UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Análisis filogenético preliminar del género *Cosmos* (Asteraceae) con base en secuencias del ADN ribosomal (ITS)

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA
RODOLFO MUÑIZ MENDOZA

Las Agujas, Zapopan, Jal., Noviembre de 2008

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1373/ C. C. BIOLOGÍA

C. Rodolfo Muñiz Mendoza

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 titulo : **"Análisis filogenético preliminar del género *Cosmos* (Asteraceae) con base en secuencias del ADN ribosomal nuclear (ITS)"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el **Dr. Aarón Rodríguez Contreras.**

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

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Las Agujas, Zapopan., 03 de septiembre del 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

FORMA F

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción Tesis con el título: **"Análisis filogenético preliminar del género *Cosmos* (Asteraceae) con base en secuencias del ADN ribosomal (ITS)"** que realizó el pasante Rodolfo Muñiz Mendoza con número de código 399463058 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.

Atentamente

Predio las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco. 17 de Octubre del 2008.

Dr. Aarón Rodríguez Contreras
Director del trabajo

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Guzmán Dávalos Laura		Oct. 17, 2008
Dr. Castro Félix Patricia		Oct 17 2008
Dr. Vargas Ponce Ofelia		Oct. 17, 2008
Supl. M. C. Cedano Maldonado Martha		Oct. 17, 2008

Tesis realizada en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Botánica del

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Universidad de Guadalajara.

Zapopan, Jalisco.

Director: Dr. Aarón Rodríguez Contreras.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a todos que me apoyaron tanto directa como indirectamente en la realización de esta tesis. Estoy agradecido con mi familia y mi novia por su apoyo para poder terminar mi carrera. Agradezco a mis sinodales, que con sus recomendaciones se pudo lograr un trabajo de buena calidad. Quiero dar un agradecimiento especial a mi director de tesis, Aarón Rodríguez Contreras, ya que gracias a sus consejos, su apoyo y sus enseñanzas he logrado realizar este trabajo.

RESUMEN

El género *Cosmos* Cav. (Asteraceae) es un buen ejemplo de la diversidad y endemicidad de plantas en México. *Cosmos* agrupa a 39 especies y 12 taxones infraespecíficos. La mayoría de las especies crecen en México pero su distribución geográfica se extiende desde los Estados Unidos de Norteamérica hasta Perú y Bolivia. Sus inflorescencias son muy vistosas, lo que convierte a estas plantas como elementos de ornato. *Cosmos* incluye hierbas anuales y perennes. La perennidad la han logrado a través de dos mecanismos; en el primero, las raíces son fasciculadas, en contraste con el segundo, donde la base del tallo es engrosada y leñosa y la raíz es axomorfa. Se analizaron secuencias de los espacios internos transcritos (ITS) del ADN ribosomal nuclear (nrADN) de 11 especies de *Cosmos* más *Coreocarpus congregatus*, *Bidens rostrata* y *Dahlia coccinea* como grupos externos. El objetivo fue establecer si los ITS son útiles para establecer relaciones filogenéticas de *Cosmos* y analizar, en el contexto filogenético, la evolución de los diferentes hábitos de crecimiento en el mismo género. El análisis de máxima parsimonia produjo árboles con resolución y es posible concluir que establecer grupos con base en hábitos de crecimiento puede ocasionar la formación de grupos no naturales como resultado de la convergencia morfológica.

ÍNDICE

I.-INTRODUCCIÓN.....1

II.-ANTECEDENTES.....4

III.-JUSTIFICACIÓN.....5

IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....6

V.-OBJETIVO.....7

VI.-HIPÓTESIS.....8

VII.-MATERIALES Y MÉTODOS.....9

7.1.-Obtención del material de *Cosmos*.....9

7.2.-Trabajo de laboratorio.....14

7.2.1-Extracción de ADN.....14

7.2.2-Amplificación de ADN.....14

7.2.3-Purificación de los productos de PCR.....15

7.2.5.-Reacción de secuenciación.....15

7.2.6.-Purificación de la reacción de secuenciación.....15

7.2.7.-Visualización de las secuencias de ADN.....15

7.2.8.-Edición y alineación de las secuencias.....15

7.2.9.-Análisis filogenéticos.....16

VIII.-RESULTADOS.....17

IX.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....25

X.-BIBLIOGRAFÍA.....27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxones utilizados en el análisis molecular.....10

Tabla 2. Comparación de valores para diferentes análisis que han utilizado ITS en Coreopsideae (Asteraceae).....17

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Uno de los dos árboles más parsimoniosos, de 11 especies de *Cosmos* con 3 grupos externos.....18

Fig. 2 Árbol de consenso estricto de dos árboles más parsimoniosos, de 11 especies de *Cosmos* con 3 grupos externos.....19

Fig. 3 Árbol más parsimonioso de 11 especies de *Cosmos* más *Coreocarpus congregatus* como grupo externo.....20

Fig. 4 Uno de los seis árboles más parsimoniosos, de 11 especies de *Cosmos* más *Bidens rostrata* como grupo externo.....21

Fig. 5 Consenso estricto de seis árboles más parsimoniosos de 11 especies de *Cosmos* más *Bidens rostrata* como grupo externo.....22

Fig. 6 Uno de los tres árboles más parsimoniosos de 11 especies de *Cosmos* más *Dahlia coccinea* como grupo externo.....23

Fig. 7 Consenso estricto de tres árboles más parsimoniosos de 11 especies de *Cosmos* más *Dahlia coccinea* como grupo externo.....24

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Protocolo de extracción de ADN en plantas.....33

ANEXO 2 Protocolo para columnas de purificación GFX.....35

ANEXO 3 Protocolo para la purificación de la reacción de secuenciación.....37

I. INTRODUCCIÓN

Asteraceae es una familia importante desde el punto de vista ornamental. Algunos géneros cultivados mundialmente son *Ageratum* L., *Achillea* L., *Aster* L., *Chrysanthemum* L., *Cosmos* Cav., *Dahlia* Cav., *Helianthus* L., *Senecio* L., *Tagetes* L. y *Zinnia* L. Las especies cultivadas de *Ageratum, Cosmos, Dahlia, Helianthus, Tagetes y Zinnia* tienen su origen en México. Las plantas del género *Cosmos* producen inflorescencias (cabezuelas) muy vistosas, lo que las convierte en elementos muy atractivos.

El nombre del género *Cosmos* viene del griego "*kosmos*" y significa "algo bello". Aparentemente, semillas de plantas de *C. bipinnatus* Cav. fueron recolectadas por Sessé y Mociño durante la Expedición Real a Nueva España y luego llevadas a Madrid donde fueron cultivadas en el jardín botánico. Con base en estas plantas, el género fue descrito con este nombre por la belleza de sus flores. En 1790, *C. sulphureus* Cav. también se encontraba en este jardín (McVaugh 1984). Desde entonces estas especies anuales de *Cosmos* fueron apreciadas y propagadas en muchas partes del mundo y en el presente hay numerosas variedades en cultivo. *Cosmos atrosanguineus* (Ort.) Hemsl. y *C. deficiens* Sherff son especies perennes cultivadas, pero no tan comunes (Bailey 1949; Brickell y Sharman 1986). En México, el uso ornamental bajo cultivo de *Cosmos* no es tan común como en otros países, donde es costumbre sembrar plantas ornamentales anuales cada año.

Cosmos agrupa a 39 especies y 12 taxones infraespecíficos. Su distribución geográfica se extiende desde los Estados Unidos de Norteamérica hasta Perú y Bolivia. En México crecen 35 especies y 9 subespecies; es decir, el 86% de los taxones. Veintiocho especies y 10 subespecies son endémicas de este país, en otras palabras el

74.5% de los taxones (Rodríguez *et al.* 2006). Por tal motivo, el género *Cosmos* es un muy buen ejemplo de la diversidad y endemicidad de este grupo de plantas en México.

Cosmos incluye hierbas anuales y perennes. La perennidad la han logrado a través de dos mecanismos; en el primero, las raíces son fasciculado-tuberoso, en contraste con el segundo, donde la base del tallo es engrosada y leñosa y la raíz es axomorfa. Las especies perennes de *Cosmos crithmifolius* Kunth y *C. landii* Melchert poseen tallos leñosos de hasta 40 cm arriba del suelo. *Cosmos mcvaughii* Sherff también es perenne y acuática (Rodríguez *et al.* 2006). Esta diversidad convierte a este grupo de plantas en un modelo ideal para el estudio de la evolución de hábitos de crecimiento.

Cosmos está agrupado en la tribu Coreopsideae y subtribu Coreopsidinae (Turner y Powell 1977; Ryding y Bremen 1992). Además de este género, Coreopsidinae incluye a los géneros *Coreocarpus* Benth., *Coreopsis* L., *Cyathomone* S.F. Blake, *Dahlia* Cav., *Ericentrodea* S.F. Blake & Sherff, *Henricksonia* B.L. Turner, *Heterosperma* Cav., *Narvalina* Cass. y *Thelesperma* Less. *Henricksonia* es endémico de México. *Cosmos* y *Dahlia* son casi exclusivos de este país, mientras que *Coreopsis*, *Coreocarpus* y *Heterosperma* tienen solamente algunos representantes en México. Por último, *Cyathomone, Ericentrodea, Narvalina* y *Thelesperma* no ocurren en México (Bremer 1994).

Los caracteres morfológicos han servido como base para la mayoría de los estudios taxónomicos (Stevens 1984, 1986). Sin embargo, la incorporación de nuevos tipos de datos, particularmente los caracteres moleculares, ha sido necesaria en taxones donde los caracteres morfológicos, por sí solos no han resuelto los problemas taxonómicos. Algunas de las razones para usar secuencias de ADN, en estudios filogenéticos son: 1) representan una fuente abundante de caracteres (potencialmente

cada nucleótido de la secuencia), 2) tienen diferentes propiedades estructurales y funcionales y 3) presentan diferentes tasas evolutivas (González 1997).

II. ANTECEDENTES

México es un país megadiverso, ya que en su territorio crecen 22,351 (Rzedowski 1991; Villaseñor 2003) de las cerca de 250,000 especies de Magnoliophyta (Litt 2006), es decir, el 8.94%. Un grupo particularmente diverso es la familia Asteraceae. A escala mundial, Asteraceae está integrada por 1,535 géneros y 23,000 especies (Bremer 1994). En México, el número de géneros y especies de Asteraceae reconocidos cambia de acuerdo al autor. Rzedowski (1991) estimó la presencia de 314 géneros y 2,400 especies. De forma similar, Turner y Nesom (1993) calcularon la presencia de 323 géneros y 2,700 especies, mientras que Villaseñor (1993) registró la existencia de 2,861 especies agrupadas en 387 géneros. De cualquier forma, Asteraceae es el grupo de plantas con flores más diverso en México y cerca del 63% de sus especies son endémicas (Villaseñor 1993; Turner y Nesom 1993).

Los estudios filogenéticos sobre angiospermas cuyo centro de origen y diversificación es México, son escasos. La mayoría han sido elaborados por investigadores norteamericanos y europeos (Bogler y Sympson 1996; Clarke *et al.* 2000; Miller y Bayer 2003; Patterson y Givnish 2003; Saar *et al.* 2003; Bogler *et al.* 2006; Seigler *et al.* 2006; Zomlefer *et al.* 2006; Mort *et al.* 2008), o bien por investigadores mexicanos formados en universidades del extranjero (Magallón y Sanderson 2002; Lara-Cabrera y Spooner 2004, 2005; Rodríguez y Sytsma 2006). Tal es el caso de la familia Asteraceae (Jansen *et al.* 1991; Ryding y Bremer 1992; Kim *et al.* 1999; Linder *et al.* 2000; Saar *et al.* 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo es importante por varias razones: 1) *Cosmos* es un género cuyo origen y diversidad está en México; 2) el trabajo constituye una propuesta pionera en la Universidad de Guadalajara, para la utilización de secuencias de ADN en la solución de problemas filogenéticos en Angiospermas; 3) *Cosmos* tiene el potencial para ser utilizado como plantas ornamentales en jardinería.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cosmos exhibe una gran diversidad de hábitos de crecimiento, por tal motivo agrupar especies con el mismo tipo de hábito podría generar la formación de grupos no naturales a consecuencia de la convergencia morfológica. Por lo tanto, es conveniente analizar y comparar secuencias de ADN; específicamente la región interna transcrita (ITS) del ADN ribosomal nuclear (nrADN) la cual ha sido utilizada en diferentes grupos taxonómicos, para establecer sus relaciones filogenéticas (Baldwin *et al.* 1995, 1998; Kim *et al.* 1999; Saar *et al.* 2003; Bogler *et al.* 2006; Mort *et al.* 2008).

V. OBJETIVO

Establecer si los espaciadores internos transcritos (ITS) del nrADN son útiles para resolver las relaciones filogenéticas de *Cosmos* y analizar, en el contexto filogenético, la evolución de sus diferentes hábitos de crecimiento.

VI. HIPÓTESIS

Agrupar especies de *Cosmos* con el mismo tipo de hábito de crecimiento podría generar la formación de grupos no naturales a consecuencia de la convergencia morfológica. En otras palabras, durante la historia evolutiva de *Cosmos*, el mismo hábito ha aparecido en distintos linajes.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención del material de *Cosmos*

Once especies de *Cosmos* más *Dahlia coccinea* Cav. y *Bidens rostrata* Melchert fueron recolectadas durante el 2006 (Tabla 1). El trabajo de campo se realizó con base en la información de ejemplares de herbario depositados en el herbario Luz María Villarreal de Puga del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUG) y revisión de bibliografía (Sherff 1932, 1964; McVaugh 1984; Melchert 1967, 1990). Las hojas recolectadas en campo se deshidrataron y conservaron en sílica gel (Chase y Hillis 1991). Los ejemplares de herbario de respaldo están depositados en los herbarios de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), IBUG, Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío (IEB), y el Herbario Nacional (MEXU).

BIBLIOTECA CUCBA

Tabla 1. Taxones utilizados en el análisis molecular

Taxón	Hábito de crecimiento	Colector	Localidad
Bidens rostrata Melchert	Anual	Rodríguez 4978 (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Zapopan, Fracc. Pinar de la Venta, 3ª sección, Bosque de la Primavera. Alt. 1735 m, 20°42.719'N, 103°31.306'W
Coreocarpus congregatus (S.F. Blake) E.B. Sm.	Anual	GenBank AF330089	Desconocida
Cosmos atrosanguineus (Hook.) Ort.	Perenne con raíz fasciculado-tuberosa	GenBank AF165847	Cultivada
C. bipinnatus Cav.	Anual	Rodríguez 4991 (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Zapopan, km 15 carretera No. 15 entre Guadalajara y Tequila. Alt. 1640 m, 20°43.468'N; 103°30.350'W
C. caudatus H.B.K.	Anual	Rodríguez *et al.* 4984 (IBUG)	México, Colima: municipio de Colima, justo en el

			crucero de la carretera No. 110 entre Colima y Pihuamo y la carretera que conduce a Tepames. Alt. 513m, 19°10.396'N; 103°39.655'W
C. crithmifolius H.B.K	Perenne con raíz axomorfa	Rodríguez y Ortiz-Catedral 5011a (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Tequila, camino de ascenso al cerro de Tequila. Alt. 1973m, 20°49.099'N; 103°51.625'W
C. deficiens Sherff	Perenne con raíz fasciculado-tuberosa	Rodríguez y Quezada 5005 (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Mascota km 83 carretera No. 90 entre Ameca y Mascota, 2 km al W del Puerto La Campana. Alt. 1842 m, 20°22.221'N; 104°35.966'W
C. intercedens Sherff	Perenne con raíz axomorfa	Rodríguez y Quezada 5002 (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Cuautla km 34 carretera San Vicente --Volcanes, 6-7 km al NW de Cuautla. Alt. 1819 m, 20°14.151'N;

			104°27.262'W
C. jaliscensis Sherff	Perenne con raíz fasciculado-tuberosa	Rodríguez 4894 (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Atenguillo km 82-83 carretera Mex. 70 justo en el Puerto La Campana. Alt.1947 m, 20° 22.238'N; 104°35.697 'W
C. landii Sherff var. *achalconensis* Melchert	Perenne con raíz axomorfa	Rodríguez 4976 (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Zapopan, fraccionamiento Pinar de la Venta, tercera sección, Bosque La Primavera. Alt. 1735 m, 20°42.719'N; 103°31.306'W
C. mcvaughii Sherff	Perenne y acuática	Rodríguez y Quezada 5006a (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Mascota km. 84 carretera No. 90 entre Ameca y Mascota, 2km al NW de puerto La Campana. Alt. 1902 m, 20°22.197'N; 104°36.149'W

C. parviflorus (Jacq.) Pers.	Anual	Quezada 1 (IBUG)	México, Zacatecas: municipio de Tlaltenango de Sánchez Román, 26.7km al SE de Tlaltenango, sobre el camino a Jalpa. Alt.2340 m, 21°39.897'N;103°09.316'W
C. sulphureus Cav.	Anual	Rodríguez 4990 (IBUG)	México, Jalisco: municipio de Zapopan, km 15 carretera No. 15. Alt.1640 m, 20°43.468'N; 103°30.350'W
Dahlia coccinea Cav.	Perenne con raíz fasciculado-tuberosa	Rodríguez *et al.* 4959 (IBUG)	México, Jalisco: municipio de La Manzanilla, 5 km al sur de La Manzanilla, carretera La Manzanilla-Mazamitla Alt.2017 m, 19°59.597N; 103°06.963'W

7.2 Trabajo de laboratorio

7.2.1 Extracción de ADN.

La extracción se llevó a cabo en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara. Este proceso se realizó siguiendo el método de Doyle y Doyle (1987, 1990) (Anexo 1). Para ello, se utilizaron las hojas recolectadas en campo, deshidratadas y conservadas en sílica gel.

7.2.2 Amplificación de ADN

La amplificación del ITS1, ITS2, la porción 5.8S y las regiones contiguas de los genes 18S y 26S del nrADN se logró utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.* 1990; Baldwin *et al.* 1995, 1998). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 de la marca MJ Research, Inc. Cada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incluyó 12.7 µl de agua ultrapura (HPLC), 2 µl de Buffer de reacción 10X, 2 µl de $MgCl_2$ 25 mM, 1 µl de dNTPs a 5 mM, 1 µl de BSA (Albumina de suero bovino), 0.5 µl de los iniciadores ITS1 e ITS2 a 10 µM, respectivamente y 0.25 U de Taq polimerasa. El programa de amplificación consistió de una fase inicial de desnaturalización a 95°C por 3 min seguido de 24 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95°C por 1 min, acoplamiento a una temperatura de 50°C por 45 seg y extensión a 72°C por 2 min. El programa continuó con 14 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 95°C por 1 min, acoplamiento a una temperatura de 50°C por 45 seg y extensión de 72°C por 2 min. La duración de la fase de acoplamiento se incrementó por 5 seg en cada uno de los 14 ciclos, para finalizar con una extensión a 72°C por 10 min y una incubación de 4°C por tiempo indefinido. Este programa funcionó para el caso de *Cosmos*, aunque en algunas muestras se tuvo que hacer reamplificación, que es tomar una muestra del producto de PCR y volverlo amplificar.

7.2.3 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron con la utilización de columnas GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). El volumen máximo de reacción de PCR fue procesado con el protocolo indicado en el Anexo 2.

7.2.4 Reacción de secuenciación del ADN

Las secuencias se obtuvieron utilizando el ABI PRISM DNA Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Co.). La reacción de secuenciación consistió en 25 ciclos con una fase inicial de desnaturalización a 96°C por 30 seg, seguido por la etapa de hibridación a una temperatura de 50°C por 15 seg y en el paso 3 de extensión a 60°C por 4 min, finalmente se incubó la muestra a 4°C por tiempo indefinido.

7.2.5 Purificación de la reacción de secuenciación

Los productos de la reacción de secuenciación se purificaron con columnas AutoSeq G-50 Dye Terminador Renoval Kit (GE Healthcare). El volumen de muestra por columna es de 12-25 µl (Anexo 3).

7.2.6 Visualización de las secuencias de ADN

Las secuencias de ADN fueron visualizadas utilizando el ABI 310 DNA Sequencer (Perkin Elmer Co.), en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Botánica, Departamento de Botánica y Zoología de la Universidad de Guadalajara.

7.2.7 Edición y alineación de las secuencias

La edición de las secuencias se realizó con el programa de cómputo Chromas Version 2.31 (McCarthy 1996,1998). Este programa permite observar las secuencias para verificar su calidad y eliminar posibles errores de edición. También permite el reconocimiento de bases no codificadas. Con la ayuda del programa MacClade

(Maddison y Maddison *et al.* 2000) se llevó a cabo la alineación de las secuencias para su posterior análisis.

7.2.8 Análisis filogenéticos

Bidens rostrata, *Coreocarpus congregatus* (S.F. Blake) E.B. Sm. y *Dahlia coccinea* fueron elegidos como grupo externo con base en los resultados de Mort *et al.* (2008). Las secuencias de *Cosmos atrosanguineus* (AF165847) y *Coreocarpus congregatus* (AF330089) fueron obtenidas de GenBank. Todos los análisis filogenéticos se ejecutaron utilizando el programa de cómputo PAUP (Beta Version 4.0b4a, Swofford 1998) con el criterio de máxima parsimonia. Los árboles más parsimoniosos se obtuvieron mediante una búsqueda exhaustiva cuando un solo taxón fue utilizado como grupo externo. En contraste, la búsqueda heurística se utilizó cuando se incluyeron tres taxones como grupo externo. Se utilizó el algoritmo TBR para la búsqueda de los árboles más parsimoniosos, la opción MulTrees apagada y una incorporación aleatoria de secuencias. El apoyo para las diferentes ramas de los árboles se calculó utilizando el análisis de remuestreo (bootstrap) (Felsenstein 1985) con 1000 repeticiones y las mismas condiciones que para la búsqueda heurística. Para determinar al mejor grupo externo, se hizo un análisis, utilizando de forma independiente, a *Bidens rostrata*, *Coreocarpus congregatus* y *Dahlia coccinea*. Este procedimiento también ayudó a realizar búsquedas exhaustivas en cada análisis, al mantener el número de taxones del grupo interno en once.

VIII. RESULTADOS

Cosmos atrosanguineus fue utilizado para determinar el tamaño de los espacios transcritos internos de este género. En *Cosmos*, el ITS1 tiene 261 bases, la región 5.8 está formada por 111 bases y el ITS2 consta de 269 bases. Toda la región alineada de ITS tiene 643 nucleótidos. Una comparación de los valores de ITS obtenidos en este análisis y otros similares con miembros de Coreopsideae, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de valores para diferentes análisis que han utilizado ITS en Corepsideae (Asteraceae).

Análisis	Núm. Taxones	Grupos externos	Caracteres totales	Caracteres informativos	Longitud del árbol	Árboles más parsimoniosos recuperados	CI	RI	HI
Mort *et al.* *2008*	56	2	698	268	1, 203	92	0.502	0.714	ND
Saar *et al.* 2003	34	2	657	92	256	5,125	0.757	0.86	0.243
Kim *et al.* 1999	50	3	510	256	1, 073	84	0.479	0.749	ND
Muñiz-Mendoza 2008	11	3	643	70	256	2	0.804	0.637	0.195

Cuando se utilizó a *Bidens rostrata*, *Coreocarpus congregatus* y *Dahlia coccinea* como grupos externos, se recuperaron dos árboles más parsimoniosos de 256 pasos y uno de ellos se muestra en la figura 1. El número de caracteres cladísticamente informativos fue de 70. El Índice de Consistencia (CI) fue de 0.8047, el Índice de Homoplasia (HI) de 0.1953 y el Índice de Retensión (RI) de 0.6377. El CI, excluyendo a los caracteres no informativos, fue de 0.6212. De forma similar, el HI al eliminar los caracteres no informativos resultó en 0.3788. El árbol de consenso estricto se muestra en la figura 2.

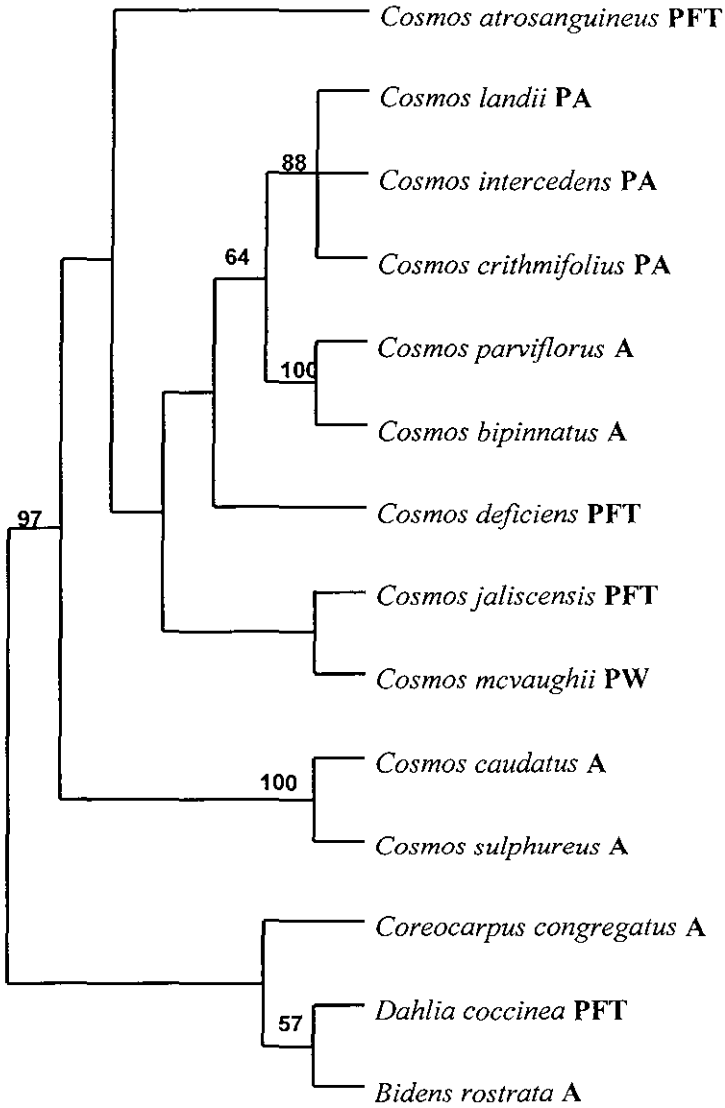

Fig. 1 Uno de los dos árboles más parsimoniosos, de 11 especies de *Cosmos* con tres taxones como grupo externo. Longitud del árbol = 256 pasos, CI = 0.8047, RI = 0.6377, HI = 0.1953. Los valores de remuestreo ≥50% con 1000 repeticiones se muestran por encima de las ramas. PFT= especies perennes con raíz fasciculado-tuberoso, PA= especies perennes con raíz axomorfa, PW= especie perenne y acuática y A= especies anuales.

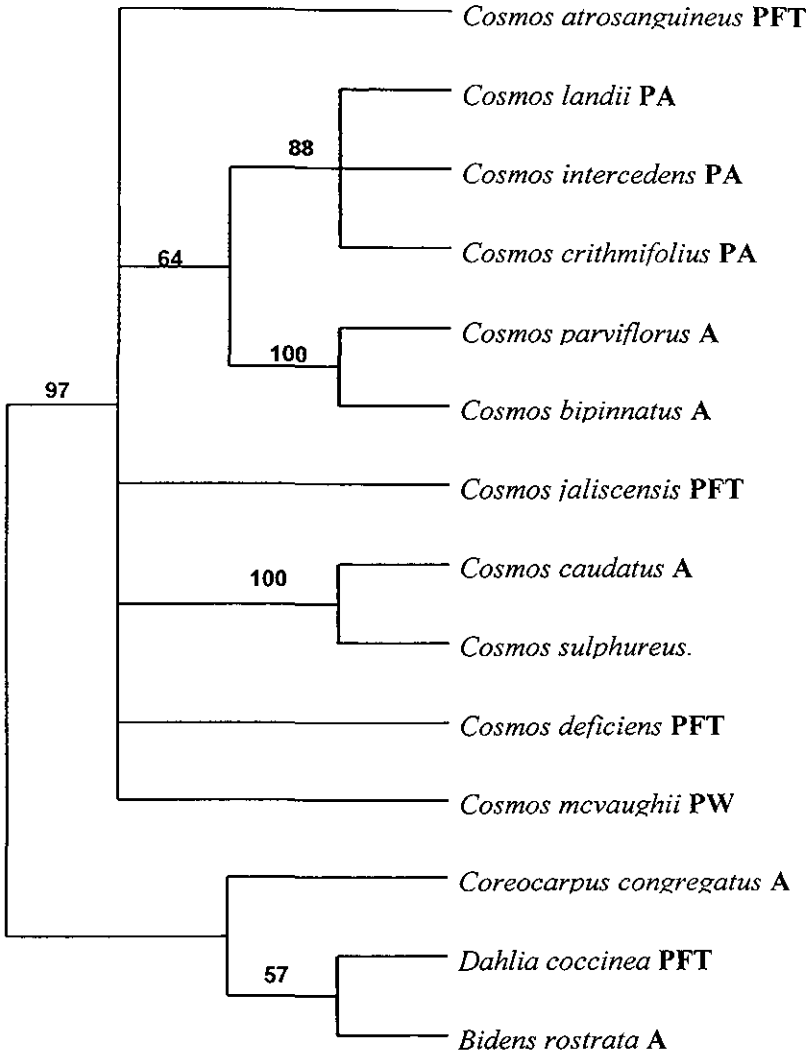

Fig. 2 Árbol de consenso estricto de dos árboles más parsimoniosos, de 11 especies de *Cosmos* con 3 grupos externos. Longitud del árbol = 143 pasos, CI = 0.8047, RI = 0.6377, HI = 0.1953. Los valores de remuestreo ≥50% con 1000 repeticiones se muestran por encima de las ramas. PFT= especies perennes con raíz fasciculado-tuberoso, PA= especies perennes con raíz axomorfa, PW= especie perenne y acuática y A= especies anuales.

La búsqueda exhaustiva utilizando a *Coreocarpus congregatus* como grupo externo recuperó un árbol más parsimonioso con una longitud de 129 pasos (Fig. 3). De los 643 nucleótidos, 538 son constantes y 65 son variables. El número de caracteres cladísticamente informativos fue de 40. El Índice de Consistencia (CI) fue de 0.8527, el Índice de Homoplasia (HI) de 0.1473 y el Índice de Retensión (RI) de 0.7564. Excluyendo a los caracteres no informativos, los valores de CI y HI resultaron en 0.6984 y 0.3016, respectivamente.

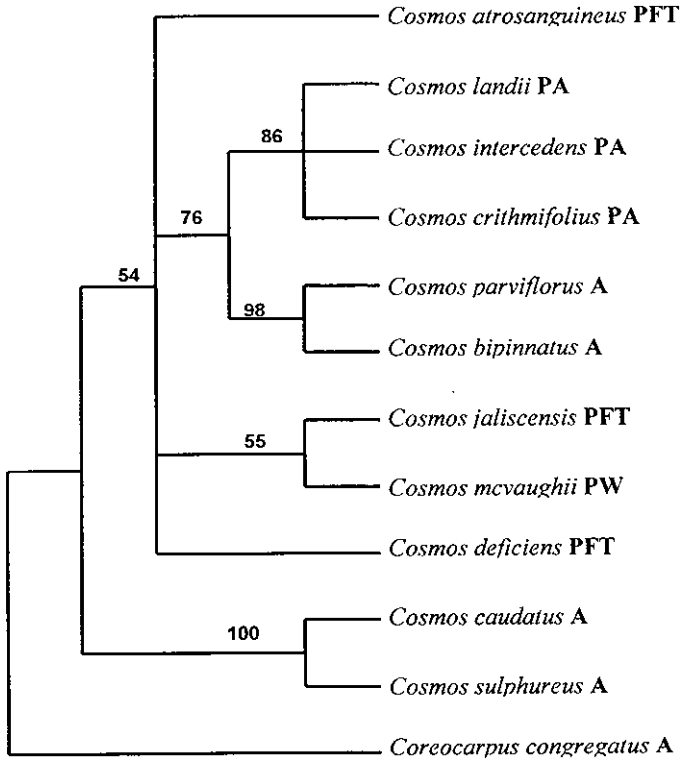

Fig.3 Árbol más parsimonioso de 11 especies de *Cosmos* más *Coreocarpus congregatus* como grupo externo. Longitud del árbol = 129 pasos, CI = 0.8527, RI = 0.7564, HI = 0.1473. Los valores de remuestreo ≥50% con 1000 repeticiones se muestran por encima de las ramas. PFT= especies perennes con raíz fasciculado-tuberoso, PA= especies perennes con raíz axomorfa, PW= especie perenne y acuática y A= especies anuales.

La búsqueda exhaustiva, utilizando a *Bidens rostrata* como grupo externo, recuperó seis árboles más parsimoniosos con una longitud de 143 pasos, uno de ellos se muestra en la figura 4. De los 643 nucleótidos, 523 son constantes y 82 son variables. El número de caracteres cladísticamente informativos fue de 38. El CI fue de 0.8951, el HI de 0.1049 y el RI de 0.7917 y al excluir los caracteres no informativos, los valores de CI y HI fueron de 0.7541 y 0.2459, respectivamente. El árbol de consenso estricto se muestra en la figura 5.

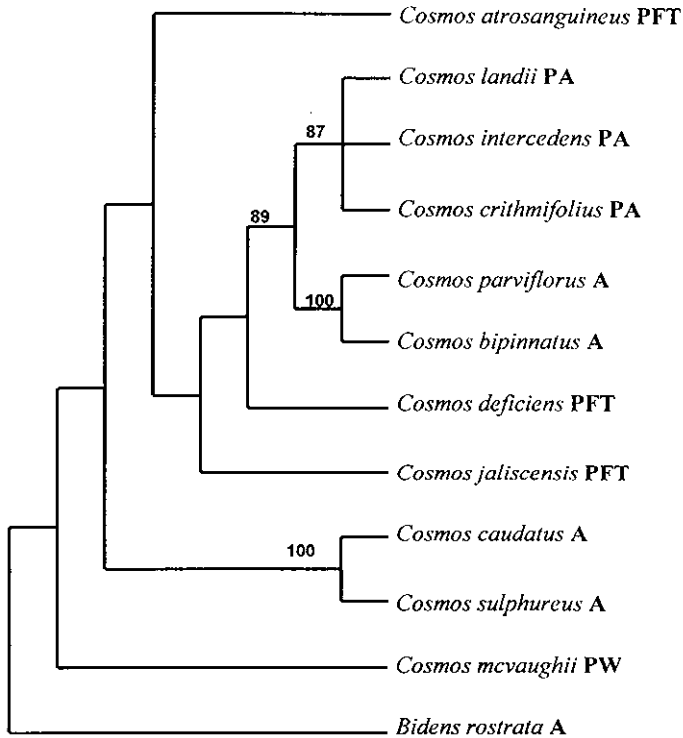

Fig 4 Uno de los seis árboles más parsimoniosos, de 11 especies de *Cosmos* más *Bidens rostrata* como grupo externo. La longitud del árbol = 143 pasos. CI = 0.8951, RI = 0.7917, HI = 0.1049. Los valores de remuestreo ≥50% con 1000 repeticiones se muestran por encima de las ramas. PFT= especies perennes con raíz fasciculado-tuberoso, PA= especies perennes con raíz axomorfa, PW= especie perenne y acuática y A= especies anuales.

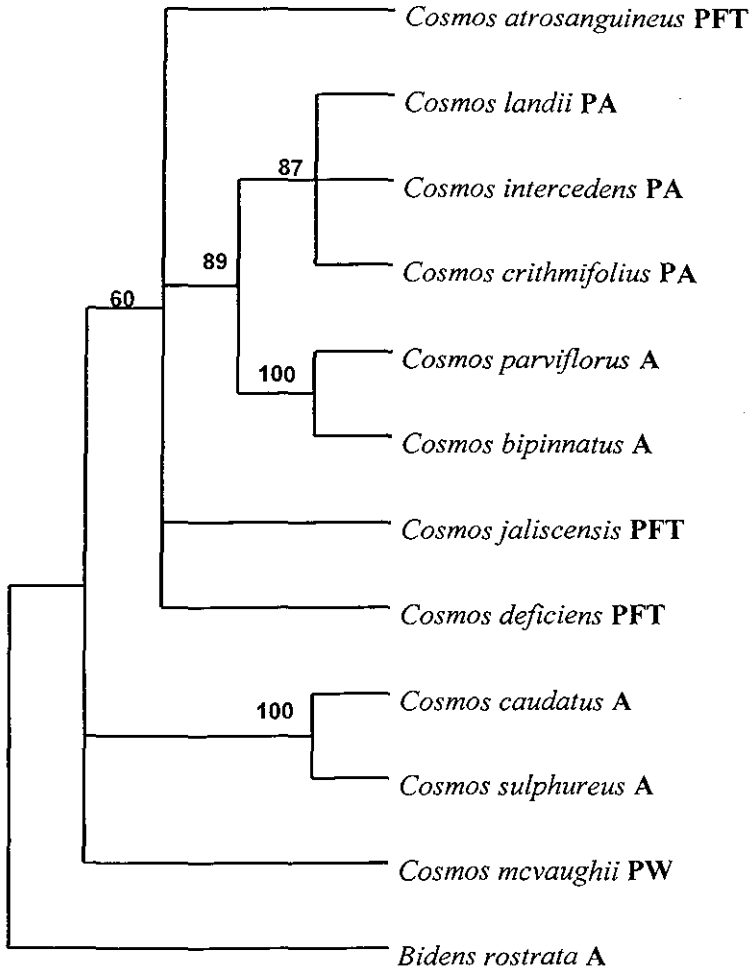

Fig. 5 Consenso estricto de seis árboles más parsimoniosos de 11 especies de *Cosmos* más *Bidens rostrata* como grupo externo. Longitud del árbol = 143 pasos, CI = 0.8951, RI = 0.7917, HI = 0.1049. Los valores de remuestreo ≥50% con 1000 repeticiones se muestran por encima de las ramas. PFT= especies perennes con raíz fasciculado-tuberoso, PA= especies perennes con raíz axomorfa, PW= especie perenne y acuática y A= especies anuales.

La búsqueda exhaustiva utilizando sólo a *Dahlia coccinea* como grupo externo, recuperó tres árboles más parsimoniosos con una longitud de 153 pasos; uno de ellos se muestra en la figura 6. De los 643 nucleótidos, 517 son constantes y 85 son variables. El número de caracteres cladísticamente informativos fue de 41. El CI fue de 0.8693, el HI de 0.1307 y el RI de 0.7500. El CI y el HI excluyendo a los caracteres no informativos fue de 0.6970 y de 0.3030, respectivamente. El árbol de consenso estricto se muestra en la figura 7.

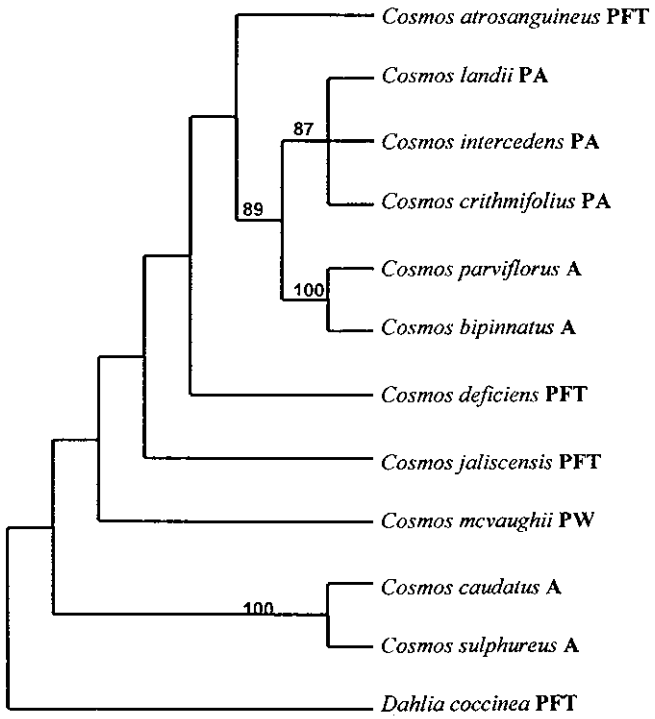

Fig. 6 Uno de los tres árboles más parsimoniosos de 11 especies de *Cosmos* más *Dahlia coccinea* como grupo externo. Longitud del árbol = 153 pasos. CI = 0.8693, RI = 0.7500, HI = 0.1307. Los valores de remuestreo ≥50% con 1000 repeticiones se muestran por encima de las ramas. PFT= especies perennes con raíz fasciculado-tuberoso, PA= especies perennes con raíz axomorfa, PW= especie perenne y acuática y A= especies anuales.

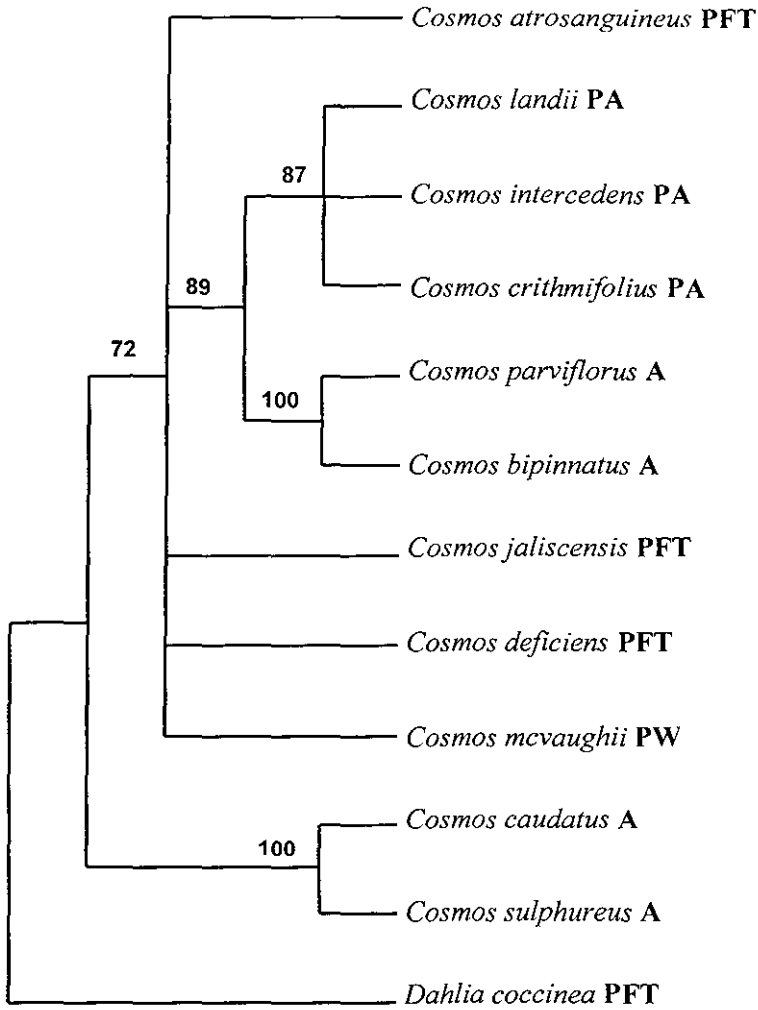

Fig. 7 Consenso estricto de tres árboles más parsimoniosos de 11 especies de *Cosmos* más *Dahlia coccinea* como grupo externo. La longitud del árbol = 153 pasos. CI = 0.8693, RI = 0.7500, HI = 0.1307. Los valores de remuestreo ≥50% con 1000 repeticiones se muestran por encima de las ramas. PFT= especies perennes con raíz fasciculado-tuberoso, PA= especies perennes con raíz axomorfa, PW= especie perenne y acuática y A= especies anuales.

IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Este análisis mostró que la región de los ITS es variable en *Cosmos*. Por lo tanto, es de utilidad para establecer sus relaciones filogenéticas. Las topologías de los árboles recuperados por los diferentes análisis son similares pero los valores de CI, HI y RI cambian.

Los resultados muestran que *Coreocarpus congregatus* es el mejor grupo externo para el análisis filogenético de once especies de *Cosmos*. Al utilizar en el análisis a este taxón se generó un solo árbol más parsimonioso, es decir, *Coreocarpus congregatus* comparte más caracteres con el género *Cosmos* que cuando se analiza a *Dahlia coccinea* y a *Bidens rostrata* por separado. El análisis generó valores altos de CI, HI y RI, y además recupera un árbol con el menor número de pasos (129). En otras palabras, tiene más apoyo estadístico. En lo sucesivo, la discusión se basará en el cladograma generado por este análisis. Habría que decir que *Dahlia coccinea* y *Coreocarpus congregatus* fueron incluidos en el análisis de Mort *et al.* (2008), en contraste, *Bidens rostrata* no fue considerado.

Cuando *Bidens rostrata* fue utilizado como grupo externo, el análisis recuperó seis árboles más parsimoniosos. Los índices de consistencia, homoplasia y retensión tuvieron los valores más altos, pero la longitud de los árboles fue mayor (146 pasos). En resumen, *Coreocarpus congregatus* representa la mejor opción como grupo externo del análisis.

Los resultados no muestran un patrón de evolución de los hábitos de crecimiento en *Cosmos*. Las especies anuales no forman un grupo monofilético como tampoco lo hacen las especies perennes con raíz fasciculado-tuberosa. La única excepción son las especies perennes con raíz axomorfa (*C. landii*, *C. crithmifolius* y *C. intercedens*), que

en todos los cladogramas siempre están formando un grupo monofilético, con un valor de remuestreo por encima del 85%. Otro grupo monofilético, que se aparece en todos los árboles, es el que forman *C. parviflorus y C. bippinatus*, con un apoyo estadístico del 99%. De forma similar, *C. caudatus* y *C. sulphureus* forman otro clado apoyado por el 100%.

En un estudio similar, Kim *et al.* (1999) analizaron la evolución de los hábitos de crecimiento en *Bidens* y *Coreopsis* utilizando los ITS. Los autores discutieron la transición entre formas anuales y perennes, concluyendo que la forma leñosa es ancestral. En contraste, nuestro estudio sugiere que las formas anuales en *Cosmos* (*C. caudatus* y *C. sulphureus*), constituyen la característica ancestral. Más aún cuando se analiza el resto del cladrograma (Fig. 3) se observa una reversión (*C. parviflorus* y *C. bipinnatus*) al hábito de crecimiento anual. Sin embargo, estas observaciones se hacen con cautela en vista del número de especies incluidas en el análisis. Este trabajo constituye el primer paso de un estudio sistemático más comprensivo de *Cosmos*. En un futuro, el trabajo comprenderá el establecimiento de relaciones filogenéticas, tomando en cuenta a todo el género *Cosmos*. Además, se hará el análisis con secuencias de ETS y el espacio intergénico *trn*H-*psb*A del ADN del cloroplasto (cpDNA).

X. BIBLIOGRAFÍA

Bailey, L. H. 1949. Manual of cultivated plants. MacMillan Publishing Co., Inc., New York. p. 999

Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82: 247-277.

Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue. 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) PF 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). Molecular Systematics and Evolution 10: 449-463.

Bogler, D. J. y B. B. Simpson. 1996. Phylogeny of Agavaceae based on its rDNA sequence variation. American Journal of Botany 83: 1225-1235.

Bogler, D. J., J. C. Pires y J. Francisco-Ortega. 2006. Phylogeny of Agavaceae based on *ndh*F, *rbc*L, and ITS sequences: implications of molecular data for classification. Aliso 22: 313-328.

Bremer, K. 1994. Asteraceae: cladistics and classification. Portland, Oregon. Timber Press. p. 752.

Brickell, C. y F. Sharman. 1986. The vanishing garden: a conservation guide to garden plants. Pp. 76-77. ed. J. Murray. London, Great Britain.

Chase, M. W. y H. H. Hillis. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. Taxon 40: 215-220.

Clarke, H. D., S. R. Downie and D. S. Seigler. 2000. Implications of chloroplast DNA restriction site variation for systematics of Acacia (Fabaceae: Mimosoideae). Systematic Botany 25: 618-63

Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantitites of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogeny: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

González D. 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. Bol. Soc. Bot. México 60:137-157.

Jansen, R. K., H. J. Michaels and J. D. Palmer. 1991. Phylogeny and character evolution in the Asteraceae based on chloroplast DNA restriction site mapping. Systematic Botany 16: 98-115.

Kim, S. C., D. J. Crawford, M. Tadesse, M. Berbee, F. R. Ganders, M. Pirseyedi y E. J. Esselman. 1999. ITS sequences and phylogenetic relationships in *Bidens* and *Coreopsis* (Asteraceae). Systematic Botany 24: 480-493.

Lara-Cabrera, S. I. y D. M. Spooner. 2005. Taxonomy of Mexican diploid wild potatoes (*Solanum* sect. *Petota*): morphological and microsatellite data. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 104: 199-225.

Lara-Cabrera, S. I. y D. M. Spooner. 2004. Taxonomy of North and Central American diploid wild potato (*Solanum* sect. *Petota*) species: AFLP data. Plant Systematics and Evolution 248: 129-142.

Linder, R. C., L. J. Goertzen, B. V. Heuvel, J. Francisco-Ortega y R. K. Jansen. 2000. The complete external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in Asteraceae and closely allied families. Molecular Phylogenetics and Evolution 14: 285-302.

Litt, A. 2006. Origins of floral diversity. Natural History June 34-40.

Maddison, D. R. y W. P. Maddison. 2000. MacClade: analysis of phylogeny and character evolution. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates, Inc.

Magallón, S. y M. J. Sanderson. 2002. Relationships among seed plants according to highly conserved genes: sorting conflicting phylogenetic signals among ancient lineages. American Journal of Botany 89: 1991-2006.

McCarthy , C. 1996-1998. Chromas vs. 1.45 (32 bit). Queensland, Australia.

McVaugh, R. 1984. Flora Novo-Galiciana. A descriptive of the vascular plants of Western Mexico. Compositae 12: 262-281.

Melchert, T. E. 1967. Systematic studies in the Coreopsidinae (Compositae): new *Cosmos* from Mexico. Sida 3(3): 170-176.

Melchert, T. E. 1990. New names and combinations in *Cosmos* (Asteraceae, Coreopsideae). Phytologia 69: 189-199.

Miller, J. T. y R. J. Bayer. 2003. Molecular phylogenetics of *Acacia* subgenera *Acacia* and *Aculeiferum* (Fabaceae: Mimosoidea), based on the chloroplast *matK* coding sequence and flanking *trnK* intron spacer regions. Australian Systematic Botany 16: 27-33.

Mort, M. E., C. P. Randle, R. T. Kimball, M. Tadesse y D. J. Crawford. 2008. Phylogeny of Coreopsideae (Asteraceae) inferred from nuclear and plastid DNA sequences. Taxón 57(1): 109-120.

Patterson, T. B. y T. J. Givnish. 2003. Geographical cohesion, chromosomal evolution, parallel adaptive radiations, and consequent floral adaptations in *Calochortus* (Calochortaceae): evidence from a cpDNA phylogeny. New Phytologist 161: 253-264.

Rodríguez, A. y K. J. Sytsma. 2006. Phylogenetics of the "tiger-flower" group (Tigridieae: Iridaceae): molecular and morphological evidence. Aliso 22: 412-424.

Rodríguez A., M. Harker, A. Quezada y S. Casillas. 2006. Diversidad y potencial ornamental del género *Cosmos* Cav. (Asteraceae) en Jalisco. Pp. 610-619, en Avances en la investigación científica en el CUCBA, ed. S. Carvajal. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco.

Ryding, O. y K. Bremer. 1992. Phylogeny, distribution, and classification of the Coreopsidaeae (Asteraceae). Systematic Botany 17: 649-659.

Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. Acta Botánica Mexicana 14: 3-21.

Saar, D. E., N. O. Polans y P. D. Sorensen. 2003. A phylogenetic analysis of the genus *Dahlia* (Asteraceae) based on Internal and External Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA. Systematic Botany 28: 627-639.

Seigler, D. S., J. E. Ebinger y J. T. Miller. 2006. The genus *Senegalia* (Fabaceae: Mimosoideae) from the new world. Phytologia 88: 38-93.

Sherff, E. E. 1932. Revision of the genus *Cosmos*. Field Museum of Natural History, Botanical Series 8(6): 401-447.

Sherff, E. E. 1964. Some new or otherwise noteworthy Coreopsidinae (Compositae) from Mexico. Brittonia 16: 58-73.

Swofford, D. L. 1998. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, test version 4.0b4a. Sunderland, MA. Sinauer Associates.

Stevens P. F. 1984. Methafors and typology in development of botanical systematics 1690-1960 or the art of putting new wine in old bottles. Taxon 33:169-211

Stevens P. F. 1986. Evolutionary classifications in botany 1960-1985. Journal of the Arnold Arboretum 67: 313-339

Turner, B. L. y G. L. Nesom. 1993. Biogegoraphy, diversity, and endangered or threatened status of the Mexican Asteraceae. Pp. 559-575, en Biological Diversity of Mexico: origins and distribution, eds. T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Turner, B. L. y A. M. Powell. 1977. Heleniae-systematic review. Pp. 699-737, en The Biology and chemistry of the Compositae, eds. V. H. Heywood, J. B. Barbone y B. L. Turner. Academic Press, Inc. New York, NY.

Villaseñor, J. L. 1993. La familia Asteraceae en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 44: 117-124.

Villaseñor, J. L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. Interciencia 28(3): 160-167.

White, T. J., T. Burns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322, en PCR protocols: a guide to methods and applications, eds. M. Innis, D. Galfand, J. Snisky, y T. White. San Diego. Academic Press.

Zomlefer, W. B., W. M. Whitten, N. H. Williams y W. S. Judd. 2006. Infrageneric phylogeny of *Schoenocaulon* (Liliales: Melanthiaceae) with clarification of cryptic

species based on ITS sequence data and geographical distribution. American Journal of Botany 93: 1178-1192.

Anexo 1.

Protocolo de extracción de ADN en plantas (Doyle y Doyle 1987)

1.- Moler el tejido (100-500 mg) con nitrógeno líquido en un mortero (previamente enfriado a -20° C) hasta obtener un polvo fino. Transferir la muestra con una espátula a un tubo de 1.5 ml que contenga 800 µl del buffer de extracción CTAB 2X (previamente calentado a 60°C) y mezclar suavemente.

2.- Incubar la muestra a 60°C por 60 min.

3.- Dejar que los tubos tomen la temperatura ambiente, esto más o menos entre 5 a 7 min.

4.- Añadir 800 µl de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y mezclar por inversión varias veces (se puede añadir la mezcla con la misma punta, tratando de cuidar no tocar el tubo para no contaminarla).

5.- Centrifugar por 20 minutos a 4,500 rpm.

6.- Recuperar el sobrenadante que contiene el ADN y transferirlo a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml.

7.- Agregar 700 µl de isopropanol frío, mezclar por inversión suavemente hasta obtener la hebra de ADN. Nota: se puede pausar el protocolo en este punto y dejar la muestra a -20°C.

8.- Transferir la hebra de ADN a un tubo Eppendorf de 1.5 ml o centrifugar por 1-2 min a 2,500 rpm. Eliminar el sobrenadante.

9.- Añadir 500 µl de buffer de lavado e invertir suavemente. Mantener por 20 min y eliminar el buffer de lavado con la pipeta de 1,000 µl, o centrifugar a baja velocidad (2,500 rpm por 2 min).

10.- Secar con aire por 30 min y resuspender en 200 µl de buffer TE asegurándose de disolver perfectamente el ADN.

11.- Añadir 70 µl de agua HPLC y 130 µl de acetato de amonio 7.5 M (2.5 M), mezclar suavemente.

12.- Añadir 850 µl de etanol a -20°C, mezclar para precipitar el DNA.

13.- Recuperar la hebra o centrifugar por 5 min a 4,500 rpm y eliminar el sobrenadante.

14.- Lavar con 1 ml de etanol al 70%. Centrifugar por 2 min a 2,500 rpm y eliminar el etanol (repetir este paso 2 veces, sólo si la hebra presenta color).

15.- Resuspender el ADN en buffer TE (sin hebra 100-150 µl y con hebra 200 µl). Disolver durante toda la noche a temperatura ambiente. Almacenar el ADN genómico obtenido a -20°C hasta su uso.

Reactivos necesarios para la extracción del ADN mediante el protocolo de Doyle & Doyle (1987).

Buffer CTAB 2X		(100 ml)
2g	CTAB	c.c. final 2%
70 ml	Agua destilada	

Disolver completamente y después añadir:

10 ml	Tris 1M pH 8	c.c. final 100 mM
4 ml	EDTA 0.5M	c.c. final 20 mM
8.18g	NaCl	c.c. final 1.4 M

Ajustar a 100 ml con agua destilada en un matraz aforado. almacenar a t° ambiente.

Importante: Al momento de la extracción añadir 1 g de PVP por cada 100 ml de Buffer CTAB 2X.

Acetato de Amonio 7.5M (100 ml)

57.81 g	Acetato de Amonio	c.c. final 2.5 M
60 ml	Agua	

Ajustar a 100 ml con agua destilada. ALMACENAR 4°C

Anexo 2.

Protocolo para purificación de productos de PCR con columnas de purificación GFX (Amersham) (GE Healthcare)

El volumen máximo de reacción de PCR que puede ser procesado con el siguiente protocolo es de 100 µl.

1.- Poner una columna GFX en un tubo de colecta para cada purificación a realizar.

2.- Añadir 500 µl de buffer de captura a la columna GFX. Importante: tener cuidado de no tocar con la punta la parte del filtro de la columna.

3.- Transferir la solución de DNA (hasta 100 µl) a la columna de GFX.

4.- Mezclar completamente la muestra por pipeteo (arriba y abajo) de 4 a 6 veces.

5.- Centrifugar a 13,000 rpm por 30 seg.

6.- Eliminar el flujo vaciando el tubo colector. Poner la columna de regreso al tubo colector.

7.- Añadir 500 µl de buffer de lavado a la columna. Centrifugar a 13,000 rpm. Por 30 seg. Nota: Si el paquete de reactivos es nuevo hay que preparar el buffer de lavado añadiendo etanol absoluto (ver indicaciones en el vial de buffer de lavado). Una vez preparado el buffer de lavado cerrar muy bien para evitar que el etanol se evapore.

8.- Eliminar el tubo colector y transferir la columna GFX a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

9.- Añadir 25 µl de agua HPLC directamente en la parte de arriba de la matriz de fibra de vidrio en la columna GFX. No eluir en menos de 10 µl.

Nota: si se usan bajos volúmenes de elusión para concentrar las muestras de DNA se reducirá la recuperación.

10.- Incubar la muestra a temperatura ambiente por 1 min.

11.- Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min para recuperar el DNA purificado.

Buffer de Lavado	(100 ml)
76 ml	Etanol Absoluto
133 µl	Acetato de Amonio 7.5 M

Ajustar a 100 ml con agua destilada. ALMACENAR –20°C.

Anexo 3

Protocolo para la purificación de la reacción de secuenciación

1.- Resuspender la resina de la columna por vortex.

2.- Aflojar la tapa un poco y desprender la parte que esta debajo de la columna.

3.- Poner la columna en un tubo de 1.5 ml (sin tapa).

4.- Centrifugar la columna en un tubo a 3,200 rpm durante 1 min.

5.- Sacar la parte de abajo de la columna con un papel absorbente (Kimwipes) y poner la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml.

6.- Aplicar 20 µl de la reacción de secuenciación en la resina de la columna, con mucho cuidado de no tocar la resina con la punta.

7.- Centrifugar nuevamente a 3200 rpm por 1 min.

8.- Quitar la columna del tubo y añadir 18 µl de formamida a la muestra purificada.

BIBLIOTECA CUCBA