

K (10 mg/ml) a cada pocillo de la placa. La placa sellada se introdujo en un termociclador con el siguiente programa de extracción:

- incubación de la placa durante 90 minutos a 55 °C;
- inactivación de la enzima proteinasa K durante 15 minutos a 99 °C,
- mantenimiento de la placa un minuto a 37 °C,
- desnaturalización durante 15 minutos a 99 °C
- pausa de 15 °C.

Tras la extracción, la placa se agitó utilizando un vórtex durante unos 10 segundos y se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos manteniendo la temperatura a 20 °C. De esta disolución se tomaron 4 µl del sobrenadante para la reacción de amplificación por PCR.

1.3. ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL (ADNmt)

La amplificación y el análisis del ADNmt se llevaron a cabo según el método descrito por Garnery y cols. (1993), el cual se basa en la amplificación de la región intergénica ARNt^{leu}-cox2 mediante los cebadores E2 (5'-GGCAGAATAAGTGACATTG- 3') y H2 (5'- CAATATCATTGATGAACC -3') localizados en el ARNt^{leu} y en la subunidad II de la citocromo oxidasa respectivamente. Dicha región está formada por secuencias de tamaño y composición conocidas. Se utilizaron PCR *beads* de GE Healthcare con un volumen final de 25 µl y una concentración 0,2 µM de cada cebador más 4 µl de ADN. Estos *beads* contienen todos los reactivos necesarios para la amplificación por PCR excepto los cebadores y el ADN diana.

El programa de amplificación consistió en:

- desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos
- 36 ciclos de 45 segundos a 95 °C (desnaturalización), 1 minuto a 47 °C (anillado), 1 minuto y 30 segundos a 72 °C (extensión)
- extensión final durante 10 minutos a 72 °C

Los fragmentos amplificados se examinaron en gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta. Para ello se separaron alícuotas de 2,5 µl mediante electroforesis durante 30-45 minutos y se determinaron el tamaño y la composición de la región intergénica mediante comparación con estándares de tamaño conocido.

Posteriormente se realizó un test basado en la técnica de RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción), consistente en una restricción con una endonucleasa (*DraI*) del producto de PCR, la cual genera patrones de bandas identificables por sus diferencias de tamaño. Las digestiones se prepararon usando alícuotas de 20 µl de los fragmentos amplificados y 6 unidades de la enzima *DraI* para cada muestra. Estas digestiones se realiza-