

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL
ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA PARA
PINUS OOCAPA

LÓPEZ LUIS JACQUELINE GUADALUPE
2162031381

ASESORES
DRA. MARIELA HADA FUENTES PONCE
34017



DR. MIGUEL ÁNGEL VALLEJO REYNA
Cedula. 10408093



Lugar de realización
Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Centro de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de
Ecosistemas Forestales. (CENID-COMEF)
Avenida Progreso No. 5, Col. Barrio de Santa Catarina, Alcaldía Coyoacán. C.P.
04010, CDMX
Fecha de inicio y terminación
Del 01 de Agosto 2019 al 01 de Febrero de 2020

INDICE

Resumen	2
Introducción	3
Marco Teórico	4
Descripción botánica de la especie <i>Pinus Oocarpa</i>	4
Importancia económica	4
Diversidad genética	5
Marcadores moleculares	6
Objetivos	7
Objetivos específicos	7
Método	7
Actividades realizadas	9
Objetivos y metas alcanzadas	9
Resultados y Discusión	9
Conclusión	16
Recomendaciones	16
Bibliografía	17

Resumen

Las poblaciones cuentan con diversidad genética que permiten a los individuos resistir y tener habilidad para sobrevivir y perpetuar la especie en distintas circunstancias. Por ello, este trabajo se enfocó en el estudio genético de *Pinus oocarpa*, la especie más importante del ramo forestal del estado de Michoacán debido a su importancia económica para la producción de resina. La finalidad de estandarizar un protocolo de extracción de DNA para *Pinus oocarpa* no hay los estudios basados en la utilización de técnicas modernas para poder evaluar la diversidad genética y proponer un manejo forestal de dicha especie.

Se utilizaron técnicas de espectrofotometría, electroforesis en geles de agarosa y marcadores moleculares para identificar el rendimiento, peso y pureza del ADN de *P. oocarpa*. Se logró extraer concentraciones de DNA de 258 a 811.6 ng μl^{-1} . Esto superó el objetivo que consistía de extraer al menos 100 ng μl^{-1} , con un rango de la relación de absorbancia 280/260 de entre 1.86 y 1.92 lo que indica que hay una buena calidad y pureza de DNA.

Para evaluar la existencia de micro satélites en esta especie, se probaron 3 pares de oligonucleótidos propuestos por Steinitz *et al* 2011 y Guevara *et al.*, 2005, de los cuales solamente el par ITPH4516_R y ITPH4516_F amplificó para *Pinus oocarpa*, esto se comprobó por medio de PCR y electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Entre las perspectivas de este trabajo se encuentra el uso del protocolo de extracción de DNA establecido para probar distintos oligonucleótidos que amplifiquen microsatélites en esta especie y aplicarlo para un análisis diversidad genética

Introducción

Pinus oocarpa es una de las especies más comunes de pino en el mundo, representa a uno de los linajes más antiguos de un grupo de pinos conocidos como de estróbilo cerrado, es utilizado para la obtención de leña, madera para construcción, resina y productos como la trementina y aguarrás, la magnitud de su distribución geográfica y lugares en donde se desarrolla, permite tener un buen estado de conservación de sus poblaciones en las diferentes locaciones (Hernández, 2004).

La demanda de resina de pino en México como materia prima para diferentes productos ha crecido en los últimos años, y rebasa las posibilidades de abasto que ofrecen los principales estados productores, entre los que destacan Michoacán, Jalisco, México y Oaxaca (SEMARNAT, 2009).

La resina de pino se considera como un producto forestal no maderable (PFNM), las especies de mayor producción resinera en México son: *Pinus oocarpa*, *P. leiophylla*, *P. lawsonii* (SEMARNAT, 2009). Estas materias primas son llevadas a diferentes estados e incluso a otros países para transformarlas químicamente y convertirlas en innumerables productos de mayor valor agregado (Munro, 2007).

Mantener la diversidad genética es de suma importancia porque es la materia prima para la evolución. Entre mayor diversidad genética presenta una especie en particular, tendrá mayores posibilidades de resistir a cambios climáticos, estrés hídrico, sequías, plagas o enfermedades habilitando sus procesos evolutivos. A su vez, se relaciona con la capacidad adaptativa que constituye una condición obligatoria para la restauración, conservación y dinámica evolutiva (CONABIO, 2006).

Para evaluar la diversidad genética en el DNA, existen diversas técnicas que consisten en la identificación y análisis de marcadores moleculares, estos pueden

detectar polimorfismos dentro del DNA nuclear, de cloroplasto o mitocondrial. Dentro de los más utilizados se encuentran los microsátélites (Sunnucks, 2000 y 2001).

La ventaja de utilizar los microsátélites es que tienen una gran variabilidad, así como la capacidad de hacer en forma semiautomática su análisis y clasificación (Echt *et al.* 1996), optimizando la identificación de poblaciones y dar seguimiento al flujo de polen o la dispersión de la semilla (Slatkin, 1995).

Marco Teórico

Descripción botánica de la especie *Pinus Oocarpa*

Pinus oocarpa es nativo de México y Centroamérica. Se distribuye desde los 28° N al noreste de México en Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas, Durango, Nayarit, Jalisco, Michoacán, hasta el sureste en Guerrero, Oaxaca, Chiapas y en el centro de la República en México, Morelos, Puebla, Hidalgo y Tlaxcala (ITTO, 2019). Es un árbol que puede llegar a medir entre 30 y 35 m de altura. El fuste alcanza entre 40 y 70 cm de diámetro a la altura del pecho. La copa es amplia, se reduce y se vuelve cónica a medida que posee competencia, las ramas se insertan en el tronco en ángulo de 45° (Veliz *et al.*, 2007).

Alcanza su mejor desarrollo de 600 a 1800 msnm. Se encuentra en ambientes con temperaturas de 13 a 23°C y precipitaciones de 650-2000 mm, con una época de seca de 5-6 meses. La maduración de los conos ocurre 26 meses después de la polinización (ITTO, 2019).

La corteza de los árboles maduros es gruesa y de color grisáceo a café, existen 5 hojas o agujas por fascículo, se caracterizan por ser gruesas en comparación a otras especies del género *Pinus*. Los estróbilos, se diferencian de las demás especies por tener forma de una manzana achatada cuando están abiertos, de escamas duras, se abren únicamente en el ápice; de tamaño variable, entre 5 a 8 cm de largo y 4 a 7.5 cm de ancho. Es característico de la especie encontrar

estróbilos de dos o tres años anteriores aún sujetos a las ramas (Veliz *et al.*, 2007).

Importancia económica

El volumen de la producción forestal en México se subdivide en dos grandes categorías: maderable y no maderable; el primero está constituido por materiales leñosos. El segundo está compuesto por: semillas, resinas, fibras, gomas, ceras, rizomas, hojas, pencas, tallos, tierra de monte (SEMARNAT, 2006).

La producción de resina de pino en México se concentra principalmente en cuatro estados: Michoacán, Jalisco, Oaxaca y Estado de México. El estado de Michoacán aporta el 90% de la producción de resina en el país y *Pinus oocarpa* Schiede ex Schtdl, es una de sus especies más importantes por la alta producción y calidad (SEMARNAT, 2013).

La resina de pino se obtiene de la exudación de donde se obtiene la trementina, aguarrás y la brea o colofonia, son productos utilizados en la industria de pinturas y perfumería, principalmente. Sus derivados son brea y aguarrás; posteriormente mediante procesos de industrialización, se obtienen principalmente ceras, pinturas, gomas, jabones, adhesivos y productos farmacéuticos; barnices, tintas, breas modificadas para la fabricación de llantas (Cunningham, 2009).

Diversidad genética

La diversidad genética es la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de determinada especie o grupo de especies (Brack, 2000). A grandes rasgos, entre mayor diversidad genética presenta una especie en particular, tendrá mayores posibilidades de sobrevivir a diversos factores como cambios en el ambiente, pérdida de vigor, fecundidad, viabilidad, plagas y enfermedades adaptándose continuamente a los cambios en su ambiente (FAO, 2007).

Las especies forestales han evolucionado bajo diferentes períodos de cambio, su variabilidad genética proporciona la capacidad de adaptarse a nuevas condiciones

climáticas. Los árboles tienen diferentes mecanismos para la propagación natural de las semillas, lo que les permite poblar lugares distantes (Boshier, 2011).

La diversidad genética puede actuar a nivel cromosómico, donde se dan paulatinamente recombinaciones o mutaciones que pueden dar o no mejores características adaptativas a las siguientes generaciones (Brack, 2000) o bien dentro las secuencias de ADN. Dentro de una población, las diferencias genéticas a nivel individual pueden incrementar las probabilidades de sobrevivencia y reproducción enfrentando la aparición de plagas, enfermedades, condiciones adversas de suelo y clima. De manera conjunta disminuyen potencialmente los efectos deletéreos del apareamiento de individuos genéticamente relacionados, evitando así la depresión endogámica (CONAFOR, 2007).

Marcadores moleculares

Un marcador genético o marcador molecular es un segmento de ADN situado en un lugar específico del genoma (locus) y cuya herencia genética se puede rastrear. Puede ser un gen o cualquier otra porción de genoma con o sin función conocida (Valadez *et al.*, 2000).

Se usan para marcar el comportamiento de un gen o la herencia de una característica particular, además pueden utilizarse para el mapeo genético, para encontrar la posición e identidad de un gen desconocido (Valadez *et al.*, 2000).

Existe un conjunto de técnicas que utilizan marcadores de DNA para evaluar la diversidad genética, los más utilizados son los microsatélites. Estos marcadores se usan para detectar polimorfismos del ADN nuclear (Sunnucks, 2001).

Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en locus únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997).

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1983). La caracterización e identificación tradicional de variedades se

ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos (Rallo *et al.*, 2002).

Los primeros se usan para estimar la variación morfológica que se presenta en una población. Existen algunas limitaciones que se basan en las características morfológicas o expresadas en el individuo (fenotipo), las cuales son influidas por el ambiente en que se desarrollan, además sólo se pueden identificar y medir en individuos completos o adultos (Solís y Andrade, 2005).

Para los marcadores moleculares los individuos pueden evaluarse desde sus primeros estadios de desarrollo, y se pueden aplicar usando a todo el individuo o sólo parte de él. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN (Solís y Andrade, 2005).

Los microsatélites, también llamados Simple Sequence Repeats (SSR) son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos se caracterizan principalmente por tener un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, tienen una confiabilidad del 100%, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Goldstein *et al.*, 1999).

La detección del polimorfismo SSR se realiza mediante amplificación por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida o geles de secuenciación. Las variaciones detectadas por los SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Lowe *et al.*, 2004).

Objetivos

Generar un protocolo de extracción de DNA para *Pinus oocarpa* para la posterior amplificación de microsatélites.

Objetivos específicos

- ✓ Extraer ADN de calidad a una concentración mínima de 100 ng ul⁻¹ y un rango de la relación de absorbancia 280/260 de entre 1.8 y 2.0.
- ✓ Obtención de 3 parejas de oligonucleótidos que amplifiquen microsatélites de *Pinus oocarpa*.

Método

Esta investigación se realizó en el laboratorio de germoplasma y biotecnología forestal del Centro de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales (Cenid Comef) del Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Para desarrollar este protocolo se utilizaron dos especies de pino, el primero fue *Pino ayacahuite* Ehrenb. Ex Schltld, las muestras de acículas para esta especie se recolectaron dentro de las instalaciones del Instituto, esto con el fin de tener una referencia positiva donde demuestra que el protocolo de extracción de DNA por el método S de CTAB descrito por Telfer es eficaz para el género *Pinus*. El segundo fue *Pinus oocarpa*, las muestras de acículas de esta especie fueron proporcionadas por investigadores del Cenid Comef del INIFAP, estas se recolectaron de árboles del estado de Michoacán. La extracción de DNA se realizó por el método S con CTAB descrito por Telfer y colaboradores (2013). Este método consta de distintas fases, desde la desinfección de la muestra, homogeneización del tejido y lisis celular, separación de lípidos y proteínas, lavados, precipitación del DNA, resuspensión, cuantificación, electroforesis y almacenamiento. Se utilizó un buffer de extracción CTAB el cual contiene NaCl al 2%, EDTA 20 mM, 0.1M Tris-HCl, 1%, polyvinylpyrrolidone, 0.2% β-mercaptoethanol y 0.5 mL de proteinasa K. La enzima utilizada fue RNase A en una concentración de 100 µg/mL, más NaCl 5M, 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico e isopropanol (Telfer *et al.*, 2013).

Una vez obtenido el DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la concentración del DNA y posteriormente pasar a la amplificación.

La amplificación de los microsatélites fue a través de la técnica de PCR (utilizando iniciadores que se alinean en las regiones específicas de la secuencia repetida, por medio del kit Go Taq® Flexi DNA Polymerase (QIAGEN) en conjunto con los oligonucleótidos B4F08_F, pEST2669_R, ITPH4516 y 18S (Citas).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador de acuerdo al siguiente programa: Precaentado 95°C por 10 minutos, desnaturalización 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, alineación 55°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 50 segundos; la extensión final se realizó a 72 °C por 10 min.

Posteriormente se visualizaron las amplificaciones de los SSR (Simple Sequence Repeat) por medio de un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, comparando su tamaño con escalas de pares de bases (pb) ya establecidas.

Actividades realizadas

- Revisión bibliográfica sobre métodos de extracción de DNA.
- Extracción de DNA por el método S con CTAB en *Pinus ayacahuite*.
- Extracción de DNA por el método S con CTAB en *Pinus oocarpa*.
- Modificaciones al protocolo original de extracción de DNA:
 - 1.- Cambio de concentración de β -mercaptoethanol.
 - 2.- Cambio de concentraciones de polyvinylpyrrolidone (pvp).
 - 3.- Tiempo de centrifugación.
 - 4.- Aumento de concentración de NaCl.
 - 5.- Electroforesis en gel de agarosa al 1%.
 - 6.- Prueba de oligonucleótidos en muestras de DNA.
 - 7.- Amplificación de microsatélites en Polymerase Chain Reaction (PCR).
 - 8.- Electroforesis en gel de agarosa al 3%.

Objetivos y metas alcanzadas

Se estableció un protocolo optimizado para purificar DNA a partir de acículas de *Pinus oocarpa* en concentraciones altas y pureza adecuada, de manera eficaz.

Las concentraciones mínimas obtenidas superan el objetivo delimitado de 100 ng μ^{-1} , pues los datos recabados oscilan entre 258.3 ± 811.6 ng μ^{-1} .(Cuadro 3)

De las 3 parejas de oligonucleótidos analizados solamente la pareja de ITPH4516_R y ITPH4516_F amplifica para *Pinus oocarpa*, mientras que B4F08_F, B4F08_R y pEST2669_R y pEST2669_F no se obtiene un patrón de bandas de calidad.

Resultados y Discusión

Como referencia se realizó el protocolo con *Pinus ayacahuite*, se obtuvieron buenas concentraciones que va desde los 261 hasta los 519 ng/ μ l (Cuadro 1) lo que concuerda con las concentraciones establecidas por Telfer *et al* 2013 que reporta concentraciones promedio de 234 ± 211 siendo este método óptimo para obtener DNA en el género *Pinus*. El rendimiento de ADN depende del tipo y cantidad de material utilizado, se empleó 300 mg de acículas de *P. oocarpa* lo que indica la cantidad de DNA existente por mg de hoja.

Cuadro 1.- Concentraciones de DNA por el método S con CTAB en *Pinus ayacahuite*.

Muestra [ng/ μ l]	A260	A280	260/280	230/260	Rendimiento
351.7	7.034	3.743	1.88	1.81	35.1 mg
261.3	5.227	2.746	1.9	1.49	26.1 mg
262	5.239	2.779	1.89	1.71	26 mg
259.1	5.189	2.743	1.89	1.5	25.8 mg
340	6.803	3.524	1.93	1.71	34 mg
519	10.38	5.695	1.82	1.76	51.9 mg

Al utilizar el mismo protocolo propuesto por Telfer *et al* 2013 en *Pinus oocarpa* no se obtuvieron concentraciones óptimas de DNA (Cuadro 2), por lo que se requirieron hacer modificaciones a los parámetros establecidos.

Cuadro 2.- Concentraciones de DNA de *Pinus oocarpa* por el método S con CTAB sin modificaciones.

Muestra [ng/μl]	A260	A280	260/280	230/260	Rendimiento
40	0.201	0.484	1.65	0.67	4 mg
57.5	1.151	0.626	1.84	1.27	5.7 mg
25.7	0.515	0.279	1.84	1.59	2.5 mg
27.1	0.543	0.302	1.8	1.35	2.7 mg
57.2	1.144	0.615	1.86	1.97	5.7 mg
69.6	1.393	0.727	1.92	2.11	6.9 mg
34.8	0.696	0.212	3.27	0.78	3.4 mg

Debido a la cantidad y tipos de metabolitos secundarios que contiene el género *Pinus* como son polifenoles, terpenos, flavonoides y polisacáridos, los cuáles varían entre especies, no es posible reproducir el mismo método de extracción universal (Khanuja, *et al*, 1999), ya que estas sustancias interfieren y son fuente de contaminación para la obtención de DNA de calidad pura.

Por ende, las modificaciones pertinentes que se han realizado forman parte de la concentración de β-mercaptoethanol, que se modificó de 0.2 % (2 μg/L) a 2% (20 μg/L), esta sustancia actúa como reductor de enlaces, desnaturalizando proteínas y estructuras de GC (Velasco, 2005).

El Polyvinylpyrrolidone (pvp) inicial era del 1%, se aumentó hasta el 8% porque las muestras obtenidas tenían un color grisáceo o sucio, este reactivo inhibe la actividad de las polifenoloxidasas, además de tener mejor efectividad añadiéndolo por separado, fuera del buffer de extracción.

Se tenía problemas en la primera centrifugación ya que el tiempo no era suficiente para la separación de tejido, membranas y proteínas de los ácidos nucleicos, porque se observaban partículas resuspendidas, el tiempo inicial era de 5 min x

18000 rpm y se adicionaron 10 minutos más, para un total 15 min x 18000 rpm obteniendo una mejor separación de fases.

En el segundo lavado de cloroformo: alcohol isoamílico (v/v) se agrega 0.3 volúmenes al 3M de NaCl, aumentando su capacidad iónica, neutralizando la carga negativa de los fosfatos lo que permite una mejor precipitación del DNA.

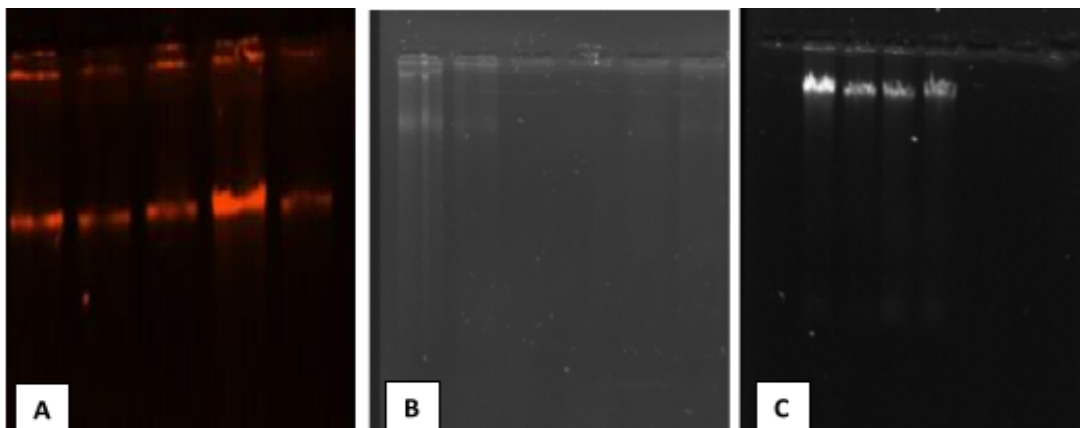
Por último, la resuspensión final se realiza en 30 µg de agua DePC, debido a que al usar 50 µg originales la muestra se diluía obteniendo lecturas bajas.

Posteriormente a dichas modificaciones se obtuvieron concentraciones más altas (Cuadro 3) en comparación al protocolo original, mejorando significativamente.

Cuadro 3.- Concentraciones de DNA de *Pinus oocarpa* por el método S con CTAB modificado.

Muestra [ng/µl]	A260	A280	260/280	230/260	Rendimiento
811.6	16.232	9.187	1.77	1.07	81.1 mg
468.3	9.366	5.284	1.77	1.34	46.8 mg
258.3	5.162	2.288	1.79	2.15	25.8 mg
590.4	11.807	6.100	1.94	1.78	59 mg
546.2	10.294	5.846	2.01	1.97	54.6 mg

Después de la obtención de DNA por cada especie de pino y protocolo utilizado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para posteriormente ser visualizada con ayuda de un transiluminador (Figura 1).



Los microsatélites son una secuencia repetida de un fragmento de DNA que está presente dentro de la información genética de una especie, para su amplificación se requiere de oligonucleótidos o iniciadores que ayudan a amplificar el fragmento que contenga un microsatélite. Steinitz *et al.*, (2012) y Guevara *et al.*, (2005) probaron algunos iniciadores (Cuadro 4) en especies de pino que produjeron productos amplificados del tamaño esperado sin embargo, al probar tres de ellos en *P. oocarpa* solamente uno de ellos amplificó.

Cuadro 4.- Secuencia de oligonucleótidos iniciadores utilizados para el análisis de microsatélites en *Pinus*. Steinitz *et al.*, (2012), Guevara *et al.*, (2005).

Nombre	Secuencia del primer
B4G08	Forward 5' GCACTTTGATTGTTGTCATCG 3'
	Reverse 5' GTGGCTGATGTCCAAATGC 3'
pEST2669	Forward 5' ATTGCTTCTGAAAGGGCATC 3'
	Reverse 5' TCCCTTGGCACCATGTTAAT 3'

ITPH4516

Forward 5' TGATGCAAACAAGTTCCATG 3'

Reverse 5' AGCACTCGCTAAACTATGAAGG 3'

Las muestras de DNA analizadas por PCR con los marcadores B4G08 (Figura 2) y pEST2669 (Figura 3) no se obtuvo amplificación alguna, así mismo presentan un patrón de bandas difuso y de escasa calidad para su interpretación.

Sin embargo, el marcador ITPH4616 (Figura 4) generó bandas nítidas lo que muestra que hay fragmentos de DNA que coinciden con la secuencia del oligonucleótido, indicando la presencia de un microsatélite que se encuentra en el genoma del *P. oocarpa* por ende ha amplificado. Tiene un peso ~ 220 bp tomando como referencia la escala del marcador de bajo peso molecular NEB N3233S (Figura 5).

Para el corrimiento de las muestras de DNA en electroforesis con geles de agarosa al 3% después de la PCR, se cargaron los pozos con un control negativo utilizando agua esterilizada, este ayuda a cerciorarnos que nuestros reactivos están libres de contaminación por lo cual no debe generar ninguna banda, el control positivo es el marcador molecular NEB N3233S, son fragmentos de DNA de tamaño conocido que sirven de referencia para calcular el tamaño aproximado del DNA que se está analizando, también se utilizó un gen de referencia, el 18S RNA ribosomal, este provee un patrón indicativo con el cual comparar los resultados de las muestras, porque todo organismo tiene este gen ya que forma parte del núcleo funcional ribosomal y su amplificación es segura porque está secuenciando.

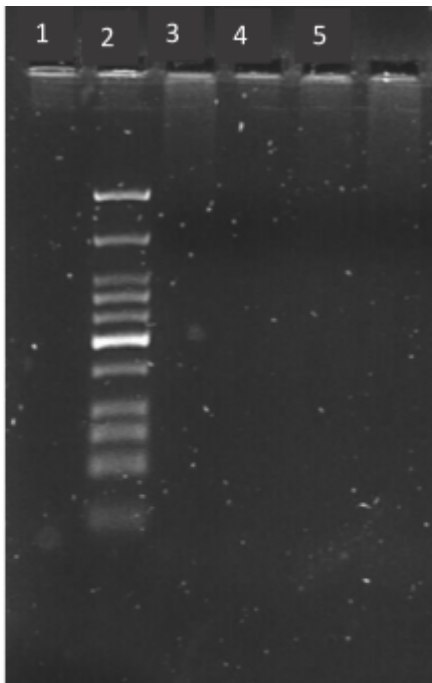


Figura 2.- Amplificación por PCR del microsatélite pEST2669. 1.- Control negativo; 2.- Marcador de bajo peso molecular NEB N3233S; 3-5 Oligonucleótido pEST2669.

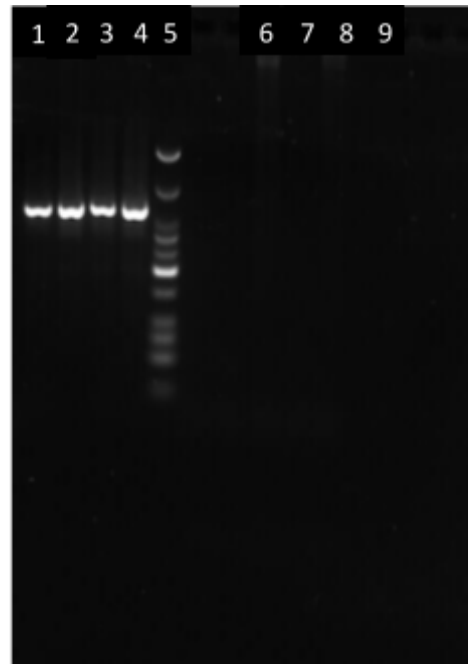


Figura 3.- Amplificación del microsatélite B4F08. 1-4- Gen 18S; 5.- Marcador de bajo peso molecular NEB N3233S; 6-9 oligonucleótido B4F08.

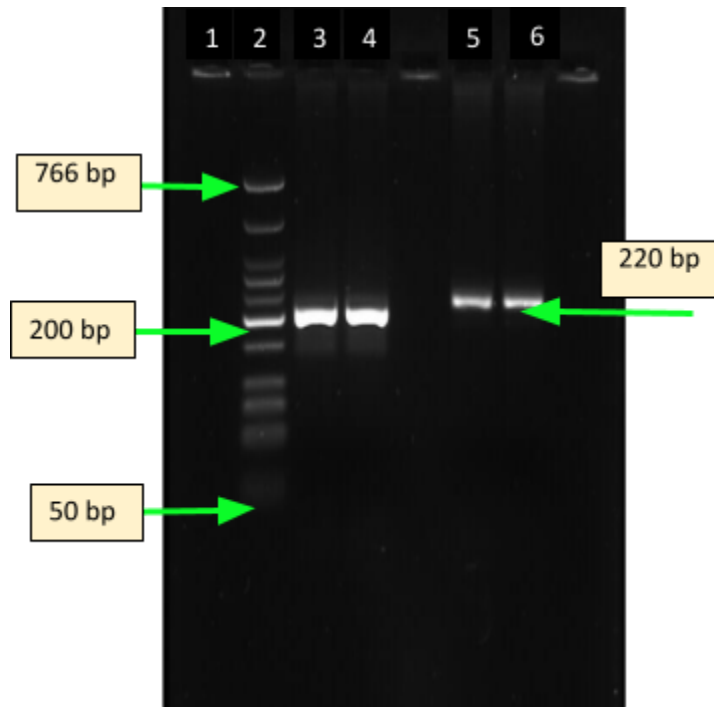


Figura 4.- Amplificación del microsatélite ITPH4616 1.- Control negativo; 2.- Marcador de bajo peso molecular NEB N3233S; 3-4 Gen 18S; 5-6 oligonucleótido ITPH4616.

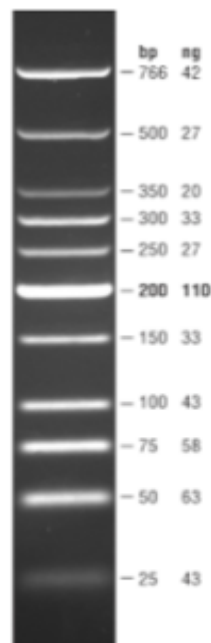


Figura 5.- Marcador de bajo peso molecular NEB N3233S

Conclusión

Las modificaciones realizadas al método S con CTAB propuesto por Telfer *et al.*, (2013) para la extracción de DNA en *P. oocarpa* permitieron optimizar un protocolo para obtener DNA de calidad y concentraciones elevadas.

Se obtuvieron concentraciones mayores a las esperadas de 258.3 ± 811.6 ng ul⁻¹.

De los 3 oligonucleótidos probados solamente el par ITPH4516_R y ITPH4516_F amplifican para la especie *Pinus oocarpa* estudiada.

Recomendaciones

Es de suma importancia tener protocolos adecuados o específicos de aislamiento y purificación de DNA, así como métodos eficientes para la amplificación mediante marcadores, esto dependerá de las condiciones de trabajo, de la especie y de sus componentes, porque cada una tiene en mayor o menor proporción polifenoles, proteínas, polisacáridos entre otros, que son factores que influyen en la extracción de material genético y no es posible utilizar en un protocolo en general.

Bibliografía

Boshier D. 2011. Bioversity International. Estrategias de conservación de especies.

Notas de introducción para el profesorado: Manual de Formación en Recursos Genéticos Forestales. Roma, Italia.

Brack, A. 2000. Biodiversidad y biocomercio en el Perú. Informe para CONAM y UNTAD.

Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2007. Análisis de diversidad genética en especies forestales. Recuperado de

https://www.conafor.gob.mx/innovacion_forestal/?p=2572 el 15 de Agosto de 2019.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2006. Diversidad genética. México D.F.

Cunningham, A. 2009. Estudio de mercado de los productos resinosos: Colofonia y aguarrás; y el potencial de la miera Ibérica de la Comarca del Izana para diferentes usos industriales. Mancomunidad de Bienes y Servicios del Rio Izana. 66 P.

Echt, C., May-Marquardt, P., Hseih, M., Zahorchak, R. 1996. Characterisation of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39: 1102-1108.

Food and Agriculture Organization, (FAO) 2007. Bioversity International. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. Vol. 1: visión general, conceptos y algunos métodos sistemáticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.

Goldstein, B., Schlotterer, C., 1999. *Microsatellites evolution and applications*. Oxford University Press, New York, 352pp.

Guevara, M. A., Chagné, D., Almeida, M. H., Byrne, M., Collada, C., Favre, J. M., Harvengt, L., Jeandroz, S., Orazio, C., Plomion, C., Ramboer, A., Rocheta, M., Sebastiani, F., Soto, A., Vendramin, G. G., & Cervera, M. T. 2005. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in *Pinus pinaster* Ait. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 57–59. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00830.x>

Hernández, M., 2004. Experiencias en recolección y acondicionamiento de frutos y semillas de 25 especies forestales con demanda en el programa de incentivos forestales. Guatemala, Guatemala. USAC. 66 p.

International Tropical Timber Organization (ITTO) 2019. Pino ocote (*Pinus oocarpa*) Recuperado de <http://www.tropicaltimber.info/es/specie/pino-ocote-pinus-oocarpa/#lower-content> el 25 de Agosto de 2019

Khanuja, S., Shasany, A., Darokar, M., Kumar, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 17(1):1-7.

Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. 2004. *Ecological genetics; design, analysis, and application*. Blackwell Science. Victoria, Australia. 326 p.

Marcadores Moleculares. Bioinformática CeCaLCULA. Universidad de los Andes Venezuela. Recuperado de <http://bioinformatica.cecalc.ula.ve/> el 05 de Septiembre de 2019.

Munro, R. A. 2007. Una industria con aroma a bosques: La resina de pino en Michoacán. Recuperado de [http:// www.revistacecti.com/?p=754](http://www.revistacecti.com/?p=754) el 22 de Agosto de 2019.

Rallo, P., Belaj, A., De la rosa, R., Trujillo, I. 2002. Marcadores moleculares. Córdoba, España. Recuperado de http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm el 05 de Septiembre 2019.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) 2006. Anuario Estadístico de la Producción Forestal. 224 p. México, D.F.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) 2009. Anuario Estadístico de la Producción Forestal. 222 p. México, D.F.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) 2013. *Anuario Estadístico de la Producción Forestal*. México, D. F.

Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60:73-76

Slatkin, M,. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.

Solis, L., Andrade, A,. 2005. La ciencia y el hombre. *Revista de divulgación Científica*. Vol. XVIII. No. 1.

Steinitz, O., Robledo, J., Nathan, R,. 2012. Effects of forest plantations on the genetic composition of conspecific native aleppo pine populations. *Molecular Ecology*. 21, 300-313

Sunnucks. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(5), 199–203.

Sunnucks, P. 2001. Eficcient genetic markers for population biology. *Tree*.

Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8.

Telfer, E., Graham, N., Stanbra, L., Manley, T., Wilcox, P., 2013. Extraction of high purity genomic DNA from pine for use in a high throughput Genotyping Platform. *New Zealand Journal of Forestry Science* 43:3.

Valadez, E., Günter, K., 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Universidad Autónoma de Chapingo. México.

Velasco, R., 2005. Marcadores Moleculares y la Extracción de ADN. *Biología en el sector Agropecuario y Agroindustrial* 3:15.

<http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/viewFile/19/12>

Véliz P., Barrios, A., Dávila P., 2007. Actualización Taxonómica de la Flora de Guatemala, Capítulo 1. Pinophyta (coníferas). Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Dirección General de Investigación -DIGI, Universidad de San Carlos de Guatemala. 131 p.