

Aplicación de marcadores de amplificación de AFLP en la diversidad genética en coníferas de Cuitzeo, Michoacán

Application of AFLP in genetic diversity in conifers of Cuitzeo, Michoacan

Por Gabriela Orozco-Gutiérrez¹, Ramón del Val-Díaz¹, H. Jesús Muñoz-Flores¹, Salvador González-Palomares¹
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Uruapan, Michoacán

Dirección electrónica del autor de correspondencia: chava1142@yahoo.com.mx

Recibido: Junio 9 de 2014
Aceptado: Noviembre 10 de 2014

RESUMEN: Los pinos de Michoacán son importantes porque son una fuente de madera que se utiliza en la construcción, muebles, paneles y pisos. Se utilizan también para la fabricación de sustancias tales como trementina, colofonia, celulosa y papel. Los pinos proporcionan la forestación en áreas donde los árboles caducifolios no pueden crecer debido a la extrema elevación y la latitud. Proveen hábitat y fuente de alimento para la fauna en estas áreas y purifican el aire. El objetivo de este proyecto fue contribuir en la huella genética representativa de la diversidad biológica de los pinos de Cuitzeo, Michoacán, México, mediante la aplicación de marcadores moleculares. Una vez recolectadas las muestras vegetales de pinos se realizó la extracción y cuantificación de ADN, amplificación de AFLP y la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR). Con las relaciones genéticas entre las especies se determinó que *Pinus chiapensis*, y *Pinus ayacahuite* son especies distintas.

PALABRAS CLAVES: Diversidad biológica, *Pinus* spp, AFLP.

ABSTRACT: Pines of Michoacan are important because they are a source of wood used in construction, furniture, paneling and floors. Are also used for the production of substances such as turpentine, rosin, cellulose and paper. The pines provide afforestation in areas where deciduous trees can not grow because of the extreme elevation and latitude. They provide habitat and food source for wildlife in these areas and purify the air. The objective was to contribute to the genetic fingerprint of the representative biodiversity pines of Cuitzeo, Michoacan, Mexico by the application of molecular markers. Once plant pine samples collected extraction and quantification of DNA and AFLP amplification chain reaction was performed. With the genetic relationships between species was determined that *Pinus chiapensis* and *Pinus ayacahuite* are different species.

KEY WORDS: Biodiversity, pines, AFLP.

Introducción

México se considera un segundo centro de diversificación del género *Pinus*. Se reconoce para México 46 especies de pinos, 3 subespecies y 22 variedades (Sánchez, 2008). El género *Pinus* representa un grupo muy heterogéneo de entidades biológicas de gran relevancia evolutiva y con diversos usos. Los pinos son el principal proveedor de madera para construcción, se emplea en la manufactura de pulpa papel y resinas (Rushforth, 1987). A pesar de la gran importancia evolutiva y de uso forestal de las especies de pinos representadas en el estado de Michoacán, en la actualidad existe escaso conocimiento sobre el estatus poblacional tanto ecológico como genético - moleculares (Rushforth, 1987; Newton *et al.*, 2002). Por lo que el presente trabajo pretende contribuir en la huella genética representativa de la diversidad biológica de los pinos mediante la aplicación de marcadores. Los marcadores de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) se han empleado con éxito en varios géneros de plantas incluyendo pinos para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas, entre las poblaciones dentro de cada especie de pinos se han detectado con éxito utilizando una estrategia común (Harris, 1999).

Materiales y métodos

El trabajo de laboratorio de este proyecto se realizó en el Campo Experimental de Uruapan, Michoacán, México, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias durante septiembre del 2012 a septiembre de 2014. El muestreo y recolección de material vegetativo se llevó a cabo en la cuenca del lago de Cuitzeo, en Cuitzeo, Michoacán. El tipo de clima corresponde a C(E)(m)(w) semi-frío húmedo. La temperatura media anual es de 9.02, la mínima de 2.0 y máxima de 16.26°C. El tipo de suelo es andosol y el tipo de vegetación es del pino-oyamel.

En el periodo de septiembre del 2012 a septiembre del 2013 se realizó el trabajo de investigación descrito a continuación:

-Identificación del material vegetativo. Se llevó a cabo la identificación taxonómica de las especies de pinos, usando claves botánicas (Newton *et al.*, 2002), consultas con personal especializado y revisión de literatura específica (Rushforth, 1987; Newton *et al.*, 2002; Sánchez, 2008).

-Equipo y herramientas para el escalado en árboles selectos. Debido a que el material vegetativo donde se realizó la recolección fue procedente de

árboles selectos (considerando árboles sanos y en etapa adulta), el equipo más recomendable para escalar estos árboles fueron las bicicletas (Figura 1). Se usó equipo de medición: Brújula, altímetro, clinómetro, GPS, cinta métrica, cinta diamétrica, binoculares y taladro de Pressler.



Figura 1. Escalado para recolectar muestras

-Recolección de material vegetativo. La recolección del material vegetativo se realizó de la porción media de la copa del árbol, y de la zona externa de la copa de los árboles selectos, debiendo ser ramillas de brotes terminales. La muestra del material vegetativo se recolectó con una intensidad de muestreo del 32% de cada especie y se aplicó un muestreo aleatorio simple.

-Etiquetado, transporte y almacenamiento del material vegetativo. El material vegetativo recolectado se identificó mediante una etiqueta donde se le marcó con el código asignado al árbol selecto, al cual pertenecen, asimismo se registraron: especie, localidad, fecha de colecta, hora, y nombre del recolector. Una vez que las muestras fueron trasladadas al laboratorio, una de ellas se almacenó en un ultracongelador a 70°C, como resguardo de material, y la otra muestra se almacenó en un refrigerador a 4°C, a partir de la cual se extrajo ADN.

-Extracción y cuantificación de ADN. Se trabajó con una campana de flujo laminar y se sometió el material a radiación ultravioleta de 5 a 10 minutos para degradar cualquier ácido nucleico. La extracción se realizó con CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Se usó un mortero el tejido con nitrógeno

líquido hasta triturar completamente, se recuperó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y 250 µl de buffer CTAB y 750 µl de STE, se centrifugó a 10,000 rpm durante 8 minutos. Se agregaron estos dos buffers, tanto como se necesitaron para que no quedara muy espeso, siempre guardando la proporción 1:3 de CTAB y STE. A la mezcla anterior se agregó un detergente aniónico como el CTAB, que solubiliza proteínas, tejidos y membranas. Se resuspendieron con 600 µl de buffer CTAB-2x con β-mercaptoetanol. Se homogeneizó en el vortex, se centrifugó a 10,000 rpm durante 8 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se repitió dos veces, hasta que el sobrenadante estuvo transparente y no tan viscoso. Se agregó 20 µl de RNAasa (5ug/ml) y homogeneizó suavemente. Después se incubó a 37°C por 20 minutos. Enseguida se agregó a cada tubo 20 µl de proteinasa K (20mg/ml) durante 20 minutos. Se incubó a 65°C durante 20 minutos, se agregó a cada tubo 600 µl de cloroformo-octanol 2:1, se agitó hasta homogeneizar y centrifugó a 9,000 rpm durante 14 minutos. Se trasladó el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 µl) y precipitó el ADN con 2/3 partes del volumen final (600 µl aproximadamente) de isopropanol frío. Se dejó precipitando 2 horas a -20°C. Se separó el ADN de la fase acuosa, para lo cual se precipitó el mismo, usando isopropanol. Se centrifugó a 9,000 rpm durante 5 minutos. Se tiró el sobrenadante y limpió el pellet con 1 ml de etanol al 70% frío y centrifugó a 7,000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante hasta eliminar el etanol y resuspendió el pellet con 100 µl de H₂O ultra pura. Se cargó la muestra de ADN, se agregó colorante naranja G para correr la muestra a 60 V en una cámara de electroforesis. Para cuantificar la cantidad de ADN se usó un espectrómetro de onda corta. La lectura se hizo en longitudes de onda de 260-280 nm, para permitir el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra.

-Protocolo de amplificación por AFLP. La reacción en cadena de la polimerasa o PCR para obtener fragmentos para AFLP se aplicó el proceso bioquímico in vitro. Desnaturalización (92-98°C, 30 a 90 seg), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.

-Digestión enzimática y ligación de adaptadores. La digestión se llevó a cabo por medio de las enzimas EcoRI y la enzima MseI, se realizaron mezcla de reacciones. Seguido de la incubación e inactivación enzimática. Para observar el ADN digerido se realizaron análisis de electroforesis en gel de agarosa.

-Preamplificación de ADN. La preamplificación se llevó a cabo en tubos de 200 µL: mezcla de ligación diluida, iniciador de preamplificación AFLP® 20 µL, buffer de reacción, se adicionaron dos gotas de

aceite mineral. Para la preamplificación de ADN se utilizó un termociclador.

-Amplificación selectiva. Para la amplificación selectiva se realizó una mezcla de trabajo de la Taq ADN polimerasa, el volumen total de esta mezcla fue de 200 μ l, para la mezcla de amplificación se realizó la preparación de la siguiente forma: 2 μ l ADN diluido de la preamplificación, además de la cantidad adecuada de iniciador MseI conteniendo dNTPs, iniciador EcoRI marcado IRDye 700, iniciador EcoRI marcado IRDye 800, mezcla de la Taq ADN polimerasa, para tener un volumen total de reacción. Para las reacciones de PCR se utilizó el termociclador Techne Genius en las condiciones de amplificación. Para observar la amplificación selectiva se realizó una electroforesis en un secuenciador modelo 4200 de LI-COR, en gel para AFLP®, LI-COR de 25 cm KBPLUS (6.5%), se mezclaron lo mejor posible, los cristales que forman las placas se lavaron con jabón Micro-90, se limpiaron con etanol y sanitas, se terminó la limpieza con papel Kimberly-Clark profesional y se montaron en las barras, se vertió la mezcla en las placas y se dejó solidificar con el peine dientes de tiburón de 48 cavidades. En cada cavidad se cargó 1 μ L, que se utilizó como marcador de ADN compuesto. Se probaron 24 iniciadores, 8 del tipo MseI y 16 del tipo Eco RI. Todos los análisis de laboratorio descritos anteriormente se realizaron con 9 repeticiones (n=9).

Resultados y discusión

México es un importante centro de diversidad para el género *Pinus*, cuenta con 42 especies y 18 taxones infraespecíficos. De una especie vegetal total de 22,000 en México, el 52% son endémicas, y muchas especies endémicas se encuentran en peligro de extinción. Los principales pinos estudiados en esta investigación en Cuitzeo, Michoacán, corresponden a *Pinus pseudostrobus*, *Pinus devoniana*, *Pinus michoacana*. Los datos obtenidos por marcadores moleculares tipo AFLP han sido muy útiles para inferir las relaciones genéticas entre especies estrechamente relacionadas de pino y taxones infraespecíficos (Newton *et al.*, 2002).

El número de marcadores RAPD analizados en muestras combinadas fue efectivo para diferenciar las especies de *P. chiapensis*, *P. ayacahuite*, *P. strobiformis*, así como los mencionados anteriormente

Los 139 marcadores polimórficos obtenidos en este estudio representaron más del 50% del número total de bandas amplificadas. Durante la extracción se tuvieron complicaciones de contaminación por posibles polifenoles y también por la acción de Dnasas. Sin embargo, se logró optimizar un protocolo de extracción con buena estabilidad y repetitividad.

Se sugiere que varias especies de pinos conviven en la cuenca del lago de Cuitzeo, en Cuitzeo, Michoacán. En este caso los factores abióticos y la introgresión podrían explicar en parte la variación observada en el tamaño del cono (Sánchez, 2008). En este trabajo se cumplió el objetivo de contribuir en la huella genética representativa de la diversidad biológica de en la cuenca del lago de Cuitzeo, en Cuitzeo, Michoacán, México, mediante la aplicación de marcadores moleculares. La presente investigación es relevante porque proporciona bases científicas y transferencia de tecnología para futuras investigaciones de pinos en otros municipios del estado de Michoacán e incluso en otros lugares.

Conclusiones

Con las relaciones genéticas entre las especies se determinó que *Pinus chiapensis*, y *Pinus ayacahuite* son especies distintas. Con la identificación de los iniciadores para la amplificación selectiva se pudo realizar el análisis de diversidad genética, el procesamiento de información y su análisis.

Referencias

- Harris, S.A. (1999). RAPDs in systematics: a useful methodology? In: Hollingsworth, P.M., Batesman, R.M., and Gornall, R.J. (Eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor and Francis, London, pp. 211–228.
- Newton, A. C., Alnutt, T. R., Dvorak, W. S., Del Castillo, R. F., and Ennos, R. A. (2002). *Patterns of genetic variation in Pinus chiapensis, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers*. *Heredity*. 89, 191–198.
- Rushforth, K.D. (1987). *Conifers*. Christopher Helm, London.
- Sánchez, G. (2008). *Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México*. *Madera y Bosques*. 12(1):107-120.