
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION BIOLOGIA



CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
BIBLIOTECA CENTRAL

**IDENTIFICACION DE *Quercus resinosa* Liebm y
Quercus magnoliifolia Nee (Fagaceae) POR MEDIO
DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD's)**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
MARIA EDUWIGES VELAZQUEZ RIVERA
GUADALAJARA, JALISCO. JULIO DE 1998

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS:

Al Alfredo Corona Rivera por su apoyo confianza y sobre todo su paciencia.

A la Dra. June Simpson por haber permitido trabajar en el laboratorio a su cargo y a la M.C. Azucena Mendoza H. por apoyo en la realización de el presente trabajo.

Al Dr. Enrique Corona Rivera por haberme permitido trabajar en el laboratorio a su cargo.

A todas las personas que laboran en el laboratorio de citogenética humana por su amistad y apoyo.

C. M.C. ARTURO OROZCO BAROCIO
 PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
 DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
 DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
 P R E S E N T E.

Por este conducto me permito poner a su consideración mi anteproyecto de tesis titulado:
IDENTIFICACION DE Quercus resinosa (L.) y Quercus magnifolia Nee (Fagaceae)
POR MEDIO DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD's).,
 el cual se anexa, para que sea turnado al Comité de Titulación de esta dependencia para su revisión y en su caso
 aprobación.

Asimismo pongo a su consideración a:

C. DR. ALFREDO CORONA RIVERA

como Director de Tesis. Así mismo, como asesor (No indispensable, opcional) a:

ING. RAYMUNDO RAMIREZ Y M.C. AZUCENA MENDOZA H.

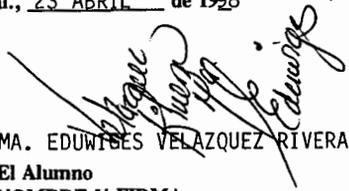
Sin otro particular, aprovecho la ocasión para reiterarle mi consideración más distinguida.

A T E N T A M E N T E

Las Aguas, Nextipac, Zapopan, Jal., 23 ABRIL de 1998

Vo.Bo.


 C. DR. ALFREDO CORONA RIVERA
 El Director
 NOMBRE Y FIRMA


 MA. EDUWIGES VELAZQUEZ RIVERA
 El Alumno
 NOMBRE Y FIRMA

ING. RAYMUNDO RAMIREZ Y M.C. AZUCENA MENDOZA H.
 EL ASESOR

EXCLUSIVO COMISION DE TESIS

SINODALES

APROBADO

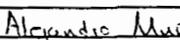
FECHA

1 DR. SERVANDO CARBAJAL HERNANDEZ

2 DR. CARLOS ALVAREZ MOYA

3 DR. JAIME ALVAREZ DE LA CUADRA

SUPL. ALEJANDRO MUÑOZ URIAS


 Alejandro Muñoz Urias

23 04 98



C. M.C. ARTURO OROZCO BAROCIO
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación en la modalidad de T E S I S que realizó el (la) pasante:

MARIA EDUWIGES VELAZQUEZ RIVERA

con el título:

"IDENTIFICACION DE Quercus resinosa Liebm y Quercus magnoliifolia Nee POR MEDIO DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD'S)",

consideramos que ha quedado debidamente concluído, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

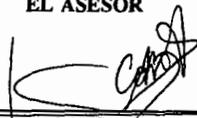
Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, 23 DE ABRIL 1998

EL DIRECTOR DE TESIS

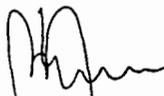
C. DR. ALFREDO CORONA RIVERA
NOMBRE Y FIRMA

EL ASESOR

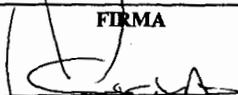

NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

1.- DR. SERVANDO CARBAJAL HERNANDEZ
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

2.- DR. CARLOS ALVAREZ MOYA
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

3.- DR. JAIME ALVAREZ DE LA CUADRA
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

ÍNDICE

	PÁG.
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	10
OBJETIVOS	12
HIPÓTESIS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	58
BIBLIOGRAFÍA	61

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS.

IDENTIFICACION DE *Quercus resinosa* Liebm y *Quercus magnoliifolia* Nee (Fagaceae)
POR MEDIO DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD's).

TESISTA: Ma. EDUWIGES VELAZQUEZ RIVERA.

DIRECTOR: C. DR. ALFREDO CORONA RIVERA.

ASESORES: ING. RAYMUNDO RAMIREZ.

M.C. AZUCENA MENDOZA H.

SEDE: Area de citogenética del Laboratorio de Genética Humana del Departamento de Fisiología, División de disciplinas básicas, CUCS Universidad de Guadalajara y el Departamento de Genética del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Irapuato (CINVESTAV).

INTRODUCCION.

México se ubica entre los países que cuentan con un gran número de encinos y robles representados por alrededor de 200 especies del género Quercus (Fagaceae), de los cuales alrededor de 42 especies corresponden al estado de Jalisco (McVaugh 1974). Por su gran adaptación a los suelos erosionados y su abundancia, resultan importantes desde el punto de vista ecológico. Además, aprovechados de manera racional, representan un beneficio económico considerable. La mayoría de las especies, son caducifolias, esto es, que pierden sus hojas en la temporada de secas del año. Los encinares habitan áreas montañosas y bosques mesófilos, por lo común asociados con Abies. La falta de un inventario y trabajos ecológicos sobre las especies de Quercus, y principalmente por el desconocimiento de sus propiedades tecnológicas, han hecho que tengan un bajo aprovechamiento (González 1987). La madera de encino es muy estimada en otros países, en cambio en nuestro país el uso que se le da a la gran mayoría de ellos es en la producción de carbón, leña así como material celulósico para la producción de papel y algunos fines medicinales. Así es como han desaparecido grandes extensiones de encinares.

Entre los estudios de los encinos y robles mexicanos existe divergencia respecto al número de especies, probablemente por que en los primeros trabajos no se consideraron las variaciones entre la misma especie (Martínez 1951; Trelease 1969; McVaugh 1974; González 1987). El estudio de McVaugh (1974) precisa para la Nueva Galicia (Jalisco, Sur de Zacatecas, Oeste de Guanajuato, Sur de Durango, Noroeste de Michoacán y Sur de Nayarit) 43 especies de las cuales 37 corresponden a Jalisco, mientras que González Villareal (1987), reporta 42 especies para el mismo estado, destacando que corresponden por partes iguales a los subgéneros Leucobalanus (encinos blancos) y Erythrobalanus (encinos rojos). Es interesante observar que los encinos más abundantes y frecuentes en el estado son los constituidos por Quercus castanea Née, Quercus magnoliifolia Née y Quercus resinosa Liebm los cuales se asocian al género Pinus. Con él comparten y dominan grandes extensiones del Estado.

En los trabajos realizados sobre Quercus en Jalisco se han utilizado claves taxonomicas (Swanson 1971; McVaugh 1974; Bello 1987; González 1987; Zavala 1989). La asignación nomenclatural resulta compleja en ocasiones debido a la presencia de hibridación interespecifica, la cual determina errores que impiden una identificación precisa. Dicha situación se observa en

muchos complejos del género Quercus y en particular en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia dos especies muy afines (Martínez 1951; McVaugh 1974; González 1987).

Existen estudios especializados los cuales incrementan la precisión en la identificación de especies debido a que en lugar de considerar fenotipos morfológicos se utilizan fenotipos a nivel celular o molecular, los cuales son menos afectados por la influencia del ambiente. Tal es el caso de los estudios citogenéticos los cuales permiten establecer el complemento diploide basándose en el número y forma de los cromosomas característicos de una especie, lo cual resulta de gran ayuda en la identificación de las especies, además del origen de la ploidía el cual puede ser por hibridación. A nivel molecular es posible evaluar el grado de variabilidad en la secuencia de proteínas o de ADN. Cuando se generan nuevas especies, cada una representa una carga genética que evolucionará independientemente. Por comparación de proteínas en dos especies podemos detectar las diferencias que han acumulado entre ellas en su proceso evolutivo. Algunas proteínas están altamente conservadas, mostrando muy poco o ningún cambio de especie a especie. De forma similar las diferencias y similitudes en patrones de ADN permiten distinguir individuos, especies o géneros diferentes. (Lewin 1990).

El ADN es un polímero lineal de nucleótidos. Cada nucleótido contiene una azúcar fosfatada en 5' y una de las cuatro bases alternativas en 1': adenina (A), citocina (C), guanina (G), ó timina (T). Su estructura comprende dos hebras antiparalelas en dirección 5'→3' y 3'→5' en hélice alfa a la derecha, unidas por puentes de hidrógeno de forma específica, la A con la T y la G con la C. En consecuencia, el conocimiento de la secuencia de una de las hebras permite deducir la secuencia de la otra, y conduce a la existencia del código genético, (Ronald 1994).

Utilizando procedimientos de cinética de reasociación, la cual depende de la complejidad de la secuencia de bases y del contenido de pares de bases G:C, el ADN que conforma el genoma de una especie puede ser clasificado como sigue (Lewin 1990):

1.- ADN de Secuencias No Repetitivas: Corresponde a la fracción de reasociación lenta. Son secuencias únicas en el genoma que corresponden a la mayoría de los genes. Los genomas de procariones están formados sólo por estas secuencias mientras que en plantas corresponde al 20% del ADN total.

2.- ADN de Secuencias Moderadamente Repetitivas: Corresponde a la fracción intermedia de reasociación. Son las secuencias cortas de ADN simple repetidas, idénticas o relacionadas. Se encuentran dispersas e intercaladas entre regiones de ADN no repetitivo.

3.- ADN de Secuencias Altamente Repetitivas: Corresponde a la fracción de reasociación más rápida. Son secuencias muy cortas de ADN simple repetidas, idénticas o relacionadas, las cuales al igual que las secuencias moderadamente repetidas se encuentran dispersas e intercaladas entre las regiones de ADN no repetitivo.

Una alternativa de clasificación del ADN genómico más precisa se basa en las diferentes densidades de flotación en gradientes de cloruro de cesio por ultracentrifugación separando al ADN por su contenido de G:C. La mayoría del ADN contiene más del 30% de pares G:C, concentraciones menores se observan como bandas adicionales denominadas de ADN satélite (ADNsat), que corresponde a secuencias de ADN repetitivo. Se han detectado familias principales de ADNsat como las secuencias Alu y LI. En centrómeros y telómeros se han detectado ADNsat, tipo α , β , y III.

El evento primario de variación en el ADN es la mutación. Los eventos mutacionales ocurren a todo lo largo del ciclo celular, en particular durante la replicación del ADN, tanto en regiones génicas como en el resto de ADN. Las mutaciones a este nivel pueden ser divididas en:

1.- Mutaciones Puntuales, este es un cambio que afecta un solo par de bases en un gen. Dichos cambios consisten en transiciones (sustitución de una pirimidina por otra pirimidina ó de una purina por otra purina) o transversiones (cambio de una purina por una pirimidina o viceversa).

2.- Rearreglos, los cuales afectan regiones largas ya sea por adición (inserción) o pérdida (deleciones) de segmentos de ADN.

Las mutaciones constituyen la fuente primaria de variabilidad. Resulta ventajoso que haya una tasa de cambios pequeña, pero finita, dado que proporciona una fuente constante de variaciones fenotípicas nuevas que permite la adaptación de plantas y animales a un ambiente físico y biológico en permanente cambio, contribuyendo además al proceso de especiación (Watson 1976).

No todo el ADN de un genoma presenta una variabilidad de utilidad taxonómica. Las regiones en la secuencia de ADN con una variación mayor a 1% son consideradas sitios polimórficos, los cuales al ser utilizados como marcadores permiten caracterizar individuos y/o poblaciones. Dicha variación se presenta principalmente en la longitud de un fragmento repetido o en el número de copias. En el caso de los polimorfismos, los cambios de pares de bases son más frecuentes que los grandes rearrreglos, y la heterogeneidad no es restringida por una región codificada. Los polimorfismos al nivel de ADN son además mucho más frecuentes que los cambios en proteínas.

El estudio de los sitios polimórficos del ADN se ha utilizado en el humano, para la identificación de individuos con fines forenses o de diagnóstico de paternidad así como diagnóstico molecular de enfermedades genéticas, entre otras. Por otro lado en plantas, las principales aplicaciones de estas técnicas ha sido en la identificación de polimorfismos característicos de una especie que indiquen resistencia a ciertos patógenos virales o pesticidas, a la identificación y caracterización de genes que regulan características de importancia agronómica y en la caracterización de especies, pudiendo ser utilizadas como herramienta taxonómica para su diferenciación (Ronald et al 1995).

El uso de marcadores moleculares está basado en la ocurrencia natural de polimorfismos. El entendimiento de esta ocurrencia de polimorfismos es una base para diseñar estrategias aplicables en la práctica. Los polimorfismos en las poblaciones naturales difieren de especie a especie. De manera que los polimorfismos constituyen una fuente rica de datos genéticamente interpretables para el diseño de estrategias que puedan ser utilizadas en la práctica para la identificación de individuos. Debido a su confiabilidad, su uso se ha incrementado. Algunos de los métodos más usados para la detección de polimorfismos en plantas, son:

VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tandem). Corresponde a los minisatélites. Son secuencias cortas de ADN simple de 5 a 50 pares de bases repetidas en tandem. Son altamente variables, la variabilidad alélica es el resultado de un número diferente de copias presentes entre dos sitios de restricción de los diferentes alelos de un mismo locus. El número de segmentos repetitivos en un locus varía entre los individuos, por lo que resulta poco probable que dos individuos compartan los mismos alelos. Los minisatélites o VNTR son especialmente útiles para

el mapeo del genoma, debido a que hay una alta probabilidad de que un individuo varíe en sus alelos. Estos pueden dejar al descubierto los polimorfismos diferentes entre individuos de una misma población.

Microsatélites: Este método es parecido a la técnica de los minisatélites, sólo que en este caso se utilizan secuencias mucho más cortas de 1 a 6pb tales como $(GC)_n$ ó $(CAC)_n$. Algunos estudios han demostrado que la segregación de microsatélites y minisatélites puede ser como marcadores codominantes.

AFLP's (Amplificación de Fragmentos Polimórficos en Longitud) Se basa en el uso de PCR con la ventaja que se pueden tamizar múltiples marcadores en una sola muestra. Parte de la amplificación de fragmentos de restricción seleccionados. El ADN del organismo de interés es digerido con dos enzimas de restricción con diferente frecuencia de corte, por ejemplo EcoRI y MseI. Posteriormente se usan adaptadores biotinilados para EcoRI que se unen a los extremos cortados por EcoRI, lo cual permite purificar aquellos fragmentos con extremos EcoRI-EcoRI y EcoRI-MseI. La mezcla purificada se somete a una amplificación por PCR preliminar utilizando oligonucleótidos específicos como cebadores (primers) para EcoRI y MseI más una base extra permitiendo la amplificación de sólo aquellos fragmentos que contengan secuencias complementarias. Una segunda amplificación se lleva a cabo de manera similar pero con 3 bases extra, una de ellas marcada con fósforo radiactivo dando lugar a un subgrupo de fragmentos de restricción de PCR se corren en gel. El resultado es de 50 a 100 bandas por carril polimórficas con la ventaja de que el uso alternativo de primers con tres bases adicionales diferentes permite la selección de subgrupos de polimorfismos de utilidad.

RFLP's (Polimorfismos en Fragmentos Grandes de Restricción) Con este procedimiento es posible obtener patrones polimórficos de bandas debido a variaciones en los sitios de restricción, a partir de muestras de ADN total o amplificado por PCR. El ADN de interés es digerido por enzimas de restricción, posteriormente es transferido a filtros de nitrocelulosa, y de ser necesario, se hibridiza con sondas de secuencia conocida. Finalmente se revela un patrón de bandas. Este procedimiento requiere el conocimiento previo de secuencias de oligonucleótidos iniciadores o sondas a utilizar.

RAPD's (Polimorfismos en la Amplificación al Azar de ADN genómico). Este método se basa

en la utilización de un par de primers idénticos que permiten amplificar segmentos de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La complejidad del ADN nuclear eucariótico es suficientemente alta como para que exista al azar mas de una copia idéntica de secuencias cortas de octa o decanucleótidos en las cuales ocurran mutaciones puntuales. Si se utilizan entonces, primers únicos de secuencia corta para una amplificación por PCR reconocerán mas de un sitio complementario, generando diversos segmentos amplificados dependiendo del correcto espaciamiento y orientación. El resultado es que cada uno de los segmentos amplificados constituye una banda y en conjunto patrones de bandas las cuales son específicas para cada individuo en la población. La variabilidad en el número y posición de las bandas es considerada un polimorfismo, comúnmente llamado polimorfismo de ADN amplificado al azar. La mayoría de las variaciones individuales por RAPD's se debe probablemente a aumentos en la sustitución o inserción/delección que modifican el sitio del primer, o a la inserción en el genoma de secuencias que separaron el sitio del primer a una distancia que no permitirá la amplificación (William et al 1990). Cada uno de estos cambios resulta en la presencia o ausencia de fragmentos de RAPD's. Por esta razón los RAPD's son dominantes en el sentido de que la presencia de una banda de RAPD's no permite la distinción entre hetero o homocigotos. (Ronald et al 1995).

La PCR consiste en la inducción de ciclos repetidos de la síntesis de segmentos cortos de ADN limitados por los oligonucleótidos para producir gran cantidad de copias a partir de una secuencia original. A diferencia de una reacción típica de PCR, un solo primer en vez de un par de primers es utilizado para la amplificación. En todas las amplificaciones de PCR tenemos los siguientes pasos:

1. - *Desnaturalización de la doble hélice de ADN*: El ADN genómico aislado debe mantenerse separado en hebras sencillas. Lo anterior se logra gracias a que los puentes de hidrogeno son fácilmente separados mediante la aplicación de calor, 94°C es suficiente para lograrlo.

2.- *Alineamiento de los primers*: La ADN polimerasa elonga las hebras ya existentes de ADN. Por lo tanto se requiere de un segmento corto con un extremo 3' libre para iniciar la síntesis de una hebra nueva de ADN. Los primers cumplen esta función. Estos son secuencias cortas complementarias al ADN plantilla. Los primers no son complementarios entre ellos si no que son complementarios a una hebra opuesta de la plantilla complementaria a partir de cada una de las

cuales puede ser elongada la hebra de ADN por la acción de la ADN polimerasa. La alineación de los primers debe ser realizada a temperaturas elevadas suficientes para permitir la hibridación del primer pero no la reasociación de las hebras parentales.

3. - *Extensión de los Primers*: El tercer paso en el ciclo es la extensión de los primers en dirección 5'→3' usando una ADN polimerasa y desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's). La extensión de los primers resultará en una síntesis de una copia adicional de ADN entre los primers. La ADN polimerasa que más es utilizada es la Taq polimerasa la cual es aislada de la bacteria Thermus aquaticus. Esta ADN polimerasa no se destruye por las altas temperaturas y trabaja con un máximo de 72°C, por lo que una sola alícuota de enzimas puede ser utilizada para muchos ciclos de PCR.

4. - *Repetición de los pasos 1-3*: El ADN iniciador se multiplicará exponencialmente cada ciclo de pasos 1-3. En el primer ciclo la segunda hebra será sintetizada a partir de la doble hélice desnaturalizada original, detendrá la síntesis hasta llegar a uno de los extremos de cada hebra original, a partir del segundo ciclo, fragmentos recién sintetizados tendrán la longitud determinada por la posición del par de primers, lo anterior resultará en la amplificación de segmentos de una misma longitud. Eventualmente, un equilibrio es alcanzado y ya no es sintetizado más ADN. Este equilibrio se alcanza entre los 20 y 30 ciclos.

Algunas ventajas de los RAPD's son que no requieren de una labor intensiva, ni es necesario construir o mantener una biblioteca genómica. Además se quiere de cantidades muy pequeñas de ADN genómico. Los RAPD's proveen de un número ilimitado de marcadores de todo el genoma. Los datos preliminares sugieren que los RAPD's revelan altos niveles de polimorfismos ya sea de manera inter o intraespecífica. Es importante considerar que la presencia de bandas compartidas entre individuos es evidencia de homología, sin embargo, la ausencia no es informativa dado que la pérdida de fragmentos amplificados se puede deber a un gran número de eventos independientes.

El uso de RAPD's tiene diferentes aplicaciones, por ejemplo se han utilizado para la identificación de variedades de Theobroma cacao (Wilde et al 1992), en trabajos de hibridación en Helianthus anomalus (Rieseberg et al 1993), o en estudios de flujo genético en especies del género Iris (Arnold et al 1991), entre otros.

El estudio de polimorfismos en encinos tiene la limitante de poco o nulo conocimiento de sus secuencias de ADN, por lo que los métodos que determinan variabilidad de secuencia anónima como los RAPD's constituyen una excelente alternativa.

ANTECEDENTES :

La amplificación al azar de ADN (RAPD's) representa los productos amplificados de la reacción en cadena (PCR) utilizando oligonucleótidos al azar y ADN genómico. Los oligonucleótidos usados para RAPD's son normalmente pares idénticos de 10pb de longitud y tienen un contenido de G:C por lo menos en un 50%. Los productos de la amplificación son observados en los geles de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Cada uno de estos cambios resulta de la presencia/ausencia de un fragmento de (RAPD's) en particular. Por esta razón siguen un patrón de herencia Mendeliana. Los cambios son debidos principalmente a la sustitución inserción o delección de pares de bases que modifican el sitio de reconocimiento el cual es complementario al primer ya sea por cambio en su secuencia o en la longitud del segmento amplificado.

En el género Quercus existen trabajos de caracterización molecular utilizando (GA/CT)_nmicrosatélites para conocer el grado de diferencias genéticas en Quercus macrocarpa. Se demostró que los (GA/CT)_n microsatélites son abundantes y altamente polimórficos en el genoma del encino, sugiriendo que tales marcadores tienen un tremendo potencial para su aplicación en estudios de parentesco y polinización (B.D. Dow 1995). Otro trabajo utilizó polimorfismos en ADN de cloroplastos para ver distribución geográfica de los encinos europeos Quercus petraea, Quercus robur, Quercus pubescens y Quercus pyrenaica. En dichas poblaciones fue posible detectar un nivel bajo de flujo de genes citoplasmáticos lo cual podría servir para reconstruir rutas de migración en el pasado de tales especies (Petit 1993). Trabajos con (RAPD's) se han reportado para analizar relaciones filogenéticas entre Quercus rugosa Née, Quercus obtusata Humb. et Bonpl. y Quercus laeta Liebm.. Con los resultados obtenidos de este trabajo se pudo proponer que Quercus laeta es antecesor de las otras dos especies, las cuales presentaron entre sí poca similitud. Los datos moleculares, mostraron entonces una interrelación no observable habitualmente por características microscópicas. En este trabajo se utilizaron marcadores de herencia nuclear y genes de herencia materna (mitocondrias), (Urbe 1994). Sin embargo las especies de Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia no han sido estudiadas no obstante su amplia distribución en el Estado de Jalisco. En algunas zonas del Estado en donde ambas especies habitan de manera simpátrica personal del Instituto de Botánica de la U. de G. ha observado individuos que presentan características tanto de una especie como de otra lo que

dificulta su identificación.

El estudio de las relaciones filogenéticas de los seres vivos y sus problemas de identificación, clasificación y nomenclatura se pueden abordar mejor entre más criterios sean definidos no solo a nivel morfológico macroscópico, sino a niveles más cercanos a la expresión primaria del genoma. El presente trabajo pretende a partir de una identificación confiable con procedimientos habituales de las especies Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia diferenciarlas por medio de marcadores moleculares (RAPDs).

OBJETIVOS:

Objetivo General:

Identificar las especies Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia mediante el uso de RAPD's.

Objetivos Particulares:

- 1.1 Delimitar las zonas de estudio.
- 1.2 Caracterizar morfológicamente cada una de las especies, (Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia) con ayuda de claves taxonómicas.
- 1.3 Obtención de ADN de hojas de una población de Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.
- 1.4 Evaluar la capacidad de los RAPD's para identificar especies del género Quercus.

HIPÓTESIS:

Los RAPD's permiten realizar la identificación de dos especies del género Quercus, Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

MATERIAL Y MÉTODOS :

ZONA DE MUESTREO:

Se seleccionaron dos áreas de muestreo, una para cada especie, en base a los registros reportados para estas especies en el Estado de Jalisco (González 1987). En cada área se marcaron diez árboles no próximos uno de otro. Dichas zonas se encuentran aisladas una de otra geográficamente y forman parte de vastas extensiones independientes.

Las zonas seleccionadas fueron :

1.- Encinar compuesto exclusivamente por Quercus magnoliifolia , Municipio de Zacoalco de Torres por el camino Santa Clara - Atemajac de Brizuela. Localizado en 20° 12' 8" de Latitud Norte 103° 40' 00" de Longitud Oeste y Altitud de 2,100 m.s.n.m.

2.- Encinar compuesto exclusivamente por Quercus resinosa : Municipio de Villa Guerrero Km 50 camino San Martín de Bolaños - Villa Guerrero . El cual se localiza a 21° 51' 8" Latitud Norte, 103° 40' 9" Longitud y Altitud de 1,600 m.s.n.m.

IDENTIFICACIÓN POR TAXONOMÍA CLÁSICA.

Se colectaron muestras de hojas, flor y fruto de cada individuo, para confirmar con criterios de taxonomía clásica que los árboles seleccionados correspondían a cada especie.

La identificación fue realizada gracias al apoyo del el Ing. Raimundo Ramírez en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

De cada individuo se tomaron muestras de las hojas más jóvenes y se colocaron en dióxido de carbono sólido para mantenerlas a baja temperatura (-70°C). Las muestras fueron transportadas en las mismas condiciones al laboratorio y se conservaron en el refrigerador hasta el momento de ser utilizadas.

EXTRACCIÓN DE ADN :

La extracción de ADN de los encinos se dificulta ya que las hojas de éstos están cubiertas de un denso tomento en ambas superficies, poseen también abundantes pelos glandulares (González 987), así como un alto contenido de polifenoles (taninos) y polisacáridos. Por tal razón fue necesario estandarizar la extracción de su ADN, para lo cual se evaluaron dos técnicas de extracción (Lodhi et al. 1994, Dellaporta et al. 1983). A continuación se describe la técnica con la que se obtuvieron mejores resultados (Dellaporta et al. 1983):

- Técnica de Dellaporta.

- 1.- Tomar aproximadamente 2.5 gr. de hoja y colocar en nitrógeno líquido, macerar hasta obtener un polvo fino.
- 2.- Agregar 20ml. de amortiguador de extracción (100mM-TRIS-HCl p.H 8, 50 mM NaCl, 10mM beta -mercaptoetanol, 1.3 % SDS) e incubar a 65°C durante 10 min.
- 3.- Agregar 6.6 ml. de acetato de potasio a 5M, mezclar e incubar durante 30min. En hielo.
- 4.- Centrifugar durante 20min. a 18000rpm. (entre 4 y 10°C).
- 5.- Filtrar sobre 20ml. de isopropanol pre-enfriado en un tubo de ensayo mezclar bien y dejar a -20 °C por lo menos 30min.
- 6.- Entonces aparecerá una madeja blanca de ADN atrapar y transferir a 700 µl de solución amortiguadora (50Mm Tris-HCl p.H 8 10 mM EDTA).
- 7.- Agregar 4µl ARNasa (10 mg/ML) e incubar durante 30min. A 37°C.
- 8.- Llevar a cabo una segunda precipitación, agregando 75µ l. de acetato de sodio 3M y 500µ l de isopropanol frío. Dejar a -20°C por 2 horas.
- 9.- Colectar el ADN y lavar con etanol al 80% y escurrir lo más posible.
- 10.- Resuspender en 200 µl de T.E (tris -HCl p.H 8 EDTA 1Mm) y almacenar a -4°C.

AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR.

El ADN obtenido de cada individuo fue usado directamente en reacción de PCR utilizando un termociclador Perkin-Elmer 9600. Cada reacción de amplificación requirió de un solo oligonucleótido por lo que la misma secuencia complementaria delimitó las regiones de ADN a ser amplificadas. Se utilizaron 14 oligonucleótidos diferentes.

La amplificación se llevó a cabo los siguientes pasos:

1.- Se prepara la mezcla de reacción:

12.0 μ l H₂O

2.5 μ l buffer (10mM Tris-Cl p.H, 50 mM KCl)

1.3 μ l Mg²⁺

2.0 μ l dNTPs

0.2 μ l Taq polimerasa

2.0 μ l BSA (Suero de Albumina de Bovino).

3.0 μ l oligonucleotido

2.- Toda esta mezcla se pasa a tubos para PCR.

3.- Se agrega 2 μ l de ADN genómico a cada uno de los tubos y se mezcla muy bien .

4.- Se amplifican en el siguiente programa :

1 ciclo 2 min. a 94°C

40 ciclos 1 min. a 94°C

2 min. a 37°C

2 min. a 72°C

1 ciclo 7 min. a 72° C

5.- Se almacenan a 4°C hasta su corrimiento.

Los oligonucleotidos utilizados fueron elegidos en base a un reporte previo (Uribe 1994) para Quercus rugosa, Quercus obtusata y Quercus laeta ,dado que resultaron ser informativos. Cada uno de los catorce oligonucleotido estuvo formado por secuencias de 10 pares de bases y un contenido de GC por lo menos de un 50 % (Operon Technology Alameda, California) se enlistan a continuación:

OPJ-15	TGTAGCAGGG
OPH-20	GGGAGACATC
OPH-19	CTGACCAGCC
OPH-18	GAATCGGCCA
OPH-17	CACTCTCCTC
OPH-15	AATGGCGCAG
OPH-14	ACCAGGTTGG
OPH-12	ACGCGCATGT
OPH-1	TCTCAGCTGG
OPG-05	CTGAGACGGA
OPE-04	GTGACATGCC
OPD-03	GTCGCCGTCA
OPC-13	AAGCCTCGTC
OPB-07	GCTGACGCAG

CORRIMIENTOS ELECTROFORETICOS:

Se realizó un corrimiento simultáneo de todas las muestras por oligonucleotido en geles de agarosa al 1.2% , a 120 volts y 96 watts, durante dos horas y media. A cada carril se agregó un volumen de 19 μ l de la mezcla de reacción amplificada más 1 μ l de colorante azul de bromofenol y xilenglicol. Se utilizó como marcador de peso molecular Hind III.

Al finalizar el corrimiento el gel se transfirió a bromuro de etidio y se mantuvo allí durante 20 minutos, y posteriormente se destiñó el excedente con agua. La observación se realizó en un transluminador de luz ultravioleta y se tomaron impresiones fotográficas en negativos con una cámara instantánea polaroid.

ANALISIS DE LOS CORRIMIENTOS ELCTROFORETICOS

Dada la complejidad de los patrones de bandas obtenidos, fue necesario el uso de programas de estadística especializados para la realización de pruebas de concordancia (programa para análisis de matrices) y pruebas de análisis de agrupamiento o "cluster analysis" (programa SPSS V.3.1 para Windows). Obteniendo los dendogramas con el método de ligamiento promedio

RESULTADOS:

IDENTIFICACION DE LOS MIEMBROS DEL GRUPO DE ESTUDIO.

Se estudiaron 20 individuos en total y se agruparon por zona de muestreo de la siguiente manera:

Grupo Quercus resinosa; individuos del 01 al 10.

Grupo Quercus magnoliifolia; individuos del 11 al 20.

Se colectaron a un tiempo hojas maduras de cada individuo por zona de muestreo. La identificación se realizó utilizando claves dicotómicas (Martínez 1951) y descripciones previas realizadas por Villarreal y cols. (1987). La caracterización morfológica obtenida a partir de las observaciones realizadas en hojas fue la siguiente:

Quercus resinosa: Hojas jóvenes muy tomentosas en ambas superficies, el haz teñido de rojo debido a la cubierta de pelos glandulares vermiformes los cuales son más largos que los pelos estrellados; envés densamente pálido tomentoso, con abundancia pelos glandulares solamente sobre las nervaduras; hojas maduras decíduas, grandes y tiesas, pálido tomento de el envés, anchamente obovadas, de 15-30cm de largo, de 9-20cm de ancho, de abruptamente angosta a ampliamente redondeadas o con menos frecuencia con el ápice obtuso u obtusamente acumulado, la base un tanto subcordada; bordes generalmente plegados, engrosados y revolutos, sinuados a ampliamente sinuado-dentados, dientes de 8-18 en cada lado, por lo general bajos, redondeados y asimétricos, ápices callosos pero con el mucrón generalmente doblado hacia adentro junto con el borde revolutivo; nervaduras de 10-20 en cada lado, ascendentes, pasan directamente hasta los dientes cuando éstos están presentes, por lo general rectas y paralelas, no así las nervaduras intermedias; haz duro, verde, un tanto lustroso, ruguloso, con una fina y persistente pubescencia estrellada, las nervaduras primarias cortas y no bien impresas, las secundarias impresas y las más pequeñas pálidas y convexas; envés densamente pálido tomentoso o con pelos suaves y delgados, los pelos con frecuencia sésiles y sobrepuestos pero no ocultan la epidermis, ésta papilosa y glandular pero no ampolladas; nervaduras primarias y secundarias forman en elevado retículo, las

nervaduras más pequeñas no discernibles.

Quercus magnoliifolia: Hojas jóvenes con el haz verde, por lo general copiosamente pubescente, con pelos cortos simples, vermiformes, glandulares, rojizos o de color ámbar y con un tomento esparcido estrellado-pubescente, envés tomentoso, glandular principalmente cerca de las nervaduras; hojas maduras muy grandes y tiesas, envés pálido-tomentoso, muy amplias y un tanto estrechamente obovadas, rara vez elípticas, de 15-25cm de largo, de 7-12cm de ancho, un tanto abruptamente angosta a ampliamente redondeada, ápice obtuso o subagudo, de la parte media de la hoja hacia la base gradualmente angosta y terminada en punta, la base cuneada, aguda, redondeada o auriculada; bordes engrosados y finamente revolutos, sinuados o marcadamente sinuado-dentados, los dientes de 10-20 en cada lado, la mayoría bajos, redondeados y asimétricos, ápices callosos o cortamente mucronados, pero el mucrón por lo general doblado hacia abajo junto con el borde revolutivo; nervaduras de 10-20 en cada lado, ascendente, generalmente rectas pasando hasta los dientes cuando éstos están presentes, las otras nervaduras se anastomosan cerca del borde; haz duro, lustroso, casi glabro, con frecuencia pubescentes en la base de la nervadura central y con pequeños pelos estrellados dispersos; nervaduras primarias notablemente impresas; las secundarias generalmente impresas y la hoja evidentemente rugulosa, las nervaduras más pequeñas pálidas y ligeramente elevadas; envés pálido tomentoso, los pelos sésiles, sobrepuestos, por lo general cubren el color verde de la hoja, la epidermis papilosa, ampollosa y glandular-puberulenta; nervadura primaria y secundaria bien marcada el retículo elevado, las nervaduras más finas solamente visibles como pequeñas líneas deprimidas entre las ampollas.

EXTRACCIÓN DE ADN.

La extracción de ADN resultó adecuada con la técnica de Dellaporta, et al. (1983) con la cual se obtuvo ADN íntegro y en cantidad suficiente (fig. 1). Lo anterior se logró después de que la técnica de Dellaporta sufrió algunas modificaciones dado que fué necesario realizar una limpieza extra con "gen-clean". Además fue necesario adicionar BSA (Albúmina de suero de bovino) a la mezcla de reacción de PCR. La técnica de Lodhi et al (1994) resultó más laboriosa aunque finalmente también se logró obtener ADN.

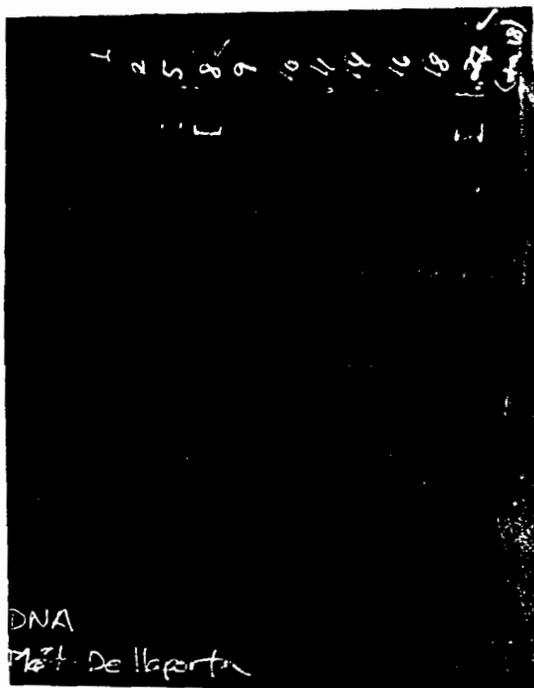


Figura 1. ADN obtenido con el método de Dellaporta. El número de la parte superior corresponde al número de individuo de ambos grupos.

PATRONES DE BANDAS

Se obtuvieron patrones de bandas productos de la ampliación por RAPD's de ambos grupos a la vez por oligonucleótido. Los corrimientos de los catorce oligonucleótidos se muestran en la Fig. 2 (a-m), cada carril corresponde a un árbol: los carriles 1-10 corresponden a individuos de Quercus resinosa; carriles del 11-20, Quercus magnoliifolia; carril 0 y 31 corresponden al marcador Hind III. Los carriles 21-30 corresponden a un grupo de individuos de ambas especies, los cuales no son considerados en el análisis estadísticos por ser misceláneos y por no corresponde a el objetivo del presente trabajo.

ANÁLISIS DE PATRONES DE BANDAS.

Los patrones de bandas obtenidas resultaron complejos dado que se observó en gran número, lo que dificultó una interpretación simple. Como consecuencia de dichos resultados, se definió un análisis alternativo el cual fue posible a partir de la conversión de patrones de bandas a valores binarios de la siguiente manera:

- 1.- Se estableció el total de posiciones posibles considerando todos los corrimientos por oligonucleótido obteniendo así una matriz estándar, la cual se transfirió a una plantilla cuadrículada transparente. Dicha plantilla quedó constituida por 20 columnas (total de individuos) y 40 renglones.
- 2.- Cada una de las fotografías obtenidas de los geles se colocó sobre la plantilla matriz estandar transparente para asignar a cada banda una posición de celda. A los sitios con banda presente se asignó el valor "1", mientras que el resto de las celdas donde había ausencia de bandas se les asignó el valor "0". Cuando una banda resultaba localizada sobre la línea que divide dos celdas de la columna correspondiente, se le asignaba una ubicación a la celda superior.
- 3.- Se obtuvieron 14 matrices, (cuadro del 1-14) una por cada oligonucleótido las cuales fueron tabuladas utilizando el programa Excel (Microsoft). Los archivos elaborados se utilizaron para el análisis estadísticos.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11												1		1	1					1
12																				
13																				
14			1						1											1
15									1											1
16					1															
17												1		1						1
18	1				1	1	1													
19			1		1							1								
20	1	1						1				1		1						
21			1		1		1													
22						1														
23															1	1				1
24					1			1	1	1		1	1	1						
25	1	1	1																	
26						1							1			1				
27																				
28																				
29					1															
30			1				1													
31																				
32																				
33																				
34				1																
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 1. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Oph15 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10		1			1							1								
11																				1
12		1												1						
13			1					1								1				
14														1	1					
15	1	1			1	1	1	1	1	1				1	1					
16								1					1	1		1		1		1
17	1	1	1		1	1		1	1	1										
18					1	1	1	1	1	1			1			1				
19			1																	
20			1																	
21		1			1		1					1	1				1			1
22		1													1	1				
23		1											1	1						
24																				
25								1	1				1							
26				1	1					1				1		1	1		1	1
27	1																			1
28																				
29																				
30		1			1	1		1	1											
31												1	1	1	1	1	1			1
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 2. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Oph18 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11	1								1			1	1	1	1	1		1	1	
12									1											
13		1			1	1			1			1		1	1					
14												1								1
15	1		1									1				1				
16			1				1								1					1
17						1		1				1		1						1
18									1				1		1	1	1			
19		1																		
20	1																			
21			1		1				1	1	1		1	1		1	1			1
22		1							1	1	1		1		1					1
23												1		1	1					
24						1			1						1					
25															1		1			
26			1				1						1		1					
27	1	1	1																	
28								1					1	1	1				1	1
29																				
30	1					1			1	1		1	1	1		1				
31																				
32													1	1						
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 3. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Oph17 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7					1															
8																				
9																				
10																				
11					1															
12							1								1					
13	1	1			1	1		1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1
14						1		1								1				1
15															1					1
16						1	1	1	1	1			1		1					
17	1	1													1					
18	1						1							1	1				1	1
19						1		1		1				1	1					
20		1			1								1	1	1	1	1	1	1	1
21					1		1	1	1	1										
22	1	1				1														
23																				
24													1	1			1			
25	1				1	1			1											
26																				
27																				
28																				
29														1						
30																				
31																				
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 4. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Oph14 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				
22			1				1													
23																				
24																				
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1			1	
26																				
27																				
28																				
29																				
30																				
31																				
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 5. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Opj15 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14			1				1													
15																				
16																				
17																				
18																				
19					1			1	1	1		1			1	1	1			1
20					1			1	1	1					1	1	1			1
21																				
22																				
23		1	1		1	1		1	1	1		1	1		1	1	1			1
24	1	1	1		1	1	1			1			1	1		1				1
25																				
26																				
27																				
28																				
29																				
30																				
31																				
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 6. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Oph16 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18												1	1	1		1				
19		1	1		1			1	1	1										
20																				
21			1					1	1						1	1				
22				1			1	1	1	1				1	1	1	1	1	1	1
23	1	1		1	1									1	1	1	1	1	1	1
24	1	1			1		1	1	1	1				1	1	1	1	1	1	1
25			1																	
26						1														
27																				
28																				
29																				
30			1																	
31																				
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 7. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Oph20 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12												1								
13					1			1	1	1		1	1			1				
14					1	1	1	1	1	1		1	1	1	1		1			
15	1	1	1		1	1	1	1	1	1		1	1			1	1		1	1
16		1	1			1										1				
17					1															
18			1		1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1			
19	1	1	1			1	1												1	1
20			1					1					1			1				
21																			1	
22	1		1	1		1		1	1	1		1	1	1	1	1	1		1	1
23		1																		
24	1		1																	
25		1			1	1		1	1	1		1	1	1	1	1	1	1		1
26					1		1												1	
27			1				1			1					1	1				
28		1																		
29						1				1										
30																				
31										1	1									
32	1	1		1	1															
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 8. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Oph19 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7														1			1			1
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13								1	1	1										
14	1	1			1		1	1	1	1			1	1	1	1	1		1	1
15														1	1		1	1		1
16	1	1			1															
17							1	1	1				1	1	1		1	1		1
18										1										
19	1				1				1											
20							1									1	1			
21					1									1	1	1	1	1		1
22	1	1			1		1	1	1	1			1							
23														1						
24																1	1			
25					1		1			1			1	1						1
26								1	1							1		1		
27	1			1									1		1	1	1	1		1
28									1	1									1	1
29	1	1					1							1						
30																				
31														1	1	1	1			
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 9. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Oph12 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13			1				1						1	1						
14																				
15			1									1								
16													1		1				1	
17						1						1								
18		1	1				1	1				1		1	1				1	
19		1	1												1					
20						1														
21																	1		1	
22			1			1	1	1	1			1	1	1	1	1	1		1	
23		1			1					1			1							
24	1					1	1	1												
25					1	1							1							
26			1				1													
27						1		1	1			1		1	1	1				1
28	1	1			1	1		1	1	1		1	1	1	1	1				
29	1	1	1	1																
30								1							1		1			
31													1						1	1
32				1									1			1				
33			1	1			1	1												
34																				
35																				
36																				
37					1															
38	1									1				1	1	1				
39						1														
40	1																			

Cuadro 10. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Opg05 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13				1																1
14			1	1	1		1	1	1			1	1	1		1	1			1
15		1											1			1				
16														1	1	1	1			1
17	1	1			1			1	1			1	1			1				1
18	1	1										1	1			1	1			
19				1	1															
20			1	1	1	1	1	1	1						1	1	1			1
21								1					1	1	1			1		
22																				
23			1																	
24	1						1		1											1
25	1	1			1		1	1					1							1
26					1				1				1	1	1			1		
27																				
28																				
29																				
30																				
31																				
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 11. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Ope04 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10									1											
11														1						
12	1	1	1	1	1	1		1	1	1			1	1	1	1	1		1	1
13			1													1				
14			1		1					1			1			1			1	
15	1	1				1		1		1				1	1					
16			1	1			1		1				1							
17					1		1		1					1	1				1	
18	1	1	1				1	1	1	1			1	1	1	1				
19			1							1				1	1				1	1
20														1						
21					1															
22						1		1					1	1					1	
23										1				1	1		1			
24		1	1	1	1	1				1									1	
25		1							1					1						
26			1				1													
27			1							1										
28																				
29										1										
30																				
31																				
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 12. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Opd03 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15	1																			
16		1		1					1	1		1	1	1	1	1	1			1
17																				
18	1	1							1	1			1	1	1	1	1			1
19															1	1	1			
20		1		1	1	1			1	1			1	1	1		1	1		1
21	1							1												1
22			1																	
23													1	1	1		1	1		1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1		1
25			1	1				1												
26													1	1	1					
27																				
28	1		1																	
29																				
30																				
31																				
32																				
33	1								1	1			1	1	1	1	1			1
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 13. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Opc13 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

posiciones	Quercus resinosa										Quercus magnoliifolia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9					1															
10																				
11																				
12		1	1		1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1				1
13																				
14																				
15	1	1	1		1	1		1	1	1		1	1	1	1	1			1	1
16												1				1	1			
17				1																
18								1	1			1	1	1		1	1			
19								1												
20								1												
21										1										
22					1			1												
23								1												
24													1		1	1				
25			1																	
26																				
27														1	1	1	1		1	1
28	1	1			1	1		1	1			1	1							
29																				
30																				
31																				
32																				
33			1					1												
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				

Cuadro 14. Matriz de distribución de bandas del oligonucleótido Opb07 en Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

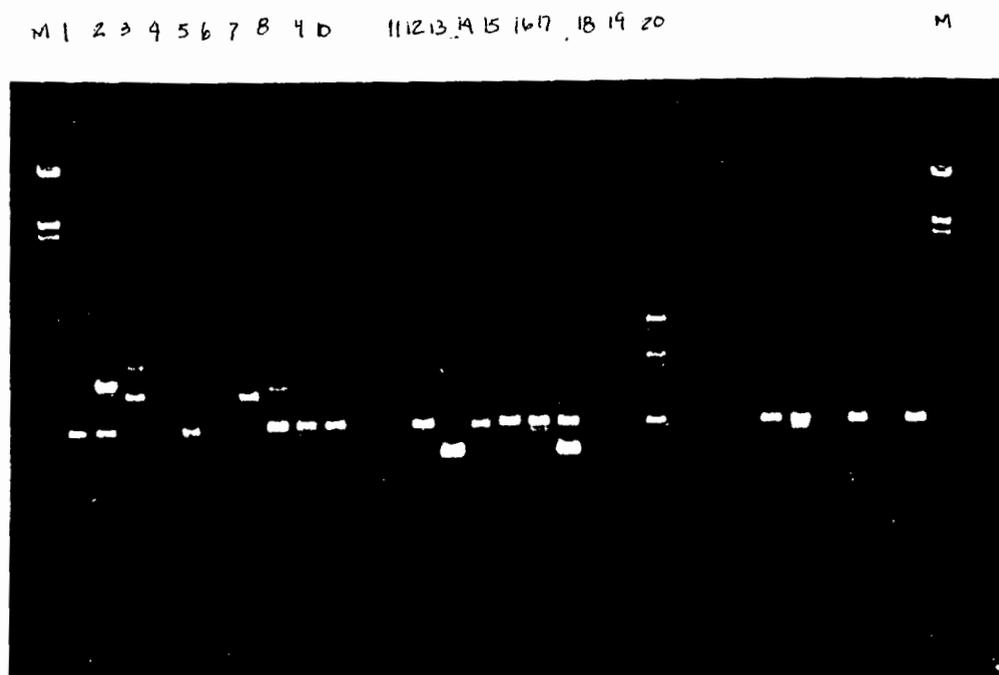


Figura 2a. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPH15. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus magnoliifolia.

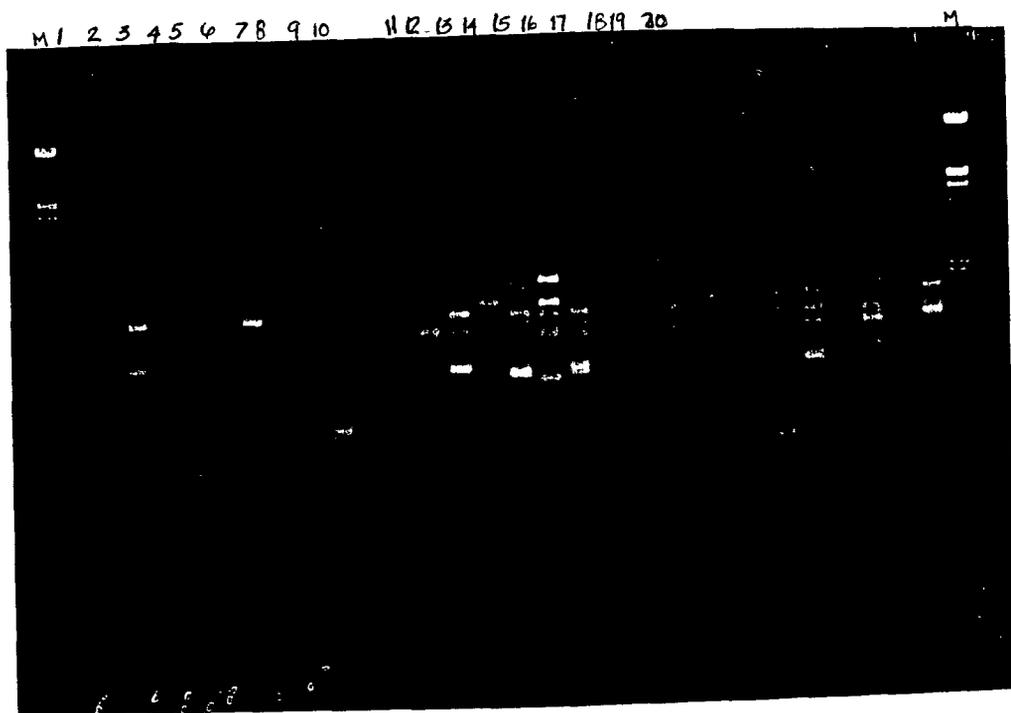


Figura 2b. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPH18. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus magnoliifolia

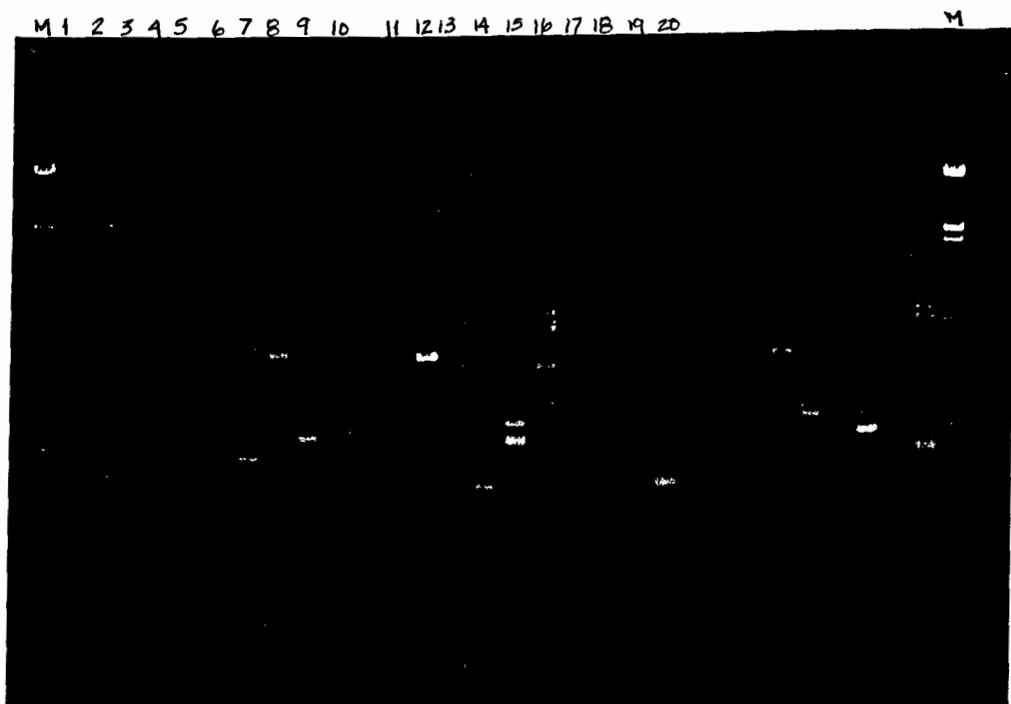


Figura 2c.. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPH17. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus magnoliifolia

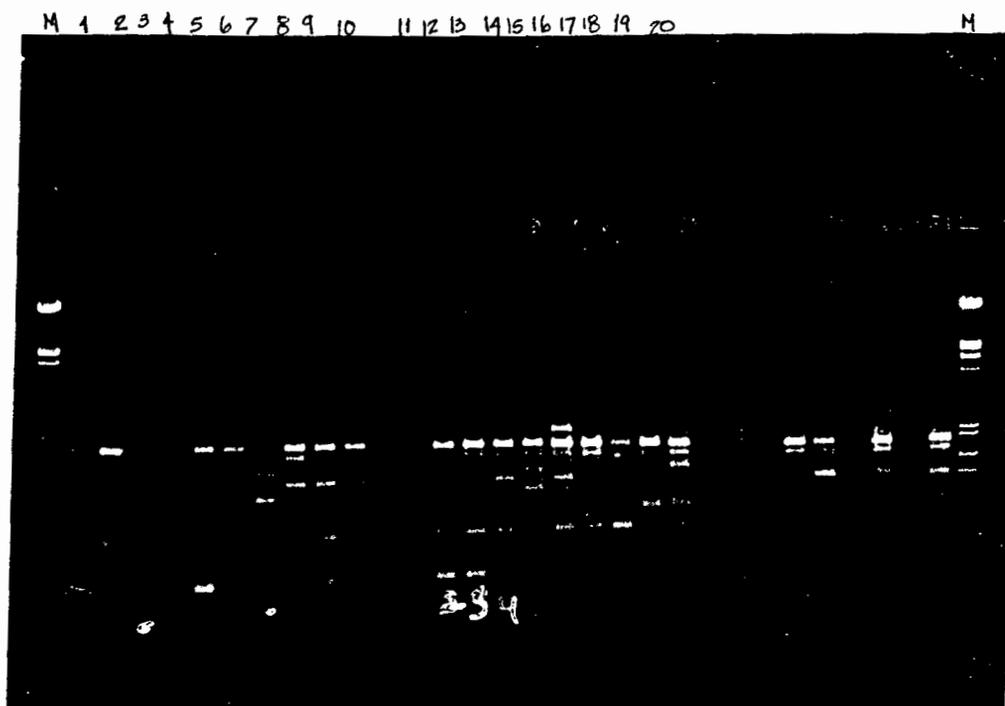


Figura 2d.. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPH14. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus magnoliifolia

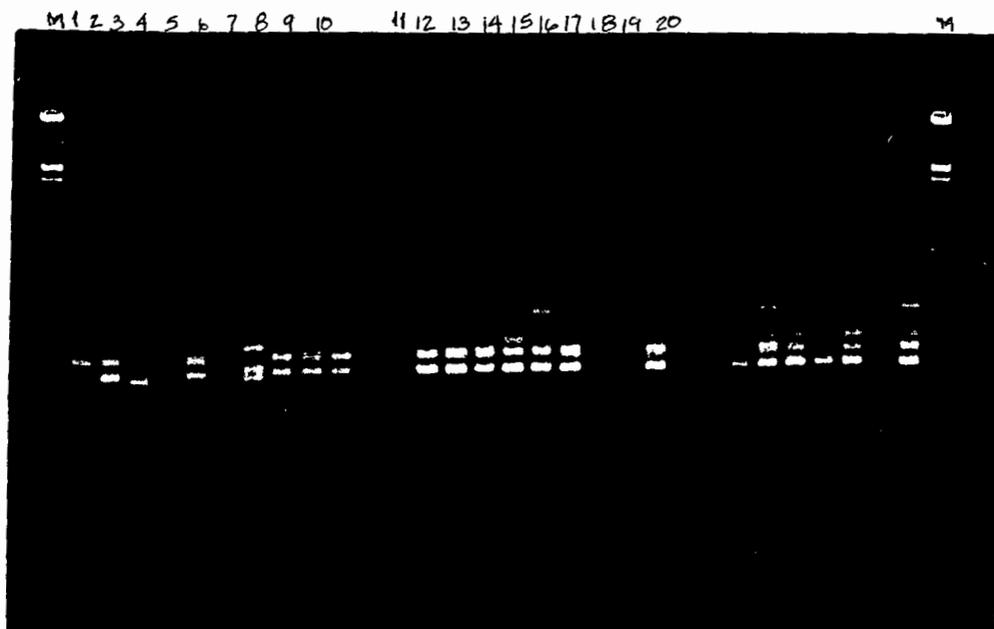


Figura 2e. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPH20. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus magnoliifolia

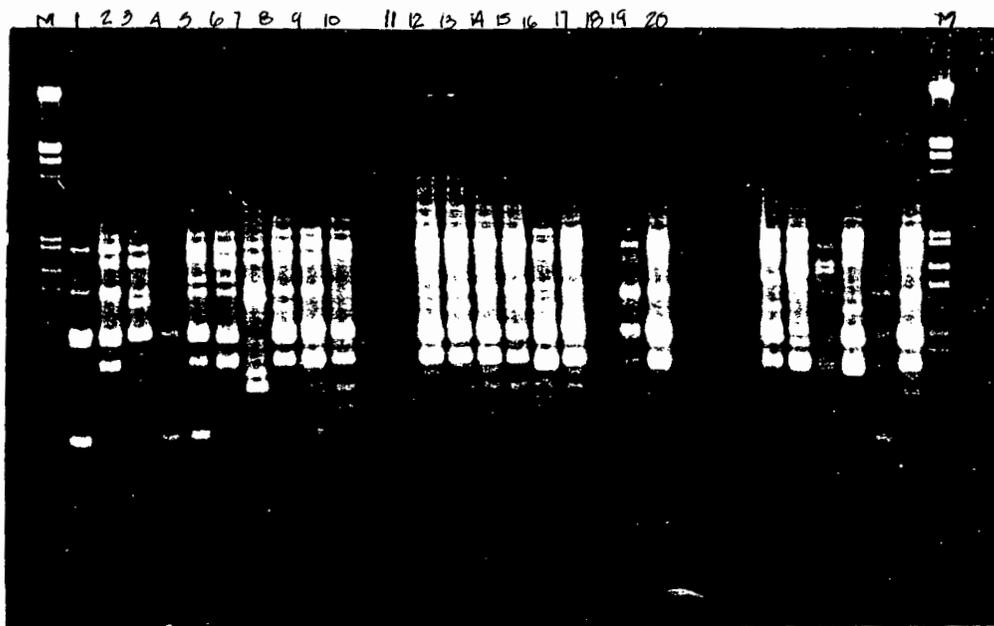


Figura 2f. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPH19. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus magnoliifolia

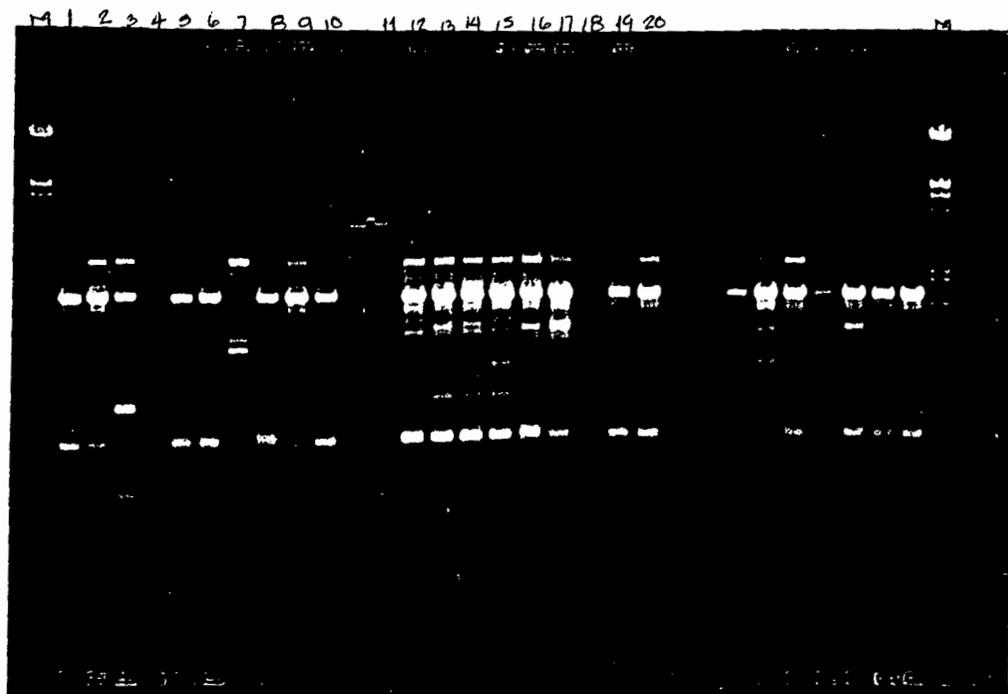


Figura 2g. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPB07. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus magnoliifolia

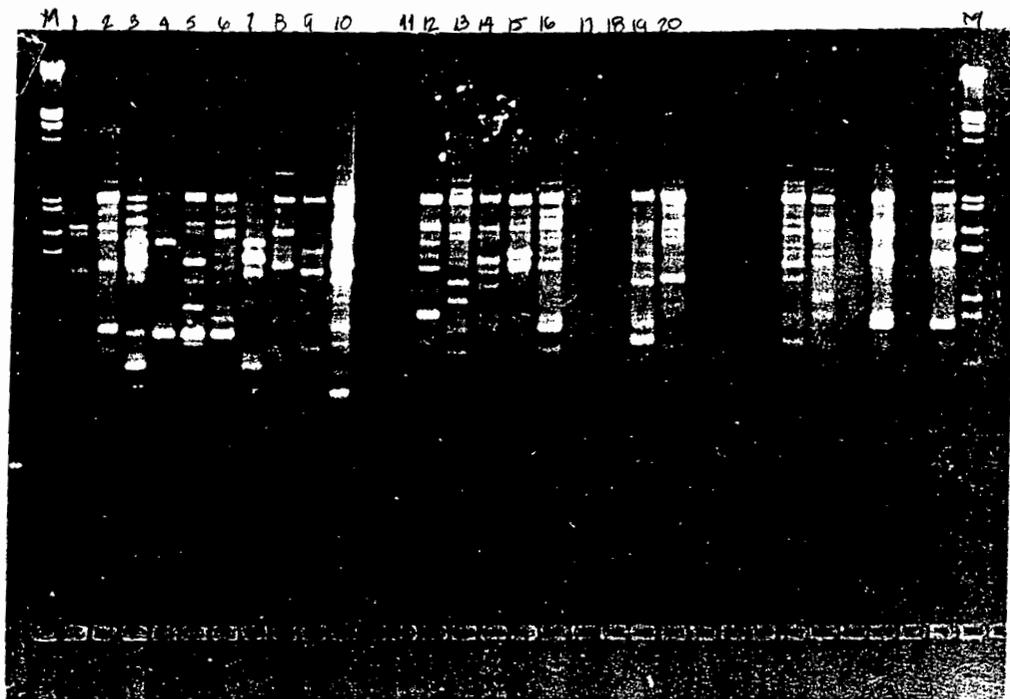


Figura 2h.. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPB03. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a *Quercus resinosa*, carril del 11 al 20 a *Quercus magnoliifolia*

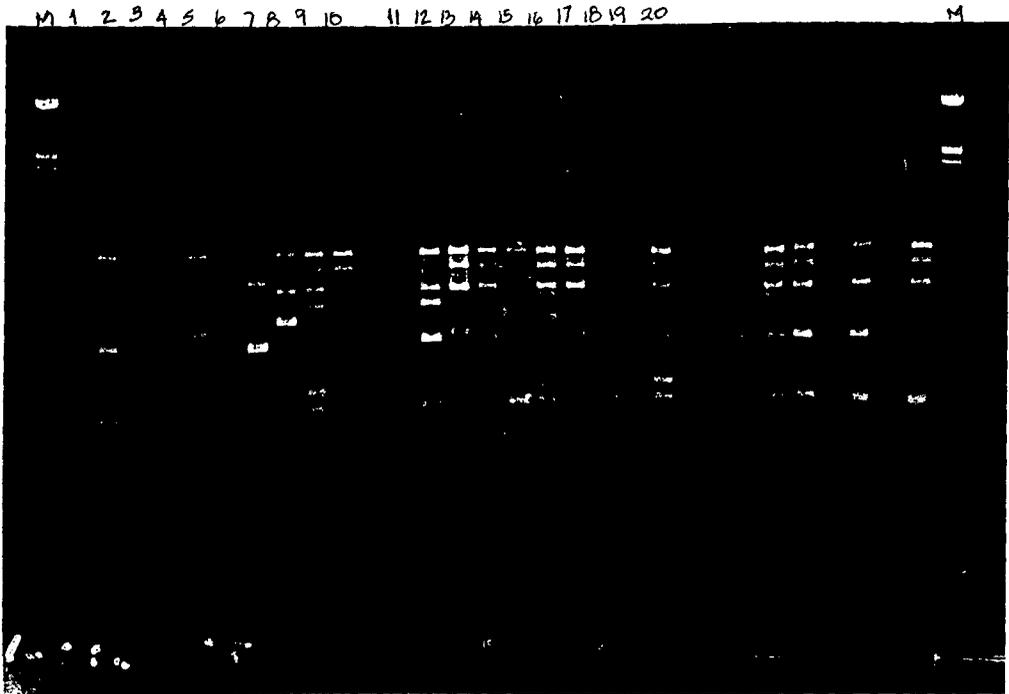


Figura 21. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPH12. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus magnoliifolia

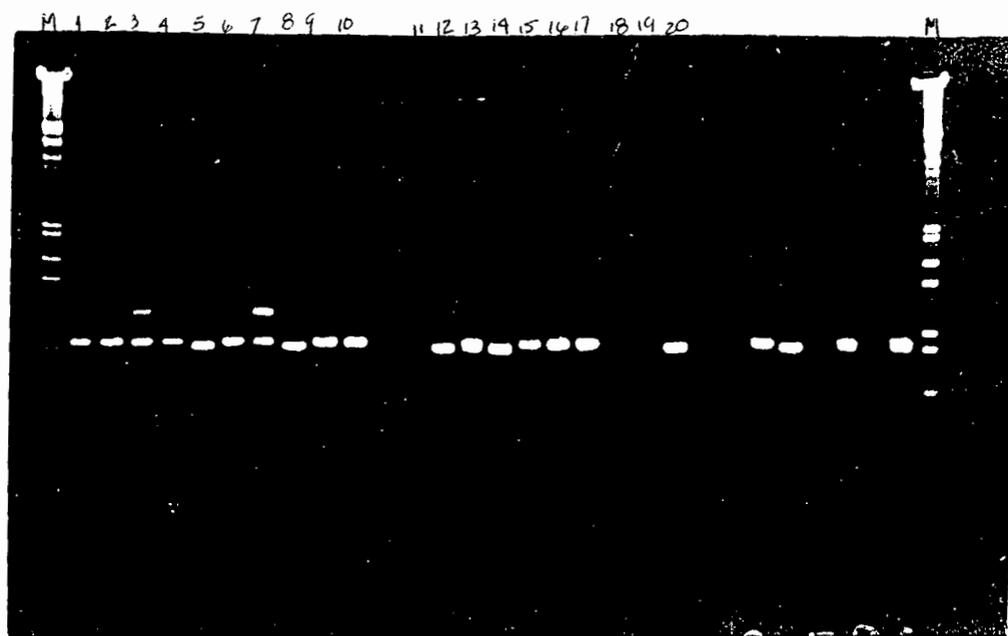


Figura 2j. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPJ15. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a *Quercus resinosa*, carril del 11 al 20 a *Quercus magnoliifolia*.

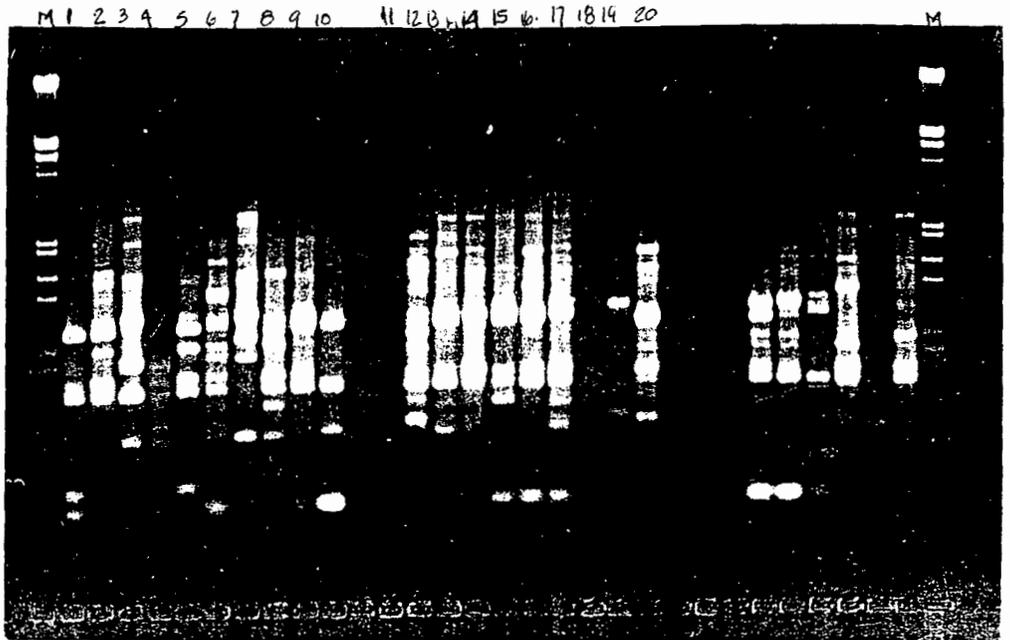


Figura 2k. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPG05. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a *Quercus resinosa*, carril del 11 al 20 a *Quercus macroleptia*

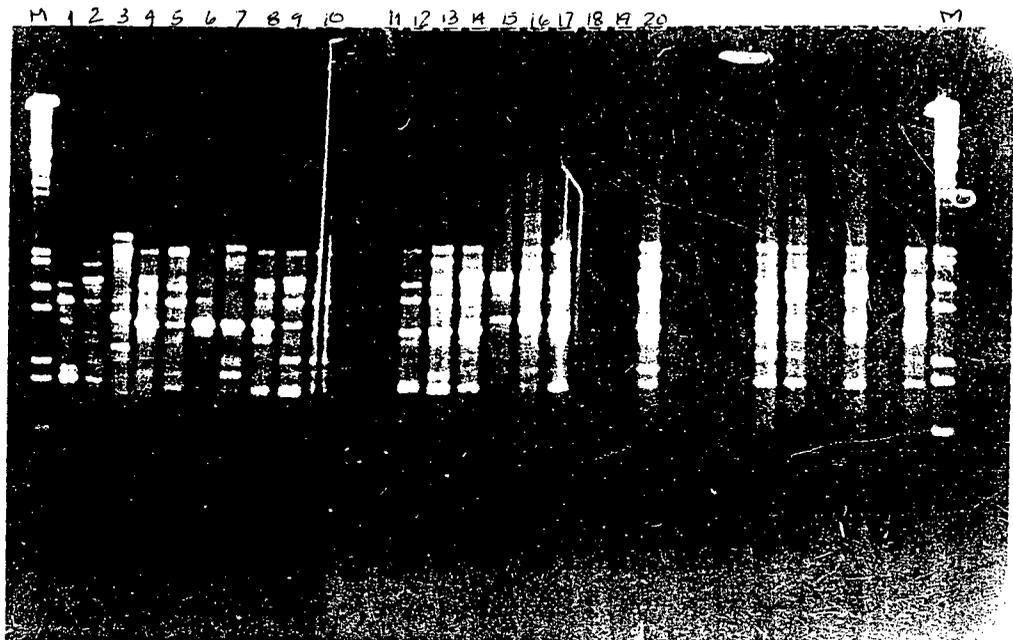


Figura 21. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPE04. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a Quercus resinosa, carril del 11 al 20 a Quercus macrocarpa.

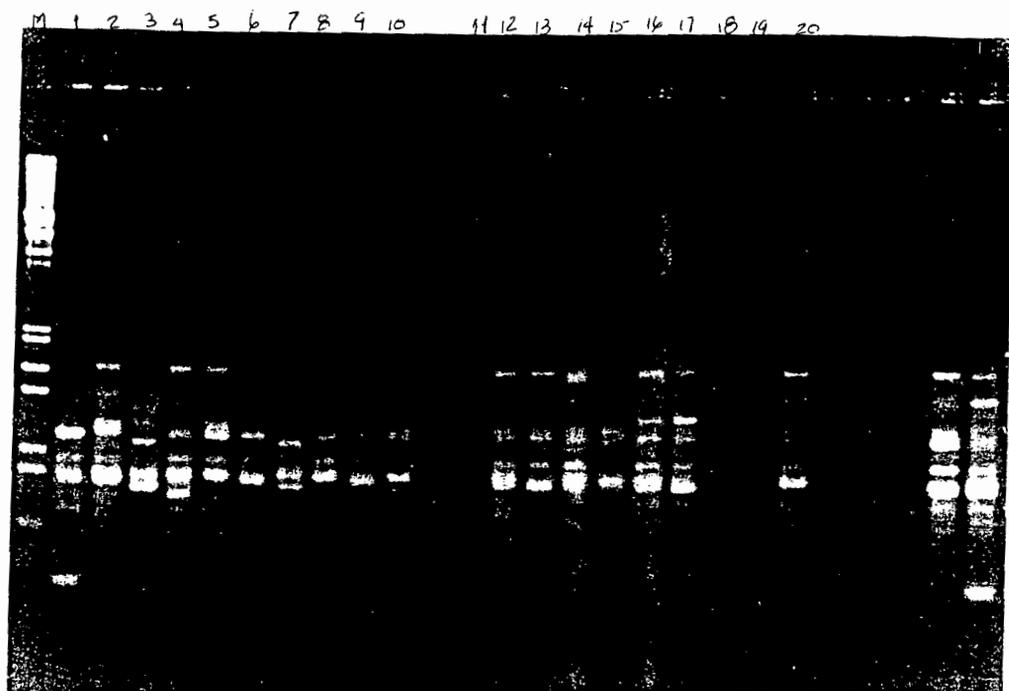


Figura 2m. Fotografía de corrimiento con el oligonucleotido OPC13. Carril M (marcador) del carril 1 al 10 corresponden a *Quercus resinosa*, carril del 11 al 20 a *Quercus magnoliifolia*.

ANÁLISIS DE CONCORDANCIA

Se comparó la concordancia de bandas entre el grupo de Quercus magnoliifolia vs Quercus resinosa utilizando un programa especialmente adaptado por el Ing. Rogelio Troyo (CIBO, IMSS) basado en el análisis de matrices (Wayne 1997), utilizando los valores binarios de las matrices, por oligonucleótido considerando los siguientes tipos de concordancia: concordancia (0,0), celdas donde no se registraron bandas entre Q. resinosa y Q. magnoliifolia discordancia (0,1), celdas en las que se registró ausencia de bandas en Q. resinosa y presencia en el grupo Q. magnoliifolia, discordancia (1,0), presencia de bandas en el grupo de Q. resinosa más no en Q. magnoliifolia y por último la concordancia (1,1) que corresponde a la celda en las que en ambos grupos se registró presencia de bandas. Como resultado obtuvimos porcentajes totales, considerando concordancia (0,0) y (1,1) y discordancia (1,0) y (0,1). Dado que lo que se buscó fue concordancia mínima, se utilizaron valores denominados de porcentaje real los cuales no consideran concordancia (0,0) dado que la ausencia de bandas entre ambas especies no se considera informativa. Se consideró a los porcentajes reales de concordancia que resultaron arriba de 21%, como los que tuvieron mayor concordancia y los menores de 21% quienes tuvieron mayor discordancia. La prueba entonces, constituye una estimación de máxima o mínima concordancia. Los valores de porcentaje real de concordancia obtenidos por oligonucleótido se muestran en el cuadro 15, ordenados por sus valores de concordancia.

Los oligonucleótidos que tuvieron mayor concordancia y en consecuencia que presentan mayor número de bandas compartidas entre sí fueron en orden descendente :OPJ-15, OPH-16, OPH-19, OPC-13, OPH-20, OPB-07. El oligonucleótido OPH- 15 resultó con un alto valor de discordancia y por lo tanto patrones distintivos de bandas entre ambas especies, le sigue los oligonucleótidos de mayor a menor discordancia OPH-17, OPH-18, OPG-05.OPE-04, OPH-14, OPD-03 Y OPH-12.

Oligonucleotidos	Concordancia Real	Valores de Concordancia *
OPJ-15	58.33	Máxima  21% Mínima
OPH-16	38.71	
OPH-19	27.27	
OPC-13	23.88	
OPH-20	21.43	
OPB-07	21.05	
OPH-12	17.28	
OPD-03	14.47	
OPH-14	13.85	
OPE-04	12.31	
OPG-05	11.36	
OPH-18	10.53	
OPH-17	10.00	
OPH-15	4.26	

Cuadro 15. Valores de porcentajes de concordancia al comparar el grupo de individuos de Quercus resinosa y Quercus magnoliifolia.

ANÁLISIS POR CLUSTERS

Los patrones de bandeo fueron analizados también por medio de la prueba estadística de análisis de agrupamiento la cual se encarga de agrupar los datos jerárquicamente de acuerdo a las semejanzas que existen entre los grupos analizados. Se obtuvieron tablas de clusters y su forma gráfica como dendogramas de las cuales se seleccionaron los oligonucleótidos más informativos, es decir, aquellos con patrones de bandeo más parecidos al interior de una especie y diferentes entre ambas especies, por lo tanto capaces de distinguir entre ambas especies y fueron el OPH-14 (fig. 3), OPH-15 (fig. 4), OPH-17 (fig. 5) y OPH-18 (fig. 6). El oligonucleótido OPH-14 resultó de máximo poder de discriminación dado que su dendograma muestra claramente la formación de dos grandes conjuntos, uno de ellos formado de individuos de la especie Quercus resinosa y el otro formado de individuos de Quercus magnoliifolia. Los individuos 03, 04 y 11 no mostraron ningún patrón de bandas por lo que no deben de ser considerados. Dado que el patrón de bandas es anónimo, es posible acumular datos de más de un oligonucleótido a la vez, lo cual permitiría aumentar el poder de discriminación entre especies. Se realizó el análisis mezclando alternativamente dos, tres y finalmente los cuatro oligonucleótidos juntos, lo cual aportó buenos resultados. Al hacer el análisis tomando de dos en dos oligonucleótidos tenemos que los más informativos son la mezcla de OPH-14 con OPH-18 (fig. 7). Al hacer la mezcla de tres oligonucleótidos tenemos que cuando se analizan los oligonucleótidos OPH-14, OPH-15 y OPH-18 (fig. 8) se obtuvieron mejores resultados. Al hacerse el análisis tomando los cuatro oligonucleótidos existen algunos árboles que por tener patrones de bandeo muy semejantes los agrupan como si fueran de una misma especie lo que pudiera ser debido a la presencia del patrón de OPH-17 (fig. 5). Podemos concluir entonces que los oligonucleótidos con los cuales podemos distinguir ambas especies son el OPH-14 y el OPH-18 analizados de manera individual, o los oligonucleótidos OPH-14, OPH-15 y OPH-18 analizados de manera conjunta. Se confirmó así que OPH-14 es el oligonucleótido con más poder discriminante entre las dos especies.

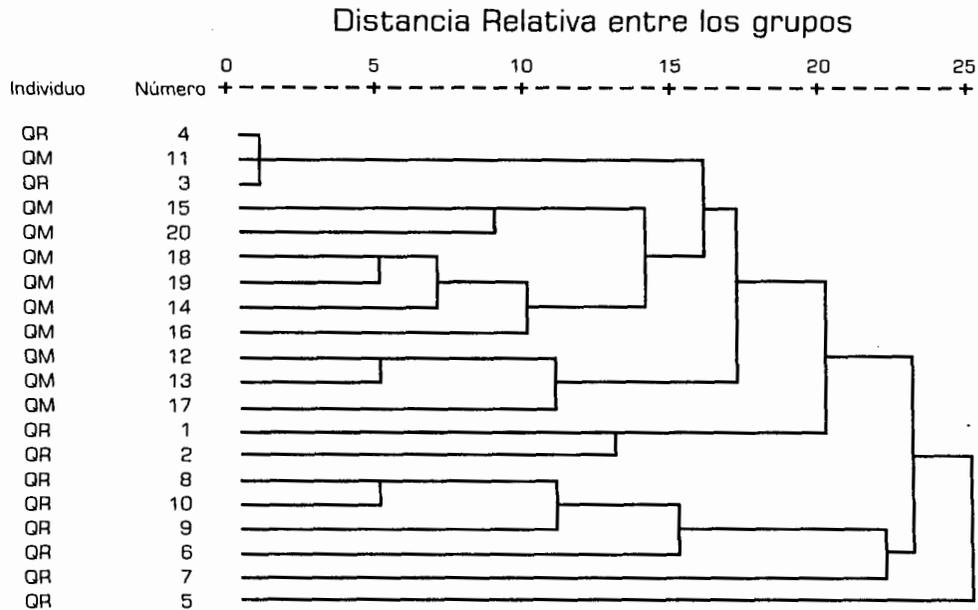


Figura. 3 Dendograma de los 20 individuos de estudio por el método de ligamento promedio, utilizando el oligonucleótido OPH-14..

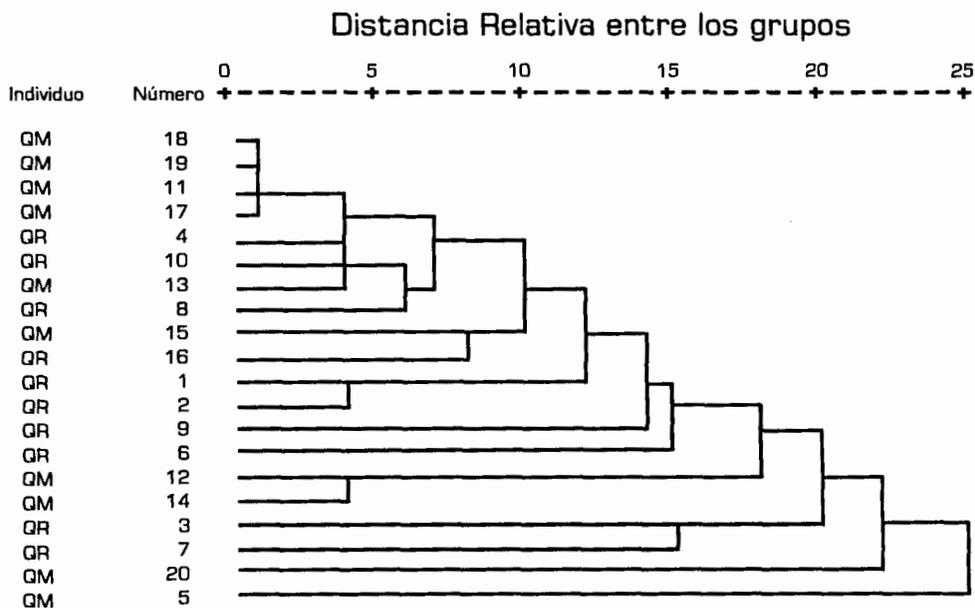


Figura. 4 Dendrograma de los 20 individuos de estudio por el método de ligamento promedio, utilizando el oligonucleótido OPH-15.

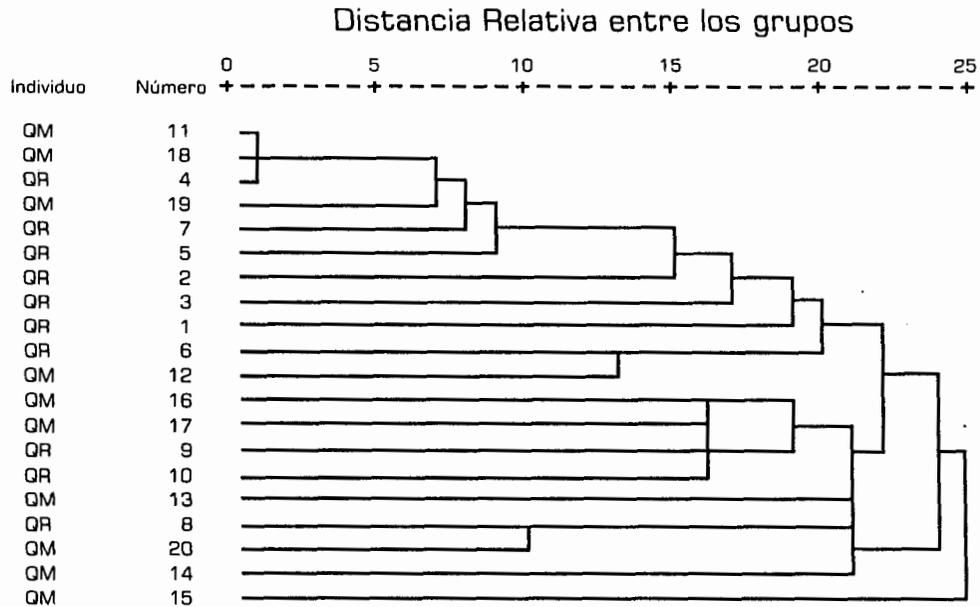


Figura. 5 Dendograma de los 20 individuos de estudio por el método de ligamento promedio, utilizando el oligonucleótido OPH-17.

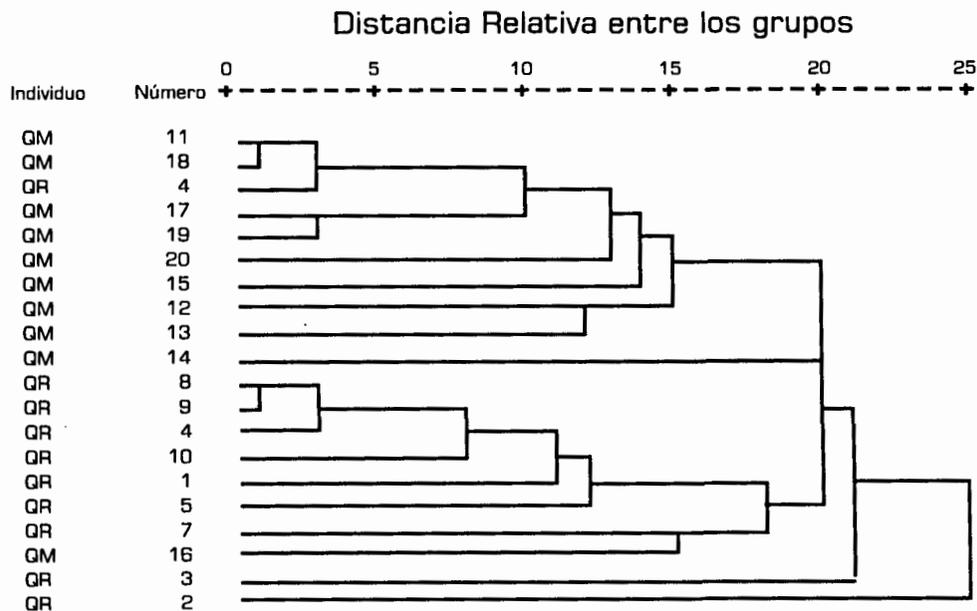


Figura. 6 Dendrograma de los 20 individuos de estudio por el método de ligamento promedio, utilizando el oligonucleótido OPH-18.

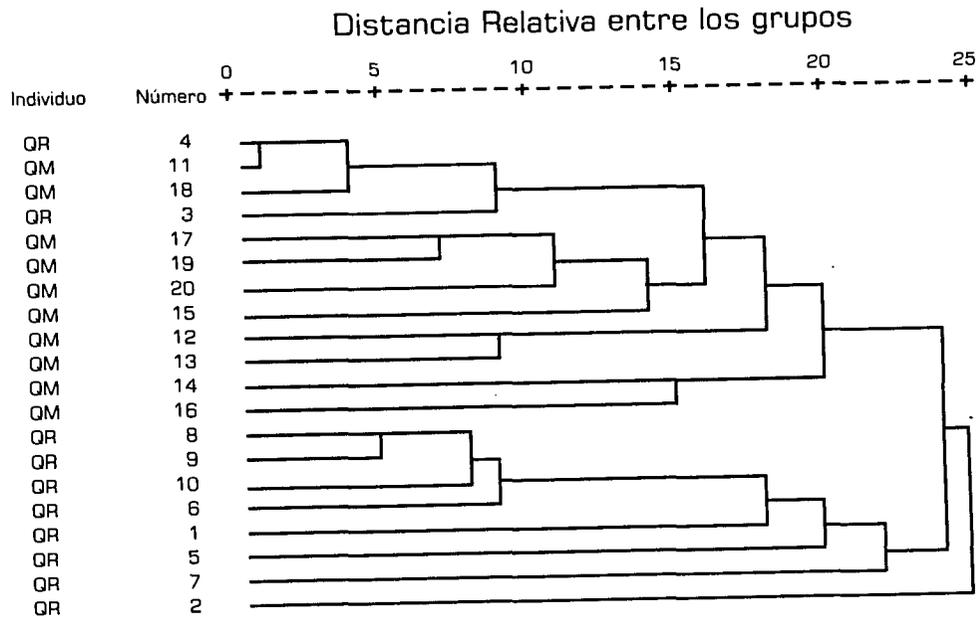


Figura. 7 Dendograma de los 20 individuos de estudio por el método de ligamento promedio, utilizando la mezcla de los oligonucleótidos OPH-14, y OPH-18.

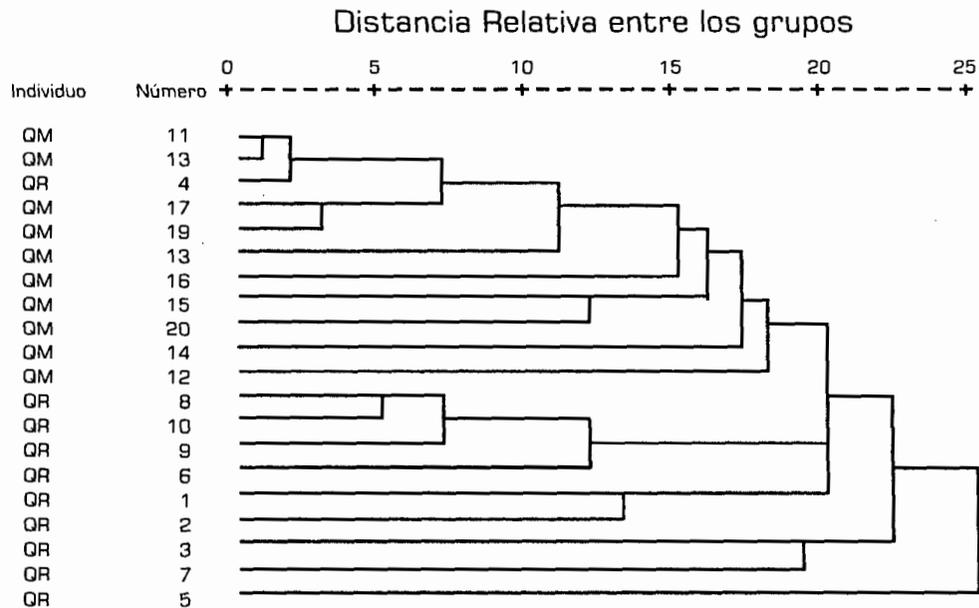


Fig. 8 Dendrograma de los 20 individuos de estudio por el método de ligamento promedio, utilizando la mezcla de los oligonucleótidos OPH-14, OPH-15 y OPH-18.

DISCUSIÓN:

El género Quercus se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país, siendo nuestro estado uno de los que cuenta con mayor número de especies. Dichas especies se pueden encontrar de manera simpátrica o alopátrica. En los casos donde dichas especies crecen de manera simpátrica tienen facilidad para hibridizarse (González.V.L. 1987), por tal razón su de manera simpátrica tienen facilidad para hibridizarse (González V.L., 1987), por tal razón su identificación en ocasiones no resulta fácil. Cuando el uso de caracteres morfológicos no es suficiente para su discriminación, el análisis de diferencias a nivel de ADN, constituye una buena alternativa. El uso de polimorfismos de ADN obtenidos por amplificación al azar utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD's), provee de patrones de bandas de ADN analizables para el establecimiento de diferencias entre genomas de dos especies. En el presente trabajo, fueron utilizadas la prueba de concordancia (programa de análisis de matrices) y la de análisis de agrupamiento para analizar los patrones de bandas obtenidos. La prueba de concordancia constituye una primera aproximación dado que muestra en una gradación continua qué oligonucleótidos se encuentran en valores extremos de discordancia y por lo tanto provee de una alternativa para estimar el poder de discriminación entre dos especies. Con dicha prueba fue posible detectar 8 oligonucleótidos que presentaron patrones que permiten distinguir ambas especies (Cuadro 15). Por otro lado el análisis de clusters agrupa datos comunes secuencialmente, es decir, sobre cada grupo formado distingue nuevos subgrupos, hasta llegar a la distinción de cada individuo, por tal razón su poder de discriminación es mayor que el de análisis de concordancia. Con la utilización de análisis de clusters los oligonucleótidos más informativos, OPH-14, OPH-15 y OPH-18 coinciden dentro del grupo de oligonucleótidos informativos establecidos por el análisis de concordancia, por lo que el análisis de clusters permitió determinar cuales de los 8 oligonucleótidos discordantes de la prueba de concordancia, podrían resultar de mayor utilidad. Los 3 oligonucleótidos seleccionados presentaron diferencias en su poder de discriminación (mostrado en los dendogramas) de los cuales la capacidad máxima de discriminación correspondió al oligonucleótido OPH-14. El dendograma del oligonucleótido OPH-14 distingue claramente dos grupos de individuos, uno para cada especie. Los individuos 3 y 4 de la especie Quercus resinosa y el individuo 11 de Quercus magnoliifolia no presentaron bandas para este oligonucleótido por lo que pueden no ser considerados. La prueba de clusters, al agrupar por separado cada especie nos permitió además, demostrar que la variación

intraespecífica no impidió distinguir los grupos, y que los individuos de Quercus magnoliifolia son más similares entre sí que los individuos del grupo de Quercus resinosa. Nuestros resultados coinciden con los de Uribe et. al.(1994) en Quercus rugosa, Quercus laeta y Quercus obtusata, respecto a la utilidad del oligonucleotido OPH-14 para distinguir especies. Uribe et. al. (1994) estudiaron la variabilidad en Quercus rugosa, Quercus laeta y Quercus obtusata del estado de Guanajuato utilizando RAPD's con 12 oligonucleótidos previamente seleccionado , concluyendo que las especies mostraban diferencias genéticas.

Es posible clasificar los oligonucleótidos su capacidad de discriminación, en específicos de género o de especie (Uribe 1995). Los oligonucleótidos OPH-14,15,17 Y 18 serían entonces específicos de especie en el grupo estudiado mientras que los oligonucleótidos OPB-07, OPJ-15, OPC-13, OPH-16, OPH-19 Y OPH-20 podrían ser comunes para género.

Las diferencias observadas entre ambas especies nos indican que hay diferencias entre sus genomas. Consideramos que dichas diferencias tienen significado biológico, debido a que las regiones amplificadas son anónimas y tomando en cuenta que los oligonucleótidos utilizados están constituidos en más de un 50% de bases GC. La fidelidad genética ha sido evaluada en Quercus petrea (AFDA 1997) con el uso de RAPD's obteniendo resultados confiables.

Los cambios acumulados en el genoma por el proceso evolutivo en una especie dada resultan en fenotipos a todos los niveles de expresión del gen, algunos de ellos con valor taxonómico. Dichos niveles pueden ser morfológicos anatómicos tales como la palinología, morfología de estomas o histología, los cuales pueden usarse como caracteres taxonómicos. A nivel subcelular de expresión génica existe literatura considerable de estudios citogenéticos (Stebbins 1971). Cualquier nivel de expresión considerado para el estudio taxonómico cumple con un requisito, y es el de que los fenotipos considerados deben presentar heredabilidad máxima, es decir, una influencia del ambiente mínima, sin embargo muchos de dichos fenotipos son debido al efecto aditivo de un número variable de genes y por lo tanto no exentos de influencias del ambiente. Por esta razón los fenotipos a niveles primarios de expresión del gen resultan de gran importancia. Tal es el caso del nivel molecular como el uso de RAPD's. En un estudio previo en Quercus petrea utilizando RAPD's (AFDA 1997) se obtuvieron muestras de ADN de propágulos vegetativos tomados de un mismo individuo en seis diferentes puntos de una misma rama, usando 15 diferentes oligonucleótidos se observó que los patrones de bandas fueron siempre idénticos. Lo anterior respalda que el uso de RAPD's puede ser confiable para la

diferenciación de especies. Los patrones de bandas obtenidos en el presente trabajo representan la variabilidad presente en las secuencias de ADN y por lo tanto pueden ser consideradas de un sólido valor taxonómico. La taxonomía clásica ha sido utilizada durante mucho tiempo y es considerada una herramienta confiable sin embargo se ve limitada cuando los fenotipos considerados resultan confusos. Los polimorfismos detectados con RAPD's ofrecen una buena alternativa ya que consideran directamente al genoma en el cual reside el origen a los fenotipos incluyendo los de valor en taxonomía clásica. La utilización de los marcadores moleculares presenta algunas desventajas en cuanto a la infraestructura requerida, y el costo de los procedimientos. Afortunadamente la taxonomía clásica es capaz de resolver una cantidad considerable de problemas de identificación y clasificación por lo que este tipo de metodología constituye una extraordinario apoyo a dichos estudios en casos específicos.

Algunas aportaciones importantes adicionales de este trabajo son la estandarización de la extracción de ADN dado que es una especie leñosa (presenta en las hojas un denso tomento en la superficie de ambas superficies poseen también abundantes pelos glandulares así como un alto contenido de polifenoles y polisacaridos), lo cual pudiera ser útil al estudio del ADN de otras especies similares. La información que aportan los oligonucleótidos utilizados podría servir de base para trabajos futuros en Quercus no sólo de identificación de especies sino además en estudios de hibridación o filogenia.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Agriculture and Food Development Authority. Kinsealy Research Centre 1997. Malahide road. Dublin 17, Ireland.
- 2.- Arnold, M.L., Bennett, B.D and Zimmer, E.A. 1990. Natural hybridization between Iris fulva and Iris hexagona pattern of ribosomal DNA variation Evolution 44: 1512-1521.
- 3.- Arnold, M.L., Buckner, C.M: and Robinson, J.J. 1991. Pollen-mediated introgression and Hybrid speciation in Louisiana irises. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 1398-1402.
- 4.- Bello, G.M. y Labat, J. 1987. Los Encinos (Quercus) del Estado de Michoacán. Cuadernos de estudio michoacanos 1. CEMCA-INIFAP. SARH. México.
- 5.- Dow B.D, Ashley M.V. and Howe H.F. 1995. Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, Quercus macrocarpa. Theor Appl. Genet 91: 137-141.
- 6.- Gonzalez, V.L. 1987. Contribución al conocimiento del género Quercus (Fagaceae) en el Estado de Jalisco. Instituto de Botanica. Univ. de Guadalajara. 240 pp.
- 7.- Lewin Benjamin. 1990. Genes IV. Oxford university Press.
- 8.- Lodhi M.A. et al. 1994. A simple and efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and Vitis Species.- Plant Molecular Biology Reporter 12(1): 6-13.
- 9.- Martinez, M. 1951. Los encinos de México y Centroamerica. An Inst. Biol. Univ. Auton. De México. México D.F. 22(2): 351-368.
- 10.- Medical Genetics de Saunders W:B: Company, cede en Nueva Yor 1991.k
- 11.- McVough, R. 1991. Flora Novo- Galiciana. Univ. Of Michigan Herbarium. Michigan 12(1) 31- 93 pp. 1994.
- 12.- Petit R.J. Kremer A. Wagner D.B. 1993 Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks.- Theor Appl. Genet 87: 122-128.

- 13.-Ronald L. P. 1994.DNA - based markers in plants. Klawer Academic Publishers. Boston 384 p.384.
- 14.-Rieseberg, L.H.,Choi, H.,Chan, R. and Spore, C.D. 1993 Genomic map of a diploid hybrid species. Heredity 70: 285-293.
- 15.-Skroch Pant. Et el. Analysis of Genetic Relationship using RAPD's marker data . Applications of RAPD's technology to plant breeding. 26-30.
- 16.-Stebbins, G.L. 1971. Chromosomes evolution in higher plants Edwards Arnold Publisher). Lonndon . Pag 104-105.
- 17.-Swason,C.P. et al. 1981. Cytogenetics. Prentice-Hall. USA 577 pp.
- 18.-Trelease: 1969.The American Oaks. J. Cramer H.K. Swaan Vol. 4 N.Y. 253 pp
- 19.- Uribe D. Ortiz G.1994 Extracción de Acidos Nucleicos de hoja de encino . Inst. Investigaciones en Biología Experimental, Fac. De Química, Universidad de Guanajuato.
- 20.-Valencia A.S. y Delgado S.A. 1992. Arquitectura de hoja como una herramienta taxonomica en el reconocimiento de individuos de encino pertenecientes a Quercus affinis. Scheid, y Q.laurina Hums& Bunpl. III. Seminario Nacional sobre la utilización de encinos. Linares N.L. (Resumen) p 69. Nov.
- 21.-Verma Rams.S. and Babu Arvina. 1992.Human Chromosome principles techniques. Second Edition. Mc.Graw Hill.
- 22.-Wayne W. Daniel 1997. Bioestadísticas base para el análisis de la Ciencia de la Salud. Noriega Editores. México.
- 23.- Wilde, J. Waugh, R. and Powell 1992 Genetic fingerprinting of Theobroma clones using random amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet. 83:871-877.
- 24.-Williams. J.G. A.E. Levak, K.J. rafalski,J.A. and Tingey, S.C.1990 DNA polymorphisms by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid

Research. Vol. 18 No. 22:6531-6535.

- 25.-Zavala, Ch.F. 1989. Identificación de encinos de México. Universidad Autónoma de Chapingo(División Ciencias Forestales) Chapingo México. 150 pp.