiento de SSR compuestos descrita en este o en otros trabajos similares. Uno de los factores clave en esta técnica de aislamiento de SSR es la ligación de los fragmentos generados en la digestión con los adaptadores. Durante el desarrollo de este estudio, se observó una contribución mínima por parte del imprimador adaptador en la amplificación del barrido, por lo que se sospechó en un fallo en el PCR o en la ligación de los adaptadores. Para corroborar cuál de los dos casos mencionados era la causa del problema, se realizó un PCR en el cual se mostró claramente que el imprimador adaptador solo se observa en fragmentos en las regiones alrededor de los 250 pb (figura 6). El control con los imprimadores adaptador y SSR mostró amplificación, por lo que se descartó un problema en el PCR. Claramente la ligación no fue lo suficientemente eficiente, esto parece ser consecuencia de problemas enzimáticos (enzimas de restricción, ligasas, *buffers*) o la formación de quimeras u otros artefactos pudieron contribuir a este problema (So *et al.* 2004). Probablemente es debido a este problema, que se observó un bajo rendimiento en la obtención de los barridos y a la falta del adaptador en la mayoría de insertos evaluados. Una de las características observadas en algunos de los insertos de bajo peso molecular, fue la formación de quimeras mediadas por el adaptador NdeI. Esto puede deberse a que dos fragmentos en simple banda hibridan en la sección del adaptador y la polimerasa extiende desde las regiones 3' OH libres generando estos artefactos, además gracias a que las condiciones del PCR favorecen en gran medida al imprimador SSR, los SSR flanqueantes sirven de sitios de anclaje para estos iniciadores y de esta forma se amplifican de forma más eficiente las quimeras. No obstante los fragmentos más comunes no tenían adaptador del todo y solo SSR flanqueaban las

secuencias, esto puede deberse a quimeras formadas durante la amplificación, o a que el imprimador SSR se pegaba a secuencias de SSR compuestos (lo deseado) y a secuencias repetitivas complementarias que coincidieran con alguno de los motivos del imprimador SSR, generando un extremo con un SSR compuesto idéntico al imprimador y otro con el verdadero SSR (Fisher *et al.* 1996; So *et al.* 2004; Lian *et al.* 2006) (Anexo 4 – figura 7). Se considera que esta es la principal razón por la poca variedad de fragmentos encontrados durante la búsqueda por SSR en las colonias de los 4 tipos de repeticiones de los cuales se obtuvieron clones positivos para la especie en estudio. Otra posible razón de peso de la poca cantidad de fragmentos disponibles pudo ser la baja frecuencia con la que generalmente los SSR compuestos se encuentran en el genoma, por lo que desde un comienzo se dispone de pocas opciones (Victoria *et al.* 2011; Hsu *et al.* 2011; Kartzinel *et al.* 2012).

A pesar de esto, se espera que los marcadores desarrollados en esta investigación puedan reflejar de forma más detallada la diversidad genética que con los marcadores dominantes (Rakoczy & Bolibok, 2004). Se recomienda mejorar ciertos pasos del procedimiento para un mejor rendimiento como lo es la ligación u optar por métodos de enriquecimiento que no involucren digestión / ligación. En general los métodos que utilizan SSR compuestos no son muy comunes todavía, pero ofrecen ventajas tales como la disminución en costos de desarrollo y uso, además que son muy compatibles con PCR *multiplex*, debido a la menor cantidad de imprimadores utilizados, lo cual disminuye la posibilidad de interferencia entre los mismos (Hayden *et al.* 2006; Dufour *et al.* 2007; Ohbayashi *et al.* 2008).

Anexos

1. Protocolos y reactivos

A) CTAB 2% modificado de Doyle & Doyle (1990)

1. Se maceran 2 hojas (se retira la vena central) o todos los pétalos y sépalos exceptuando el labelo de dos flores.
2. A continuación adicionar 7ml de solución amortiguadora CTAB 2%.
3. 0,1 g (aproximadamente una punta de espátula) PVP (Polivinilpirrolidona)
4. 70 μ l de β -mercaptoetanol.
5. Se incuba 40 min entre 50 y 55 °C, agitándose cada 10 min.
6. En una cámara de extracción de gases se añade 4ml de cloroformo:octanol (24:1) y se agita durante 2 min.
7. Los tubos se colocan en la centrifuga a 9000 rpm por 20 min a 4 °C.
8. Se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio, se adiciona 2/3 de isopropanol y 1/10 de NaCl 5M
9. Se deja reposar 1 h en hielo y se centrifuga a 2900 rpm, 30 min a 4 °C. De no observar precipitado durante la hora en hielo, se deja toda la noche a 4 °C y se centrifuga al día siguiente.
10. Se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado con 200 μ l de Etanol 70%, se retira el etanol y se deja secar.
11. Finalmente resuspender con H₂O bidestilada (según el tamaño del precipitado, entre 50 y 400 μ l).

B) TBE, solución amortiguadora usada en electroforesis, compuesta por (concentraciones finales)

- Tris-HCl 0.089 M, pH 8.0
- Ácido bórico 0.089 M
- EDTA 0.0025 M pH 8.0 (Etilendiaminotetraacetato de sodio).

C) Tratamiento con enzima RNasa

1. Se transfiere una alícuota de 100 μ l de la solución de ácidos nucleicos totales del Anexo 1A a un tubo nuevo.
2. Se adiciona 2 μ l de RNasa 1 μ g/ml y se incuba 30 min a 37 °C. Este paso se hace por duplicado.
3. En una cámara de extracción de gases se adiciona 50 μ l de Fenol y 50 μ l de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), se agita hasta formar una emulsión.
4. Se centrifuga a 8000 rpm 5min.
5. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se precipita con 1/10 del volumen transferido de NaOAc 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.
6. Se incuba en hielo 30 min y luego se centrifuga. También se puede dejar toda la noche a -20 °C.
7. Se lava con etanol 70%; se elimina el alcohol y se deja secar el precipitado
8. El precipitado se resuspende H₂O bidestilada (50-100 μ l) según el tamaño del precipitado

D) Preparación de la acrilamida y tinción con AgNO₃.

Preparación del gel 6%

- 25.2 g de Urea
- 11 ml H₂O bidestilada
- 6 ml de TBE 10X
- 18 ml de Acrilamida (19:1)
- 340 μ l persulfato de amonio
- 34 μ l TEMED.

Tinción con Nitrato de plata.

1. Se coloca el gel en una bandeja y se adiciona 600 ml ácido acético al 7,5% y se agita durante 20 min. Se retira de la bandeja a un recipiente para utilizarlo al final de la tinción.
2. A continuación lavar con 500 ml de H₂O bidestilada durante 2 minutos 2 veces.
3. Se adiciona 600 ml de nitrato de plata 1 g/l conteniendo 1200 µl de formaldehído 37% y se agita durante 20 min.
4. Se realiza un nuevo lavado con 600 ml de H₂O bidestilada rápidamente y se deja secar.
5. Durante el secado se preparan 600 ml de Carbonato de sodio 30 g/l, conteniendo una solución de tiosulfato de sodio (3 granos en 1 ml de H₂O bidestilada, se prepara fresca) y 1800 µl de formaldehído 37%. Posteriormente se adiciona y agita hasta que se visualicen las bandas.
6. La reacción se detiene adicionando los 600 ml de ácido acético que se utilizó en el inicio, durante 10 min.
7. Se lava con 600 ml de H₂O bidestilada durante 10 min.

E) Placas LB agar

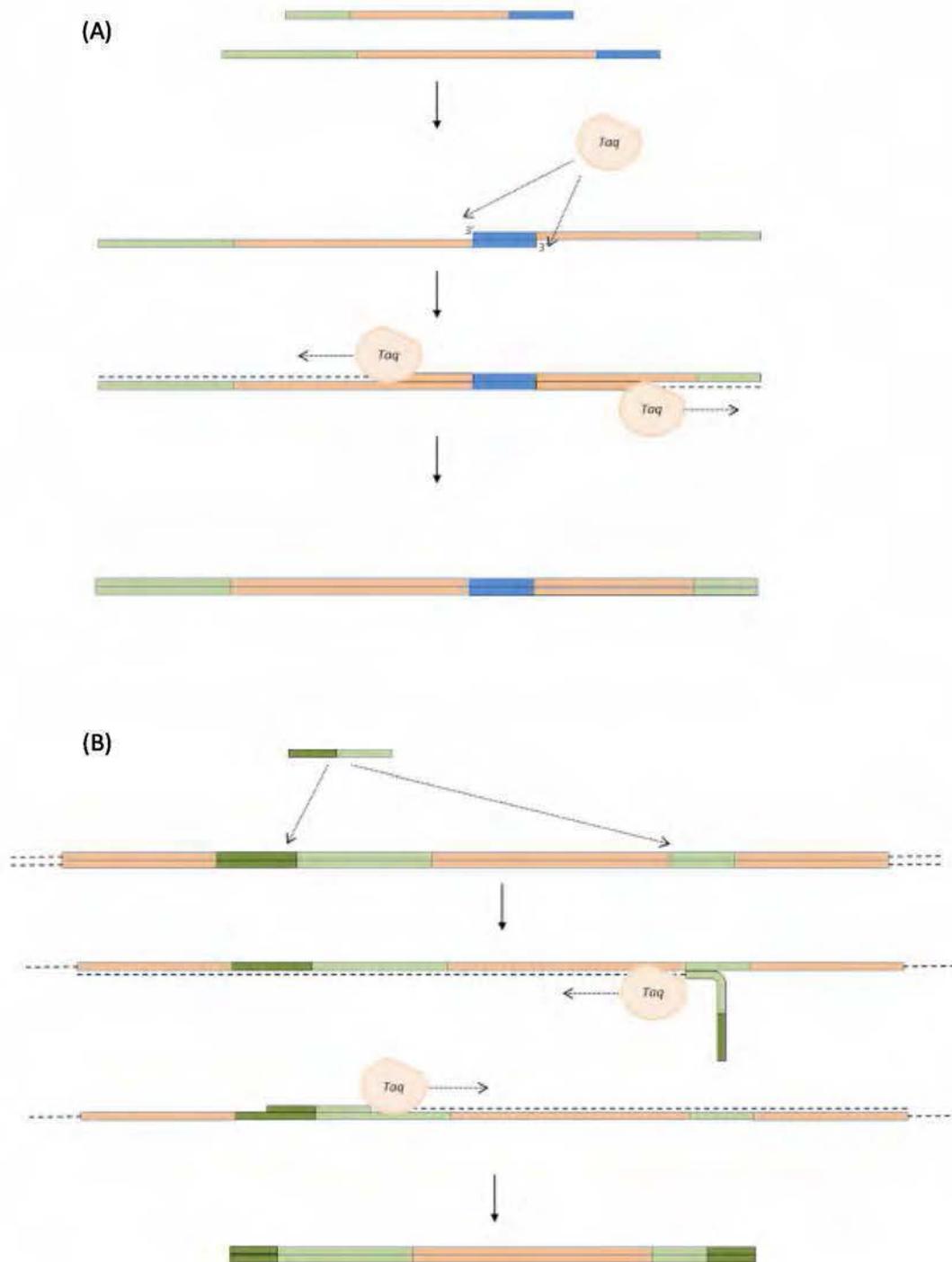
- Triptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g
- Aforar con H₂O bidestilada 1L
- De ser necesario ajustar pH a 7
- Agar al 1.5%

2. Cuadro 1. Lista de las poblaciones silvestres de *Phragmipedium langifalium* en Costa Rica usadas en este estudio. Tomado de Muñoz & Warner 2007.

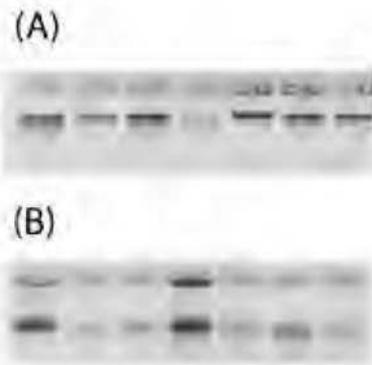
Población	Número de individuos colectados
Centro Biológico Aguas Silvestres (Bi)	21
Rara Avis (RA)	21
Paraíso (PBC)	21
Tilarán I (Mva)	20
Tilarán II (Mvb)	37
Río Cuarto (Btb)	51
TOTAL	192

3. Cuadro 2. Lista de imprimadores y adaptadores usados durante el aislamiento de los microsátélites.

Código	Secuencia 5'-3'	Tm °C
SSR1	(AC) ₅ (AG) ₆	55,8
SSR2	(AC) ₅ (TC) ₆	55,5
SSR3	(TG) ₅ (TA) ₈	45
SSR4	(TC) ₅ (AT) ₈	43,5
SSR5	(AC) ₅ (AT) ₈	45,4
SSR6	(TC) ₅ (AC) ₆	56,2
SSR7	(TC) ₅ (TG) ₆	56
SSR8	(TG) ₅ (AG) ₆	55,5
SSR9	(AG) ₅ (AC) ₆	56
SSR10	(AG) ₅ (TC) ₆	53,7
SSR11	(TG) ₅ (TC) ₆	55,8
SSR12	(AG) ₅ (AT) ₈	43,3
NdeII adaptador	Sentido: GAGGATGAGTCCTGA	-
	Antisentido : GATCTCAGGACTCATC	-
NdeII AdapPrim (imprimador adaptador)	GGATGAGTCCTGAGAT	43,3
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT	52,8
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	44,4



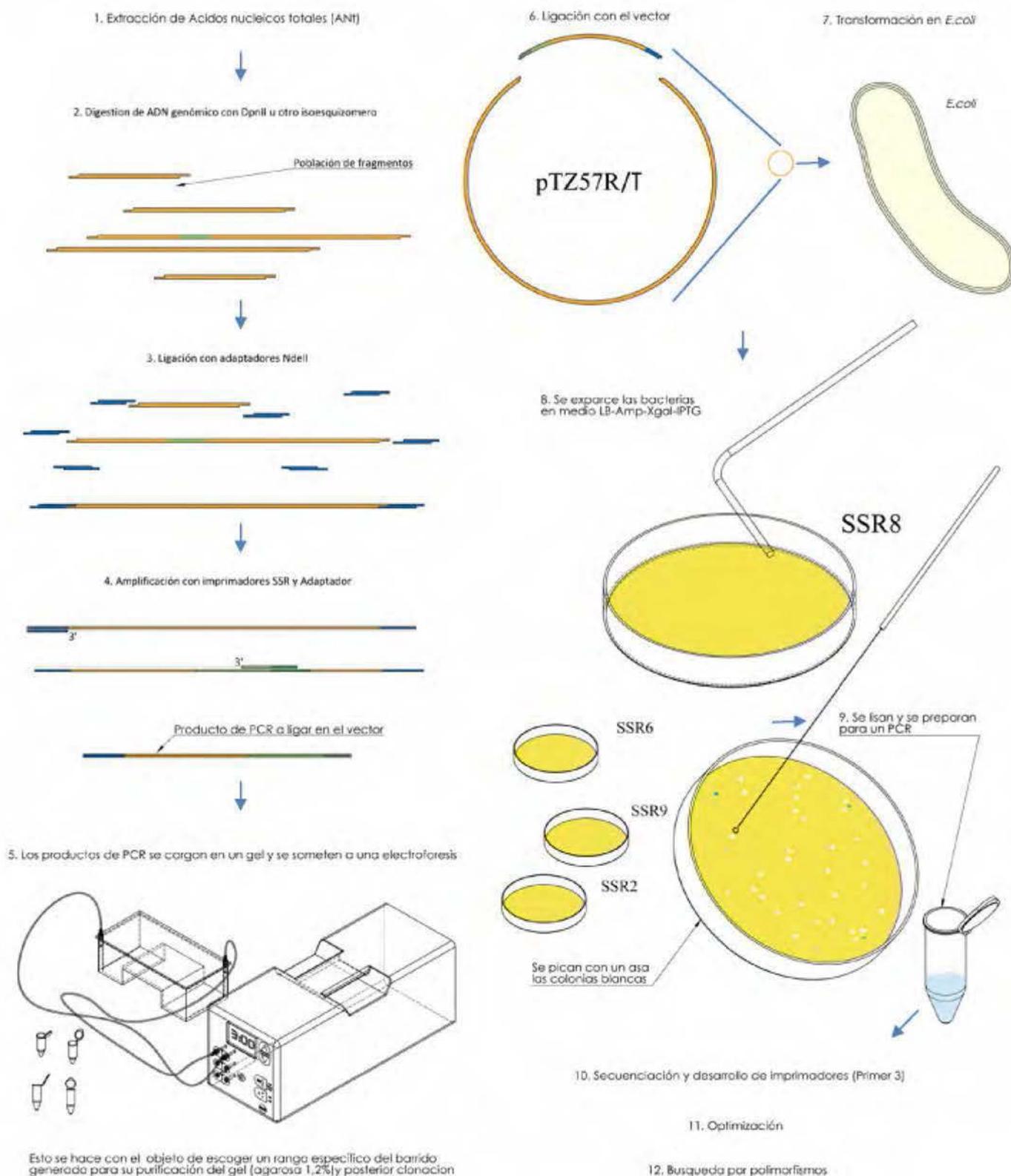
4. Figura 7. Posibles mecanismos de la formación de artefactos durante la amplificación. A) Método de hibridación mediado por adaptador (azul). B) Mal alineamiento del primer adaptador, los dos tonos de verde representan un SSR compuesto y al imprimador SSR. Aquí no se representan el método no mediado por adaptador de formación de quimeras.



5. Figura 8. Comparación de ADN extraídos de hojas (A) y de flores (B) en *P. longifolium*. Gel agarosa 0,8%.



6. Figura 9. Especies de *Phragmipedium* sometidas al estudio. A) *P. langifalium* B) *P. pearcei*. Imágenes cortesía de Christina Smith, investigadora del Jardín Botánico Lankester.



7. Figura 10. Resumen del protocolo de aislamiento de SSR. Para más detalles referir a la metodología.

Literatura citada

- Abasolo M.A., E.S. Fernando, T.H. Borromeo & D.M. Hautea. 2009. Cross-species amplification of shorea microsatellite DNA markers in *Parasharea malaananan* (Dipterocarpaceae). Philippine Journal of Science. 138 (1): 23-28.
- Aceto S. & L. Gaudio. 2011. The MADS and the beauty: Genes involved in the development of orchid flowers. Current Genomics. 12: 342-356.
- Alcantara S., J. Semir & V. Solferini. 2006. Low Genetic Structure in an Epiphytic Orchidaceae (*Oncidium haakeri*) in the Atlantic Rainforest of South-eastern Brazil. Annals of Botany. 98: 1207-1213.
- Atwood, JT. 1984. The relationships of the slipper orchids (subfamily Cypripedioideae, Orchidaceae). Selbyana. 7: 129-147.
- Barchi L., S. Lanteri, E. Portis, A. Acquadro, G. Valè, L. Toppino & G.L. Rotino. 2011. Identification of SNP and SSR markers in eggplant using RAD tag sequencing. BMC Genomics. 12(304): 1-9.
- Bohra A., A. Dubey, R.K. Saxena, R.V. Penmetsa, K.N. Poornima, N. Kumar, A.D. Farmer, G. Srivani, H.D. Upadhyaya, R. Gothwal, S. Ramesh, D. Singh, Kulbhushan Saxena¹, P.B.K. Kishor, N.K. Singh, C.D. Town, G.D. May, D.R Cook & R.K. Varshney. 2011. Analysis of BAC-end sequences (BESs) and development of BES-SSR markers for genetic mapping and hybrid purity assessment in pigeonpea (*Cajanus* spp.). BMC Plant Biology, 11(56): 1-15.
- Bull L.N., C.R. Pabón-Peña & N.B. Freimer. 1999. Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. Genome Research. 9(9): 830-838.
- Buzatti Oliveira R.S., R.A. Ribeiro, J.P. de Lemos Filho & M.B. Lovato. 2012. Fine-scale spatial genetic structure of *Dalbergia nigra* (Fabaceae), a threatened and endemic tree of the Brazilian Atlantic Forest. Genetics and Molecular Biology. 35(4): 838-846.
- Campbell V.V., G. Rowe, T.J.C. Beebee & M.J. Hutchings. 2007. Genetic differentiation amongst fragrant orchids (*Gymnadenia conopsea* s.l.) in the British Isles. Botanical Journal of the Linnean Society. 155: 349-360.

- Chen C.-M., M.-C. Hsiao, T.-W. Pai, R. Cheng, W.-S. Tzou & M.D.-T. Chang. 2008. Identify SSR Regulators for Functional Gene Sets through Cross-Species Comparison. ORSC & APORC. 204-211 pp.
- Chen X., D. Min, T.A. Yasir & Y.-G. Hu. 2012. Genetic Diversity, Population Structure and Linkage Disequilibrium in Elite Chinese Winter Wheat Investigated with SSR Markers. PLoS ONE. 7(9): 1-9.
- Chung M.Y., J.D. Nason & M.G. Chung. 2005. Patterns of hybridization and population genetic structure in the terrestrial orchids *Liparis kumakiri* and *Liparis makinaana* (Orchidaceae) in sympatric populations. *Molecular Ecology*. 14: 4389-4402.
- Chung M.Y. & C.W. Park. 2008. Fixation of alleles and depleted levels of genetic variation within populations of the endangered lithophytic orchid *Amitastigma gracile* (Orchidaceae) in South Korea: implications for conservation. *Plant Systematics and Evolution*. 272: 119-130.
- Cox A.V., G.J. Abdelnour, M.D. Bennett & I.J. Leitch. 1998. Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85(5): 681-687.
- Crichton R.J., J. Squirrell, S.J. Woodin, S.E. Dalrymple & P.M. Hollingsworth. 2012. Isolation of microsatellite primers for *Melampyrum sylvaticum* (Orobanchaceae), an endangered plant in the United Kingdom. *American Journal of Botany*. 99(11): 457-459.
- Dakin E.E., & J.C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*. 93: 504-509.
- Doyle J.J. & J.L. Doyle. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*. 12(1): 13-15.
- Dufour B.A., T.M. Hogan & D.D. Heath. 2007. Ten polymorphic microsatellite markers in the invasive round goby (*Neogabius melanostamus*) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*. 7: 1205-1207

- Dutta S., G. Kumawat, B.P. Singh, D.K. Gupta, S. Singh, V. Dogra, K. Gaikwad, T.R. Sharma, R.S. Raje, T.K. Bandhopadhyaya, S. Datta, M.N. Singh, F. Bashasab, P. Kulwal, K.B. Wanjari, R.K. Varshney, D.R. Cook, N.K. Singh. 2011. Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. *BMC Plant Biology*. 11(17): 1-13.
- Ellis J.R. & J.M. Burke. 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*. 99: 125-132.
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1:47-50.
- Fay M.F., R. Bone, P. Cook, I. Kahandawala, J. Greensmith, S. Harris, H.Æ. Pedersen, M.J. Ingrouille & C. Lexer. 2009. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. *Annals of Botany* 104: 517-525.
- Fisher P. J., R. C. Gardner & T.E. Richardson. 1996. Single locus microsatellites isolated using 54 anchored PCR. *Nucleic Acids Research*. 24, (21): 4369-4371.
- Forrest A.D., M.L. Hollingsworth, P.M. Hollingsworth, C. Sydes & R.M. Bateman. 2004. Population genetic structure in European populations of *Spiranthes ramanzaffiana* set in the context of other genetic studies on orchids. *Heredity*. 92: 218-227.
- Garcia A.A.F., L.L. Benchimol, A.M.M. Barbosa, I.O. Geraldi, C.L.Souza Jr & A.P. de Souza. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*. 27(4): 579-588.
- Gaudeul M., T. Giraud, L. Kiss, J.A. Shykoff. 2011. Nuclear and chloroplast microsatellites show multiple introductions in the worldwide invasion history of common ragweed, *Ambrasia artemisiifolia*. *PLoS ONE*. 6(3): e17658. doi:10.1371/journal.pone.0017658
- Guo Y.-Y., Y.-B. Luo, Z.-J. Liu & X.-Q. Wang. 2012. Evolution and biogeography of the slipper orchids: Eocene vicariance of the conduplicate genera in the old and new world tropics. *PLoS ONE*. 7(6): 1-13.

- Gustafsson S. & P. Sjögren-Gulve. 2002. Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia adaratissima* and a comparison with the more common congener, *G. canapsea*. *Conservation Genetics*. 3: 225-234.
- Gustafsson A.L.S., C.F. Verola & A. Antonelli. 2010. Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils and a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Haffmannseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae). *BMC Evolutionary Biology*. 10(177): 1-13.
- Hayden M.J. & P.J. Sharp. 2001. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. *Nucleic Acids Research*. 29(8): 1-6.
- Hayden M.J., P. Stephenson, A.M. Logojan, D. Khatkar, C. Rogers, J. Elsdén, R.M.D. Koebner, J.W. Snape, P.J. Sharp. 2006. Development and genetic mapping of sequence-tagged microsatellites (STMs) in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 113: 1271-1281.
- Hippolyte I., C. Jenny, L. Gardes, F. Bakry, R. Rivallan, V. Pomies, P. Cubry, K. Tomekpe, A.M. Risterucci, N. Roux, M. Rouard, E. Arnaud, M. Kolesnikova-Allen and X. Perrier. 2012. Foundation characteristics of edible *Musa* triploids revealed from allelic distribution of SSR markers. *Annals of Botany* 109: 937-951.
- Hopkins S.E. & D.L. Taylor. 2011. Microsatellite loci development in mycoheterotrophic *Carallurhiza maculata* (Orchidaceae) with amplification in *C. mertensiana*. *American Journal of Botany*. 98(9): 253-255
- Hsu C.-C., Y.-L. Chung, T.-C. Chen, Y.-L. Lee, Y.-T. Kuo, W.-C. Tsai, Y.-Y. Hsiao, Y.-W. Chen, W.-L. Wu, H.-H. Chen. 2011. An overview of the *Phalaenopsis* orchid genome through BAC end sequence analysis. *BMC Plant Biology* 2011. 11(3): 1-11.
- Hu K.-M., D.-Y. Qiu, X.-L. Shen, X.-H. Li & S.-P. Wang. 2008. Isolation and manipulation of Quantitative Trait Loci for disease resistance in rice using a candidate gene approach. *Molecular Plant*. 1(5): 786-793.

- Huang J.-L., C.-X. Zeng, H.-T. Li, & J.-B. Yang. 2011 Isolation and characterization of 15 microsatellite markers from the spring orchid (*Cymbidium gaeringii*) (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. 98(4): 76-77.
- Huynh T.T., R. Thomson, C.B. Mclean & A.C. Lawrie. 2009. Functional and genetic diversity of mycorrhizal fungi from single plants of *Caladenia farmasa* (Orchidaceae). *Annals of Botany*. 104: 757-765.
- Ibrahim R.I.H. 2011. A modified CTAB protocol for DNA extraction from young flower petals of some medicinal plant species. *Geneconserve*. 10(40): 165-182.
- Kartzinel T.R., D.W. Trapnell & T.C. Glenn. 2012. Microsatellite primers for the neotropical epiphyte *Epidendrum firmum* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. 99(11): 450-452.
- Keiper F.J., M.J. Hayden & H. Wallwork. Development of sequence tagged microsatellites (STMs) for the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. 2006. *Molecular Ecology Notes*. 6: 543-546
- Kelly M.K., P.A. Jauert, L.E. Jensen, C.L. Chan, C.S. Truong & D.T. Kirkpatrick. 2007. Zinc regulates the stability of repetitive minisatellite DNA tracts during stationary phase. *Genetics* 177: 2469-2479.
- Kennedy A.H. & G.L. Walker. 2007. The population genetic structure of the Showy Lady's-Slipper orchid (*Cypripedium reginae* Walter) in its glaciated and unglaciated ranges. *Castanea*. 72(4): 248-261.
- Koopowitz, H. 2008. Tropical Slipper Orchids. *Paphiopedilum* and *Phragmipedium* species and hybrids. Timber Press, Portland. 411 pp
- Kozłowski P., K. Sobczak & W. J Krzyżosiak. 2010. Trinucleotide repeats: triggers for genomic disorders?. *Genome Medicine*. 2(29): 1-5.
- Kumar Parida S., V. Dalal, A. Kumar Singh, N. Kumar Singh & T. Mohapatra. 2009. Genic non-coding microsatellites in the rice genome: characterization, marker design and use in assessing genetic and evolutionary relationships among domesticated groups. *BMC Genomics*. 10(140): 1-14.

- Kwapata K., W.F. Mwase, J.M. Bokosi, M.B. Kwapata & P. Munyenembe. 2007. Genetic diversity of *Annana senegalensis* Pers. populations as revealed by simple sequence repeats (SSRs). African Journal of Biotechnology. 6(10): 1239-1247.
- Lawson M.J. & L. Zhang. 2006. Distinct patterns of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genomes. Genome Biology. 7(2): 1-11.
- Li D., Z. Deng, B. Qin, X. Liu & Z. Men. 2012. De novo assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). BMC Genomics. 13(192): 1-14.
- Li J.-h., Z.-j. Liu, G.A. Salazar, P. Bernhardt, H. Perner, Y. Tomohisa, X.-h. Jin, S.-w. Chung, Y.-b. Luo. 2011. Molecular phylogeny of *Cypripedium* (Orchidaceae: Cypripedioideae) inferred from multiple nuclear and chloroplast regions. Mol. Phylogenet. Evol. doi:10.1016/j.ympev.2011.06.006
- Li Y.-C., A.B. Korol, T. Fahima, & E. Nevo. 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. Mol. Biol. Evol. 21(6): 991-1007.
- Liu G. & M. Leffak. 2012. Instability of (CTG)_n•(CAG)_n trinucleotide repeats and DNA synthesis. Cell & Bioscience. 2(7): 1-13.
- Lian C., M.A. Wadud, Q. Geng, K. Shimatani & T. Hogetsu. 2006. An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers. J Plant Res. 119: 415-417.
- López-Roberts M.C., P.R.M. Almeida, E.J.F. Oliveira & C. Van Den Berg. 2012. Microsatellite marker development for the threatened orchid *Masdevallia salamanii* (Orchidaceae). American Journal of Botany. 99(2): 66-68.
- Mondragón-Palomino M., L. Hiese, A. Härter, M.A. Koch & G. Theißen. 2009. Positive selection and ancient duplications in the evolution of class B floral homeotic genes of orchids and grasses. BMC Evolutionary Biology. 9(81): 1-26.
- Mondragón-Palomino M. & G. Theißen. 2009. Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes. Annals of Botany. 104: 583-594.

- Morgante M., M. Hanafey & W. Powell. 2002. Microsatellite are not preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*. 30: 194-200.
- Muñoz M. & J. Warner. 2007 Distribución de poblaciones silvestres y descripción del hábitat de *Phragmipedium* en Costa Rica. *Lankesteriana* 7(1-2): 66-70.
- Muñoz M., J. Warner, F.J. Albertazzi. 2010. Genetic diversity analysis of the endangered slipper orchid *Phragmipedium langifalium* in Costa Rica. *Plant Syst Evol*. 290: 217-223.
- Ohbayashi K., Y. Hodoki, S. Nakayama, M. Shimada & H. Kunii. 2008. Development of new microsatellite markers from a salt-marsh sedge *Carex rugulosa* by compound simple sequence repeat-polymerase chain reaction. *Molecular Ecology Resources*. 8: 1497-1499.
- Park Y.-J., J. K. Lee, & N-S Kim. 2009. Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for evaluation of molecular diversity and germplasm classification of minor crops. *Molecules* 14: 4546-4569.
- Pellegrino G., M.E. Noce, F. Bellusci & A. Musacchio. 2006. Reproductive biology and conservation genetics of *Serapias vameracea* (Orchidaceae). *Folia Geobotanica*. 41: 21-32.
- Pfaff C.L., E.J. Parra, C. Bonilla, K. Hiester, P.M. McKeigue, M.I. Kamboh, R.G. Hutchinson, R.E. Ferrell, E. Boerwinkle, & M.D. Shriver. 2001. Population structure in admixed populations: Effect of admixture dynamics on the pattern of linkage disequilibrium. *Am. J. Hum. Genet*. 68: 198-207.
- Phuekvilai P., P. Pongtongkam & S. Peyachoknagul. 2009. Development of Microsatellite Markers for *Vanda* Orchid. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 43: 497-506.
- Pinheiro F., M.O. Santos, F. Barros, D. Meyer, A. Salatino, A.P. Souza & S. Cozzolino. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*. *Conservation Genetics*. 9:1661-1663.
- Pinheiro F., C. Palma-Silva, F. Barros & S. Cozzolino. 2009. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*. *Genetics and Molecular Biology*. 32(2): 337-339.

- Rakoczy-Trojanowska M. & H. Bolibok. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular & Molecular. Biololy. Letters.* 9 (2): 221-238.
- Rodrigues K. F. & S. V. Kumar. 2009. Isolation and characterization of 24 microsatellite loci in *Paphiopedilum rathschildianum*, an endangered slipper orchid. *Conserv Genet.* 10: 127-130.
- Rudd S., H. Schoof, & K. Mayer. 2005. Plant Markers - a database of predicted molecular markers from plants. *Nucleic Acids Research.* 33: 628-632.
- Semagn K., Å. Bjørnstad & M.N. Ndjondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology.* 5(25): 2540-2568.
- So A.P., R.F.B. Turner & C.A. Haynes. 2004. Increasing the efficiency of SAGE adaptor ligation by directed ligation chemistry. *Nucleic Acids Research.* 32(12). doi:10.1093/nar/gnh082
- Swarts, N.D. A.L. Batty, S. Hopper & K.W. Dixon 2007. Does integrated conservation of terrestrial orchids work? *Lankesteriana* 7(1-2): 219-222.
- Tang M., C.-X. Zeng, Y.-F. Bi & J.-B. Yang. 2012. Microsatellite markers for the Chinese endangered and endemic orchid *Cymbidium tartisepalum* (Orchidaceae). *American Journal of Botany.* 99(1): 11-13.
- Terwilliger J.D. 2000. Inflated false-positive rates in Hardy-Weinberg and linkage-equilibrium tests are due to sampling on the basis of rare familial phenotypes in finite populations. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 258-259.
- Tranbarger T.J., W. Kluabmongkol, D. Sangsrakru, F. Morcillo, J.W. Tregear, S. Tragoonrung & Norbert Billotte. 2012. SSR markers in transcripts of genes linked to post-transcriptional and transcriptional regulatory functions during vegetative and reproductive development of *Elaeis guineensis*. *BMC Plant Biology.* 12(1): 1-11.
- Ueno S., Y. Moriguchi, K. Uchiyama, T. Ujino-Ihara, N. Futamura, T. Sakurai, K. Shinohara & Y. Tsumura. 2012. A second generation framework for the analysis of microsatellites in expressed sequence tags and the development of EST-SSR markers for a conifer, *Cryptomeria japonica* *BMC Genomics.* 13(136): 1-16.

- Van Zonneveld M., X. Scheldeman, P. Escribano, M.A. Viruel, P. Van Damme, W. Garcia, C. Tapia, J. Romero, M. Sigueñas, J.I. Hormaza. 2011. Mapping genetic diversity of cherimoya (*Annana cherimala* Mill.): Application of spatial analysis for conservation and use of plant genetic resources. PLoS ONE 7(1): 1-14.
- Varshney R.K., A. Graner & M.E. Sorrells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. 23(1): 48-55.
- Vergnaud G. & F. Denoeud. 2000. Minisatellites: mutability and genome architecture. Genome Res. 10: 899-907.
- Victoria F.C., L.C. da Maia & A. Costa de Oliveira. 2011. In silico comparative analysis of SSR markers in plants. BMC Plant Biology 11(15): 1-15.
- Vignala A., D. Milan, M. Sancristobal & André Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genet. Sel. Evol. 34: 275-305.
- Zakrzewski F., T. Wenke, D. Holtgräwe, B. Weisshaar & T. Schmidt. 2010. Analysis of a c0t-1 library enables the targeted identification of minisatellite and satellite families in *Beta vulgaris*. BMC Plant Biology. 10(8): 1-14.
- Zane L., L. Bargelloni & T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology. 11: 1-16.
- Zhang L., K. Zuo, F. Zhang, Y. Cao, J. Wang, Y. Zhang, X. Sun & K. Tang. 2006. Conservation of noncoding microsatellites in plants: implication for gene regulation. BMC Genomics. (323): 1-14.