

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

---



**IDENTIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES NUCLEARES EN**  
*Pinus chiapensis* Y EN EL COMPLEJO  
*Pinus ayacahuite – P. strobiformis – P. flexilis.*

---

**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**

**RODOLFO ROMÁN RUBIO**

**Las Agujas, Zapopan, Jal., Junio de 2004**

---



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. RODOLFO ROMÁN RUBIO  
PRESENTE.**

Manifiestamos 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: "Identificación de microsátélites nucleares en *Pinus chiapensis* y en el complejo *Pinus ayacahuite - P. strobiformis - P. flexilis*", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DRA. ALMA ROSA VILLOBOS ARÁMBULA** y como asesores el **M.C. LUIS E. FIGUERA VILLANUEVA** y **DR. JORGE ALBERTO PÉREZ DE LA ROSA**.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., 5 de marzo del 2004

DRA. MÓNICA ELIZABETH ROJAS LÓPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

- c.c.p. **DRA. ALMA ROSA VILLOBOS ARÁMBULA**.-Director del Trabajo
- c.c.p. **M.C. LUIS E. FIGUERA VILLANUEVA**.-Asesor del Trabajo
- c.c.p. **DR. JORGE ALBERTO PÉREZ DE LA ROSA**.-Asesor del Trabajo
- c.c.p. Archivo

MERL/LHL/mam

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION  
DE LA DIVISIÓN 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 modalidad Tesis e informes opción Tesis con el título: "IDENTIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES NUCEARES EN *Pinus chiapensis* Y EN EL COMPLEJO *P. ayacahuite - Pinus strobiformis - P. flexilis*", que realizó el pasante: Rodolfo Román Rubio, con el número de código: 394413303, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen respectivo.

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



ATEB  
Las Agujas, Zapopan, Jalisco de mayo del 2004.

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
TECNICO SUPERIOR UNIVERSITARIO  
EN CONTROL DE PLAGAS URBANAS  
Y MANEJO DE AREAS VERDES

EL DIRECTOR DEL TRABAJO

LOS ASESORES

*Alma Rosa Villalobos*  
Dra Alma Villalobos A  
NOMBRE Y FIRMA

*Luis E. F...*  
*Jorge Alberto Pérez de la Rosa*  
JORGE ALBERTO PÉREZ DE LA ROSA  
NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

*Patricia Castro*  
1.- NOMBRE COMPLETO

*Fernando Santacruz Rovalcaba*  
2.- NOMBRE COMPLETO

*Aarón Rodríguez Contreras*  
3.- NOMBRE COMPLETO

*Jorge Alberto Pérez de la Rosa*  
4.- NOMBRE COMPLETO

*Patricia Castro*  
FIRMA  
*[Signature]*  
FIRMA  
*[Signature]*  
FIRMA  
*[Signature]*  
FIRMA

La presente tesis se llevó a cabo 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 CONACYT asignación 2000 número 33129 B, titulado: Pinos Blancos Mexicanos: Diversidad Genética, Química y Ubicación Taxonómica, con la beca de proyecto de investigación número 4685

La parte de la detección y resolución de alelos, se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología y Genética Forestal, de la Universidad Dalhousie en Halifax, Nueva Escocia, Canada; bajo la supervisión del Dr. Om Rajora. (Apoyo otorgado para los proyectos de Integración de Cuerpos Académicos y Conformación de Redes de Cuerpos Académicos. Convocatoria 2001. CA 03 "BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR". Fondos Concurrentes U de G para proyectos CONACYT Asignación 2000 Acuerdo No. 02/SA-CI/DBCM/4.2/084.

Dirigida por:  
Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alma Rosa Villalobos por permitirme trabajar a su lado, enseñarme el valor de la organización y mostrarme la puerta hacia la investigación. A la Dra. Anne Santerre por sus enseñanzas, su buen humor y su apoyo cuando éste se necesita. A la maestra Paty Castro por su ayuda en la elaboración de esta tesis, por su incansable ánimo para trabajar y seguir adelante, por siempre preocuparse por nosotros como estudiantes, hijos y seres humanos. Al Dr. Luis Figuera por haberme guiado cuando lo necesitaba. A mi compañera Carmen Lorena por su alegría y sus regaños. A Verónica Palomera por ayudarme en mi aprendizaje dentro del laboratorio, por aguantarme cuando ni yo mismo podía hacerlo, por darme ánimos para seguir adelante aún cuando el camino se tornó difícil, por ser mi maestra, mi amiga y compañera.

Al Dr. Om Rajora por permitirme trabajar en su laboratorio, a mis compañeros en el laboratorio en la Universidad Dalhousie; Vikram Chatree, Alok Gupta y Dave Mealea.

A la gente que de alguna u otra forma me ayudo a realizar este trabajo: Dra. Ana Rebeca Jaloma Cruz, Dra. Nelly Macías, Dra. Evelia Leal, Dr. Carlos Prada por ser en su momento una gran guía. A mis amigos de la Universidad de Guadalajara: Karol G. Ceballos, Sandra Méndez Alcalá, Yunuhen Rodríguez C, Susana Maldonado M, Javier de Alba, Hugo Enrique Ramírez, Roberto Saracho y Pablo Enrique Sánchez por aguantarme, guiarme y apoyarme. A mis amigos: Pierre de Potter, Nuno Fernandes, Moncho Santillana, Fernanda, Yery Medina, Mónica Gabriela Rangel, Saul Lomeli Guerrero, Paula B. Muñoz Reyes Retana, Omar Garabito, Jenny Turubiartes, Janette y Gisell De León. A todos ellos por compartir tantos buenos momentos juntos.

A mis hermanos Sofía y Guillermo, por quererme como sólo ellos saben hacerlo. ¡Gracias Amigüitooooos! Armana y Armano...los amo.

A Paola Estefanía por ser el ángel que da un nuevo brillo a mi vida.

A mi Padre por darme la vida.

A José Ramón Aldana González por su apoyo incondicional en todo momento, sus consejos, su tiempo, su amistad, gracias por ser mi gran amigo.

A Baruc Montaña Montaña por tener las palabras correctas en el tiempo correcto, por estar conmigo en las buenas y en las malas, algo que la distancia no puede detener. Por ser mi mejor amigo...Gracias enano.

Y a mi Mamá, la luz y la fuerza que alimentan mi camino, mi esperanza, mi orgullo, mi ejemplo a seguir. Mamá gracias por ser mi apoyo todos los días y a toda hora, por hacer de mi lo que soy, por transformar a un niño en un estudiante, a un adolescente en un joven, a un profesionalista en un hombre. Gracias Sofía Rubio Romero por ser mi mamá.

**A mi mamá.-**

*"La felicidad es como los microsátélites;  
pequeñas experiencias de luz espaciadas a lo largo del oscuro gemona de  
nuestras vidas"*

RENO.-



# ÍNDICE

	Página.
<b>RESUMEN</b>	1
1 Generalidades	2
1.1 Importancia del género <i>Pinus</i> en México.	2
1.1.1 <i>Pinus chiapensis</i> : taxonomía, morfología, distribución y ecología.	2
1.1.2 Complejo <i>Pinus strobiformis</i> - <i>P. ayacahuite</i> - <i>P. flexilis</i> : taxonomía, morfología, distribución y ecología.	3
1.1.3 Características del genoma de pinos.	6
2 Marcadores Moleculares	6
2.1 Microsatélites.	6
2.2 Tipos de Microsatélites.	7
2.3 Mecanismos de mutación de Microsatélites.	9
2.4 Ventajas y desventajas como marcadores moleculares.	11
2.5 Resolución e identificación de alelos.	11
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	13
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
1 Muestras de pinos.	15
2 Extracción de ADN.	16
3 Amplificación de Microsatélites.	16
<b>RESULTADOS</b>	20
1 Amplificación de Microsatélites nucleares.	20
2 Determinación de genotipos para cada <i>locus</i> SSR's.	22
3 Relación de muestras amplificadas / muestras trabajadas.	22
4 Alelos SSR's identificados.	
<b>DISCUSIÓN</b>	28
<b>PERSPECTIVAS</b>	31
<b>CONCLUSIONES</b>	32
<b>LITERATURA CITADA</b>	33
<b>ANEXO 1</b> Protocolos de extracción de ADN.	35
<b>ANEXO 2</b> Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN.	38
<b>ANEXO 3</b> Genotipos observados para cada <i>locus</i> SSR's.	39

## RESUMEN

El marcador genético ideal es aquel que proporciona un elevado número de alelos codominantes distribuidos en todo el genoma. Los marcadores microsatélites cumplen estas características por lo que son muy utilizados en análisis de evolución molecular y diversidad genética.

En este trabajo se examinó si los cebadores para amplificar microsatélites nucleares desarrollados en *Pinus strobus* (Echt *et al.* 1996; Rajora *et al.* 2000) permiten identificar seis *loci*; cuatro de ellos simples (RPS2, RPS12, RPS50, RPS39) y dos compuestos (RPS25 Y RPS 60), en *Pinus chiapensis* y en el complejo de pinos formados por *Pinus ayacahuite*, *Pinus strobiformis* y *Pinus flexilis*, comúnmente conocidos como pinos blancos.

Los seis pares de cebadores fueron útiles en la identificación de microsatélites nucleares en las muestras. Sin embargo la eficiencia de amplificación fue diferente entre los seis *loci*, así RPS2 y RPS12 mostraron la mayor eficiencia con 70.4 % y 82.2 % respectivamente; seguido de RPS25b, RPS50 y RPS39 con sólo el 50 % y RPS60 con 9 % de amplificación.

Los resultados mostraron variación en el número y la frecuencia de los alelos en cada taxa. Así como alelos compartidos por dos o más taxa y alelos específicos de un solo taxa. También se identificaron alelos raros, con diferencias de 1 par de base, así como alelos monomórficos. Se identificaron un total de 69 alelos, para los seis *loci*, con un rango de 101 a 269 pares de bases. El *locus* con el mayor número de alelos fue RPS12 (22) y el *locus* con menor número de alelos fue RPS60 (8).



## ANTECEDENTES

### 1. GENERALIDADES

#### 1.1 Importancia del género *Pinus* en México.

El género *Pinus* comprende algunas de las especies de árboles más importantes económicamente y ecológicamente que existen en México y América Central. Los pinos son el principal proveedor de madera para construcción de todo tipo, se emplean en la manufactura de pulpa, papel y resinas. Son fuente importante en la alimentación tanto para humanos como para aves, y quizá lo más importante sea como combustible para millones de personas. Norteamérica es especialmente rica con un total de 65 especies, de estas, 43 existen en México y América Central y 38 se distribuyen al norte de México (Farjon *et al.* 1997). México tiene el mayor número de especies de pinos (incluyendo formas y variedades) que cualquier otro país del mundo (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 las poblaciones humanas (Richardson 1998). Las especies de pinos blancos en México, entre las que se encuentran el complejo *Pinus strobiformis* - *Pinus ayacahuite* - *Pinus flexilis*, no son una excepción. La mayoría de las poblaciones se encuentran disminuidas, aisladas y fragmentadas. Además, debido a sus fustes rectos, grandes dimensiones y su madera de buena calidad, estos pinos representan un recurso económico importante para este país (Pérez de la Rosa 1993).

#### 1.1.1 *Pinus chiapensis*: Taxonomía, morfología, distribución y ecología.

*Pinus chiapensis* (Mart.) Andresen fue descrito en 1940 por Martínez como *Pinus strobus* var. *chiapensis*. Posteriormente, Andresen en 1964 después de un análisis morfométrico, lo reconoció a nivel específico. Taxonómicamente se encuentra ubicado dentro del subgénero *Strobus*, sección *Strobus*, subsección *Strobi* (Little y Critchfield 1969). *Pinus chiapensis* agrupa árboles de tronco recto, a veces bifurcado, alcanza normalmente 30 a 35 m y ocasionalmente 40 m de altura y un

diámetro de 1 hasta 1.5 m. De corteza rugosa y escamosa en el tronco, descascarándose, con fisuras poco profundas, de color café-grisáceo hasta gris; en árboles jóvenes suave y de color verde-grisáceo. Acículas en fascículos de 5, de (5-) 6-12 (-13) cm de longitud y 0.6-0.8 (-1) mm de ancho. Rectas o ligeramente torcidas, laxas, con los márgenes aserrados. Estomas presentes solamente en las dos caras internas; las escamas de la vaina del fascículo pronto caedizas. Los estróbilos son las estructuras reproductoras que hacen las funciones de flores. Los conos generalmente en verticilos de 2-4, con pedúnculos delgados, pedúnculos, deciduos, cilíndricos a ovoide-oblongos cuando abren, de (6-)8-16(-25)x 4-8 cuando están abiertos, de color café opaco. Semillas de 7-9 x 4-5 mm, de color café, con ala adnada de 20-30 x 6-9 mm (Farjon *et al.* 1997).

*Pinus chiapensis* se encuentra distribuido en México en los estados de Guerrero, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Figura 1). En Guatemala en localidades como El Quiché y Huehuentenango. La distribución está restringida a pequeñas comunidades relictuales de la especie en bosques montañosos, de subtropicales a templados y cálidos, con gran cantidad de lluvia y neblina, en suelos magros bien drenados (Farjon *et al.* 1997). Crecen en un rango altitudinal de entre (500-) 800 - 2000 (-2200) msnm, en donde no llega a formarse escarcha de hielo, ya que no es resistente a la congelación. *P. chiapensis* se asocia con *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus*, *P. ayacahuite* y de forma más localizada con *P. tecunumanii* y *P. patula* y con árboles de hojas anchas (*Quercus* spp., *Liquidambar styraciflua*, *Magnolia*, *Platanus mexicana*, *Ulmus mexicana*, *Carpinus caroliniana*, *Fagus mexicana*, *Clethra* spp., y *Brosimum*).

#### **1.1.2 Complejo *Pinus ayacahuite* - *P. strobiformis* - *P. flexilis*: taxonomía, morfología, distribución y ecología.**

*Pinus ayacahuite*, *P. strobiformis* y *P. flexilis* forman parte del grupo de pinos conocido como pinos blancos o blandos. Taxonómicamente se encuentran ubicados dentro del subgénero *Strobus*, sección *Strobus*, subsección *Strobi* (Little y Critchfield 1969).

En general *Pinus ayacahuite* y *P. strobiformis* comparten características como el tamaño del árbol, la forma de crecimiento, las acículas, conos y semillas, lo que dificulta frecuentemente su determinación; son árboles de troncos rectos que pueden medir entre 25 y 45 m de altura con diámetros de hasta 2 m. Las acículas son de color verde en fascículos de cinco, generalmente rectas, laxas con los márgenes débilmente aserrados. Los conos son de color café opaco y se pueden encontrar en verticilos o solitarios de dos o cuatro, en pedúnculos cortos, péndulos deciduos generalmente cilíndricos. Las escamas varían ligeramente en el número y la forma de la apófisis, abren pronto y ampliamente, son delgadas, flexibles y muy resinosas. Las semillas son de color café con ala adnada, con diferencias en el tamaño de la semilla entre los taxa. Se presenta un incremento paulatino (clíne), en el tamaño del ala, este se manifiesta desde las semillas ápteras del norte de la República Mexicana, hasta las semillas que presentan alas bien desarrolladas en el sur, este clíne se ve interrumpido en el límite norte del Eje Volcánico Transversal (Farjon *et al.* 1997; Farjon y Styles 1997; Pérez de la Rosa 1993).

A diferencia de otras especies de pinos, los árboles del complejo *Pinus ayacahuite* - *P. strobiformis* - *P. flexilis* tienen preferencia por lugares sombríos y húmedos, crecen en suelos fértiles, profundos y bien drenados. Pérez de la Rosa (1993), los encuentra en altitudes superiores a los 2000 msnm y reporta 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. *P. strobiformis* se distribuye en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Durango, Jalisco, Zacatecas y San Luis Potosí (Figura 1). Por su parte, *P. ayacahuite* se distribuye en los estados de Chiapas, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Tlaxcala, y 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).

En *Pinus flexilis*, el árbol es de tronco recto o retorcido, con ramas ascendentes de uno a varios tallos, se ramifica desde muy abajo y alcanza normalmente entre 10 y 15

m y ocasionalmente hasta 20 m de altura y un diámetro de 1 a 1.5 m, de corteza delgada y escamosa, con placas y escamas pequeñas, de color café a gris, acículas en fascículos de 5, de (5-) 6-9 cm de longitud y 0.8-1.2 mm de ancho, rectas o torcidas, laxas, muy débilmente aserradas, semillas 10-15 x 8-10 mm de color café oscuro, con ala adnada rudimentaria o muy pequeña, hasta de 5 mm de longitud; frecuentemente el ala está ausente cuando la semilla cae del cono, habita en bosques abiertos de alta montaña hasta subalpinos o expuestos en lo mas alto de las montañas, su distribución en México se limita a algunas cumbres montañosas de Chihuahua, Coahuila y el sur de Nuevo León (Farjon *et al.*, 1997).



Figura 1. Distribución en México de *Pinus chiapensis* y del complejo *P. ayacahuite*-*P. strobiformis*.

### 1.1.3 Características del genoma de pinos.

Los pinos presentan el número básico predominante en las Pináceas  $2n=24$ . El tamaño del genoma de coníferas es grande comparado con el de otras plantas. El valor C varía de 19,5 a 26,5 pg, según estimaciones realizadas en ocho especies de pinos (Díaz 2001). Gran parte del ADN de pinos corresponde a la fracción de ADN repetido. Experimentos de reasociación cinética muestran que el 25% del ADN total es de copia única y el 75% pertenece a las fracciones de ADN moderada y altamente repetido, pero el porcentaje de genes expresados es poco conocido. Se considera que en *P. maritime* sólo el 5% del genoma sería ADN codificante, aunque esto puede ser una subestimación ya que un número significativo de genes están en forma de familias multigénicas (Díaz 2001).

## 2. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares basados en ADN se han convertido en una poderosa herramienta en diversos tipos de estudios en genética de poblaciones, conservación y mejoramiento de especies forestales, y la identificación del grado de diferenciación entre especies a través de análisis filogenético. En comparación a los métodos tradicionales, los moleculares son potencialmente útiles para acelerar la cantidad de información de especies que han sido clasificadas basándose únicamente en características morfológicas o de origen geográfico. Esto es especialmente importante cuando los caracteres morfológicos son limitados o difíciles de interpretar por su simplicidad y plasticidad causante de homoplasia morfológica. Además, los marcadores que son filogenéticamente informativos y que discriminan entre taxones estrechamente relacionados son especialmente útiles como ayuda en la conservación *ex situ* (Díaz 2001).

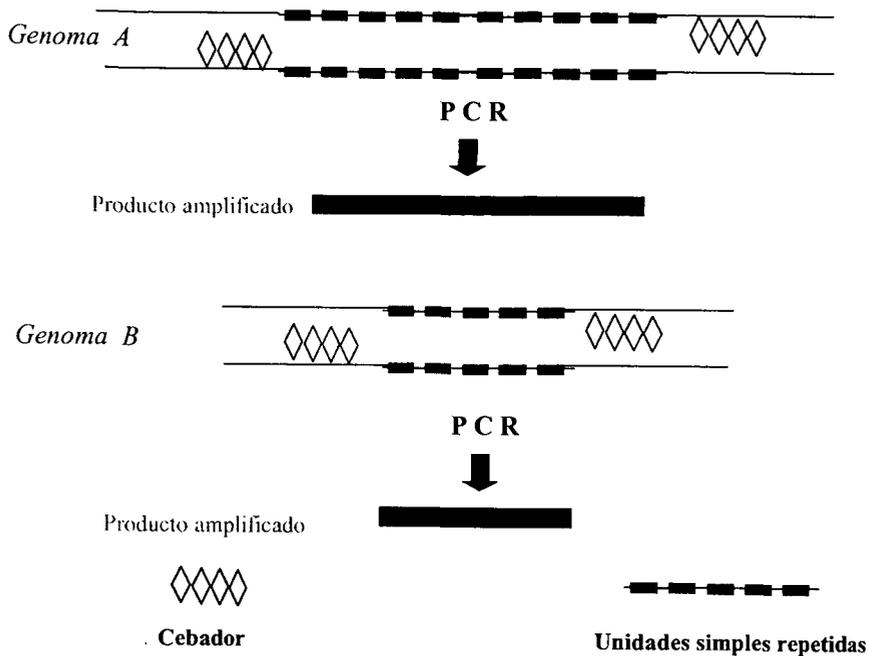
La utilización de isoenzimas para la evaluación de la diversidad genética en pinos durante los años 80 presentaba un principal inconveniente, el limitado número de *loci* analizables (Díaz 2001). Así, la proliferación de técnicas relativamente sencillas, principalmente las basadas en PCR (Polymerase Chain Reaction), ha hecho posible incrementar sustancialmente el número de *loci* analizados. Estas técnicas permiten estudiar directamente la variación a nivel de ADN incrementando el nivel de polimorfismo detectado con isoenzimas. Los marcadores basados en PCR se

pueden obtener a partir de cebadores específicos dirigidos hacia un gen o secuencia específica, para lo que se requiere conocer la secuencia de la región del ADN que se desea amplificar, o bien a partir de cebadores de secuencia arbitraria que amplifican regiones al azar del ADN y en conjunto, por lo tanto, cubren una mayor parte del genoma (Díaz 2001).

## 2.1 Microsatélites

Los microsatélites son repeticiones en tandem de 1 a 6 pb encontrados en todos los genomas procarióticos y eucarióticos analizados hasta ahora (Karhu 2001). Históricamente el término microsatélite se utilizaba para describir repeticiones de dinucleótidos CA/GT. Los microsatélites también se conocen como SSRs (simple sequence repeats) o STR's (short tandem repeats). Si estas repeticiones son suficientemente largas e ininterrumpidas son excelentes marcadores genéticos debido a su elevado nivel de polimorfismo (Karhu 2001; Zane *et al.* 2002).

Los microsatélites nucleares se encuentran tanto en regiones codificadoras como no codificadoras del genoma y por lo general se caracterizan por un alto grado de polimorfismo en el tamaño o en el número de repeticiones (Figura 2). En plantas, las repeticiones GA/CT y AT/TA son las más comunes. En coníferas, el tipo de repeticiones entre las especies son muy variables siendo GA/CT y CA/GT las más comunes y por lo general se localizan en secuencias de ADN repetitivas. La secuenciación del genoma del cloroplasto en *Pinus thunbergii* ha permitido el desarrollo de microsatélites universales para coníferas (Karhu 2001; Zane *et al.* 2002). También se han descrito microsatélites en el genoma de mitocondrias y de cloroplasto de coníferas (Soranzano *et al.* 1999; Echt *et al.* 1998).



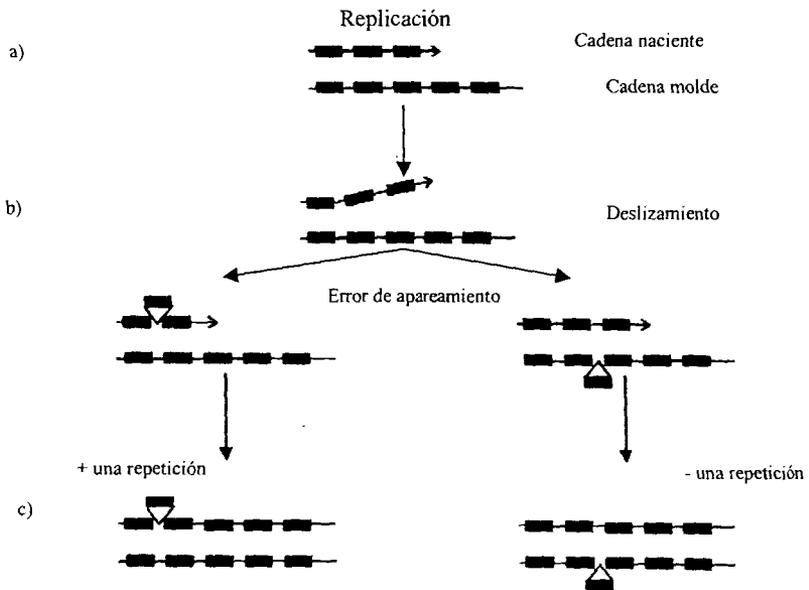
**Figura 2.** En el genoma A, la región de la unidad de repetición simple repetida es más larga que en el genoma B, por lo que los productos amplificados presentan diferencias en su tamaño. Los cebadores permiten amplificar la región interrepetida por PCR.

## 2.2 Tipos de microsatélites

De acuerdo a las características de las secuencias, los microsatélites se clasifican en perfectos e imperfectos. Perfectos cuando presentan secuencias con repeticiones motivo sin interrupciones o repeticiones adyacentes de otras secuencias como  $(AC)_{19}$  ó  $(AG)_{10}$ . Los microsatélites imperfectos, poseen dos o más de la misma repetición motivo separadas por no más de tres nucleótidos no repetidos consecutivos como  $(CA)_{11}CT(CA)_4$  o  $(ACC)_{12}GTACATAA(ACC)_{10}$ . Los microsatélites perfectos compuestos, contienen secuencias de este tipo,  $(CA)_{16}A(TC)_{10}$ , mientras que los microsatélites imperfectos compuestos son aquellos con secuencias  $(CA)_9 A(AG)_{19}$   $A(GA)_7$  (Kutil y Williams 2001).

### 2.3 Mecanismos de mutación en microsatélites.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar las elevadas tasas de mutación de los microsatélites. El primero involucra la recombinación entre moléculas de DNA por entrecruzamiento desigual o conversión génica (Karhu 2001). El segundo mecanismo involucra el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación provocando un error de apareamiento. Estudios en levaduras y bacterias como *E. coli*, mostraron que el deslizamiento en la replicación al parecer es el mecanismo principal para la generación de mutaciones de tamaño en microsatélites. En el deslizamiento de la replicación y en el error de apareamiento, la cadena naciente se disocia de la cadena molde durante la replicación en el área de la repetición, y puede realinearse fuera de fase con la cadena molde. Cuando la replicación continúa, la cadena recién sintetizada, puede ser más larga o más corta que el molde, cuando el bucle ocurre en la cadena naciente o en la cadena molde respectivamente (Figura 3). De esta manera, los microsatélites ganarán o perderán una o varias repeticiones (Karhu 2001).



**Figura 3.** Proceso de mutación por deslizamiento en la replicación de microsatélites a) Deslizamiento de la polimerasa durante la replicación, b) Error de apareamiento de la cadena naciente o de la cadena molde y c) Continuación de la replicación.

La secuenciación de la repetición (CA)<sub>n</sub> en humanos mostró inserción/delección y mutaciones puntuales. La inserción de 6 pb en la región flanqueante del microsatélite; provoca una mala interpretación de los alelos, al considerar solo el tamaño, por ejemplo (CA)<sub>20</sub> con la inserción de 6 pb, puede co-migrar con un alelo (CA)<sub>23</sub> sin la inserción (Grimaldi y Crouau - Roy 1997). Las mutaciones puntuales por lo general no cambian el tamaño del microsatélite (Blanquer-Maumont y Crouau - Roy 1995).

Las mutaciones en las regiones de apareamiento de los cebadores de los microsatélites, provocan la reducción o pérdida de productos de PCR (Callen *et al.* 1993). Estos productos son llamados alelos nulos y se comparan con los alelos nulos de aloenzimas. Los alelos nulos pueden manifestar una baja heterocigocidad a la esperada; ya que sí en un heterocigoto, un alelo no se amplifica por problemas de alineación del cebador, entonces el fenotipo (en el gel) aparecerá con una sola banda; como un homocigoto. Los alelos nulos también son responsables de la falta de correlación de los alelos entre parentales y su descendencia, cuando en la descendencia no amplifica un alelo que está presente en los parentales (Pemberton *et al.* 1998).

Para estimar la variación entre poblaciones y distancias génicas basados en datos de microsatélites es necesario considerar los modelos teóricos de mutación. En el modelo de alelo infinito (IAM, Kimura y Crow 1964), la mutación puede involucrar cualquier número de repeticiones en tandem y siempre resulta en un nuevo alelo que no existía previamente en la población. Sin embargo, el modelo del deslizamiento de la polimerasa es el mecanismo más aceptado para la variación de longitud en SSR's, al causar principalmente pequeños cambios en el número de repeticiones; así los alelos de tamaños similares estarán más relacionados que los alelos de tamaños muy diferentes; y los alelos podrían mutar hacia alelos ya presentes en la población. El modelo de mutación stepwise (SMM) (Kimura & Ohta, 1978), desarrollado para aloenzimas, provee la estimación de las relaciones filogenéticas, distancias génicas y diferenciación poblacional para datos de microsatélites. Estas estimaciones se basan en lo siguiente: (I) una mutación resulta del cambio de una unidad de repetición, (II) la tasa de mutación es constante e independiente del tamaño de la repetición, (III) no hay asimetría en la distribución de las mutaciones, (IV) y no hay restricción de

alelos. En adición a este modelo, Di Rienzo *et al.* (1994) describieron el modelo de dos fases (TPM), donde una limitada proporción de las mutaciones involucraban varias repeticiones. Varios autores sugieren que uno o más de uno de estos supuestos podrían ser incorrectos o por lo menos no aplicar para todos los microsatélites. Sin embargo, la tasa de mutación sobre el número de repeticiones y sobre la pureza de la repetición, no han sido tomado en cuenta en estos modelos de mutación.

#### **2.4 Ventajas y desventajas de los microsatélites como marcadores moleculares.**

Los microsatélites se han convertido en los marcadores preferidos de muchos investigadores, por su alta variabilidad, por ser marcadores co-dominantes y su facilidad de conteo y registro. Su principal desventaja es la necesidad de aislarlos *de novo* en la mayoría de las especies que se analizan por primera vez; ya que los microsatélites se encuentran usualmente en regiones no codificadoras donde la tasa de sustituciones nucleotídicas es más alta que en las regiones codificadoras. Como consecuencia, la estrategia de crear cebadores universales que reconozcan secuencias conservadas, la cual ha sido muy efectiva para ADN<sub>m</sub> y ADN<sub>cp</sub>, es realmente problemática para microsatélites nucleares. No obstante, en algunas especies, se ha descrito la presencia de regiones flanqueantes altamente conservadas, entre ellas cetáceos, peces y tortugas. Es importante señalar que durante el proceso de aislamiento de microsatélites se seleccionan repeticiones ampliamente distribuidas en el genoma, ya que suelen ser más polimórficas. Sin embargo, el elevado polimorfismo observado en una especie no garantiza que polimorfismos similares se encuentren en especies relacionadas, especialmente cuando se incrementa la distancia evolutiva (Zane *et al.* 2002).

#### **2.5 Resolución e Identificación de Alelos SSR's**

Los alelos en los microsatélites están definidos por el número de repeticiones y se identifican por varios métodos. Así, la cantidad de diversidad alélica observada varía con la capacidad de resolución y separación de los fragmentos de DNA en el tipo de gel utilizado. Por ejemplo, la electroforesis en agarosa y la tinción con bromuro de etidio (BrEt) es inadecuada para la separación de fragmentos con diferencias de una sola repetición dinucleotídica, pero suficiente para separar fragmentos que difieran en 10 pb. La resolución de los productos de PCR mejoran con el uso de geles de agarosa de bajo punto de fusión o Nusieve® (Wolfe y Liston 1998). La electroforesis

en geles de poliacrilamida (PAGE) tiene un mayor poder de resolución, separando moléculas cuya longitud difiere hasta en un 0.2 % (1pb en 500pb) (Sambrook *et al.* 1989). Por lo tanto los geles de poliacrilamida se utilizan para la resolución de alelos SSR's, tanto en condiciones nativas o desnaturalizantes, como con variaciones en la tinción con BrEt, nitrato de plata, autoradiografía o la incorporación de radioactividad en la reacción de PCR (Wolfe y Liston 1998).

Debido a que los microsatélites presentan segregación mendeliana en organismos diploides, se esperaría obtener una o dos bandas por individuo. Sin embargo, se ha descrito que en ocasiones los cebadores que amplifican microsatélites polimórficos producen patrones multibandas muy complejos; este problema aparece particularmente en organismos que contienen grandes cantidades de DNA repetitivo como es el caso de las coníferas (Squirrell *et al.* 2003).

Finalmente durante la resolución de alelos en marcadores microsatélites existe la posibilidad de reducción o pérdida completa de amplificación por parte de algunos alelos (alelos nulos) debido a la sustitución, pérdida o ganancia de nucleótidos en el sitio de alineación del cebador. Además debido a que la variación de los microsatélites está basada en la variación en longitud (en pb) de los fragmentos amplificados, es posible que dos fragmentos de la misma longitud no se deriven de una misma secuencia ancestral, introduciendo la posibilidad de homoplasia (Karhu 2001).

## JUSTIFICACIÓN.

Los microsatélites empiezan a ser los marcadores preferidos en muchos estudios por su elevada variabilidad, su herencia codominante y su facilidad en el registro de datos y reproducibilidad. Sin embargo, la principal desventaja en el uso de microsatélites nucleares es la necesidad de aislarlos *de novo* en la mayoría de las especies que se analizan por primera vez. Además, los microsatélites como marcadores presentan algunos inconvenientes; entre ellos la dificultad en la interpretación de los patrones de bandedo; confusiones provocadas por alelos nulos, así como reducción o pérdida completa de amplificación de algunos alelos, debido a sustituciones en el sitio de unión del cebador (Zane *et al.* 2002).

A pesar de que la conservación de las secuencias que flanquean las repeticiones de los microsatélites permite la amplificación de los marcadores entre especies relacionadas; es importante establecer las condiciones adecuadas para la identificación de marcadores apropiados. Así, en este trabajo se propone examinar si los cebadores de microsatélites desarrollados en *Pinus strobus* (Echt *et al.* 1996; Rajora *et al.* 2000) permiten identificar *loci* correspondientes en el complejo *Pinus ayacahuite* - *P. strobiformis* - *P. flexilis* y en *P. chiapensis*, los cuales podrán ser utilizados en estudios filogenéticos y de diversidad genética de las poblaciones de pinos blancos mexicanos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar microsatélites nucleares en *P. chiapensis* y en el complejo *Pinus ayacahuite - P. strobiformis - P. flexilis* a partir de cebadores desarrollados en *Pinus strobus*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Definir los alelos para seis microsatélites, cuatro de ellos simples (RPS2, RPS12, RPS50, RPS39) y dos compuestos (RPS25 Y RPS 60), en las muestras de pinos blancos.
2. Establecer escaleras de alelos que nos permitan definir genotipos individuales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Muestras de Pinos

Se colectaron acículas de *Pinus ayacahuite*, *P. strobiformis* y *P. chiapensis* (Cuadro I). Además se obtuvieron megagametofitos haploides (n) y embriones diploides (2n) de semillas germinadas de *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. flexilis* (Cuadro II). Las muestras de acículas y semillas de pinos perfectamente caracterizados y representativos de cada especie fueron colectadas por el Dr. Jorge A Pérez de la Rosa y Georgina Vargas Amado del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara, de Marzo de 2001 a Noviembre de 2002, las semillas de *P. flexilis* que fueron colectadas en Diciembre de 1991.

**Cuadro I. Listado de acículas de *Pinus* analizadas con el taxa, localidad, número de muestras y posición geográfica.**

Taxa	Localidad/Estado	n	Altitud (msnm)	Coordenadas
<i>P. strobiformis</i>	El Potosí, Nuevo León	1	2750	24°53'N 100°13'W
	Cananea, Sonora	2	2470	23°37'N 25°50'W
N=5	Bocoyna, Chihuahua.	2	2470	31°03'N 110°22'W
<i>P. ayacahuite</i>	Xico, Veracruz.	2	2930	19°31'N 97°05'W
	Cuale, Jalisco.	3	1810	20°22'N 105°02'W
	Las palmas, Michoacán	1	2260	19°40'N 102°25'W
	Omitlán, Hidalgo.	1	2450	20°09'N 98°39'W
	Palo Hueco, Hidalgo	2	2630	20°09'N 98°38'W
	El Copal, Querétaro.	1	2800	21°10'N 99°41'W
N=26	Palenque, Chiapas	16	2390	16°40'N 92°33'W
<i>P. chiapensis</i>	Tlapacoyan, Veracruz.	4	750	19°55'N 97°15'W
	Heytamaico, Puebla.	4	1000	19°53'N 97°16'W
N=21	Bochil, Chiapas.	13	1630	16°59'N 92°50'W

**Cuadro II. Listado de semillas de *Pinus* analizadas con el taxa, localidad, número de muestras y posición geográfica.**

Taxa	Localidad/Estado	n	Altitud (msnm)	Coordenadas
<i>P. flexilis</i> .	Cerro el Potosí, Nuevo León	2	3450	24°53'N 100°13'W
<i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	San Rafael, Edo. de México	3	2721	19°12'N 98°44'W

## 2. Extracción de DNA

La extracción de DNA, a partir de tejido fresco de acículas, embriones y megagametofitos se llevo a cabo con un método descrito por Doyle y Doyle (1987), con algunas modificaciones (Palomera 2002) (ANEXO 1). La concentración y calidad del DNA se determinó en ng/μl por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa, respectivamente (Sambrook *et al.* 1989) (ANEXO 2).

## 3. Amplificación de Microsatélites

Para la identificación de los microsatélites se utilizaron seis pares de primers (Cuadro III), desarrollados en otro pino blanco, *Pinus strobus* (Echt *et al.* 1996; Rajora *et al.* 2000). Los criterios de selección de los cebadores utilizados fueron:

- Nivel de polimorfismo, número elevado de alelos reportados para cada cebador.
- Similitudes en la temperatura de alineación, para posibles reacciones multiplex.
- Diferencias entre los pesos moleculares en pares de bases (pb) de los productos amplificados de cada cebador, para próximas reacciones multiplex.

**Cuadro III. Loci SSR, tipo de repetición, secuencia de los iniciadores, número de alelos, tamaño esperado y temperatura óptima de alineación descritas en *P. strobus* (Echt *et al.* 1996; Rajora *et al.* 2000).**

Locus	Repetición	Secuencia de los cebadores	Tamaño (pb)	Temperatura de alineación	No de Alelos
RPS2	(AC) <sub>15</sub>	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA TGGAGGCTATCACGTATGCACC	145 - 171	55°C	4 - 10
RPS12	(AC) <sub>17</sub>	TCAATGTGGAGATGGTGATT ACTTCTGACCTAACCAGAAACC	153 - 209	57°C	11 - 21
RPS25b	(AC) <sub>17</sub> AG(AT) <sub>19</sub>	CACATATGGCAGAACACACA GATCGTCGCACTATCGAAC	97 - 115	55°C	9 - 10
RPS60	(AC) <sub>19</sub> (AT) <sub>7</sub>	ACGATAATGGCGGTGAGAACAA CACCTGCTCCTTCGTACATCCA	247 - 279	57°C	8 - 17
RPS50	(AC) <sub>17</sub>	CCCAGTÁATCTGTTTTAGAGC ACACATGAAATGTCAGAATGC	160 - 188	50°C	8 - 13
RPS39	(AC) <sub>17</sub>	GCCAGCTCCAACCAGAATC GGCTCGCTGACCCAATAA	160 - 180	57°C	2 - 6

### A) Reacción de PCR y Condiciones de Amplificación.

Para la identificación de los microsatélites se siguieron las condiciones de la reacción descritas por Rajora *et al.* (2000) con algunas modificaciones.

#### Reacción para PCR

Mezcla - PCR	1X	Mezcla Primer - Taq	1X
Buffer 10X(MBI Fermentas)*	1µl	Cebador 5' 2.5µM	1µl
MgCl <sub>2</sub> 2.5mM	1µl	Cebador 3' 2.5µM	1µl
dNTP's 2.5mM (Invitrogen)	0.8µl	Taq Pol 1U/µl	<u>0.15µl</u>
dH <sub>2</sub> O	<u>4.85µl</u>		0.35µl
	7.65 µl		
DNA (20ng/µl)	2µl	<b>Volumen final: 10 µl.</b>	

\* (200mM Tris-HCl pH 8, 500mM KCl)

Debido a que los cebadores utilizados se marcaron con fluorescencia lo que los hace muy sensibles a la luz, la reacción se realizó con la mínima cantidad de luz requerida. Además la preparación de la reacción de PCR se realizó en placas colocadas dentro de un recipiente con hielo.

Finalmente, las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MJR Research® PT100. El programa de amplificación inicial consistió de un paso de desnaturalización prolongada a 94°C por 3 minutos, seguido de dos ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, alineación a 60°C por 15 segundos y extensión a 72°C por 15 segundos. Los siguientes diez ciclos incluyeron desnaturalización a 94°C por 15 segundos, alineación a 59.5°C por 15 segundos (disminuyendo 0.5°C cada ciclo, hasta 54.5°C) y extensión a 72°C por 15 segundos. Los últimos treinta ciclos fueron de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, alineación a 54°C por 15 segundos, extensión a 72°C por 15 segundos. Se agregó un paso de extensión a 72°C por 3 minutos, y para finalizar un paso de conservación por tiempo indefinido para mantener las muestras a 4°C.

## **B) Corrimiento electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7%.**

Limpiar las placas de vidrio con isopropanol, ensamblar las placas con los separadores y apretar con las pinzas. Pesar 10.08 g de urea. Agregar 3.64 ml de Long ranger gel® J.T. Baker y 3.00 ml de TBE 10X. Adicionar agua destilada, hasta que la mezcla pese 27.0 g y mezclar hasta que la urea se disuelva. Una vez que la urea este disuelta, filtrar la mezcla. Finalmente añadir 150 µl de persulfato de amonio 10% (5g de persulfato de amonio en 50 ml de agua destilada, almacenar fuera del contacto con la luz) y 15 µl de TEMED (Tetrametiletilenediamina), mezclar con movimientos circulares.

Para preparar el gel vaciar inmediatamente la mezcla a las placas de vidrio. Para lograr un gel sin burbujas, mantener las placas en forma vertical. Permitir que la mezcla fluya al dar unos pequeños golpes con los dedos a las placas, cuando la mezcla comience a salir por el otro extremo, colocar las placas en posición horizontal. Por último colocar el peine para formar el pozo de aplicación de las muestras; y permitir la polimerización del gel durante una hora.

### **Precorrimiento.**

1. Una vez polimerizado el gel, limpiar perfectamente los residuos de poliacrilamida de las partes exteriores de las placas, con agua destilada e isopropanol; cualquier resto de poliacrilamida en las placas, es detectado por el láser y distorsiona el corrimiento.
2. El espacio donde irá el peine no deberá tener residuos de poliacrilamida y el agua deberá correr fácilmente, si es necesario remover los residuos con ayuda de una pequeña hoja de rasurar.
3. Se secan los sujetadores, para evitar problemas con el equipo; se acomodan dentro del sistema LI-COR, las placas con los sujetadores y el reservorio superior, después el reservorio inferior y las tapas. Se utiliza para correr TBE 1X en ambos reservorios. Se conecta el cable interior se cierra el equipo y se programa en el sistema de computo el precorrimiento a 200V por 15 minutos.

### **Corrimiento de productos amplificados en Sistema LI-COR.**

1. Mientras ocurre el precorrimento se añaden 20  $\mu$ l de la mezcla de paro para PCR al producto amplificado.  
Solución de paro para PCR.  
0.225 g de Azul de Bromofenol  
0.225 g de Xylen Cianol en 45 ml de Formamida.  
250.0  $\mu$ l 2M de NaOH
2. Colocar en el termociclador y desnaturalizar a 93°C por 3 minutos.
3. Una vez terminado el precorrimento del gel. Cargar en cada uno de los pozos 0.4  $\mu$ l del producto amplificado, así como 0.2  $\mu$ l de un marcador de referencia (LI-COR's IRDye 800 PerkinElmer Lifesciences®).
4. Correr a 200 V por 90 minutos.

### **C) Análisis y Registro de los Productos Amplificados.**

Para el análisis de los microsátélites se utilizó el sistema LI-COR el cual es un equipo con detección de fluorescencia infrarroja de alta sensibilidad; que contiene un compartimento para colocar la cámara de electroforesis con el gel de poliacrilamida.

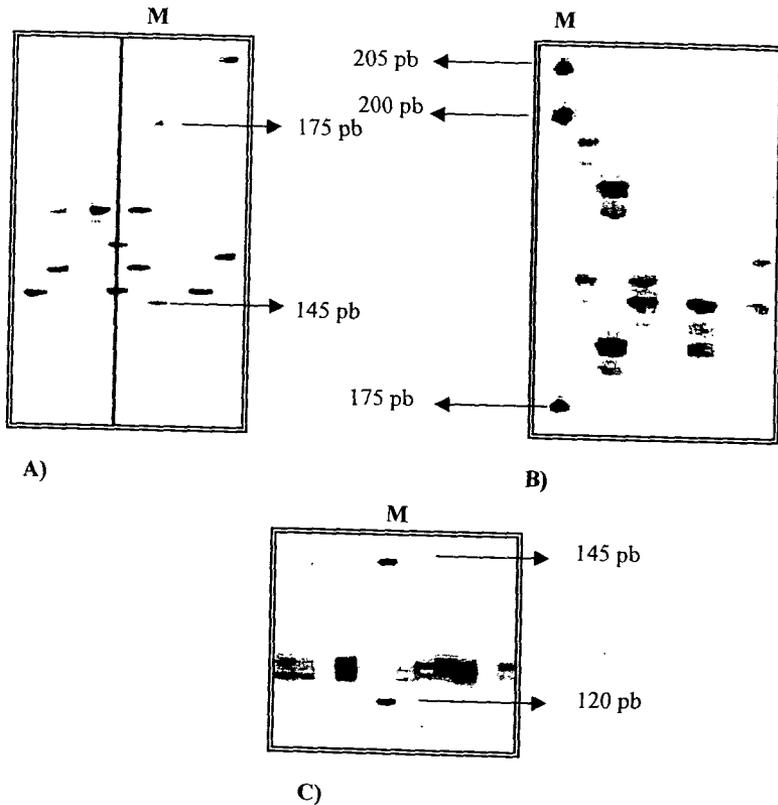
Una vez terminado el corrimiento electroforético las bandas en el gel se detectaron por un láser integrado en el compartimento del sistema LI-COR, produciendo señales que se traducen en una imagen con el programa de cómputo, imagen que representa el patrón de bandas de los productos de PCR

Para el análisis de los patrones de bandeo de los productos amplificados por PCR se utilizó el programa de computo SAGA <sup>GT</sup>, compatible con el sistema LI-COR. El programa permitió capturar imágenes digitales de mapas de bits, mismos que fueron enviados por medios electrónicos a una computadora y analizados por el programa de cómputo. Además para definir los alelos de cada loci SSR's, así como su tamaño en pb, se utilizó dentro del gel un marcador molecular de referencia con marcaje fluorescente, que el sistema de LI-COR toma como referencia para determinar tamaño en pb de los productos amplificados.

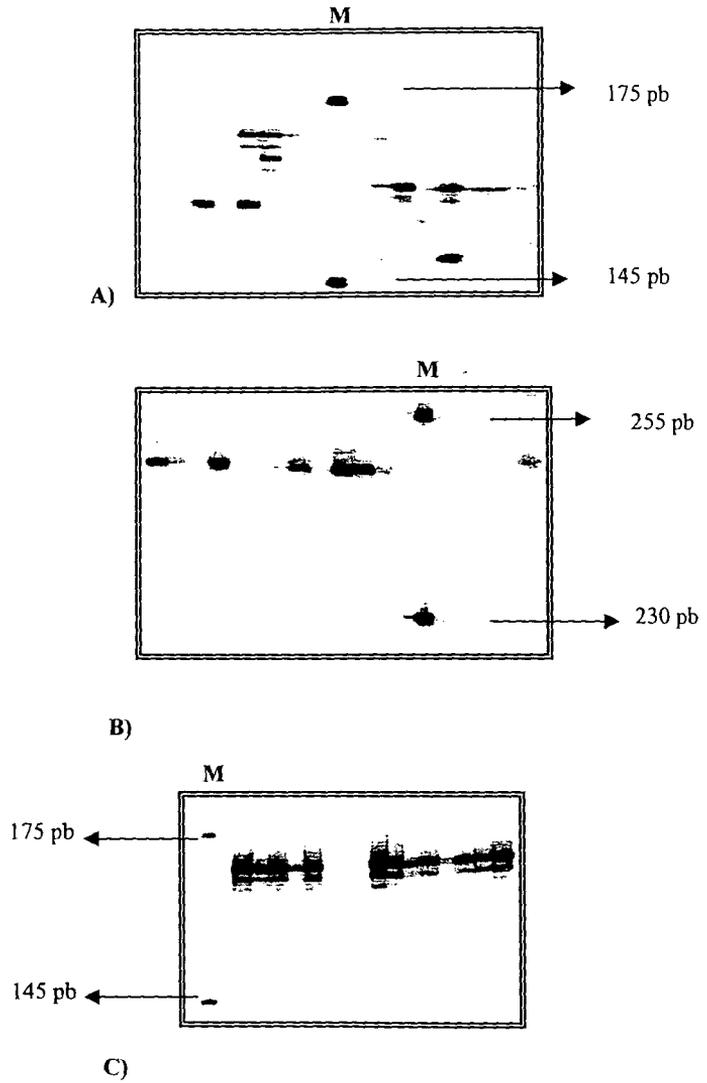
## RESULTADOS

### 1. Amplificación de microsatélites nucleares

Todos los cebadores fueron útiles en la identificación de microsatélites nucleares en las muestras de *P. chiapensis* y en el complejo *P. ayacahuite* - *P. strobiformis* - *P. flexilis*. En las Figuras 5 y 6 se muestran fragmentos de los geles de poliacrilamida con algunos de los alelos para cada *locus* SSR.



**Figura 5.** Fragmentos de los geles que muestran los alelos SSR identificados en los loci A) RPS12, B) RPS2, C) RPS25b y M (marcador de referencia).



**Figura 6.** Fragmentos de los gels que muestran los alelos SSR detectados en los locus A)RPS50, B)RPS60, C)RPS39 y M (marcador de referencia).

## 2. Determinación de los genotipos para cada locus SSR

Los genotipos observados para los seis marcadores SSR en las muestras de pinos estudiadas se muestran en el ANEXO 3.

## 3. Relación de muestras amplificadas/muestras trabajadas.

En el Cuadro III se detalla el número de muestras que amplificaron en relación al número de muestras trabajadas para cada *locus* por taxa. Lo anterior nos proporciona la eficiencia del proceso de amplificación con los cebadores específicos para cada uno de los *loci* analizados. Se observa una mayor eficiencia para los *loci* RPS2 y RPS12 con porcentajes de muestras amplificadas de 70.4 y 82.2 respectivamente. Aproximadamente la mitad de las muestras trabajadas mostró amplificación positiva para los *loci* RPS25b, RPS50 y RPS39. Mientras que para el *locus* RPS60 se observó una eficiencia muy baja ya que solamente el 9 % de las muestras amplificaron.

Cuadro III. Relación de muestras amplificadas/muestras trabajadas y porcentaje de éxito en amplificación en *Pinus ayacahuite* (PAE), *P. ayacahuite* var. *veitchii* (PAV), *P. strobiformis* (PS), *P. chiapensis* (PCH) y *P. flexilis* (PF).

<i>Locus</i>	PAE	PAV	PS	PF	PCH	%
RPS2	14/18	3/6	5/5	2/4	7/11	70.4
RPS12	22/26	2/6	4/5	2/4	21/21	82.2
RPS25b	12/18	1/4	4/5	1/4	4/11	52.3
RPS50	8/18	3/5	5/5	2/4	7/10	59.5
RPS60	1/18	0/6	0/5	0/4	3/11	9
RPS39	7/18	0/6	4/5	0/4	11/11	50

## 4. Alelos SSR's identificados

A pesar de que la mayoría de los alelos SSR's identificados en cada *locus* se encuentran dentro de los tamaños descritos o esperados de acuerdo al número de repeticiones (Rajora *et al.* 2000 y Echt *et al.* 1996), es decir alelos con diferencias de 2 pares de bases (pb), también se observan algunos alelos con diferencias de 1 pb por lo que se consideran "alelos raros" ( alelos subrayados en cada uno de los siguientes cuadros).

En el Cuadro IV se detallan los resultados observados para el *locus* RPS2. En un total de 62 genomas haploides (cromosomas) analizados se obtienen 13 alelos con tamaños de 142 a 169 pb. Se observa variación en el número y la frecuencia de los alelos en cada uno de los taxa, *Pinus ayacahuite* típico presenta el mayor número de alelos; sin embargo, más de la mitad de los cromosomas amplificados portan el alelo 149 o 150. Así mismo, el alelo 149 es el mas frecuente en la variedad *veitchii* de *P. ayacahuite*. En el caso de *P. strobiformis* el alelo 151 es el mas observado, mientras que *P. flexilis* presenta una alta frecuencia del alelo 150. En la mayoría de los genomas de *P. chiapensis* amplifica el alelo 147. Se observa que 5 de los alelos (148, 149, 150, 151, 157) son compartidos por dos o más taxa y el resto son alelos específicos de un solo taxa.

**Cuadro IV. Alelos en pares de bases identificados para el *locus* RPS2.**

	PAE		PAV	PS	PF	PCH
Alelos	N	N	N	N	N	N
<u>142</u>		1				
145	1					
147						10
<u>148</u>	5	1				1
149	9	4				
<u>150</u>	8				3	
151	2			6		2
153				2		
155						1
157				1	1	
<u>160</u>	2					
165	1					
<u>169</u>				1		
<b>No. Alelos</b>	<b>13</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>Crs</b>	<b>62</b>	<b>28</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>14</b>

N=Número de veces observado.

Crs= Cromosomas analizados.

El locus RPS12 (Cuadro V) es el más diverso con 22 alelos en total en un rango de 147 a 198 pb. *Pinus ayacahuite* típico presenta el mayor número de alelos (12); seguido de *Pinus chiapensis* (11). Sin embargo, puede observarse que en el primer taxa el alelo raro 184 es el más frecuente (18 cromosomas), mientras que el segundo taxa 3 alelos 147, 163 y 167 son los más frecuentes, con 13, 6 y 7 cromosomas respectivamente. En cuanto a los alelos específicos, ocho de once alelos encontrados para *P. chiapensis* son únicos para el taxa, seguido de *P. ayacahuite* típico solo con cinco alelos únicos. *Pinus flexilis* resultó monomórfico para el alelo específico 173. *Pinus strobiformis* cuatro de cinco alelos son compartidos con *P. ayacahuite* típico.

**Cuadro V. Alelos en pares de bases para el locus RPS12.**

	PAE	PAV	PS	PF	PCH	
Alelos	N	N	N	N	N	
147					13	
151					2	
153					5	
155					1	
157		1			1	
163					6	
165		2				
167					7	
171			1			
173				4		
175	2		2			
177	2	1				
181	2		2			
183	4		1			
184	18		2			
186	1					
187	3					
188					1	
189					4	
192	2					
193	2					
194	4					
195	1				1	
198	3				1	
<b>No. Alelos</b>	<b>22</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>11</b>
<b>Crs</b>	<b>102</b>	<b>44</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>42</b>

N=Número de veces observado.

Crs= Cromosomas analizados.

En cuarenta y nueve genomas haploides estudiados, se encuentran 10 alelos para el locus RPS50 con tamaños de 150 a 182 pb y sólo dos alelos exclusivos 176 y 178 pb para *P. ayacahuite veitchii* y *P. chiapensis* respectivamente (Cuadro VI). El alelo 160 es el más frecuente para *P. ayacahuite* típico (8 cromosomas). Mientras que un alelo (168) está presente en todos los taxa con excepción de *P. flexilis*. Se destaca la ausencia de alelos raros en este marcador.

**Cuadro VI. Alelos en pares de bases identificados para el locus RPS50**

	PAE	PAV	PS	PF	PCH	
Alelos	N	N	N	N	N	
150	1	1				
156				1		
160	8					
162	4					
166			1	2		
168	3	1	1		1	
170		2			2	
176		1				
178					2	
182		1			4	
No. Alelos	10	4	5	2	2	7
Crs	49	16	6	2	3	22

N=Número de veces observado.

Crs= Cromosomas analizados.

En el *locus* RPS39 (Cuadro VII) se observan diez alelos con tamaños de 145 a 172 pb en 44 cromosomas analizados. Para este *locus* se observan nueve alelos específicos. Seis de un total de siete alelos en *P. ayacahuite* típico y tres de tres en *P. strobiformis*. El alelo 170 es el más frecuente ya que se presenta en 26 cromosomas en total, *P. chiapensis* es monomórfico para este alelo. *Pinus ayacahuite* típico resultó con la mayor diversidad de alelos (7) para éste *locus*. En taxas como *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. flexilis* no se logró la amplificación en las muestras trabajadas.

**Cuadro VII. Alelos en pares de bases identificados para el *locus* RPS39.**

	PAE	PS	PCH
Alelos	N	N	N
<u>145</u>	1		
<u>152</u>		2	
<u>157</u>		4	
<u>161</u>	2		
<u>163</u>	2		
<u>167</u>		2	
<u>168</u>	2		
<u>170</u>	4		22
<u>171</u>	2		
<u>172</u>	1		
<b>No.</b>			
<b>Alelos 10</b>	7	3	1
<b>Crs 44</b>	14	8	22

N=Número de veces observado.

Crs= Cromosomas analizados.

En el Cuadro VIII se describe el marcador RPS25b, se encontraron nueve alelos con tamaños que van de 101 a 168 pb en un total de 56 cromosomas. El taxa con mayor número de alelos, es *P. ayacahuite* típico, de los cuales el 126 y 124 son los más frecuentes con 15 y 6 cromosomas respectivamente. El alelo raro 126 es el más frecuente (37 cromosomas), y está presente en casi todos los taxa, excepto en *P. flexilis* el cual es monomórfico para el alelo raro 144.

**Cuadro VIII. Alelos observados para el locus RPS25b.**

	PAE	PAV	PS	PF	PCH
Alelos	N	N	N	N	N
101			1		
102			1		
113		1			1
117	1				
124	6	2			
126	15	7	8		4
144				2	
160	1				
168	1				
<b>No.</b>					
<b>Alelos</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Crs</b>	<b>56</b>	<b>24</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>2</b>

N=Número de veces observado.

Crs= Cromosomas analizados.

Sólo fue posible lograr la amplificación del locus RPS60 en ocho genomas haploides para dos taxa; *P. ayacahuite* típico y *P. chiapensis*, por lo que resultó el marcador con menor eficiencia en amplificación de los seis utilizados. Se encontraron alelos con tamaños de 251 a 269 pb exclusivos para ambas especies; cuatro alelos para *P. chiapensis* y solo uno para *P. ayacahuite* típico (Cuadro IX).

**Cuadro IX. Alelos en pares de bases identificados para el locus RPS60.**

	PAE	PCH
Alelos	N	N
251		1
259		2
265		2
267	2	
269		1
<b>No. Alelos</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>Crs</b>	<b>8</b>	<b>6</b>

N=Número de veces observado.

Crs= Cromosomas analizados.

## DISCUSIÓN

### 1. Obtención e identificación de microsatélites.

La principal desventaja del uso de microsatélites nucleares es la necesidad de aislarlos de *novo* en la mayoría de la especies que se analizan por primera vez. No obstante, en algunas especies se ha descrito la presencia de regiones flanqueantes altamente conservadas (Zane *et al.* 2002). En un trabajo previo en el que se trabajaron siete microsatélites con repeticiones de tripletes, desarrollados de *Pinus taeda* (subgénero *Pinus*) fue posible lograr la amplificación en otros seis pinos duros (*P. palustris*, *P. echinata*, *P. radiata*, *P. patula*, *P. halepensis* y *P. kesiya*) y en *P. strobus* (Kutil y Willams 2001).

No existen trabajos previos de identificación de microsatélites nucleares en *P. chiapensis* y en el complejo *P. ayacahuite* - *P. strobiformis* - *P. flexilis*. En este trabajo se seleccionaron cuatro tipos de microsatélites perfectos (RPS2, RPS12, RPS50, RPS39) y dos compuestos (RPS25b Y RPS 60). Los cebadores utilizados en este trabajo para la identificación de microsatélites nucleares fueron desarrollados en *P. strobus* (Rajora *et al.* 2000; Echt *et al.* 1996) una especie con la que se comparte género, subgénero, sección y subsección. Kutil & Williams (2001) concluyeron que las repeticiones perfectas son mejores candidatos para llevar a cabo amplificación transespecífica que los microsatélites compuestos. Al igual que estos autores se encontró una mejor eficiencia tanto en la amplificación como en la cantidad de alelos amplificados, al trabajar con cebadores para microsatélites perfectos con porcentajes de muestras amplificadas del 50 al 82 %. En cambio para los microsatélites compuestos se observamos porcentajes de 52% y 9 % respectivamente (Cuadro III).

En general las condiciones de la reacción y del programa de PCR reportadas por Rajora *et al.* (2000) fueron las adecuadas para amplificar la mayoría de los microsatélites. Se esperaría una mejoría en la amplificación al optimizar las condiciones de PCR; en particular, las temperaturas de alineación para cada par de cebadores, ya que la temperatura de alineación está determinada por el tipo y número de bases nitrogenadas que los constituyen. En cuanto a la detección de los alelos LICOR, es un sistema costoso, por lo que es recomendable implementar sistemas de detección con geles de poliacrilamida y tinción de plata, para generar datos de

manera mas accesible en el laboratorio de genética con el fin de apoyar el estudio de la diversidad genética de los pinos blancos mexicanos.

## 2. Los microsatélites, sus repeticiones y los modelos de mutación.

Todos los loci SSR's fueron polimórficos. Se observó un promedio de 11.5 alelos por *locus*; similar a lo descrito por Echt *et al.* (1996) y Rajora *et al.* (2000) 7 y 12.8 respectivamente. La abundancia, facilidad de la determinación del genotipo y la gran diversidad alélica de los cuatro *loci* RPS2, RPS 12, RPS25b y RPS50 los hace marcadores útiles para los estudios de genética de poblaciones y el mapeo génico.

La mayor cantidad de alelos encontrados, fue en el *locus* RPS12 con 22 alelos, a diferencia del *locus* RPS60 en el cual sólo se logró amplificación de 5 alelos. Cabe destacar que el *locus* RPS50 es el único que no presentó alelos raros. En el *locus* RPS25b (Cuadro VIII) se encontró el alelo (126) con mayor frecuencia en el estudio (30 cromosomas) y presente en *P. chiapensis*, *P. strobiformis* y *P. ayacahuite* típico, lo que nos podría hablar de secuencias altamente conservadas. El taxa con una mayor diversidad alélica es *P. ayacahuite* típico (36), seguido de *P. chiapensis* (29), *P. strobiformis* (17), *P. ayacahuite* var. *veitchii* y finalmente *P. flexilis* (6). En cuanto al número de homocigotos y heterocigotos, la especie con un mayor número de alelos heterocigotos es *P. chiapensis* y la especie con menor número de heterocigotos es *P. flexilis* (ANEXO1). Es importante señalar que existe una relación ente el número de muestras trabajadas con la riqueza alélica de cada taxa.

En el caso del *locus* RPS12 (CuadroV) cuatro de veintidós alelos los comparten *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*, los cuales forman parte del complejo y nueve de veintidós alelos son exclusivos para *P. chiapensis*. Al igual ocurre en el *locus* RPS50 (Cuadro VI), donde tres de nueve alelos los comparten *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*, y cuatro de nueve alelos son exclusivos para *P. chiapensis* y solo un alelo se comparte entre estas tres especies; los alelos que se presentan sólo en una especie podrían manejarse como marcadores específicos para esa especie.

En el Cuadro VII, podemos observar que el *locus* RPS39 amplificó un alelo (170) exclusivo para *P. chiapensis* presente en todas las muestras amplificadas de esta

especie. Con respecto al *locus* RPS60 un microsatélite compuesto; amplificó cuatro alelos específicos para *P. chiapensis*, un alelo (267) para *P. ayacahuite* y no se logró amplificación en *P. strobiformis*. En el caso de *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. flexilis* ninguno de los *locus* amplificados lo comparten entre estas especies. En general se observaron un mayor número de alelos compartidos por *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* específicamente en los *loci* RPS12, RPS 2, RPS50 Y RPS25b.

Finalmente el presente trabajo demuestra que algunos cebadores desarrollados en *P. strobus* pueden ser utilizados en otras especies de pinos blancos, confirmando lo descrito por Echt *et al.* (1996), sobre la amplificación de marcadores microsatélites entre especies del mismo subgénero.

## CONCLUSIONES

- Los cebadores desarrollados en *Pinus strobus*, fueron suficientemente afines para lograr una amplificación de seis *loci*; cuatro de ellos simples (RPS2, RPS12, RPS50, RPS39) y dos compuestos (RPS25 y RPS 60), en *P. chiapensis* y en las especies del complejo *P. ayacahuite - P. strobiformis - P. flexilis*
- Las condiciones de PCR descritas por Rajora *et al.* (2000) y Echt *et al.* (1996) resultaron ser adecuadas para lograr la amplificación de los microsatélites en muestras de *P. chiapensis* y en las especies del complejo *P. ayacahuite - P. strobiformis - P. flexilis*.
- El sistema LI-COR, resultó ser el adecuado para la separación de los productos amplificados y por tanto para la identificación de los alelos, y la determinación de genotipos individuales.
- En el presente trabajo se identificaron 69 alelos en los seis *loci*. Se obtuvieron diferentes polimorfismos, en cada uno de los *locus* SSR's y cada una de las especies. Con los alelos encontrados se logró establecer un listado ó escalera de genotipos.
- Y finalmente el éxito de amplificación de los microsatélites perfectos (RPS2, RPS12, RPS50, RPS39) fue mayor que de los microsatélites compuestos (RPS25 y RPS 60).

## PERSPECTIVAS

Es deseable que trabajos como éste, se complementen con datos de secuenciación de los microsátélites y sus regiones flanqueantes. La secuenciación de los productos amplificados, permitiría conocer las posibles mutaciones que nos llevan a encontrar alelos raros, alelos nulos, así como las variaciones en los tamaños de los microsátélites y sus regiones flanqueantes. Además, la secuenciación de fragmentos del genoma de especies de pinos blancos crearía información para el desarrollo de cebadores específicos para las especies en cuestión. Este banco de datos podría proporcionar información para la identificación de semillas en bancos de germoplasma.

Así, futuros trabajos, en particular un estudio poblacional, nos podría arrojar resultados para conocer las condiciones de diversidad genética; herramienta necesaria para crear un programa de manejo y conservación de las especies de pinos blancos en México. Además, contar con estos datos permitiría llevar a cabo un análisis filogenético de las especies de pinos blancos encontrados en México y contribuir con la definición del estrato taxonómico del complejo *Pinus ayacahuite* - *Pinus strobiformis* - *Pinus flexilis*.

## LITERATURA CITADA.

- Andresen JW (1964) The taxonomic status of *Pinus chiapensis*. *Phytologia* 10 : 417-421.
- Blanquer-Maumont y Crouau -Roy (1995) Polymorphism, monomorphisms and sequences in conserved microsatellites in primates species. *Journal of Molecular Evolution* 41 : 492 - 497.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richardson R I, Mulley JC, Suterland GR (1993) Incidence and origin of "Null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> in SSR's markers. *American Journal of Human Genetics* 52 : 922 - 927.
- Díaz V M (2001) Caracterización de la diversidad genética de poblaciones naturales de *Pinus oocarpa* de Nicaragua a través de marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. España.
- DiRienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin y Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 : 3166 - 3176.
- Doyle JJ y Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bolletin* 19 : 11-15.
- Echt CS, May-Marquardt P, Hseih M, Zahorchak R (1996) Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39 : 1102-1108.
- Echt, CS, DeVerno, LL, Anzidei, M and Vendramin, GG (1998) Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology* 7: 307-316.
- Farjon A, Pérez de la Rosa J A, Styles BT (1997) *Guía de Campo de los Pinos de México y América Central*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Farjon A y Styles BT (1997) *Pinus (Pinaceae)*. Flora Neotropica, Monograph 75. New York Botanical Garden, New York.
- Grimaldi M-C, Crouau - Roy B (1997) Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequence for SSR's. *Journal of Molecular Evolution* 44 : 336 -340.
- Karhu A (2001) Evolution and applications of pine microsatellites. Tesis Doctoral. Universidad de Oulu, Finlandia.
- Karhu A, Dieterich JH, Savolainen O (2000) Rapid expansion of Microsatellite sequences in pines. *Molecular Biology and Evolution* 17 : 259-265.
- Kimura M y Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49 : 725 - 738.

Kimura M y Ohta T (1978) Stepwise mutational model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75 : 2868 - 2872.

Kutil B L, Williams C G (2001) Triple-Repeat Microsatellites Shared Among Hard and Soft Pines. *The Journal of Heredity* 92 : 327-332.

Little EL, Critchfield WB (1969) *Subdivisions of the genus Pinus*. U. S. Forest Service Miscellaneous Publications 1144, Washington, D. C.

Palomera V (2002) Comparación de métodos de extracción de DNA en diferentes tejidos de tres especies de pinos blancos (*Pinus spp.*). Tesis Licenciatura. Universidad de Guadalajara, México.

Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA (1998) Non amplifying alleles at SSR's loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* 4 : 249 - 252.

Pérez de la Rosa JA (1993) Taxonomía de *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

Perry JP (1991) *The Pines of Mexico and Central America*. The Timber Press, Inc. Portland, Oregon.

Rajora OP, Rahman MH, Buchert GP, Dancik BP (2000) Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* 9 : 339-348.

Richardson DM (1998) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press.

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor.

Soranzano N, Provan J, Powell W (1998) Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology* 7 : 1247-1263.

Squirrell J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russella J, Lowe AJ, Gibby M y Powell W (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12 : 1339-1348.

Wolfe AD y Liston A (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary. In: *Molecular Systematics of Plants II DNA Sequencing* (ed. Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ) 65-68. Kluwer Academic Publisher. Boston.

Zane L, Bargelloni L y Pattarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11 : 1-16.

## ANEXO 1

### Extracción de DNA a partir de acículas *Palomera* (2002)

1. Moler 1 gr de tejido (acículas) con nitrógeno líquido, en un mortero (previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), hasta obtener un polvo fino. Transferir la muestra con una espátula a un tubo nalgene de 50 ml con 8 ml de buffer CTAB 2X (previamente calentado a  $65^{\circ}\text{C}$ )
 

<i>Buffer CTAB 2X (pH 8) 100ml</i>			
CTAB	2%	2g	
Tris	100 mM		1.21g
NaCl	1.4 M		8.18g
EDTA	20 mM		0.744g
PVP 10	1%	1g	
2. Incubar en baño maría a  $65^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos. Después de incubar dejar enfriar por aproximadamente 10 minutos.
3. Agregar 7.5 ml de solución cloroformo-álcohol isoamílico (24-1), mezclar suavemente 2 o 3 veces y permitir que el gas escape.
4. Centrifugar a 4,000 rpm por 20 minutos
5. Transferir la fase acuosa (aprox. 6 ml), con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu\text{l}$ , a un tubo de 50 ml limpio.
6. Añadir un volumen similar al recuperado de isopropanol frío (aproximadamente 6 ml) y mezclar suavemente hasta precipitar el DNA. Mantener a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.
7. Transferir el DNA precipitado a un tubo de 50 ml limpio, en caso

de no obtener precipitado (hebra) centrifugar dos minutos a 2,500 rpm para formar una pastilla.

8. Añadir 10 ml de buffer de lavado al precipitado o pastilla y mezclar por inversión para resuspender el DNA.

9. Mantener por 20 minutos, en el buffer de lavado (mezclar por inversión) y recuperar la hebra de DNA o centrifugar a baja velocidad ( 2,500 rpm por 2 minutos). En caso de tener hebra eliminar con la ayuda de la micropipeta el buffer de lavado.

Buffer de lavado 100ml		
Etanol	76%	76ml
Acetato de amonio	10 mM	0.07g

10. Decantar y secar la pastilla con aire por un tiempo corto. Diluir el ADN en 1 ml de buffer TE

Buffer (TE) 100ml		
Trisma	10 mM	0.121g
EDTA	1 mM	0.018g

11. Agregar 5  $\mu\text{l}$  de RNAsa e incubar por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

RNAsa	2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
RNasa	2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Agua destilada	140 $\mu\text{l}$

12. Agregar 2 ml de agua destilada y 1.5 ml acetato de amonio 7.5 M. Mezclar suavemente.

Acetato de amonio (PM77.08g)	7.5 M
------------------------------	-------

13. Inmediatamente añadir 10 ml de etanol frío, mezclar suavemente hasta que el DNA precipite.

14. Recuperar la hebra de ADN o centrifugar a 2,500 rpm por 2 min para formar la pastilla.
15. Lavar con 5 ml de etanol al 70%, centrifugar a 2,500 rpm por 2 minutos.
16. Decantar, secar con aire y resuspender en 200 - 700  $\mu$ l de Buffer TE.

**B) Micro-método de Extracción de DNA para Megagametofitos y Embriones (Palomera 2002)**

1a. Triturar el megagametofito en un tubo Eppendorf de 2.0 ml con 200  $\mu$ l de buffer de extracción CTAB 2X. Añadir 800  $\mu$ l de buffer CTAB 2X y mezclar por inversión suavemente hasta homogenizar.

1b. Triturar el embrión en un tubo de 2.0 ml con 500  $\mu$ l de buffer de extracción, mezclar por inversión suavemente hasta homogenizar el tejido.

2. Incubar a 65°C por 60 minutos.
3. Después de la incubación sacar los tubos y permitir que se enfrien a temperatura ambiente de 5 -7 minutos.

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

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

5. Centrifugar por 20 minutos a 4000 rpm.
6. Recuperar el sobrenadante que contienen el DNA y transferirlo con la pipeta de 1000  $\mu$ l a otro tubo Eppendorf.  $\approx$  700  $\mu$ l en Megas y  $\approx$  250  $\mu$ l para embriones.
7. Agregar 700  $\mu$ l de isopropanol frío. Invertir suavemente varias veces hasta precipitar el DNA.
8. Transferir el DNA precipitado a un tubo Eppendorf de 1.5 ml con la pipeta de 1000  $\mu$ l. Centrifugar por 1 o 2 minutos a 2500 rpm.
9. Añadir 1 ml de buffer de lavado e invertir suavemente. Mantener durante 20 minutos y eliminar el buffer de lavado con la pipeta de 1000  $\mu$ l, o centrifugar a baja velocidad (2,500 rpm 2min)
10. Secar con aire por un tiempo corto. Añadir 200  $\mu$ l de buffer TE y disolver la hebra o pastilla de DNA.
11. Agregar 70  $\mu$ l de agua destilada y 130  $\mu$ l de acetato de amonio 7.5 M. Mezclar suavemente por inversión.
12. Añadir 850  $\mu$ l de etanol frío, mezclar suavemente hasta precipitar el DNA.
13. Recuperar la hebra de DNA o centrifugar a 4500 por 5 minutos para formar pastilla.
14. Lavar con 1 ml de etanol 70%, y centrifugar a 2,500 rpm por 2 minutos.

15. Decantar el etanol con la pipeta y añadir 200- 400  $\mu$ l de buffer TE. Disolver durante 2 hrs a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente.
16. Almacenar el DNA genómico obtenido, en congelación a -20°C hasta su uso.

## ANEXO 2

**Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por espectrofotometría.** (Sambrook 1989).

Para conocer la concentración de DNA en ng/ $\mu$ l las muestras se diluyeron 1:100 en agua destilada y se determinó la DO (Densidad Óptica) a 260 nm (Espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis). La cantidad del ADN en la muestra se obtiene aplicando la fórmula:

$$[\text{DNA}_{\text{ng}/\mu\text{l}}] = \text{DO}_{260} \times 100 (\text{factor de dilución}) \times 50 \mu\text{g/ml} (\text{factor constante}).$$

La pureza de las muestras de DNA es indicada automáticamente en las lecturas del espectrofotómetro con la relación de absorbancia  $A_{260}:A_{280}$ . En general una preparación pura de DNA de doble hebra presenta una relación de 1.8 o 2.0. Relaciones más altas se deben frecuentemente a contaminación de RNA, mientras que relaciones menores entre 1.4-1.7 pueden indicar la presencia de proteínas o impurezas (Sambrook *et al.* 1989).

### **Análisis Cuantitativo y Cualitativo del ADN por Electroforesis en Geles de Agarosa.**

Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 0.8 % en buffer TBE 1X (TBE 10X:Tris 0.89 M, Acido bórico 0.89 M, EDTA 25M). El gel se colocó en el soporte de la cámara de electroforesis (equipo de electroforesis submarina BIO-RAD®) y se añadió buffer de corrimiento TBE 1X hasta cubrir el gel. Se aplicaron las muestras 6  $\mu$ l de ADN genómico y 4  $\mu$ l de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25 %, Glicerol 30 %) en los pozos. Se aplicó además un marcador de DNA de alto peso molecular (ADN del bacteriófago lambda cortado con *Hind* III. GIBCO BRL®). Las muestras corrieron hacia el polo positivo, aplicando un voltaje constante de 90 Volts por 90 minutos. El gel se tiñó sumergiéndolo en solución de bromuro de etidio (c.c. final de 0.5 mg/ml) durante 15 minutos, se destiñó en agua destilada aproximadamente durante 1 hora y se visualizó con un transiluminador de luz UV (UVP), se fotografió con cámara Polaroid® (FOTODYNE).

**Genotipos SSR's observados en *Pinus strobiformis***

Población	Muestra	Locus		SSR		RPS 50	RPS 60
		RPS 2	RPS 12	RPS 25b	RPS 39		
El Potosí	PS1b	151	171/175	101/126	NA	164	NA
Cananea	PS7a	151/157	175/183	126	152	160/166	NA
	PS17	151/169	184	126	157	160/168	NA
Bocoyna	PS37	151	NA	126	157	160	NA
	PS39	153	181	102/126	167	160	NA

**Genotipos SSR's observados en *P. ayacahuite*.**

Población	Muestra	Locus		SSR		RPS 50	RPS 60
		RPS 2	RPS 12	RPS 25b	RPS 39		
Cuale	PAE1b	148	192	160/168	NA	160/168	NA
	PAE 23b	148	187	124	NA	160	NA
	PAE 24	NT	181/184	NT	NT	NT	NT
Las Palmas	PAE 7a	NA	198	124	163	162	NA
Omitlán	PAE 9a	160	194	126	171	150/160	NA
Palo Hueco	PAE 16	NA	183	126	161	160	NA
	PAE 18b	149	194	126	168	162	NA
El Copal	PAE 19	149	183	NA	NA	160	NA
Xico	PAE 37	NT	181/186	NT	NT	NT	NT
	PAE 39b	145/148	193	124	NA	168	NA
Palenque	PAE 47	NT	175/184	NT	NT	NT	NT
	PAE 48	NT	175/184	NT	NT	NT	NT
	PAE 50	150	NA	NA	NA	NA	NA
	PAE 52	151	NA	NA	170	NA	NA
	PAE 126	149	184	NA	170	NA	NA
	PAE 127	149	187/198	126	NA	NA	NA
	PAE 131	149/165	NA	NA	NA	NA	NA
	PAE132	NT	184	NT	NT	NT	NT
	PAE 133a	NA	184	NA	NA	NA	NA
	PAE 134	NA	184	126	145/172	NA	NA
	PAE135	150	184	117/126	NA	NA	267
	PAE136	150	184	126	NA	NA	NA
	PAE137	NT	177/184	NT	NT	NT	NT
	PAE138	NT	184	NT	NT	NT	NT
	PAE 139	150	NA	126	NA	NA	NA
	PAE140	NT	177	NT	NT	NT	NT

NA No Amplificó  
 NT No Trabajada

Genotipos SSR's observados en *Pinus chiapensis*.

Especie Población	Muestra	Locus SSR					
		RPS 2	RPS 12	RPS 25b	RPS 39	RPS 50	RPS 60
Tlapacoyan	Pch1b	NA	167	NA	170	178	NA
	Pch2e	NA	167	NA	170	NA	NA
	Pch3c	151	163/189	NA	170	178/182	259
	Pch4d	NA	189/198	NA	170	NA	NA
Hueytamalco	Pch6b	NA	167	NA	170	NA	NA
	Pch8	NT	167/195	NT	NT	NT	NT
	Pch9a	NT	147/188	NT	NT	NT	NT
	Pch9c	147	147/189	NA	170	168/182	265/265
Bochil	Pch10	148/157	153/157	126	170	156/182	251/269
	Pch11b	147	147/189	126	170	156/182	NA
	Pch12	147	147	NA	170	NA	NA
	Pch13	147	147/155	113/126	170	156/170	NA
	Pch14	147	153	126	170	170	NA
	Pch15	NT	147	NT	NT	NT	NT
	Pch17	NT	153	NT	NT	NT	NT
	Pch21	NT	151/163	NT	NT	NT	NT
	Pch22	NT	147/163	NT	NT	NT	NT
	Pch23	NT	163	NT	NT	NT	NT
	Pch25	NT	151/163	NT	NT	NT	NT
	Pch28	NT	147	NT	NT	NT	NT
	Pch32	NT	147	NT	NT	NT	NT

Genotipos SSR's observados de semillas *P. flexilis* y *P. ayacahuite* var. *veitchii*

	Muestra	Locus SSR					
		RPS 2	RPS 12	RPS 25b	RPS 39	RPS 50	RPS 60
<i>P. flexilis</i>	3e	NA	NA	144	NA	156/182	NA
	3m	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5m	150/155	173	NA	NA	166	NA
	5e	150	173	NA	NA	NA	NA
<i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	1m	NA	NA	126	NA	NA	NA
	1e	149	165/165	NA	NA	176/182	NA
	8m	142/148	NA	113/126	NA	NA	NA
	8e	NA	157/177	126	NA	150/168	NA
	9m	NA	NA	126	NA	NA	NA
	9e	149	NA	124	NA	170	NA

NA No Amplificó  
NT No Trabajada

*"El amor es una secuencia de copia única en el genoma de cada individuo,  
y depende de cada uno de nosotros someterla a una replicación"*

RENO.-