
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Pinus ayacahuite* Ehrenberg ex
Schlechtendal: REPRODUCIBILIDAD Y SEGREGACIÓN DE
MARCADORES RAPDs**

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

CARMEN LORENA RAMOS NAVARRO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Diciembre de 2005.



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología

163/ C. C. BIOLOGÍA

C. CARMEN LORENA RAMOS NAVARRO
PRESENTE

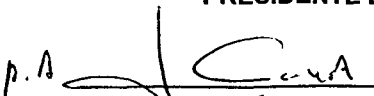
Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : **“Diversidad genética de *Pinus ayacahuite* Ehrenberg ex Schlechtendal: Reproducibilidad y Segregación de Marcadores RAPDs”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al **M en C. PATRICIA CASTRO FÉLIX** y como asesor / a **DR. JORGE ALBERTO PÉREZ DE LA ROSA** y el/la **DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan., 14 de Abril del 2005


DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



C.c.p. - M en C. PATRICIA CASTRO FÉLIX- M en C. PATRICIA CASTRO FÉLIX
Director del trabajo

Dr. Carlos Álvarez Moya
 Presidente del Comité de Titulación
 Carrera de Licenciado en Biología
 CUCBA Universidad de Guadalajara
 P R E S E N T E

Nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis, opción Tesis con el título: "DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Pinus ayacahuite* Ehrenberg ex Schlechtendal: REPRODUCIBILIDAD Y SEGREGACIÓN DE MARCADORES RAPDs" que realizó la pasante CARMEN LORENA RAMOS NAVARRO, con número de código 396637047, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de Usted con un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 30 de noviembre del 2005

DIRECTOR DEL TRABAJO

Patricia Castro

M en C. Luz Patricia Castro Félix

ASESORES

Alma Rosa Villalobos

Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula

Jorge Alberto Pérez de la Rosa

Dr. Jorge Alberto Pérez de la Rosa

Nombre completo de los sinodales asignados por el comité de titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. José de Jesús Sánchez González	<u>J. Jesús Sánchez González</u>	06/12/05
Dr. Carlos Álvarez Moya	<u>CA Moya</u>	5/Dic/12
Dr. Carlos Ramírez Serrano	<u>Carlos Ramírez</u>	06-12-05
Suplente. Dr. Daniel Ortuño Sahagún	<u>Daniel Ortuño Sahagún</u>	5/12/05

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara; dentro del proyecto de CONACYT número 33129 B, titulado: Pinos Blancos Mexicanos: Diversidad Genética, Química y Ubicación Taxonómica.

Dirigida por:

M. en C. Luz Patricia Castro Félix

Asesorada por:

Dra. Alma Villalobos Arámbula

Dr. Jorge Alberto Pérez de la Rosa

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

Página

Resumen	v
Introducción	1
I. Antecedentes	
I. 1. El Género <i>Pinus</i> en México.....	2
I. 2. <i>Pinus ayacahuite</i>	2
I. 2.1. Taxonomía.....	2
I. 2.2. Morfología	3
I. 2.3. Ecología y Distribución Geográfica	3
I. 3. Genoma Nuclear en Pinos	5
I. 4. Marcadores Moleculares y Diversidad Genética	6
I. 4.1. Polimorfismo de DNA Amplificados al Azar (RAPDs)	6
I. 4.1.1. Generalidades	6
I. 4.1.2. Ventajas y Desventajas	7
I. 4.1.3. Análisis de Fragmentos RAPDs	8
I. 4.1.4. Diversidad Genética con RAPDs	8
II. Justificación	9
III. Objetivos	10
IV. Materiales y Métodos	
IV. 1. Recolección de las Muestras de Pinos y Semillas	11
IV. 2. Descripción de las Poblaciones	12
IV. 3. Germinación de Semillas	12
IV. 4. Obtención de Megagametofito y Embriones	12
IV. 5. Extracción de DNA	13
IV. 6. Marcadores RAPDs	13
IV. 6.1. Análisis de Patrones de Bando y Definición del Perfil de los Marcadores RAPDs	14
IV. 6.2. Amplificación de Marcadores RAPDs para el análisis de Reproducibilidad	14
IV. 6.3. Amplificación de Marcadores RAPDs para el análisis de Segregación	15
IV.6.4. Análisis de Datos	15
IV.6.5. Diversidad Genética	15
V. Resultados y Discusión	
V.1. Amplificación de RAPDs en Acículas, Megagametofitos y Embriones	17

V.2. Reproducibilidad	20
V.3. Análisis de Segregación	25
V.4. Diversidad y Diferenciación Genética	27
VI. Conclusiones	31
VII. Literatura Citada	32
Anexos	
Anexo 1. Protocolos	37
A. Protocolo de Extracción de DNA	37
B. Cuantificación de DNA	39
C. Reprecipitación de DNA	39
D. Determinación de la Pureza del DNA	39
E. Electroforesis en Gel de Agarosa	39
F. Protocolo para la Reacción de PCR-RAPDs	40
G. Corrimiento Electroforético de los Productos de la Reacción PCR-RAPD	41
Anexo 2. Base de Datos	43
Patrones de Amplificación de Marcadores RAPDs	43

Resumen

En este trabajo se determinaron los niveles de diversidad y diferenciación genética de dos poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* con marcadores RAPDs reproducibles que mostraron un patrón de segregación mendeliana. Las reacciones PCR-RAPDs con los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 revelaron un total de 22 fragmentos tanto en material diploide (acículas y embriones) como en haploide (megagametofito). Se analizó la reproducibilidad de la amplificación de los fragmentos en un total de 27 muestras de DNA. La replicación de la amplificación empleando *Taq* pol de dos marcas comerciales mostró que el 86% (19) de los fragmentos presentaron un porcentaje de reproducibilidad superior al 90%. Además, el análisis de reproducibilidad en dos réplicas de la extracción de DNA de 12 pinos, mostró que el 91% (20) de los fragmentos presentaron un porcentaje de reproducibilidad superior al 90%. Se identificaron 12 marcadores polimórficos y solamente dos de los loci analizados presentaron una considerable distorsión de la segregación mendeliana. La mayoría de los loci polimórficos (11) se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg.

El análisis de variación genética de *P. ayacahuite*, considerando solamente los marcadores reproducibles que presentaron segregación mendeliana, reveló una mayor diferenciación genética poblacional ($F_{ST}=0.12$), que el análisis realizado con la totalidad de los marcadores amplificados ($F_{ST}=0.1$). Los estimadores de variación genética de la población de Las Palmas, Michoacán revelaron valores mas altos ($P = 69\%$, $h=0.27$, $I=0.39$), que los observados en la población de Tlalmanalco Edo. de México ($P=50\%$, $h=0.22$, $I=0.34$).

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética constituye un aspecto clave y fundamental para las estrategias de conservación biológica. La variabilidad genética es un recurso biológico que debe conservarse, con el fin de mantener la especie a largo plazo, ya que constituye la materia prima sobre la cual se producen los procesos evolutivos (Hartl y Clark, 1989).

En México, el *Pinus ayacahuite* Ehrenberg ex Schlechtendal, constituye una de las fuentes de madera más utilizada como combustible, así como en la construcción y en la manufactura de papel. Las semillas de este árbol son una fuente de alimentación tanto para humanos como para otras especies animales (Farjon *et al.*, 1997). *Pinus ayacahuite* presenta una amplia distribución en el territorio mexicano, sin embargo, debido a la explotación exagerada muchas de las poblaciones se encuentran disminuidas, aisladas y fragmentadas, (Pérez de la Rosa, 1993). Genéticamente, estas condiciones favorecen la pérdida de la variación intrapoblacional y la diferenciación entre poblaciones (Hanski, 1999). Hasta ahora se desconocen los niveles de variación y diferenciación genética de las poblaciones naturales de *P. ayacahuite*.

Los polimorfismos de DNA amplificadas al azar (Randomly amplified polymorphic DNAs, RAPDs) son marcadores ampliamente utilizados en el análisis de diversidad genética de especies vegetales. Para obtener índices de diversidad confiables con este tipo de marcadores, es conveniente trabajar con fragmentos RAPDs reproducibles que segreguen en forma mendeliana. En este trabajo se determinaron los perfiles RAPDs en acículas, megagametofito y embrión de *P. ayacahuite* con tres iniciadores (OPA-08, OPA-11 y OPC-06), se analizó la reproducibilidad y se determinaron los patrones de segregación de los fragmentos amplificadas. Además, se calcularon los índices de diversidad genética en dos poblaciones de *P. ayacahuite* localizadas en el Eje Volcánico Transversal, utilizando: a) el total de los fragmentos RAPDs amplificadas y b) los fragmentos reproducibles que presentaron un patrón de herencia mendeliana.

I. ANTECEDENTES

I. 1. El Género *Pinus* en México

Los pinos (género *Pinus*, familia *Pinaceae*) son una fuente importante de madera en muchos países, ya sea como un recurso forestal natural o en poblaciones cultivadas. Existen más de cien especies reconocidas por los taxónomos, todas originarias de los países del hemisferio norte. Norteamérica es especialmente rica con un total de 65 especies, de estas 38 se distribuyen al norte de México y 43 en México y América Central, (Farjon *et al.*, 1997). Las condiciones topográficas y climáticas, favorecen la diversidad del género *Pinus* en México, en donde se describieron más de 40 especies (Perry, 1991). Los bosques de pinos en México y América Central están amenazados por la sobreexplotación, los desmontes para otras formas de uso de la tierra, el sobrepastoreo, el incremento en la frecuencia de fuegos y otras presiones que generalmente coinciden con el incremento en la población humana.

I. 2. *Pinus ayacahuite*

I. 2.1. Taxonomía

Pinus ayacahuite forma parte del grupo de pinos conocido como pinos blancos o blandos. Taxonómicamente se encuentran ubicados dentro del subgénero *Strobis*, sección *Strobis*, subsección *Strobi* (Little y Critchfield, 1969). En pinos, la taxonomía se basa principalmente en el estudio de las características morfológicas; (Farjon y Styles, 1997). En el caso de *P. ayacahuite*, la caracterización morfológica reconoce dos variedades: *P. ayacahuite* var. *veitchii* Shaw (Perry, 1991) y *P. ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw (Martínez, 1948), la última variedad ha sido reconocida como *P. strobiformis*, una especie afín pero diferente a *P. ayacahuite*. La información morfológica no siempre es adecuada para la inferencia de relaciones taxonómicas. Pérez de la Rosa (1993) reporta que *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* presentan un marcado cline (cambio gradual) en el tamaño del ala de la semilla, característica que explica aproximadamente el 75% de la variación total observada entre los dos taxa.

I.2.2. Morfología

En pinos, la caracterización morfológica se basa principalmente en el tamaño de los árboles, la forma de crecimiento y el análisis de acículas, conos y semillas. En general los árboles de *P. ayacahuite* presentan troncos rectos que llegan a medir de 25 a 45 m de altura con diámetros de hasta 2 m. Las ramillas son delgadas, pueden ser ligeramente pubescentes, de color verde-amarillento, rojizas o grisáceas, con acículas de color verde, en fascículos de 5, de tamaño muy semejante, generalmente rectas, laxas con los márgenes débilmente aserrados. Los conos son de color café opaco y se pueden encontrar solitarios o en verticilios de 2-4, en pedúnculos cortos, péndulos deciduos, generalmente cilíndricos, el tamaño presenta variación entre las variedades de *P. ayacahuite* (Cuadro I). Las escamas varían ligeramente en el número y la forma de la apófisis, se abren pronto y ampliamente, son delgadas, flexibles y muy resinosas. Las semillas son de color café, con ala adnada, aunque se presentan diferencias en el tamaño de la semilla entre *P. ayacahuite* y *P. ayacahuite* var. *brachyptera* (*P. strobiformis*), es en el tamaño del ala donde se observan las principales diferencias (Cuadro I). La variedad *brachyptera* presenta semillas ápteras y *P. ayacahuite* semillas con alas que pueden alcanzar un tamaño de hasta 3 veces el tamaño de la semilla (Farjon *et al.*, 1997; Farjon y Styles, 1997).

I.2.3. Ecología y Distribución Geográfica

A diferencia de otras especies de pinos, *P. ayacahuite* tiene preferencia por lugares sombríos y húmedos, crece en suelos fértiles, profundos y bien drenados. Pérez de la Rosa (1993), los encontró en altitudes superiores a los 2000 msnm y reportó su presencia en laderas de exposición norte y en el fondo de cañadas; indica que en la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre Oriental, lugares en los que se localiza *P. strobiformis*, el clima es más seco y frío que en el Eje Volcánico Transversal y al sur del mismo. *Pinus strobiformis* se distribuye en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Durango, Jalisco, Zacatecas y San Luis Potosí. *Pinus ayacahuite* se localiza en los estados de Chiapas, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Tlaxcala; en Honduras, en las montañas más altas y en El Salvador, únicamente en Chalatenango. Se ha observado que en áreas planas principalmente, los árboles se

desarrollan mezclados con otras coníferas. Es frecuente encontrarlos asociados con especies del género *Abies*, pinos y encinos (Pérez de la Rosa, 1993; Farjon *et al.*, 1997).

Cuadro I. Principales características morfológicas del complejo *P. ayacahuite*.
(X representa tamaño de la semilla).

	<i>P. ayacahuite</i> típico	<i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	<i>P. ayacahuite</i> var. <i>brachyptera</i>
Árbol			
Altura (m)	40-45(-50?)	40-45(-50?)	20-30
Diámetro (cm) del tronco	150-200	150-200	80-100
Acículas			
Longitud (cm)	(8-)10-15(-18)	(8-)10-15(-18)	(5-)7-11(-12)
Ancho (mm)	0.7-1.0	0.7-1.0	(0.6-)0.8-1.1(1.2)
Conos			
Longitud (cm)	(10-)15-40	10-50	12-30(-60)
Ancho (cm)	7-15	10-15	7-11
Escamas del cono	100-150	100-150	70-120
Semillas			
Longitud (mm)	8-10	10-15	12-18
Ancho (mm)	6-8	7-9	8-11
Ala			
Longitud en relación al tamaño de la semilla	2-3.5 X	2 X	0-0.5 X

I.3. Genoma Nuclear en Pinos

Los pinos son organismos diploides con un número cromosómico haploide de 12. El contenido de DNA en el genoma de pinos en relación a otras especies vegetales, es considerablemente alto, por ejemplo *P. lambertiana* contiene 34.7 pg (pico gramos) de DNA por núcleo diploide mientras que el maíz solamente 6 pg y el eucalipto de 0.7 a 1.2 pg. En pinos, el genoma nuclear esta constituido principalmente por DNA altamente repetitivo en forma de secuencias multicopias no codificantes, solamente el 0.1% del genoma del núcleo se expresa en RNAm (Ledig, 1998).

Las acículas y las semillas son generalmente las estructuras a partir de las cuales se extrae y purifica el genoma nuclear de pinos. Aislar DNA de buena calidad de acículas es extremadamente difícil debido a la presencia de polifenoloxidasas libres, que si no son eliminadas rápidamente, oscurecen y degradan el DNA (Kim *et al.*, 1997). Otras proteínas cuando se oxidan pueden unirse de manera casi permanente al DNA expuesto, aumentando la dificultad en posteriores manipulaciones. Cerca del 90% de la pared celular esta compuesta de celulosa, pectinas y polisacáridos, estos compuestos dificultan aún mas la extracción de DNA de tejido vegetal en relación a la extracción de DNA de tejido animal (Rogers *et al.*, 1994). Los polisacáridos son probablemente la razón más común de la baja producción y pureza de DNA extraído de plantas. La digestión del DNA mediante enzimas de restricción y la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son especialmente sensibles a la presencia de polisacáridos ácidos (Rogers *et al.*, 1994).

La semilla de las gimnospermas es una fuente importante de material genético ya que contienen el gametofito y el embrión. El gametofito es una estructura multicelular con doble función: contiene el gameto y nutre al embrión. El genotipo de cada gametofito es idéntico al gameto materno que forma el embrión. Así, el megagametofito en cada semilla es genéticamente equivalente a la progenie haploide de la planta, por lo tanto cualquier *locus* heterocigoto en la semilla parental puede segregar 1:1 en el gametofito sin considerar la contribución del polen. El megagametofito de pinos ha sido extremadamente útil para el análisis de diversidad genética, relaciones genéticas y estudios de flujo génico en poblaciones naturales (O' Malley *et al.*, 1996). Debido a su tamaño el embrión ha sido poco utilizado como fuente de material genético, generalmente la extracción de DNA a partir de embrión presenta una pobre eficiencia, sin embargo en aquellas especies que producen

semillas grandes, esta puede aumentar en forma considerable. Debido a las diferencias en la composición del embrión (no compuestos terpenoides) y del gametofito (rico en grasas y polisacáridos), los métodos de extracción de DNA difieren de los utilizados para la obtención de DNA de acículas (Palomera, 2002).

I.4. Marcadores Moleculares y Diversidad Genética

El desarrollo de marcadores moleculares ha facilitado enormemente el estudio de la diversidad genética. Los marcadores más utilizados son los RAPDs (polimorfismos de DNA amplificado al azar), los RFLPs (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), los AFLPs (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) y microsátelites. Estos marcadores difieren en el tipo y cantidad de variabilidad que proporcionan, así como en la conveniencia de su uso, ya que esta depende de la pregunta que se desee responder en particular y en la facilidad y costo para su desarrollo y aplicación. Se considera que el marcador ideal debe de ser 1) neutro, 2) polimórfico y 3) codominante (Ouborg *et al.*, 1999).

I.5. 1. Polimorfismos de DNA Amplificados al Azar (RAPDs)

I.5.1.1. Generalidades

Los RAPDs son marcadores moleculares generados por la amplificación de segmentos aleatorios de DNA. La técnica se basa en la posibilidad estadística de que se presenten sitios complementarios a un iniciador a lo largo del genoma. Los polimorfismos (*e.g.* las diferencias en el número de bandas) entre individuos se deben a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento, o bien a la inserción o delección de los fragmentos en éstos sitios (Williams *et al.*, 1993).

La aplicación de la metodología de RAPD permite efectuar un muestreo al azar y eficiente del genoma. Se amplifican pequeñas cantidades del material genético por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando iniciadores sintéticos de secuencias al azar de 10 b (Operon Technologies, Inc., Alameda, Calif.). El iniciador o cebador permite buscar en el genoma sitios invertidos, resultando en la amplificación de segmentos de DNA de longitudes variables. El corto tamaño del cebador aumenta considerablemente la probabilidad de encontrar sitios de unión a lo largo del genoma. El protocolo de

amplificación difiere de las condiciones clásicas para PCR en que se emplea un único cebador por reacción, por lo que no es necesario conocer la secuencia del genoma sometido al análisis (Williams *et al.*, 1990).

1.5.2. Ventajas y Desventajas

Los RAPDs se encuentran junto con los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) entre las técnicas moleculares consideradas como multilocus, ya que permiten el análisis de varios *loci* a la vez. Los marcadores RAPDs son más utilizados que los AFLP debido a que la metodología es más sencilla, por lo tanto más rápida y menos costosa (Harris, 1999).

La gran ventaja que presentan los RAPDs es su capacidad para detectar polimorfismos sin secuenciar o caracterizar el genoma de interés. Aplicando la metodología de RAPDs en forma adecuada es posible resolver una cantidad considerable de marcadores neutros y detectar polimorfismos en la molécula de DNA de interés (Williams *et al.*, 1990).

La presencia de bandas erróneas y la reproducibilidad de la amplificación se encuentran entre los principales problemas prácticos reportados con el empleo de marcadores RAPDs (Otero *et al.*, 1997; Wolfe y Liston, 1998). La reproducibilidad puede verse afectada por factores ambientales entre los que se encuentran, la pureza de DNA, la concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y la relación iniciador/DNA molde. Además las diferencias en las temperaturas de alineación y la utilización de diferentes tipos de polimerasa pueden también afectar los patrones de RAPDs. Otros factores que pueden alterar la reproducibilidad de los marcadores RAPDs son: factores genéticos como la variación en el contenido de DNA nuclear y la poliploidia. Es necesaria una rigurosa estandarización del protocolo de PCR-RAPD para reducir la variación provocada por los componentes de la reacción (Weeden *et al.*, 1992). Skroch y Nieuhuis (1995) reportan una marcada mejoría en la reproducibilidad si se reducen las diferencias en las condiciones de la reacción entre réplicas.

Una desventaja de los marcadores RAPDs en relación a las isoenzimas y los RFLPs es su condición de dominancia, el 95 % de los productos RAPDs se comportan como marcadores dominantes (Wolfe y Liston, 1998). La dominancia de estos marcadores implica que las estimaciones de los niveles de diversidad genética solo puedan realizarse

de manera indirecta. Además la metodología de RAPDs muestrea al azar todo el genoma vegetal, lo que implica que los marcadores pueden tener un origen nuclear o citoplasmático. Debido a que en organismos superiores, la genética de poblaciones del genoma nuclear difiere de la de los genomas citoplasmáticos es importante conocer el origen de los marcadores RAPDs (Pearson *et al.*, 2002).

I.5.3. Análisis de Fragmentos RAPDs.

Al ser los RAPDs marcadores dominantes, en el análisis electroforético se observa solamente la presencia o la ausencia del marcador, por lo que no es posible detectar individuos heterocigotos (+ -) para una determinada mutación ya que se mezclan con los homocigotos dominantes (+ +) (Wolfe y Liston, 1998). El análisis de datos con marcadores RAPDs se dificulta debido a que el que dos individuos compartan la ausencia de una banda no significa necesariamente que compartan la misma mutación, pueden ser homocigotos o heterocigotos para mutaciones o alelos diferentes. La ausencia de una banda puede tener su origen en uno o varios cambios en el genoma y estos cambios pueden ocurrir en cualquiera de los nucleótidos que se alinean al cebador (Wolfe y Liston, 1998).

I.5.4. Diversidad Genética con RAPDs

La técnica de RAPDs ha sido ampliamente utilizada en estudios de diversidad genética de un gran número de especies vegetales (Ritland y Ritland, 2000). Es sin duda una de las técnicas más aplicadas para determinar los niveles de variación dentro y entre poblaciones, ya que la mayoría de los polimorfismos revelados son probablemente neutrales. Además, tienen la ventaja de presentar un número mayor de *loci* que los que se pueden obtener con los otros marcadores. Así, en los casos en que hay poca variabilidad, el uso de marcadores RAPD es más adecuado en relación a RFLP e isoenzimas, ya que aumenta la probabilidad de detectar variación genética (Mosseler *et al.*, 1992).

En coníferas es posible determinar la herencia de los marcadores RAPDs sin la necesidad de cruza controladas. Se considera que son el material ideal para realizar estudios genéticos, ya que la amplificación de RAPDs en megagametofitos, permite superar la naturaleza dominante de estos marcadores y diferenciar homocigotos de heterocigotos.

Se espera una relación de segregación 1:1 de la cruce de un heterocigoto para un marcador molecular con un homocigoto recesivo (Ledig, 1998).

II. JUSTIFICACIÓN

La variabilidad genética es una característica biológica que debe conservarse, con el fin de mantener la especie a largo plazo. A fin de realizar estudios de diversidad genética confiables, es necesario contar con marcadores que sean reproducibles y fáciles de analizar. Hasta el año 2000 los RAPDs se reportan como los marcadores más utilizados en el análisis de la diversidad genética de especies vegetales (Ritland y Ritland, 2000). Aunque una cuidadosa estandarización de la reacción de PCR-RAPD reditúa en una marcada mejoría en la reproducibilidad de los marcadores entre replicas (Pearson *et al.*, 2002), esta aún es uno de los principales problemas que se presentan al analizar los datos generados con este tipo de marcadores (Skroch y Nieuhaus, 1995).

Generalmente en coníferas, la extracción de DNA se realiza a partir de acículas y de gametofitos. En el caso de las acículas el genoma es diploide y en el de los gametofitos haploide. En aquellas especies que presentan semillas grandes, el embrión puede utilizarse como fuente alterna de genoma diploide. Los protocolos de extracción y purificación del DNA, del megagametofito y del embrión, presentan algunas modificaciones en relación al que comúnmente se emplea para obtener DNA de acículas. Las diferencias en los protocolos de extracción pueden generar artefactos durante la amplificación de marcadores RAPDs por PCR (Ellsworth *et al.*, 1993). Sin embargo, hasta ahora no se ha efectuado un análisis de la reproducibilidad de los perfiles de amplificación de este tipo de marcadores en DNA aislado a partir de diferentes estructuras de coníferas.

Otra de las principales críticas al empleo de RAPDs, es el hecho de que generalmente se desconoce la naturaleza de su herencia (Harris, 1999). En el caso de las coníferas, el megagametofito hace posible analizar la herencia de los *loci* sin necesidad de cruza controladas, las cuales son costosas y frecuentemente imposibles de llevar a cabo, la cruza de prueba no es necesaria en pinos, ya que la herencia (segregación) puede demostrarse en los megagametofitos haploides de un solo árbol (O' Malley *et al.*, 1996). El uso de RAPDs reproducibles, que presenten un patrón de herencia mendeliana, incrementa la confiabilidad de los niveles de diversidad y diferenciación genética revelados con este tipo de marcadores.

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la diversidad y diferenciación genética de dos poblaciones de *Pinus ayacahuite* con marcadores RAPDs.

Objetivos Específicos:

1. Definir el perfil de amplificación de marcadores RAPDs con OPA-11, OPA-08 y OPC-06, en material diploide (acículas y embriones) y material haploide (megagametofitos) de *P. ayacahuite*.
2. Analizar la reproducibilidad de la amplificación de los RAPDs en material diploide de *P. ayacahuite*.
3. Analizar los patrones de segregación de los marcadores RAPDs generados con OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en muestras de acículas y semillas de *P. ayacahuite*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Recolección de las Muestras de Pinos y Semillas.

Se colectaron muestras de acículas de 27 árboles de la población de *P. ayacahuite* var. *veitchii* de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México y de 25 árboles de la población de *P. ayacahuite* típico de Las Palmas, Michoacán (Figura 1). Además, se obtuvieron semillas de los conos maduros de seis árboles de cada una de las poblaciones y se germinaron de seis a diez semillas de cada cono con el objetivo de separar los megagametofitos y sus embriones. Las acículas y semillas fueron colectadas por el Dr. Jorge A. Pérez de la Rosa y Georgina Vargas Amado del Instituto de Botánica durante abril de 2001 a julio de 2004.

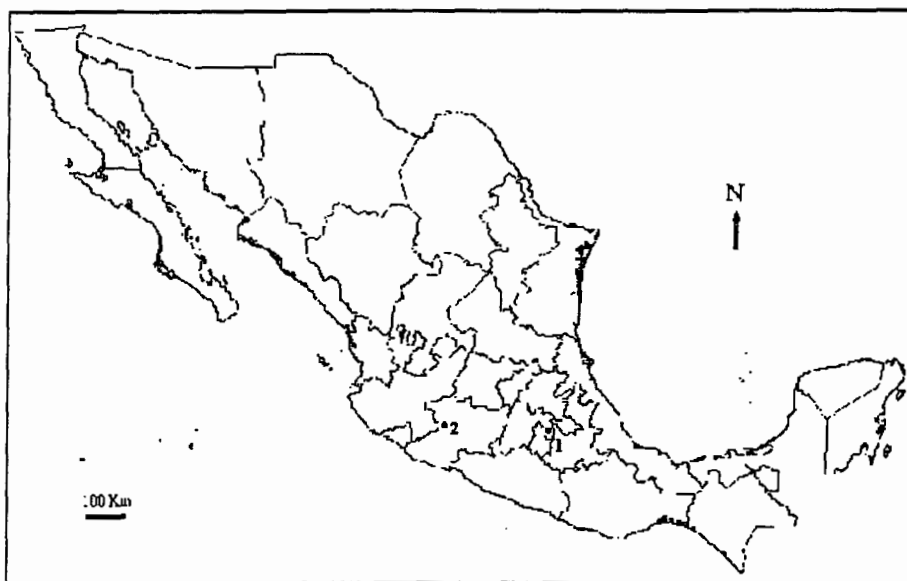


Figura 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Pinus ayacahuite*, 1. San Rafael Tlalmanalco, Edo. de México, 2. Las Palmas, Michoacán.

IV.2. Descripción de las Poblaciones

Las muestras de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) G. R. Shaw se colectaron en el estado de México, municipio de Tlalmanalco, cañada al este de San Rafael. La población se localiza a 19° 12' 38" de latitud Norte, y 98° 44' 10" de longitud Oeste; a una altitud de 2721 msnm, con una temperatura anual de 15°C y precipitaciones pluviales de 744 mm/año. La población se encuentra en un bosque muy perturbado de *P. ayacahuite* var. *veitchii*, *Pinus* spp. y *Cupressus lusitanica*, por lo que se considera una población aislada. Los pinos de ayacahuite tienen un tamaño de entre 25-35 m. Las semillas se colectaron entre julio y agosto de 2003, y la época de dehiscencia inicia en octubre.

Las muestras de *P. ayacahuite* típico fueron colectadas en el estado de Michoacán en el municipio de los Reyes en Las Palmas. La población se encuentra a 19° 40' de latitud Norte y 102° 25' de longitud Oeste, a una altitud de 2260 msnm, con una temperatura anual de 15°C y precipitación pluvial de 636 mm/año. La población se encuentra aislada y reducida. La semillas de esta población se colectaron en septiembre de 2003 .

IV.3. Germinación de Semillas

Las semillas se lavaron tres veces con agua destilada. Se mantuvieron 12 h en agua destilada, se añadieron 250 ml de agua oxigenada comercial y un volumen igual de agua destilada, después de 30 min en esta solución se lavaron por cuarta vez con agua destilada. Se eliminó el exceso de agua para almacenarlas hasta por dos semanas en bolsas de papel a 4°C.

IV.4. Obtención de Megagametofitos y Embriones

Se diseccionó la semilla germinada con la ayuda de un bisturí, localizando visualmente el megagametofito (n) (Figura 2). Se separó la cubierta que cubre al gametofito con ayuda de unas pinzas de disección. Después, se llevo a cabo un corte en forma vertical en el gametofito, se localizó y extrajo el embrión (2n). Es importante eliminar del megagametofito el tejido que lo une con el embrión (suspensores). Finalmente se colocaron por separado ambas estructuras en tubos de 2 ml y se mantuvieron a -80 °C hasta la extracción de DNA.

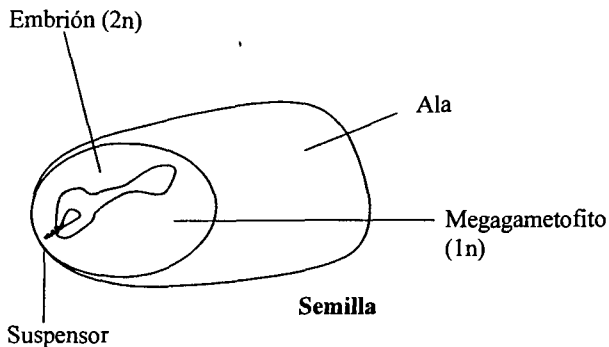


Figura 2. Esquema General de la Semilla de Pino.

IV.5. Extracción de DNA

La extracción de DNA en las acículas, embriones y megagametofitos se llevó a cabo mediante el método descrito por Doyle & Doyle (1987), con algunas modificaciones. En el caso de las acículas se adicionó polivinilpirrolidona 10 al 1% (PVP 10) al amortiguador de extracción. En embriones y megagametofitos la extracción se efectuó sin PVP 10. Para la extracción del DNA del gametofito fue necesario el uso de fenol para eliminar la grasa y facilitar la extracción (Palomera, 2002). Finalmente, se cuantificó la concentración del DNA mediante espectrofotometría y se determinó la calidad del mismo mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989) (Anexo 1).

IV.6. Marcadores RAPDs

Los marcadores RAPDs se obtuvieron siguiendo el procedimiento de Williams *et al.* (1990) con algunas modificaciones. Las reacciones de PCR se desarrollaron en un volumen final de 25 μ l. Se emplearon tres iniciadores previamente seleccionados con base en la calidad de la amplificación en acículas de *P. ayacahuite*. Cada iniciador está constituido por una secuencia arbitraria de 10 nucleótidos. La secuencia de los iniciadores y las concentraciones de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) empleados en las reacciones de amplificación se muestran en el Cuadro II. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research modelo PTC 100 (Anexo 1). Los productos de la reacción se separaron por

electroforesis en geles de agarosa al 1.8% (4 V/cm) y se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (Anexo 1). Se corrió un marcador de 100 pb (Gibco) en el mismo gel. Los amplificados se visualizaron bajo luz ultravioleta y se tomó una fotografía utilizando el sistema de fotodocumentación EDAS (Kodak) (Anexo 1).

Cuadro II. Descripción de los iniciadores y las concentraciones de MgCl₂ utilizados en las relaciones de amplificación.

Iniciador	Secuencia 5'-----3'	MgCl ₂ cc final
OPA-08	GTGACGTAGG	4.5 mM
OPA-11	CAATCGCCGT	4.5 mM
OPC-06	GAACGGAATC	3.5 mM

IV.6.1. Análisis de Patrones de Bando y Definición del Perfil de los Marcadores RAPDs

Se registraron los fragmentos amplificados con cada cebador en acículas, gametófitos y embriones de la población de *P. ayacahuite* del Edo. de México. Los fragmentos se analizaron visualmente y con el sistema de fotodocumentación EDAS (Kodak), utilizando un nivel de sensibilidad de 2 (intermedio). Se determinó el tamaño de cada fragmento, con base en la comparación con el marcador de 100 pb. Se definieron los perfiles RAPDs con base en el número, tamaño en pares de bases (pb) y el nivel de intensidad de los fragmentos.

IV.6.2. Amplificación de Marcadores RAPDs para el Análisis de Reproducibilidad

Se analizó la reproducibilidad de los fragmentos amplificados utilizando las muestras de DNA de acículas de la población del Edo. de México (n=29). Las muestras se amplificaron por duplicado en experimentos independientes, con los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06 (replicas de la amplificación). En uno de los experimentos las reacciones se desarrollaron con *Taq* pol Perkin Elmer y en el otro con *Taq* pol Invitrogen. Además se extrajo DNA de las muestras de acículas de 12 pinos por duplicado (replicas de la extracción) y se desarrollaron las reacciones PCR-RAPDs con los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06.

IV.6.3. Amplificación de Marcadores RAPDs para el Análisis de Segregación

Para el análisis de segregación se generaron fragmentos RAPDs con los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06 en seis megagametofitos de seis árboles de cada una de las poblaciones de *P. ayacahuite* (n=72). Además en la población del Edo. de México se analizaron los embriones correspondientes a cada megagametofito (n=36) y en la población de Mich. los embriones de solamente 3 megagametofitos (n=18).

IV.6.4. Análisis de Datos

Los fragmentos se registraron en una base de datos como presentes (1) o ausentes (0). Estas matrices se utilizaron para la determinación de la reproducibilidad. Se calculó el porcentaje de reproducibilidad de cada fragmento y se obtuvo un promedio por cebador.

El análisis de segregación se elaboró formando una base de datos en la que se registró la presencia (1) o ausencia (0) de los fragmentos en el genoma diploide (acículas) y en el genoma haploide (gametofito). Se identificaron los *loci* que mostraron segregación y se registró el número de árboles heterocigotos para cada uno de los locus. Se contabilizó el número de gametófitos con presencia o ausencia del marcador. Se calculó el porcentaje de desviación de la relación esperada con segregación mendeliana (1:1) y se identificaron los *loci* que presentaron una fuerte desviación.

Para analizar los *loci* polimórficos que segregaron en forma mendeliana se utilizó el programa PopGene ver. 1.31. La distribución genotípica observada fue comparada con la distribución genotípica esperada en condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg y se identificaron los *loci* que presentaron el equilibrio. Se calcularon los valores de heterocigosidad esperada para cada *loci* y los respectivos índices de fijación (F_{IS}) (Wright, 1978).

IV.6.5. Diversidad Genética

A partir de los datos obtenidos en 20 muestras de cada población se construyeron dos matrices de datos binarios de presencia y ausencia de los fragmentos: 1) con el total de los *loci* amplificados y 2) solamente con los *loci* que presentaron una reproducibilidad igual o mayor al 90%, herencia mendeliana y equilibrio Hardy-Weinberg. Se realizó el análisis de los RAPDs como marcadores dominantes, con el programa PopGene ver. 1.31, y se

estimaron los valores de polimorfismo promedio y los índices de diversidad de Nei (1972) (h) y de Shannon (1949) (I). Se determinó el nivel de diferenciación poblacional a través del cálculo del índice de fijación entre poblaciones F_{ST} (Hartl y Clark, 1989) y la distancia genética de Nei (1972).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Amplificación de RAPDs en Acículas, Megagametofitos y Embriones.

En todos los experimentos de PCR-RAPD con DNA obtenido de acículas y embriones se observaron fragmentos RAPDs con los tres iniciadores (OPA-08, OPA-11 y OPC-06). Sin embargo, debido a la presencia de fenol, dos de las muestras de DNA extraídas de gametofitos no amplificaron. Por lo que en estas muestras se reprecipitó el material genético (Anexo 1) y se aumentó el número de lavados. Debido a que el fenol inhibe la reacción de PCR (Palomera, 2002), es importante considerar el aumento de lavados con etanol al 70% en el protocolo de extracción de DNA.

Las reacciones PCR-RAPDs de las muestras de DNA de acículas, gametófitos y embriones de *P. ayacahuite*, con los tres iniciadores, mostraron un total de 22 fragmentos amplificados. El DNA de cada uno de los materiales utilizados presentó el mismo perfil de amplificación con cada iniciador. El iniciador OPA-11, produjo el mayor número de amplificados, con un total de 10 bandas con una variación en tamaño de 1900 a 700 pb. Los otros dos iniciadores generaron cada uno seis fragmentos, de un tamaño de 1700 a 550 pb para OPA-08 y de 2200 a 750 pb para OPC-06 (Cuadro III, Figura 3).

Cuadro III. Perfiles de bandeos obtenidos con cada cebador en *P. ayacahuite*.
Intensidad de las bandas: F = fuerte, I = intermedia D = débil.

OPA-11	OPA-08	OPC-06
Fragmento (pb)	Fragmento (pb)	Fragmento (pb)
1900 I	1700 D	2200 F
1800 I	1100 F	1700 I
1500 I	950 F	1300 F
1300 I	850 F	1100 I
1200 I	750 I	900 F
1050 D	550 I	750 D
900 F		
850 I		
750 D		
700 I		

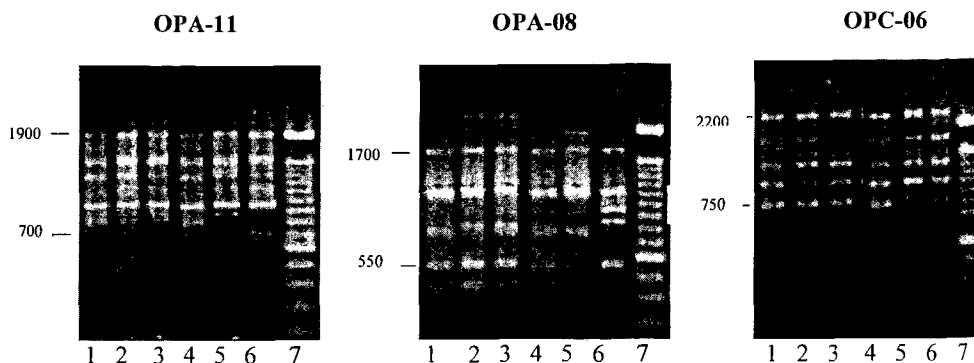


Figura 3. Patrones de Amplificación con los Iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en acículas (1,4), megagametofito (2,5), embriones (3,6) de *P. ayacahuite*. Marcador de 100 pb (7).

Los fragmentos se clasificaron en tres grupos de acuerdo a la intensidad de las bandas en el gel: Fuerte, Intermedia y Débil (Cuadro III). Solamente los fragmentos OPA-11₁₉₀₀, OPA-08₁₁₀₀, OPA-08₉₅₀, OPA-08₈₅₀, OPC-06₂₂₀₀, OPC-06₁₃₀₀, OPC-06₉₀₀ se observaron como bandas fuertes. El patrón de intensidad fue similar en el megagametofito y el embrión; sin embargo, en algunos experimentos, se observaron fragmentos que presentaron diferencias en la intensidad entre genomas (Cuadro IV). Por ejemplo, el fragmento OPC-06₁₁₀₀ se observó ocasionalmente como una banda fuerte en acículas e intermedia en gametofito y embrión (Figura 4). Las diferencias observadas pueden deberse a su vez a diferencias en la pureza del DNA extraído de las muestras de acículas.

Cuadro IV. Fragmentos con diferencias en la intensidad de amplificación.
Intensidad de las bandas: F = fuerte, I = intermedia y D = débil.

Fragmentos	Acículas	Megagametofito	Embrión
OPA-11 1900	I	F	F
OPA-11 1800	I	D	D
OPA-11 700	I	D	D
OPA-08 550	I	D	D
OPC-06 1100	I	F	F

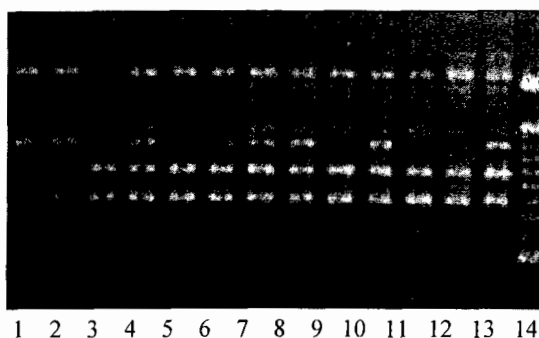


Figura 4. Diferencias en la intensidad de la amplificación del fragmento OPC-06₁₀₀ en acículas (1,2), megagametofitos (3,5,7,9,11,13) y embriones (4,6,8,10,12). Marcador de 100 pb (14) en *P. ayacahuite*.

Aunque en nuestro estudio no se observaron diferencias en los patrones de amplificación de acículas, gametofitos y embriones, ha sido señalado que el tipo de muestra y su calidad pueden generar artefactos en los patrones de bandeo de marcadores RAPDs (Ellsworth *et al.*, 1993). En el análisis de la variación genética de poblaciones naturales con estos marcadores, la variación generada por artefactos representa un importante problema, por lo que este tipo de variación debe diferenciarse del verdadero polimorfismo, para efectuar un análisis confiable con marcadores RAPDs. En el trabajo de Isabel *et al.* (1999), al analizar la diversidad genética de los genotipos diploides para marcadores RAPDs de *P. strobus* se infieren a partir del megagametofito haploide y el análisis se efectúa como marcadores dominantes; sin embargo, en este trabajo no se especifica si se efectuó un análisis previo de los perfiles de amplificación en acículas y gametofitos que permitiera eliminar artefactos y validar la inferencia del genotipo diploide a partir del haploide.

Es importante señalar que frecuentemente se observaron individuos heterocigotos u homocigotos para el alelo nulo, en los que el fragmento no aparecía en el gametofito pero si estaba presente en el embrión. En la Figura 4 se observa que el individuo es heterocigoto para OPC-06₁₃₀₀, el fragmento se observa en acículas, en los gametofitos 7 y 13 pero esta ausente en el resto de los gametofitos; sin embargo, el fragmento está presente en los embriones 4, 6, 8 y 10. Lo anterior podría utilizarse para realizar futuros estudios de flujo

genético a través del análisis del genotipo del embrión en árboles homocigotos para el alelo nulo.

V.2. Reproducibilidad

El análisis de reproducibilidad de los fragmentos amplificados en las réplicas realizadas con *Taq* pol de dos marcas comerciales (Perkin Elmer e Invitrogen), reveló 19 fragmentos que presentaron un porcentaje de reproducibilidad superior al 90% (Cuadro V). El iniciador con el menor número de bandas intensas (OPA-11) amplificó los fragmentos menos reproducibles (OPA-11₁₉₀₀ y OPA-11₇₅₀), el promedio de reproducibilidad de este iniciador al considerar el total de los fragmentos fue de 91%. Los iniciadores OPA-08 y OPC-06 presentaron promedios de reproducibilidad superiores al 98%. Los patrones generados con los tres iniciadores en las dos réplicas se muestran en las Figuras 5, 6 y 7.

Cuadro V. Reproducibilidad (R) de los fragmentos por iniciador en las réplicas de la amplificación.

Iniciador					
OPA-11		OPA-08		OPC-06	
Fragmento (pb)	R (%)	Fragmento (pb)	R (%)	Fragmento (pb)	R (%)
1900	81	1700	100	2200	100
1800	90	1100	100	1700	100
1500	100	950	100	1300	100
1300	90	850	100	1100	93
1200	90	750	100	900	100
1050	100	550	92		
900	100				
850	90				
750	81				
Promedio	91.3		98.6		98.6

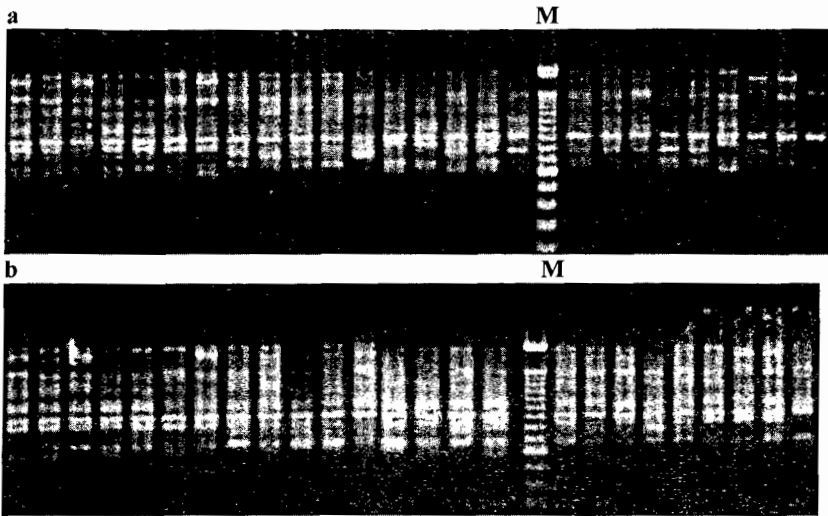


Figura 5. Réplicas de la amplificación con el iniciador OPA-11. Gel a, *Taq* pol Invitrogen, Gel b, *Taq* pol Perkin Elmer. M representa marcador de 100 pb en *P. ayacahuite* var. *veitchii*.

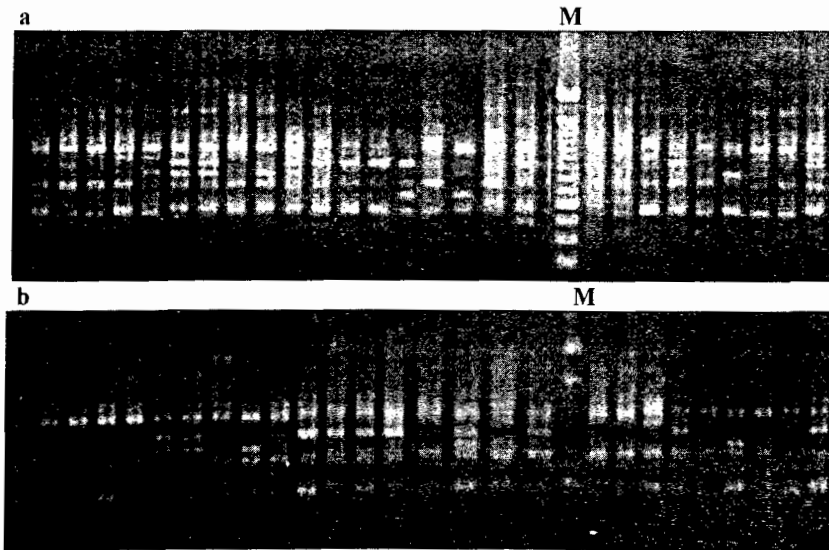


Figura 6. Réplicas de la amplificación con el iniciador OPA-08 Gel a, *Taq* pol Invitrogen, Gel b, *Taq* pol Perkin Elmer. M representa marcador de 100 pb en *P. ayacahuite* var. *veitchii*.

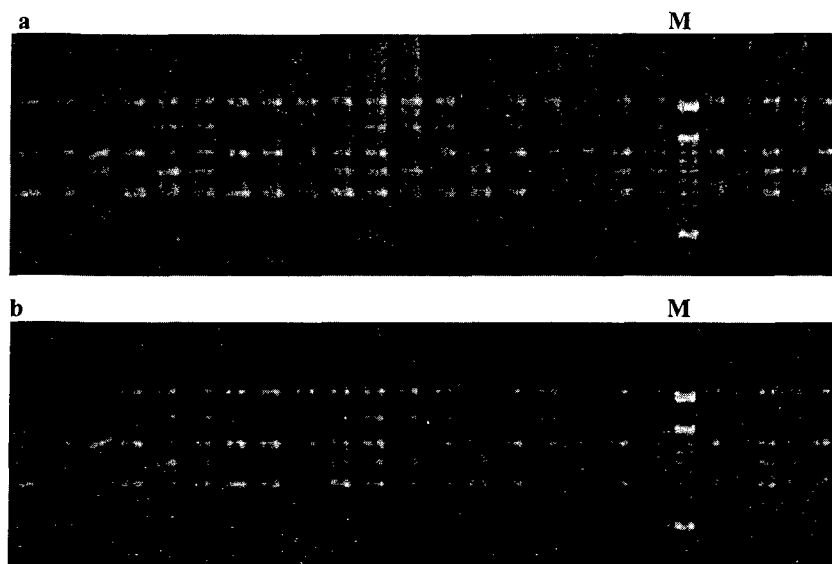


Figura 7. Réplicas de la amplificación con el iniciador OPC-06 Gel a, *Taq* pol Invitrogen, Gel b, *Taq* pol Perkin Elmer. M representa marcador de 100 pb *P. ayacahuite* var. *veitchii*.

El análisis de la reproducibilidad en las réplicas de la extracción reveló 20 fragmentos con un porcentaje de reproducibilidad superior al 90%. Solamente el fragmento OPC-06750 mostró un porcentaje inferior al 90%. En general, el promedio de reproducibilidad por iniciador fue superior al 90%, (Cuadro VI). Los patrones de amplificación generados con los tres iniciadores en las réplicas de la extracción se muestran en la Figura 8.

Cuadro VI. Reproducibilidad (R) de los fragmentos por iniciador en las réplicas de la extracción de DNA de acículas.

		Iniciador			
OPA-11		OPA-08		OPC-06	
Fragmentos (pb)	R (%)	Fragmento (pb)	R (%)	Fragmento (pb)	R (%)
1900	100	1700	91	2200	100
1800	100	1100	91	1700	100
1500	100	950	100	1300	100
1300	100	850	82	1100	100
1200	90	750	100	900	100
1050	100	550	100	750	89
900	100				
850	100				
750	100				
Promedio	99%		94%		98%

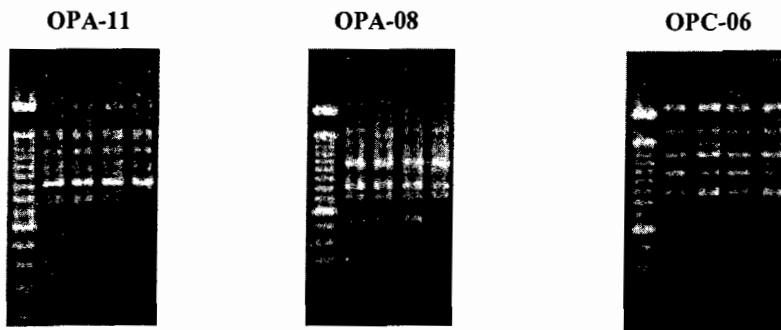


Figura 8. Amplificación de RAPDs con OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en réplicas de la extracción de DNA de acículas.

Se ha señalado repetidamente que los marcadores RAPDs presentan problemas de reproducibilidad entre diferentes laboratorios y aún entre réplicas en un mismo laboratorio (Ritland y Ritland, 2000; Harris, 1999; Wolfe, 1998). La reproducibilidad de un marcador particular puede afectarse por diversos factores. Así, variaciones en la pureza del DNA, en la concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y en la relación iniciador/DNA molde, pueden modificar los patrones de bandeó. Además, diferencias en las temperaturas de

alineación y la utilización de diferentes tipos de polimerasas termoestables, pueden tener efectos sobre los patrones de RAPDs. Aquellos marcadores RAPDs que amplifican aún con alineaciones incompletas, se espera que sean particularmente sensibles a cambios en el protocolo. Skroch y Nienhuis (1995) reportan un 76% de reproducibilidad entre réplicas de la amplificación al analizar genotipos de *Phaseolus vulgaris* con marcadores RAPDs. La alta reproducibilidad de los marcadores observada en este trabajo puede ser resultado de la estandarización y optimización de la técnica PCR-RAPD realizada previamente en el laboratorio, particularmente la optimización de la concentración de $MgCl_2$ por iniciador y al hecho de que la amplificación se realizó con iniciadores seleccionados (Arvizu, 2003).

V.3. Análisis de Segregación.

De un total de 22 fragmentos producidos con los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06, 21 se analizaron como marcadores codominantes. El genotipo diploide (homocigoto para la presencia del fragmento AA, heterocigoto AB y homocigoto para el alelo nulo BB) se infirió a través del genotipo haploide de los gametofitos. Siete de estos fragmentos resultaron monomórficos (OPA-08₁₇₀₀, OPA-08₁₁₀₀, OPA-08₇₅₀, OPA-11₁₉₀₀, OPC-06₂₂₀₀, OPC-06₁₃₀₀ y OPC-06₉₀₀) mientras que los 14 restantes fueron polimórficos de acuerdo al criterio de considerar un *locus* como polimórfico, cuando el alelo más común presenta una frecuencia menor a 0.95.

Dos de los *loci* polimórficos (OPC-06₁₁₀₀, OPC-06₇₅₀) mostraron una considerable distorsión en la segregación alélica (Cuadro VII); restando así, solamente 12 *loci* polimórficos y siete monomórficos para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg (Cuadro VIII). Aunque los *loci* OPA-11₁₉₀₀, OPA-11₁₅₀₀, OPA-11₁₀₅₀, OPA-11₉₀₀ y OPA-08₁₇₀₀ presentaron un exceso de alelos segregantes, el tamaño de la muestra analizada (1 o 2 individuos heterocigotos), no es suficiente para la definición de estos resultados, sería importante analizar un mayor número de individuos heterocigotos para estos marcadores. Exceptuando al *locus* OPA-11₁₅₀₀, el resto de los *loci* polimórficos mostraron el equilibrio de Hardy-Weinberg. El número de heterocigotos esperados para este marcador fue de 0.24, sin embargo el número de heterocigotos observados fue de 0.09, el valor de chi cuadrada fue de 6.3 ($p=0.01$), y el índice de fijación de 0.614. El promedio del índice de fijación para todos los fragmentos RAPDs fue de 0.03.

Cuadro VII. *Loci* que mostraron distorsión en la segregación alélica

<i>Locus</i>	Heterocigotos	No. de alelos positivos	No. de alelos nulos	Exceso %
OPA-11 1900	1	2	3	20
OPA-11 1500	1	6	2	33
OPA-11 1050	2	13	8	23.8
OPA-11 900	1	3	2	20
OPA-08 1700	2	4	7	27
OPC-06 1100	5	22	14	22
OPC-06 750	5	29	16	28.8

Cuadro VIII. Determinación el equilibrio de Hardy-Weinberg en fragmentos RAPDs como marcadores codominantes.

<i>Loci</i>	Tamaño de la muestra	Heterocigotos observados	Heterocigotos esperados	Chi cuadrada	p	Índice de fijación
OPA-11 1800	22	0.4545	0.5238	0.2115	0.6455	0.0909
OPA-11 1500	22	0.0909	0.2468	6.3	0.01	0.614
OPA-11 1300	22	0.4545	0.5063	0.1282	0.7203	0.0598
OPA-11 1200	22	0.5455	0.5195	0.0303	0.8618	-0.1
OPA-11 1050	22	0.1818	0.1732	0.0526	0.8185	-0.1
OPA-11 900	22	0.1818	0.1732	0.0526	0.8185	-0.1
OPA-11 800	22	0.6364	0.5065	0.8012	0.3707	-0.3162
OPA-08 1700	22	0.0909	0.0909	0	1	-0.0476
OPA-08 1100	22	0.0000	0.0000	-	-	0.0000
OPA-08 950	22	0.3636	0.5195	1.0909	0.2962	0.2667
OPA-08 850	22	0.2727	0.4545	2	0.1572	0.3714
OPA-08 750	22	0.0000	0.0000	-	-	0.0000
OPA-08 550	22	0.2727	0.2468	0.1754	0.6753	-0.1579
OPC-06 2200	22	0.0000	0.0000	-	-	0.0000
OPC-06 1700	22	0.4545	0.4545	0	1	-0.0476
OPC-06 1300	22	0.0000	0.0000	-	-	0.0000
OPC-06 900	22	0.0000	0.0000	-	-	0.0000
Promedio	22	0.2443	0.26	-	-	0.0314

En pinos es frecuente observar una distorsión de la segregación o desviación de la relación esperada (1:1) en alelos de genes que codifican para proteínas (Ledig, 1998). En el caso de los RAPDs es probable que la distorsión de la segregación sea resultado de un origen citoplásmico del marcador, ya que los cloroplastos se heredan a través del polen paterno (Wolfe, 1998).

El tamaño de la muestra (n=12) estuvo determinado por el número de árboles en los que se disponía de conos maduros. El desconocimiento de la fenología de la mayoría de las poblaciones de *P. ayacahuite* dificulta el muestreo de acículas y conos en buenas condiciones. El número de gametófitos analizados por árbol es suficiente para la identificación de individuos heterocigotos, ya que la probabilidad de no detectarlos cuando se analizan de seis a ocho megagametofitos, es de 3 a 1% (Isabel *et al.*, 1999).

V.4. Diversidad y Diferenciación Genética.

El número total de fragmentos utilizados para estimar la diversidad y la diferenciación genética a nivel poblacional fue de 20, debido a la imposibilidad de analizar claramente el fragmento OPC-06750 en las dos poblaciones de *P. ayacahuite*. El análisis de diversidad reveló 12 *loci* polimórficos en la población del Estado de México y 13 *loci* polimórficos en la población de Michoacán. Lo anterior representó un 60% de polimorfismo promedio para la primera población y un 65% para la segunda. El índice de diversidad de Nei (h) en la población del Estado de México fue de 0.27 y el de Shannon (I) de 0.38; la población de Michoacán presentó un valor de $h=0.25$ y un valor de $I=0.38$. El análisis de diferenciación poblacional mostró un valor de $F_{ST}=0.1$ y una distancia genética de $Nei=0.08$. En promedio al considerar ambas poblaciones ($n=40$), *P. ayacahuite* presentó 15 *loci* polimórficos lo que representa 75% de polimorfismo promedio y valores de $h=0.29$ y de $I=0.42$.

Cuando se eliminaron los fragmentos menos reproducibles, el fragmento que no mostró equilibrio Hardy-Weinberg y aquellos fragmentos que presentaron una fuerte distorsión de la segregación mendeliana, restaron solamente 16 fragmentos para realizar el análisis de diversidad y diferenciación genética. Este análisis reveló solamente 8 *loci* polimórficos en la población del Estado de México y 11 *loci* polimórficos en la población de Michoacán. Los porcentajes de polimorfismo promedio fueron de 50% para la primera población y 69% para la segunda. El índice de Nei y el Shannon fueron de 0.22 y 0.34 respectivamente para la primera población, y de 0.27 y 0.39 para la segunda. La gran perturbación del bosque en el que se encuentra la población de *P. ayacahuite* var. *veitchii* en el Estado de México podría explicar los niveles de variación genética más bajos en relación a la población de *P. ayacahuite* de Michoacán. El análisis de diferenciación poblacional reveló un valor de $F_{ST}=0.12$ y una distancia genética de $Nei=0.09$. En promedio al considerar ambas poblaciones ($n=40$), *P. ayacahuite* presentó 11 *loci* polimórficos lo que representa 69% de polimorfismo promedio y valores de $h=0.28$ y de $I=0.41$.

Los resultados revelan que cuando se consideraron todos los fragmentos RAPDs para analizar la diversidad genética, se obtuvieron niveles de variación genética muy similares en las dos poblaciones. Sin embargo, el análisis efectuado con fragmentos RAPDs

seleccionados, con base en la reproducibilidad y la segregación, reveló un valor de variación más alto en la población de Las Palmas, Michoacán. Además al considerar solamente este grupo de marcadores, se observó una mayor diferenciación poblacional ya que tanto el valor de F_{ST} como la distancia genética de Nei revelaron valores más altos.

Al trabajar con los 16 fragmentos RAPDs más confiables y realizar el análisis de diversidad y diferenciación genética considerando estos marcadores como codominantes, se obtuvieron índices de diversidad similares a los revelados por el análisis de RAPDs como marcadores dominantes, los índices de variación genética fueron también más altos en la población de Las Palmas, Michoacán. Sin embargo, se observaron diferencias en los indicadores de diferenciación poblacional, la distancia genética de Nei fue de 0.04 y el valor de F_{ST} fue de 0.068. Estos valores indican muy poca diferenciación entre las poblaciones. Es importante señalar que en esta parte de nuestro trabajo se analizó un número reducido de muestras ($n=5$ para la población de Michoacán y $n=6$ para la población del Estado de México). Sin embargo, nuestros resultados son similares a los reportados por Isabel *et al.* (1999) quienes reportan una sobrestimación de los valores de diferenciación poblacional cuando los RAPDs se analizan como marcadores dominantes.

Las ventajas que presentan los marcadores RAPDs en relación a otros marcadores moleculares, hacen que estos sean preferidos para el análisis de la estructura genética de una gran cantidad de especies eucariotas. Sin embargo, en estos estudios generalmente se considera el total de los fragmentos amplificados en la reacción PCR-RAPDs, independientemente de su reproducibilidad y del tipo de segregación que presenten. El ensayo de la reproducibilidad de los RAPDs es simple e incrementa la confianza en el registro y análisis de los datos. Las gimnospermas presenta la ventaja de que a través del genotipo observado en los gametofitos de un mismo árbol, es posible analizar y así seleccionar aquellos marcadores que presenten segregación mendeliana. La selección de marcadores RAPDs reflejará a su vez valores más confiables de variación y diferenciación genética.

Cuadro IX. Variación y diferenciación genética de *P. ayacahuite*.

Población	No. de loci	No. de loci polimórficos	P	H	I	F _{ST} / Distancia Genética
Michoacán	20	13	65%	0.25	0.37	0.1 / 0.08
Edo de México	20	12	60%	0.27	0.38	
<i>P. ayacahuite</i>	20	15	75%	0.29+ 0.20	0.43+ 0.28	
Michoacán	16	11	69%	0.27+ 0.20	0.39+ 0.29	0.12 / 0.09
Edo. de México	16	8	50%	0.22+ 0.24	0.33+ 0.34	
<i>P. ayacahuite</i>	16	11	69%	0.28+ 0.22	0.41+ 0.30	

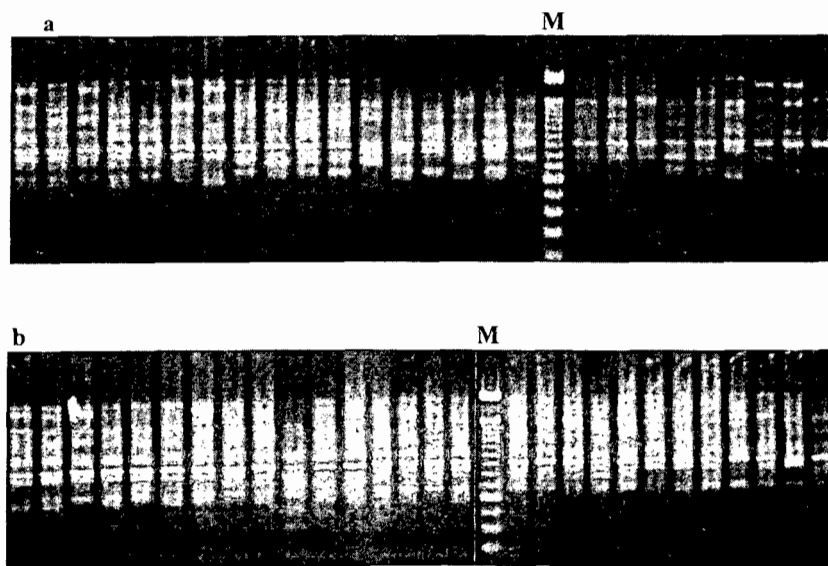


Figura 9. Amplificación de marcadores RAPDs con OPA-11 en las poblaciones: Gel a, Estado de México; Gel b, Michoacán.

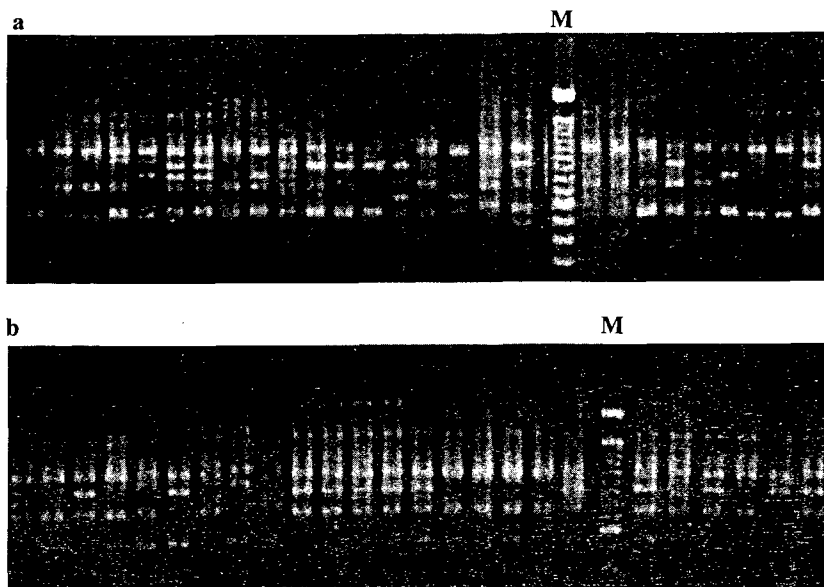


Figura 10. Amplificación de marcadores RAPDs con OPA-08 en las poblaciones: Gel a, Estado de México; Gel b, Michoacán.

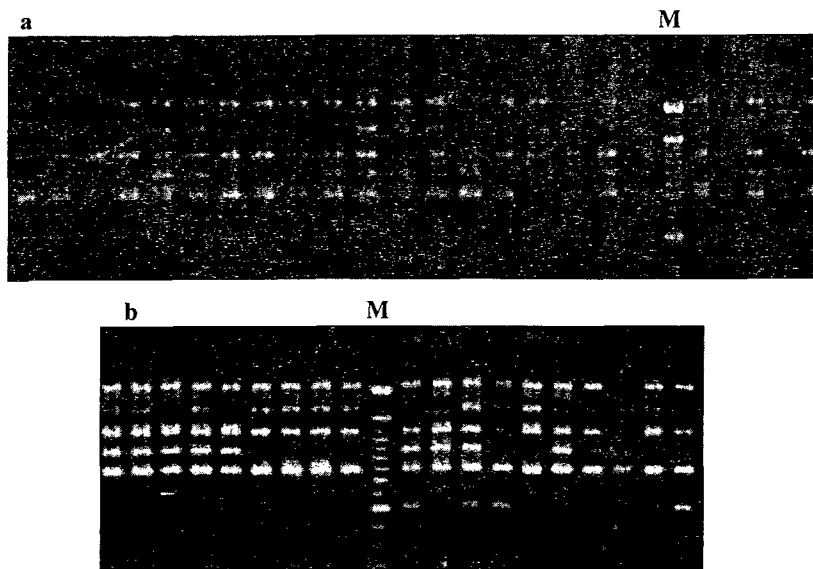


Figura 11. Amplificación de marcadores RAPDs con OPC-06 en las poblaciones: Gel a, Estado de México; Gel b, Michoacán.

VI. CONCLUSIONES

- Se observaron los mismos patrones de amplificación de marcadores RAPDs con los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en genoma diploide (acículas y embriones) y en genoma haploide (megagametofito) de pinos. Es posible trabajar marcadores RAPDs utilizando cualquiera de las fuentes de DNA mencionadas.
- La optimización de las condiciones de las reacciones PCR-RAPDs y el empleo de iniciadores seleccionados, incrementa considerablemente la reproducibilidad de los fragmentos amplificados.
- La mayoría de los marcadores RAPDs analizados presentan la segregación esperada para herencia mendeliana. Esto demuestra indirectamente el origen nuclear de los marcadores. Es importante señalar que es necesario aumentar el número de individuos heterocigotos analizados para definir claramente el patrón de segregación de los *loci* OPA-11₁₉₀₀, OPA-11₁₅₀₀, OPA-11₁₀₅₀, OPA-11₉₀₀ y OPA-08₁₇₀₀.
- Exceptuando al *locus* OPA-11₁₅₀₀, los marcadores RAPDs presentaron equilibrio de Hardy-Weinberg. Se desconoce la causa del desequilibrio observado.
- Se presenta una mejor resolución en la diferenciación genética cuando se trabaja con marcadores RAPDs confiables (reproducibles y con segregación mendeliana). El valor de F_{ST} de 0.12 refleja un nivel de diferenciación moderado entre las dos poblaciones .
- *Pinus ayacahuite* presenta altos niveles de variación genética. La población de Las Palmas, Michoacán presenta mayor variación genética que la población de Tlalmanalco Edo. de México. Lo anterior podría estar relacionado con las condiciones de explotación y las formas de manejo que presentan ambas poblaciones.

VII. LITERATURA CITADA

- Andresen, J.W. 1964. The taxonomic status of *Pinus chiapensis*. *Phytologia* 10: 417-421.
- Arvizu, L. 2003. Caracterización de marcadores RAPDs *Pinus Chiapensis* y en el complejo *Pinus ayacahuite* – *P. strobiformis*. Tesis Licenciatura. Universidad de Guadalajara. México.
- Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G. 1993. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods in Enzymology* pp 295-309.
- Bruederle, L.P., Rogers, D.L., Krutovskii, K.V., Politov, D.V. 2001. Population genetics and evolutionary implications. En: Tomback D.F., Arno S.F., Keane R.E., (eds.) *Whitebark pine communities*, Island Press pp 137-153.
- Catalán, P., Shi, Y., Armstrong, L., Draper, J., Stace, C.A. 1995. Molecular phylogeny of the grass genus *Brachipodium* P. Beauv. based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 117: 263-280.
- Critchfield, W.B., Little, E.L. 1966. Geographic distribution of the pines of the world. USDA Forest Service Miscellaneous Publications 991.
- Díaz, V., Muñiz, M., Ferrer, E. 2001. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology* 10: 2593-2603.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D., Risenberg, L.H. 1996. Nucleic acids III: Analysis of basements and restriction sites. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, pp 249- 230.
- Eguiluz, P.T. 1982. Clima distribución del género *Pinus* en México. *Ciencia Forestal* 38: 30-44.
- Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D., Honeycutt, L.R. 1993. Artfactual variation in Random Amplified Polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 14: 214-217.
- Ern, H. 1976. Descripción de la vegetación montañosa de los Estados Mexicanos de Puebla y Tlaxcala. *Willdenowia* 10: 128.

- Excoffier, L., Smousse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics* 131: 479-491.
- Farjon, A., Pérez de la Rosa, J.A., Styles, B. 1997. Guía de campo de los Pinos de México y América Central. Royal Botanic Gardens, Kew. Universidad de Oxford.
- Farjon, A., Styles, B. 1997. *Pinus* (Pinacea). The New York Botanical Garden. New York
- Furman, B.J., Grattapaglia, D., Dvorak, W.S., O'Malley D.M. 1997. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican Pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology* 6: 321-331.
- Gillies, A.C.M., Cornelius, J.P., Newton, A.C., Navarro, C., Hernández, M., Wilson, J. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrella odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology* 6: 1133-1145.
- Hadrys, M., Balick, M., Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles, S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plants species. *New Forests* 6: 95-124.
- Hanski, I. 1999. Metapopulation Ecology. Oxford Series in Ecology and Evolution. pp 105.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1989. Population structure of multilocus associations. *Proceedings of National Academy of Science USA* 78: 5913-5916.
- Harris, S.A. 1999. RAPDs in systematics – a useful methodology? En: *Molecular systematics and plant evolution*. P. M. Hollingsworth, R. M. Batesman, R. J. Gornall (eds.), Taylor y Francis. London pp 211-228.
- Hernández, J.J. 1990. Variación genética isoenzimática en *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades de México y Centroamérica. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Hu, J., Quiros, C.F. 1991. Identification of brocoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Report* 10: 505-511.
- Isabel, N., Beaulieu, J., Bousquet, J. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data, alloenzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 6369-6373.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudense des Sciences Naturelles* 44: 223-270.

- Kim, C.S., Lee C.H., Shin J.S., Shung Y.S., Hyung N.I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research* 25: 1085-1086.
- Lanner, R.M. 1996. Made for each other: A symbiosis of birds and pines. Oxford University Press, New York.
- Ledig, F.T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. En: Richardson D. M. (ed), Ecology and biogeography of *Pinus*, Cambridge University Press, Cambridge pp 251-280.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398.
- Liston, A., Robinson, W.A., Piñero, D., Álvarez-Buylla, E.R. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution* 11: 95-109.
- Little, E.L.Jr., Critchfield, W.B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus*. U. S. Forest Service Miscellaneous Publications 1144, Washington, D. C., 51.
- Lu, M., Szmidt A.E., Wang, X. 1995. Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris*. *Heredity* 74: 582-589.
- Lynch, M., Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos. Subsecretaría de Recursos Forestales y de Caza, Secretaría de Agricultura y Ganadería. 2ª edición, ediciones Botas, México.
- Mosseler, A., Egger, K.N., Hughes, G.A. 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 1332-1337.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M., Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 5269-5273.
- Newton, A.C., Allnut, T.R., Dvorak, W. C., Del Castillo R.F., Ennos, R.A. 2002. Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity* 89: 191-198.

- Nybom, H., Bartish, I.V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives on Plant Ecology Evolution and Systematics* 3/2: 93-114.
- O'Malley, D.M., Grattapaglia, D., Chaparro, J.X., Wilcox, P.I., Amerson, H.V., Liu, B.H., Whetten, R., McKeand, S., Kuhlman, E.G., McCord, S., Crane, S., Sederoff, R. 1996. Molecular Markers, Forest Genetics and Tree Breeding. En *Genomes of Plants and Animals: 21st Stadler Genetics Symposium*. Plenum Press, New York.
- Otero, A.A., De la Cruz, M. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad de Botánica* 60: 85-117.
- Ouborg, N.J., Piquot, Y., Van-Groenendael, M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87: 551-568.
- Palomera, V. 2002. Comparación de métodos de extracción de DNA en diferentes tejidos de tres especies de pinos blancos (*Pinus* spp.). Tesis Licenciatura. CUCBA, Universidad de Guadalajara.
- Pearson, C.V.M., Rogers, A.D., Shearer, M. 2002. The genetic structure of the rare lagoonal sea anemone, *Memmatostella vectensis* Stephenson (Cnidaria; Anthozoa) in the United Kingdom based on RAPD analysis. *Molecular Ecology* 11: 2285-2293.
- Pérez de la Rosa, J.A. 1993. Taxonomía de *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.
- Perry, J.P. 1991. The pines of Mexico and Central America. The Timber Press, Inc. Portland.
- Price, R.A., Liston, A.L., Strauss, S.H. 1998. The history of pines in Mexico and Central America. En: Richardson, D. M. (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge pp 49-68.
- Reisenberg, L.H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* 5: 99-105.
- Ritland, C., Ritland, K. 2000. DNA-Fragment Markers in Plants. En: Baker A. J. (ed.) *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Ltd. pp 208-234.
- Rogers, S.O. Phylogenetic and taxonomic information from herbarium and mummified DNA. En Adams R. P., Miller R. P., Golenberg E. M., Adams J. E. 1994. *Conservation of plant genes II: Utilization of ancient and modern DNA*. Missouri Botanical Garden.
- Sambrook, J., Fritsh E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor.

- Shannon, C.E., Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Skroch, P., Nienhuis, J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1086-1091.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman: San Francisco.
- Szmidtl, A.E., Wang, X.R., Lu, M.Z. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestri* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76: 412-420.
- Tomback, D.F., Arno S.F., Keane, R.E. 2001. The Compelling Case for Management Intervention. En *Whitebark Pine Communities. Ecology and Restoration*. Island Press.
- Tulsieram, L.K., Glaubitz, J.C, Kiss, G., Carlson, J.E. 1992. Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. *Biotechnology* 10: 686-690.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E., Lofhi, M. A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. En: *Applications of RAPD markers to plan breeding*. Crop Science Society of America pp 12-17.
- Williams, J.G.F., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J A., Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218: 704-740.
- Wolfe, A.D., Liston, A. 1998. Contributions of PCR- based methods to plant systematics and evolutionary biology. En: Soltis D.E., Soltis P.S., Doyle J.J., (eds.) *Molecular Systematics of Plants II*, Kluwe Academic Publishers pp 43-86.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals Eugenics* 15: 323-354.
- Wu, R.L., O'Malley, D.M., McKeand, S.E. 1999. Understanding the genetic architecture of quantitative trait in gymnosperms by genotyping haploid megagametophytes. *Theor Appl*.

ANEXO 1: PROTOCOLOS

A. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE DNA

1. Protocolo de Extracción de DNA a partir de acículas.

1. Triturar 1 g de tejido (acículas) con nitrógeno líquido, en un mortero (previamente enfriado a -20°C), hasta obtener un polvo fino. (Para evitar degradación del DNA durante el proceso de extracción tomar las muestras una por una del congelador).
2. Transferir la muestra con una espátula a un tubo de 50 ml con 8 ml de amortiguador de extracción CTAB 2X previamente calentado a 65°C . Mezclar suavemente por inversión, hasta homogenizar completamente. (amortiguador CTAB 2X (pH 8) 100 ml: CTAB 2%-2g, Tris 100mM-1.21g, NaCl 1.4M-8.18g, EDTA 20mM- 0.744g y PVP 10%-1g).
3. Incubar en baño maría a 65°C por 60 minutos; a los 30 min. mezclar suavemente por inversión 2-3 veces. Después de la incubación enfriar a temperatura ambiente 5-7 min.
4. Agregar 7.5 ml de solución Cloroformo- alcohol isoamílico 24-1, mezclar por inversión suavemente 2 o 3 veces y permitir que el gas escape.
5. Centrifugar a 4,000 rpm por 25 minutos.
6. Transferir la fase acuosa, con ayuda de una micropipeta de 1000 μl , a un tubo de 50 ml limpio.
7. Añadir un volumen igual de isopropanol frío y mezclar suavemente hasta precipitar el DNA. En caso de no obtener una hebra mantener a -20°C por 30 min. o toda la noche.
8. Transferir la hebra de DNA precipitado con una micropipeta de 1000 μl (cortar la punta) a un tubo de 50 ml limpio, en caso de no obtener precipitado centrifugar dos minutos a 2,500 rpm para formar una pastilla y eliminar el sobrenadante.
9. Añadir 10 ml de amortiguador de lavado al precipitado o pastilla y mezclar lentamente por inversión. Mantener por 20 min. en el amortiguador de lavado (cada 5 min. mezclar por inversión). Recuperar la hebra de DNA (eliminar con la ayuda de la micropipeta el amortiguador de lavado o decantar si es posible) o centrifugar a 2,500 rpm por 2 min. (amortiguador de lavado 100 ml: Etanol 76% - 76ml, Acetato de amonio 10 mM - 0.07g).
10. Secar con aire por un tiempo corto. Añadir 1 ml de amortiguador TE y disolver completamente la hebra o pastilla. (amortiguador TE 100 ml: Trisma 10mM-0.121g y EDTA 1mM-0.018g).
11. Agregar 5 μl de RNAsa (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubar por 30 minutos a 37°C .
12. Agregar 2 ml de agua destilada.
13. Añadir 1.5 ml acetato de amonio 7.5M (Para 50 ml: Acetato de Amonio-28.905 g) Mezclar suave por inversión.
14. Inmediatamente añadir 10 ml de etanol frío, mezclar suavemente hasta precipitar el DNA.
15. Recuperar la hebra de DNA o centrifugar a 8,500 rpm por 10 min. para formar la pastilla.
16. Lavar con 5 ml de etanol al 70%, centrifugar a 2,500 rpm por 2 min.
17. Decantar, secar con aire y resuspender en 500-1000 μl de TE (250 μl sin hebra o pastilla). Disolver durante 2 h a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente.
18. Almacenar el DNA genómico obtenido en congelación a -20°C hasta su uso.

2. Protocolo Micro-método de Extracción de DNA para Megagametofitos y Embriones (*Palomera, 2002*)

1a. Triturar el **megagametofito** en un tubo de 2.0 ml con 200 μ l de amortiguador de extracción CTAB 2X. Añadir 600 μ l de amortiguador CTAB 2X y mezclar por inversión suavemente hasta homogenizar.

1b. Triturar el **embrión** en un tubo de 2.0 ml con 200 μ l de amortiguador de extracción CTAB 2X. Añadir 300 μ l de amortiguador CTAB 2X y mezclar por inversión suavemente hasta homogenizar el tejido.

2. Incubar a 65°C por 60 min.

3. Después de la incubación, los tubos se enfrían a temperatura ambiente de 5 -7 minutos.

4a. Al **megagametofito** añadir 800 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1), mezclar suavemente por inversión.

4b. Al **embrión** añadir 500 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente por inversión.

5. Centrifugar por 25 minutos a 4500 rpm.

6. Recuperar el sobrenadante que contienen el DNA y transferirlo con la pipeta de 200 μ l a otro tubo (Nota: \approx 700 μ l en megas y \approx 250 μ l para embriones).

7. Agregar 700 μ l de isopropanol frío. Invertir suavemente varias veces hasta precipitar el DNA.

8. Transferir el DNA precipitado a un tubo de 1.5 ml con la pipeta de 1000 μ l. Centrifugar por 1 o 2 min. a 2,500 rpm.

9. Añadir 1 ml de amortiguador de lavado e invertir suavemente. Mantener durante 20 minutos y eliminar el amortiguador de lavado con la pipeta de 1000 μ l, o centrifugar a baja velocidad (2,500 rpm 2min).

10. Secar con aire por un tiempo corto. Añadir 200 μ l de amortiguador TE y disolver la hebra o pastilla de DNA.

11. Agregar 70 μ l de agua destilada y 130 μ l de acetato de amonio 7.5M. Mezclar suavemente por inversión.

12. Añadir 850 μ l de etanol frío, mezclar suavemente hasta precipitar el DNA.

13. Recuperar la hebra de DNA o centrifugar a 4,500 por 5 minutos para formar pastilla.

14. Lavar con 1 ml de etanol 70%, y centrifugar a 2,500 rpm por 2 min. repetir el proceso 2 a 3 veces.

15. Decantar el etanol con la pipeta y añadir 200- 400 μ l de amortiguador TE. Disolver durante 2 h a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Nota: Almacenar el DNA genómico obtenido, en congelación a -20°C hasta su uso.

B. Cuantificación de DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

La concentración del DNA se determinó por espectrofotometría con luz UV.

1. Diluir 10 μ l de DNA en 990 μ l de H₂O destilada.
2. Leer la absorbancia a 260 nm (DO). Calibrar con blanco de H₂O.
3. Calcular la concentración multiplicando: $DO_{260} \times 100^* \times 50^{**} = \text{ng}/\mu\text{l}$
 - Factor de dilución: 1000/10 o 1/100 y ** 1 DO de DNA genómico (50 ng/ μ l o μ g/ml).

C. Reprecipitación del DNA.

1. 1 ml de etanol absoluto frío y mezclar suavemente varias veces hasta precipitar el DNA por inversión.
2. Incubar en el congelador a -20°C por 20 min. o toda la noche.
3. Recuperar la hebra o en caso de no obtener hebra centrifugar durante 15 min. a 7,000 o 10,000 rpm por 15 min. para formar una pastilla.
4. Decantar el alcohol.
5. Lavar con 50 μ l de etanol al 70% frío mezclar suavemente varias veces por inversión durante 20 min. Repetir el proceso dos a tres veces más.
6. Decantar, secar con aire y resuspender en 200-500 μ l de TE. Disolver el DNA toda la noche a temperatura ambiente.
7. Almacenar el DNA genómico obtenido en congelación a -20°C hasta su uso.

D. Determinación de la Pureza del DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

La calidad del DNA se determinó por espectrofotometría.

1. Con la dilución anterior.
2. Leer la absorbancia a 280 nm. Usar blanco de H₂O, para calibrar.
3. Determinar el grado de pureza con la relación: $DO_{260}\text{-DNA}/DO_{280}\text{ proteínas}$.
Relación: > 1.7 (buen grado de pureza) y < 1.7 (contaminación con proteínas).

E. Electroforesis en Gel de Agarosa (Sambrook *et al.*, 1989)

La calidad del DNA también se determinó por electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis muestra la posibilidad de contaminación del DNA con sales o proteínas, así como su integridad o degradación.

Correr 6 μ l de DNA genómico con 4 μ l de jugo azul 6X (*Para 10 ml*: Xilencianol 25 mg; Azul de bromofenol 25 mg y Glicerol 3 ml), en un gel de agarosa al 0.8%, con las condiciones descritas a continuación.

a) Preparación del gel (40 ml al 0.8%)

Agarosa	0.32 g
Amortiguador TBE 1X	40 ml

1. Sellar los bordes del molde y colocar el peine.
2. Disolver la agarosa en el amortiguador TBE 1X en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, calentar en una plancha o microondas hasta que la solución este transparente.

3. Enfriar aproximadamente a 50°C y vaciar al molde (evitar las burbujas), gelificar a temperatura ambiente de 30-40 min.

b) *Corrimiento Electroforético.*

1. Remover el peine, colocar el gel en la cámara horizontal para electroforesis submarina (Easy Cast B1A, OWL Scientific), cubrir con amortiguador TBE 1X.
2. Colocar cuidadosamente la muestra en cada punto de aplicación.
3. Cerrar la cámara y acomodar el campo eléctrico cuidando que el DNA migre hacia el ánodo. Correr a 80 volts por 40-60 min. (Hasta que los colorantes migren a la tercera parte del gel).
4. Tefiir el gel en una solución con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) por 5 minutos.
5. Desteñir con agua destilada, observar el gel en un transiluminador de luz UV.

TBE 10X (1000 ml): Tris 0.89M-108 g; Ácido Bórico 0.89M -55 g y EDTA 25mM-9.3 g.

F. Protocolo para la Reacción de PCR-RAPD.

Antes de la Reacción de PCR

1. Descongelar las diluciones de DNA molde; Amortiguador PCR 10X, dNTPs 5mM, cebadores y H₂O grado molecular. Centrifugar todo a 14,000 rpm por 20 seg.
2. Marcar los tubos de reacción (tubos de 0.2 ml) y ordenarlos de la manera más conveniente para evitar errores siguiendo el diseño experimental.
3. Preparar 21 µl de Mezcla de PCR por reacción:

	3.5 mM	4.5 mM
Amortiguador PCR10X	2.5 µl	2.5 µl
MgCl ₂ 25mM	3.5 µl	4.5 µl
dNTPs 5mM	0.7 µl	0.7 µl
dH ₂ O	14.3 µl	13.3 µl

Nota: Preparar la Mezcla de PCR el mismo día de la reacción para obtener mejor resolución de los productos RAPDs, calculando una cantidad suficiente más una alícuota extra.

4. Preparar 2 µl de Mezcla Primer-*Taq* por reacción:

Iniciador	1.5 µl
dH ₂ O	0.35 µl
<i>Taq</i> Pol	0.2 µl

Reacción de PCR

5. Agregar 21 μ l de mezcla PCR en el fondo del tubo.
6. Añadir 2 μ l de DNA molde (10 o 40 ng/ μ l) y 2 μ l de la mezcla Primer-*Taq* en puntos opuestos de la pared del tubo.
7. Mezclar los componentes de la reacción, golpeando con el dedo la base del tubo.
8. Centrifugar a 14,000 rpm por 20 seg.
9. Colocar las muestras en el termociclador MJ PT-100 R con el programa de amplificación:
 - Desnaturalización Inicial a 94°C por 3 min.
 - 45 ciclos de
 - Desnaturalización a 94°C por 1 min.
 - Alineación a 36°C por 2 min.
 - Extensión a 72°C por 2 min.
 - Extensión prolongada a 74°C por 10 min.
 - Tiempo indefinido a 4°C.

10. Almacenar el producto de reacción a 4°C o -20°C hasta llevar a cabo la electroforesis.

G. Corrimiento Electroforético de los productos de la Reacción PCR-RAPDs.

Preparación de las muestras

1. Agregar 4 μ l de jugo azul 6X a cada tubo de reacción de PCR-RAPDs.
2. Centrifugar a 14,000 rpm por 20 seg.

Preparación del Gel de Agarosa al 1.8%

Para cámara OWL de 108 Pozos (3 peines de 36 pozos cada uno)

Diluir 4.32 g de agarosa en 240 ml de TBE 1X.

Para cámara EC de 80 Pozos (2 peines de 40 pozos cada uno)

Diluir 3.9 g de agarosa en 220 ml de TBE 1X

Para cámara EC de 40 Pozos

Diluir 2.16 g de agarosa en 120 ml de TBE 1X

Corrimiento Electroforético del Gel de Agarosa

1. Cargar de 13 a 15 μ l de la muestra.
2. Cargar 4 μ l del marcador de 100 pb
3. Correr a 65, 75 y 100 V en las cámaras de 40, 80 y 108 pozos respectivamente; Durante 180 min. 220 min. y 240-270 min. respectivamente; o bien hasta que el azul de bromofenol migre 6 cm.

Nota: Correr el gel siguiendo el criterio de 3 volts por centímetro.

Tinción con Bromuro de Etidio del Gel de Agarosa

1. Sumergir el gel en bromuro de etidio (c.c. 10 mg/ml) durante 30-40 min.
2. Desteñir con agua destilada al menos por 60 min.

Fotografía con el Sistema de Fotodocumentación EDAS del Gel de Agarosa.

1. Encender la cámara digital. **Nota:** Revisar que tenga los filtros.
2. Conectar la cámara con el cable de puerto serial al CPU
3. Ensamblar la cámara en la caperuza
4. Colocar el gel en el transiluminador de luz UV, cubrir con el adaptador de campo visual correspondiente al tamaño del gel.
5. Montar la caperuza con la cámara sobre el transiluminador, centrarlo con el adaptador de campo visual.
6. Encender el trasiluminador y entrar al programa 1D.
7. Abrir archivo (file) y adquirir imagen (acquire).
8. Al abrir el dialogo de la cámara se muestra la fotografía del gel con opción predeterminada de tinción con bromuro de etidio.

ANEXO 2: BASE DE DATOS

Matriz de datos binarios utilizada en el análisis de RAPDs como marcadores dominantes (20 loci).

Numero de poblaciones = 2

Numero de *loci* = 20

Nombre del *Locus*:

A11-1900 A11-1800 A11-1500 A11-1300 A11-1200 A11-1050 A11-900 A11-850 A11750
 A8-1700 A8-1100 A8-950 A8-850 A8-750 A8-550 C6-2200 C6-1700 C6-1300 C6-1100
 C6-900

Nombre de la población = Tlalmanalco, Edo. de México

fis = 0

```

1 1 0 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 1 1
1 1 1 0 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 1 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 1
1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1
1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1
1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1
1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1
1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 1
1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1
1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1
1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1
1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1

```

Nombre de la población = Las Palmas, Michoacán

fis = 0

```

1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 0 1 0 1 0 1 0 1
1 1 0 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 1 0 1 0 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 1 0 1 0 1
1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 0 1
1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1
1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1 1
1 1 0 0 1 1 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1 1
0 1 0 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1
1 1 0 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1

```

Matriz de datos binarios, elaborada con fragmentos reproducibles que segregan mendelianamente, utilizada en el análisis de RAPDs como marcadores dominantes (16 loci).

Numero de poblaciones = 2

Numero de *loci* = 16

Nombre del *Locus*:

A11-1800 A11-1300 A11-1200 A11-1050 A11-900 A11-850
 A8-1700 A8-1100 A8-950 A8-850 A8-750 A8-550
 C6-2200 C6-1700 C6-1300 C6-900

Nombre de la población = Tlalmanalco, Edo. de México

fis = 0

```

1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 0 1 1
1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 0 1 1
1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 1 1
1 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1
1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 0 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1
1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1
1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1 1 1 1 1
1 0 1 1 1 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 1
1 0 1 1 1 0 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1
1 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 0 1 0 1 1
1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 1

```

Nombre de la población = Las Palmas, Michoacán
fis = 0

```
1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0 1
1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 0 1
1 0 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 0 0 1
1 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1
1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1
1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1
1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 1
1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 0 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 0 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 1 1 0 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1
1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 0 1
0 0 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 0 1
1 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 1 1 1
```

Matriz de datos utilizada en el análisis de RAPDs como marcadores codominantes.

Numero de poblaciones = 2

Numero de *loci* = 16

Nombre del *Locus*:

A11-1800 A11-1300 A11-1200 A11-1050 A11-900 A11-850 A8-1700 A8-1100 A8-950

A8-850 A8-750 A8-550 C6-2200 C6-1700 C6-1300 C6-900

Nombre de la Población = Las Palmas, Michoacán

fis = 0

AB AB AB AB AA AB AA AA AB AA AA AB AA AA AA AA
 AA AA AA AA AA AB AB AA AA AB AA AA AA AB AA AA
 AB AB BB AA AA AA AA AA BB AA AA AB AA AB AA AA
 AB AB AA AA AB AA AA AA BB AB AA AA AA AB AA AA
 AB AA BB AA AA AB AA AA BB BB AA AA AA AA AA AA
 AA AA AA AA AA AB AA AA AB BB AA AA AA AB AA AA

Nombre de la población = Tlalmanalco, Edo. de México

fis = 0

BB AA AB AA AA AA AA AA AB BB AA AB AA BB AA AA
 BB BB AB AB AA AB AA AA AA AB AA AA AA AA AA AA
 BB AB AB AA AA AB AA AA AA BB AA AA AA AB AA AA
 AA AB AB AA AB BB AA AA BB BB AA AA AA AA AA AA
 AB BB AB AA AA AB AA AA AB BB AA AA AA AA AA AA