



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas
Departamento de Química

**Evaluación de la diversidad genética de Laurel Silvestre
(*Litsea glaucenscens* Kunth) en el Estado de
Aguascalientes**

Tesis que presenta
Biol. Claudia Montserrat Valle Rodríguez

Para obtener el grado de
Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal

Tutor de tesis
Dr. Francisco Morales Domínguez

Comité Tutorial
Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch
M. en C. Laura Ma. de Lourdes de la Rosa Carrillo

Aguascalientes, Ags., Mayo de 2009



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Presente:

Por este medio le comunico que los miembros del comité tutorial de la alumna Claudia Montserrat Valle Rodríguez, estudiante de la Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, hemos revisado la versión final del escrito de la tesis "Evaluación de la diversidad genética de Laurel silvestre (*Litsea glaucescens*) en el estado de Aguascalientes". Que defenderá en el examen de titulación correspondiente.

Por lo anterior se considera que puede proceder a realizar los trámites administrativos correspondientes y se le asigne la fecha de examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags. A 26 de Mayo de 2009

M. en C. Ma. De Lourdes de la Rosa Carrillo
Miembro del comité Tutorial

Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch
Miembro del comité Tutorial

Dr. Francisco Morales Domínguez
Tutor responsable



DEDICATORIA

Con mucho cariño para mi mamá Ofelia por apoyarme siempre e incondicionalmente en todos mis emprendimientos y por su ejemplo de perseverancia, valentía y dedicación.

Para mi esposo Aarón Bernal, por su apoyo, confianza, comprensión y su ejemplo de trabajo y esfuerzo que me dieron los ánimos y las ganas de terminar este proyecto. Te amo, Aarón.

A todos mis familiares y amigos que me apoyaron y que siempre creyeron en mí, especialmente a mi amiga y hermana Mosselle Valencia, por aguantar mi mal genio cuando no me salían las cosas en el laboratorio.

A mi tía Elia y a mi tío Gustavo, por su ejemplo de superación y estudio constante.

A mis primitos Jackie, Mosselle, Ana Paula, Danny, Alexis, Alan, Madaí, Carlitos y Huguito para que lo tomen como un ejemplo de lucha y superación en sus vidas.

A la memoria de mis papás Elvira y Jesús

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez, por su amistad y por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo y por la motivación para una constante superación desde que lo conocí en el pregrado.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe – Bach por sus enseñanzas, su ejemplo de dedicación y por ser una fuente de inspiración desde el inicio de mi carrera y por todo su apoyo en la realización de este proyecto.

A la maestra Laura Ma. de Lourdes de la Rosa Carrillo por su ayuda y comprensión tanto en lo académico como en lo personal. Y por enseñarme a realizar la técnica molecular de este proyecto.

Al Dr. Pedro Castillo Lara y al M. en C. Andrés Rogelio Jiménez del Instituto de investigación de zonas desérticas de la U.A.S.L.P., por ayudarme a localizar las poblaciones de laurel en la Sierra Álvarez, San Luis Potosí.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirme ser parte de su historia y obtener mi grado de pregrado y posgrado dentro de sus aulas.

Al CONACYT por la beca otorgada.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que me aguantaron durante dos años y quienes me hicieron la vida más amena en tiempos de adversidad, especialmente a Blanchis, Margarita, Paulina y Cesar, quienes me enseñaron que la tolerancia, el esfuerzo y la constancia son los mejores aliados cuando nos tardamos en encontrar el camino hacia el éxito.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE GENERAL	IV
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aporte de la investigación	1
2. MARCO TEORICO	2
2.1 Generalidades	2
2.2 Descripción taxonómica	3
2.3 Descripción Botánica	4
2.4 Distribución del Laurel Silvestre en México	7
2.5 Usos tradicionales del laurel y factores de riesgo que amenazan a la especie	8
2.6 Alternativas para evitar la extinción de la especie	9
2.7 Variación Genética de plantas	11
2.8 MARCADORES Y TAXONOMÍA	13
2.8.1 Marcadores morfológicos	13
2.8.2 Marcadores bioquímicos: isoenzimas	14
2.8.3 Marcadores moleculares	15
2.8.4 Polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP)	18
2.8.5 Uso de Marcadores Moleculares en plantas	20
2.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	22
2.10 AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DEL ADN POLIMÓRFICO (RAPD)	23
2.11 APLICACIONES DEL MÉTODO RAPD	27
2.11.1 Detección de híbridos	27

2.11.2 Diversidad genética intra e interpoblacional (intraespecífica) _____	28
2.11.3 Diversidad genética interespecífica_____	30
2.11.4 Polimorfismo en plantas regeneradas por embriogénesis somática_____	32
2.11.5 Elaboración de mapas genéticos _____	34
2.11.6 Algunos trabajos importantes con RAPD _____	35
3. HIPOTESIS _____	39
4. JUSTIFICACIÓN _____	40
5. OBJETIVOS _____	42
5.1 Objetivo general_____	42
5.2 Objetivos específicos _____	42
6. METODOLOGÍA _____	45
6.1 Ubicación de las poblaciones y colecta de material biológico_____	45
6.2 Extracción de ADN_____	49
6.3 Implementación de la técnica RAPD_____	52
6.4 Tipo de análisis e interpretación de la información obtenida _____	54
7. RESULTADOS _____	54
7.1 Ubicación de las poblaciones y colecta de material biológico_____	54
7.2 Implementación de la técnica para la extracción del ADN_____	63
7.3 Implementación de la técnica RAPD_____	65
7.4 Análisis estadístico de la información_____	75
8. DISCUSIONES _____	77
9. CONCLUSIONES _____	85
10. BIBLIOGRAFIA _____	86
APENDICE DE ABREVIATURAS _____	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Temperaturas de alineamiento para la amplificación de <i>Litsea glaucescens</i> K. _____	50
Tabla 2. Mezcla de reacción para amplificación de fragmentos RAPDS en <i>Litsea glaucescens</i> Kunth _____	50
Tabla 3. Secuencia del juego de oligonucleótidos OPA de la marca Operon Technologies* _____	52
Tabla 4. Localización de poblaciones la laurel en Sierra Fría, San José de Gracia, Aguascalientes _____	56
Tabla 5. Localización de poblaciones la laurel en Sierra del Laurel, Calvillo, Ags. _____	57
Tabla 6. Localización de poblaciones la laurel en Estación Biológica UAA, San José de Gracia, Aguascalientes. ____	58
Tabla 7. Localización de poblaciones la laurel en Sierra de Álvarez, San Luis Potosí _____	59
Tabla 8. Temperaturas de amplificación del Laurel Silvestre utilizando oligonucleótidos de la serie OP-A. _____	65
Tabla 9. Lista de iniciadores y sus secuencias, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por región geográfica y polimorfismo total _____	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Litsea glaucescens</i> K. _____	6
Figura 2. Mapa de área natural protegida de la Sierra Fría __	56
Figura 3. Puntos de colecta en Sierra de Laurel _____	57
Figura 4. Mapa que representa las coordenadas aproximadas de l estación biológica de UAA _____	58
Figura 5. Mapa que muestra el área natural protegida Sierra de Álvarez, S.L.P. _____	59
Figura 6. Planta de laurel en Sierra Fría _____	60
Figura 7. Planta de laurel en Sierra de Laurel _____	60
Figura 8. Árbol de laurel en área protegida Sierra de Laurel _	61
Figura 9. Arbusto de laurel en área protegida Sierra de Álvarez, San Luis Potosí _____	62
Figura 10. Electroforesis de ADN de laurel en gel de agarosa 0.8% _____	64
Figura 11. Análisis preliminar RAPDS para laurel _____	66
Figura 12. Análisis RAPDS de laurel, de la serie de 20 oligos OPA _____	67
Figura 13. Análisis RAPDS de laurel, utilizando el oligo OPA-3 _____	69
Figura 14. Análisis RAPDS de laurel, utilizando el oligo OPA-3 _____	70
Figura 15. Análisis RAPDS de laurel, utilizando el oligo OPA-10 _____	71
Figura. 16. Análisis RAPDS de laurel, utilizando el oligos OPA-10 y OPA 3 para muestras provenientes de la estación Biológica _____	72
Figura 17. Análisis RAPDS de laurel, utilizando los oligos OPA-03, OPA-13 y OPA-18 para muestras provenientes de material <i>in vitro</i> _____	73

Figura 18. Análisis RAPDS de laurel, utilizando el oligo
OPA3, OPA13, OPA18, OPA4 y OPA10
para muestras de papaya y Laurel_ _ _ _ _ 74
Figura 19. Dendograma obtenido del análisis estadístico _ _ _ 76



RESUMEN

El Laurel Silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) que se encuentra en el Estado de Aguascalientes; principalmente en la Sierra del Laurel y Sierra Fría, es una de las especies protegidas y se ha catalogado en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2001. Una de las principales causas de extinción es debido a la tala inmoderada para rituales religiosos principalmente en Domingo de Ramos, cuya fecha coincide con la época de floración de la especie lo que le impide la formación de fruto y semilla y por ende su capacidad de reproducción. En el presente trabajo se realizó la ubicación de poblaciones de laurel en Sierra Fría y Sierra de Laurel, encontrando que en las dos regiones la especie se encuentra en un saqueo inmoderado constante, lo que ha traído como resultado que queden pocos individuos con la capacidad de generar semilla, presentándose mayor deforestación en Sierra Fría en la cual se ha reducido el hábitat de laurel a unos pocos kilómetros cuadrados; condiciones similares se encontraron en Sierra de Laurel, con la ventaja de que en ésta área se encontró mas cantidad de laureles. Se realizó una caracterización genética de poblaciones de Laurel Silvestre en el estado de Aguascalientes comparadas con individuos proveniente de San Luis Potosí, utilizando la técnica molecular conocida como amplificación aleatoria de ADN polimórfico ó RAPD, donde se encontró que los dos estados presentan divergencia en cuando a su composición genética y que por lo tanto no sería plausible una reforestación con individuos provenientes de otras regiones, sin embargo, en el presente estudio también se analizó material de laurel establecido *in vitro*, el cual no presto diferencia significativa comparado con los laureles de donde fue colectado, lo cual nos da la pauta para suponer que pudiera ser una herramienta eficaz para una reforestación con dichos individuos en el futuro.

SUMMARY

The wild Laurel (*Litsea glaucescens* Kunth) found in the State of Aguascalientes, mainly in the Sierra del Laurel and Sierra Fría is a protected species and is listed endangered by the NOM-059-SEMARNAT-2001. One of the main causes of extinction due to logging immoderate primarily for religious rituals in Sunday which date coincides with the flowering season of the species which prevents the formation of fruit and seed and therefore their ability to reproduce. In the present study was conducted from the location of populations in Sierra de Laurel and Sierra Fría, finding that in both regions the species is in a constant immoderate looting, which has resulted in few remaining individuals with the ability to generate seed, appearing in more deforestation in the Sierra Fría which has reduced the habitat bay a few square kilometers, similar conditions were found in Laurel Mountains, with the advantage that in this area was much more complacent. We performed a genetic characterization of wild populations of Laurel in the state of Aguascalientes compared with individuals from San Luis Potosi, using the molecular technique known as random amplification of polymorphic DNA or RAPDS, which found that the two states differ in terms their genetic composition and thus would not be a plausible reforestation individuals from other regions, however, this study also reviewed material bay established in vitro, which does not provide significant difference compared with the laurels of which was collected, which gives us to suppose that the pattern could be an effective tool for those individuals with reforestation in the future.

1. INTRODUCCIÓN

APORTE DE LA INVESTIGACIÓN

El Laurel Silvestre (*Litsea glaucescens* K.) que se encuentra en el Estado de Aguascalientes; principalmente en la Sierra del Laurel, es una de las especies protegidas y se ha catalogado en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2001. Una de las principales causas de extinción es debido a la tala inmoderada para rituales religiosos principalmente en Domingo de Ramos, a su uso potencial como planta medicinal, gastronómica y a la destrucción de su hábitat por condiciones naturales como sequías, incendios forestales y plagas. Debido a lo anterior y a las condiciones en que se encuentran las poblaciones silvestres de laurel existe una seria amenaza para los recursos genéticos, por lo que es necesario realizar un estudio y estimación sobre la cantidad de variabilidad genética presente en las poblaciones con la finalidad de poder rescatar un recurso natural de gran importancia en nuestro Estado.

El tipo de datos que normalmente se han utilizado para describir, seleccionar y utilizar los recursos genéticos en plantas comúnmente, se basan en características agronómicas y morfológicas. En lo que respecta al Laurel Silvestre, no se han encontrado datos de caracterización de la diversidad genética de las poblaciones e identificación a nivel molecular. Actualmente, con el desarrollo de la Biología Molecular, principalmente con la técnica de la Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) utilizada para la amplificación de fragmentos de ADN, se han creado poderosas herramientas que pueden utilizarse en la caracterización y evaluación de la diversidad genética.

Como alternativa para evaluar correcta y eficazmente la biodiversidad en las poblaciones de Laurel Silvestre que se encuentran dentro del estado de Aguascalientes, se pretende utilizar las huellas genéticas con muestras de ADN, utilizando la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

La familia *Lauraceae* agrupa alrededor de 2,500 especies en aproximadamente 50 géneros, distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. En México no es una familia particularmente diversa, pero está representada por elementos arbóreos importantes de algunas comunidades vegetales, mismas que son interesantes también desde el punto de vista fitogeográfico y por su diversidad biológica (CONABIO, 1997).

El género *Litsea* comprende alrededor de 400 especies, la mayoría de ellas nativas de Asia. Generalmente son árboles perennes ricos en compuestos aromáticos. En México, el género está representado por el Laurel Silvestre (*Litsea glaucescens*), éste es un árbol o arbusto de 1 a 12 m de alto que habita en bosques de encino o de encino-pino, generalmente en cañadas o a la orilla de arroyos. En el continente americano crece entre los 1,300 y 2,500 msn y se distribuye desde el norte de México hasta Costa Rica. A lo largo del territorio en el que habita recibe diversos nombres, como Aureli, Canelillo, Chico, Ecpatli de Chietla, Laurel chico, Laurelillo, Sufricalla y Zitzuch. Esta especie constituye uno de los productos no maderables más importantes de los bosques de encino o encino-pino de toda la República Mexicana. Lo anterior se debe al aprovechamiento de sus hojas como condimento y a las diversas propiedades medicinales que se le atribuyen (PROESPA, 2007).

2.2 Descripción Taxonómica

Según Rzedowski 1987, la Clasificación taxonómica del Laurel Silvestre es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Subreino: Espermatofita

Phylum: Magnoleophyta

Clase: Magnoleopsida

Orden: Laurales

Familia: *Lauraceae*

Género: *Litsea*

Especie: *Litsea glaucenscens Kunth*



2.3 Descripción Botánica

Litsea glaucescens, es un arbusto o árbol pequeño, dioico, de 1 a 12 m de altura; ramas jóvenes rollizas, de corteza café o glauca, glabras o levemente pubescentes; yemas terminales glabras o rara vez pubescentes; hojas alternas, peciolo de (2)4 a 8(12) mm de largo, glabros o rara vez pubescentes, lámina lanceolada, angosta a ampliamente ovada o (angostamente) elíptica, de (1.5)3.5 a 7(9.5) cm de largo, por (0.6)1.5 a 3(4) cm de ancho, ápice (gradualmente) agudo, algunas veces apiculado, base aguda, obtusa o rara vez cordada, margen algunas veces engrosado, penninervada, venas laterales (4)6 a 8(10), inmersas en el tejido foliar, arqueándose hacia arriba cerca del margen y conectadas por asas, coriácea o algunas veces cartácea; inflorescencias (masculinas y femeninas) axilares, de 0.9 a 1.5 cm de largo, solitarias o agrupadas a lo largo de cortos brotes áfilos, umbeladas, cubiertas en la juventud por dos pares de brácteas decusadas, con brácteas deciduas adicionales entre las flores, pedicelo floral de (0.5)1 a 1.5(2.8) mm de largo, pubescente; flores masculinas de 2.5 a 3 mm de largo, subcampanuladas, amarillentas, tépalos 6 u 8, elípticos a más o menos obovados, aproximadamente iguales, de 2.6 a 3.6 mm de largo, por 1.4 a 2.2 mm de ancho, glabros abaxialmente, los exteriores en ocasiones esparcidamente pubescentes en su parte central, por lo común esparcidamente pubescentes en su parte central adaxialmente, estambres 9 ó 12, todos iguales excepto por la presencia de glándulas en los filamentos del verticilo más interior, de 2.3 a 2.9 mm de largo, con filamentos glabros, anteras glabras, glándulas de 0.5 a 0.9 mm de largo, más o menos elipsoides o de bordes muy

irregulares, estaminodios ausentes, hipanto de 0.2 a 0.4 mm de largo, pubescente por fuera, glabro por dentro, pistilodio de 1 a 1.7 mm de largo; flores femeninas de 1.6 a 2 mm de largo, subcampanuladas, amarillentas, tépalos 6, elípticos, angostamente elípticos u obovados, de 1.8 a 2.5 mm de largo, por 0.7 a 1.5 mm de ancho, glabros abaxialmente, los exteriores en ocasiones esparcidamente pubescentes en su parte central, pubescentes adaxialmente, estaminodios 9, de 1 a 1.4 mm de largo, hipanto de 0.2 a 0.4 mm de largo, ovario y estilo glabros; fruto esférico, de 8 a 10 mm de diámetro, negro en la madurez, asentado en una cúpula pequeña discoide, de cerca de 3 mm de diámetro, tépalos y estambres algunas veces persistentes (pero marcescentes) en el margen de la cúpula. Habitante bastante común de bosques húmedos de encino y de pino, así como de bosques mesófilos de montaña y de algunos matorrales. Generalmente crece a una altura de 800-2500 msnm (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

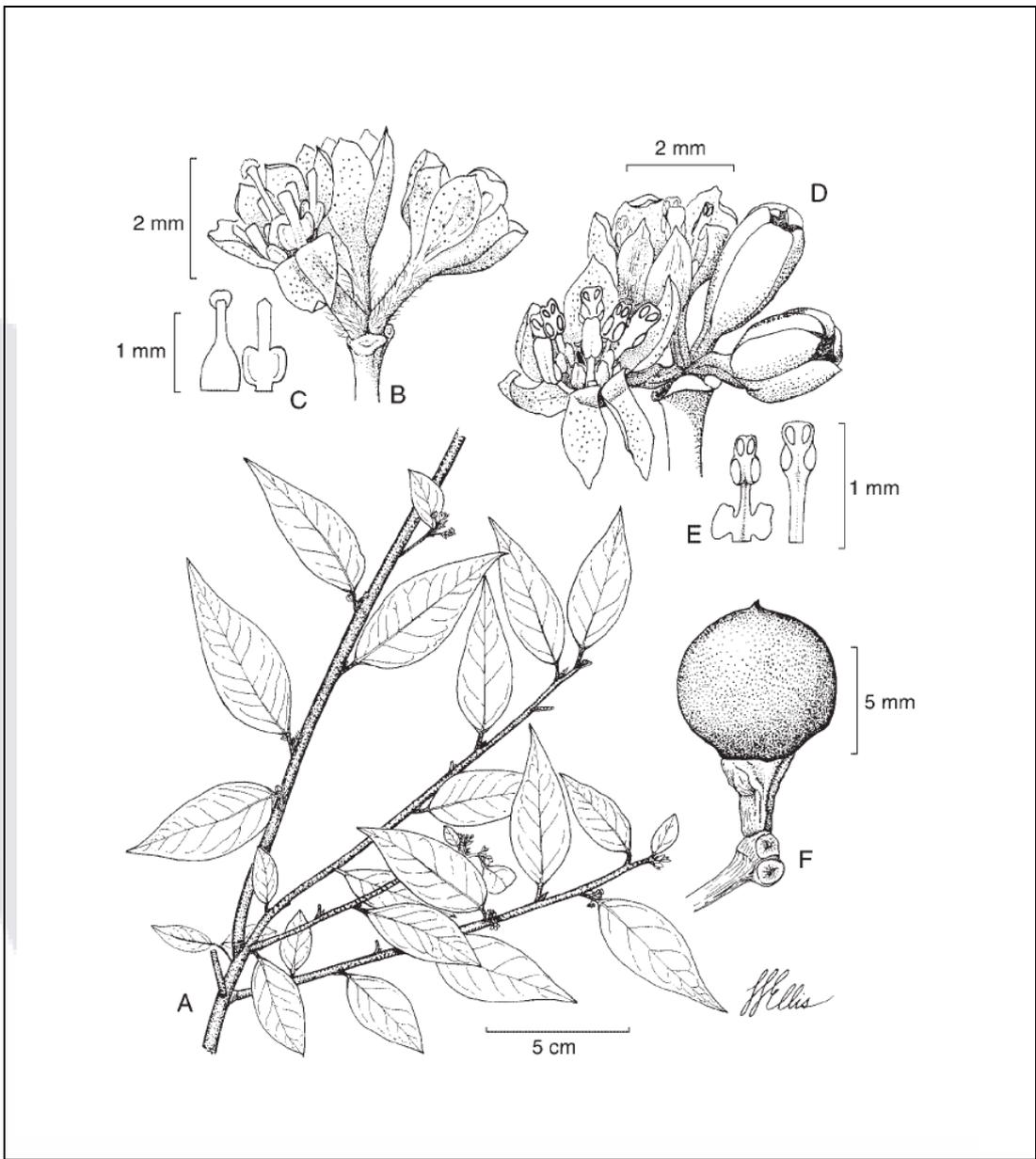


Figura 1. *Litsea glaucescens* K. A. ramilla con inflorescencias; B. última división de una inflorescencia femenina; C. vista esquemática de ovario y estaminodio (flor femenina); D. última división de una inflorescencia masculina; E. vista esquemática de (izquierda a derecha): estambre de los verticilos interiores y estambre de los verticilos exteriores; F. fruto.

2. 4 Distribución del Laurel Silvestre en México

El área de distribución del Laurel en México es amplia, se le suele encontrar sólo en ciertos hábitats muy específicos, por lo que nunca llega a ser una especie abundante. En nuestro país, se ha documentado su existencia en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Jalisco, San Luis Potosí, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas, pudiendo haber poblaciones más pequeñas en otros estados. Su floración ocurre durante los meses de Febrero a Mayo y los frutos maduran de Agosto a Septiembre. Tiene requerimientos de hábitat muy particulares, ya que sólo prospera en sitios sombreados y húmedos, asociados a la presencia de agua en cañadas (Rzedowski y Rzedowski, 2001). El conocimiento de sus requerimientos particulares en cuanto al hábitat es determinante para la conservación y uso racional del Laurel Silvestre. Se ha visto que en especies similares muchos factores juegan un papel importante en la determinación de su distribución dentro de las comunidades naturales, de tal manera que existe una íntima asociación entre hábitat y distribución vegetal. Estos factores pueden ser agrupados en cuatro categorías: hábitat, formas de vida, factores fenológicos y reproductivos (Sri-Ngernyuan, 2003).

En Aguascalientes el Laurel Silvestre crece en los municipios de San José de Gracia y principalmente en Calvillo; en este municipio el género ha dado nombre a la Sierra del Laurel, llamada así por que en algún tiempo esta planta abundaba en las cañadas (PROESPA, 2007).

2.5 Usos tradicionales del laurel y factores de riesgo que amenazan a la especie

La gente de Aguascalientes y de municipios cercanos a la Sierra del Laurel, utiliza las hojas del Laurel Silvestre como condimento en muchas comidas, especialmente en sopas. El té de las hojas se usa para la congestión de pecho, tos, enfermedades del oído y enfermedades gastrointestinales. El Laurel Silvestre posee propiedades antiespasmódicas, antidiarreicas, para aliviar dolores e infecciones de garganta y en forma de infusión para combatir dolores por frío, escalofrío, hipo y cólicos en general (Bermúdez y Sánchez, 2000).

También se ha detectado su uso en rituales religiosos como el Domingo de Ramos donde se explota excesivamente para su comercialización. Cada año, principalmente en Febrero, Marzo y Abril, justo en la época de floración de la especie, esta planta se colecta y se utiliza para la realización de gran cantidad de ramos que se venden en el "domingo de ramos", cortando su ciclo natural y la oportunidad de propagar la especie. Cabe mencionar que existen otros factores que afectan a esta especie como los incendios forestales, factores bióticos y abióticos, como plagas y condiciones ambientales extremas respectivamente (PROESPA, 2007).

El Laurel Silvestre es tan escaso debido principalmente a que tiene requerimientos de hábitat muy particulares, ya que solo prospera en sitios sombreados y húmedos, asociados a la presencia de agua en cañadas. Se ha determinado que en toda la Sierra del

Laurel dentro del municipio de Calvillo, solamente existe poco mas de 200 hectáreas con los requerimientos mínimos para que esta especie encuentre las condiciones óptimas para su existencia. Recientes investigaciones han demostrado que en el área mencionada, quedan pocos árboles adultos con capacidad de producir semilla. Actualmente, el Laurel Silvestre se encuentra en peligro de extinción de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001, y ello se debe tanto a la paulatina destrucción de sus hábitats como a una explotación cada vez más intensa e incontrolada (PROESPA, 2007).

2.6 Alternativas para evitar la extinción de la especie

El Laurel Silvestre es una especie protegida según la NOM-059-ECOL-2001, la cual establece que aquellas especies cuyas áreas de distribución o tamaño de sus poblaciones en el territorio nacional han disminuido drásticamente poniendo en riesgo su viabilidad biológica en todo su hábitat natural, debido a factores tales como la destrucción o modificación drástica del hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros. Esta categoría coincide parcialmente con las categorías en peligro crítico y en peligro de extinción de la clasificación de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, por sus siglas en inglés). Por lo tanto se establece que queda prohibida la extracción del Laurel Silvestre ya que se encuentra en peligro de extinción de acuerdo con la norma oficial vigente, su extracción, traslado, acopio y comercialización, ya se trate de plantas completas o sus partes, y sin la debida autorización, constituye un delito federal.

Para evitar su desaparición la PROESPA (Procuraduría Estatal de Protección al Ambiente) ha realizado campañas para prevenir su extracción, acopio, transportación y comercialización sin las autorizaciones correspondientes, así mismo ha difundido esta información a la población para generar conciencia de que cuando una especie se extingue, desaparece para siempre. También ha promovido su reforestación mediante la germinación de semillas viables en viveros autorizados, y la posterior plantación de los árboles en los sitios adecuados (PROESPA, 2007), sin embargo, la reproducción por semillas en vivero es muy difícil debido a que esta especie requiere de condiciones ambientales muy particulares y la mayoría de las veces las plantas no se adaptan bien a las condiciones del vivero para desarrollarse, por lo cual se están desarrollando Técnicas de Cultivo de Tejido Vegetal para propagar la especie *in vitro* y de esta manera contribuir a evitar su desaparición.

Se ha detectado que a pesar de que el Laurel Silvestre es una especie protegida, no se han realizado trabajos moleculares para determinar la diversidad genética entre sus poblaciones, solo se han realizado trabajos sobre su distribución y morfología, por lo cual se considera de gran importancia desarrollar y caracterizar la variabilidad genética que existe entre los representantes de esta especie.

2. 7 Variación Genética de plantas

La diversidad genética se refiere a la variación al nivel de "genes individuales" (polimorfismo) que provee de un mecanismo a las poblaciones para adaptarse a los cambios de su medio ambiente. La mayor variación y/o el mejor de los cambios que al menos alguno de los individuos tenga en su variantes alélicas, producido por el nuevo ambiente, dará lugar a descendientes con la variante que continuará en la población en las generaciones subsecuentes. Hay una delicada interdependencia entre diversidad biológica y genética, cambios en el ambiente resultan en cambios en la biodiversidad, requiriendo adaptación de las especies que permanecen. Cambios en la diversidad genética, particularmente la disminución de la diversidad a través de la pérdida de especies, resulta en la reducción de la diversidad biológica (Rus-Kortekaas, W. *et al.*, 2004).

La diversidad genética puede conceptualizarse jerárquicamente en tres niveles: de alelo, de grupos de alelos que tienden a variar en su conjunto y del genoma completo de una especie. La variación genética, con base en la mutación y recombinación genética dentro de especies y poblaciones, constituye la materia prima de la selección natural y deriva génica, de esta forma algunas variantes pueden conferir ventajas adaptativas sobre los individuos que las poseen, donde cada individuo podría ser proveedor en el sentido "darwiniano", y podría dejar más descendientes que aquellos que poseen menores variantes (Lewin, *et al.*, 1999). Matolweni *et al.*, 2000 consideran que patrones complejos de variación pueden empañar los límites

entre especies y conducir a la complejidad taxonómica. Hillis y Holder, 2000, indican el interés de los biólogos por escribir la historia de la vida usando las relaciones evolutivas como una fuente de datos de análisis biológicos de otros campos, y que los árboles evolutivos o filogenéticos proveen de la estructura básica para interpretar la variación biológica.

Asimismo, el mismo autor reporta que la variación genética puede resultar de una mutación, como un cambio en el genotipo de un organismo, el cual no fue heredado de sus ancestros; y considera que es la última fuente de variación en una especie que reabastece el suministro de variabilidad genética. El mismo Singh, agrega que una mutación puede ser puntual o presentarse como un cambio mayor en la estructura del cromosoma; al ser de esta última forma, puede deberse a delección, inversión, aneuploidia, o poliploidia, por lo que la recombinación consistirá en un rearrreglo de cromosomas, realizado de manera conjunta por medio de la meiosis y la fertilización del material genético de distintos parientes, produciendo un nuevo genotipo (Singh, 1999).

Los estudios filogenéticos incluyen dos tipos básicos de datos del ADN: cambios en el contenido u orden del genoma y la substitución de nucleótidos o como lo interpretan Hillis, *et al* 2000, fragmentos de restricción y secuencia del ADN. La variación a nivel del ADN puede observarse directamente por la secuencia del ADN o del ARN, o directamente por la observación de los polimorfismos detectados con alguna de las endonucleasas de restricción que comercialmente están disponibles, las cuales son empleadas comúnmente en la técnica amplificación aleatoria del ADN (RAPD).

La eficacia sistemática será mayor si el carácter utilizado no es el resultado de la influencia del medio sobre el fenotipo, por lo que el uso directo del material genético debe aportar los caracteres más fundamentales para una clasificación, con la ventaja adicional de que el número de datos que se pueden obtener está limitado solo por el tamaño del genoma (Hillis, *et al.*, 2000).

Conocer la similitud entre los individuos y las poblaciones es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético, pues permite, además de la organización del material, la selección adecuada de los genotipos superiores y la complementación con datos fenotípicos y agronómicos para el desarrollo de una población mejorada (Ramírez-Ramírez, 2003). Además, es fundamental para proponer estrategias de manejo racional (Eguiarte-Frums, 2003).

2.8 MARCADORES Y TAXONOMÍA.

2.8.1 Marcadores morfológicos

La taxonomía siempre ha estudiado características morfológicas, lo cual requiere observaciones muy exhaustivas de los organismos en diferentes estadios de desarrollo. Los criterios utilizados carecen muy a menudo de definición y objetividad y, en cualquier caso, son marcadores ambiguos debido a las influencias ambientales y al criterio del observador (Becerra, *et al.*, 2001).

2.8.2 Marcadores bioquímicos: isoenzimas.

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70s se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies de organismos, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico.

Las isoenzimas son formas moleculares estructuralmente diferentes de un sistema enzimático con la misma función catalítica. Las isoenzimas se originan por alteraciones en su secuencia de aminoácidos que causan cambios en la carga neta o en su conformación, y por lo tanto en su movilidad electroforética (Stark-Muller, 1998).

Tales alteraciones de aminoácidos proveen una manera de monitorear cambios en la secuencia de nucleótidos del respectivo gen codificante. Como consecuencia, las isoenzimas pueden marcar la variación alélica del loci de un gen estructural, ya que tales alelos son representados por isoenzimas con diferente movilidad electroforética. Las isoenzimas que se ha probado que están codificadas por diferentes alelos del mismo gen son designadas como alozimas o aloenzimas. Las ventajas que ofrece las aloenzimas como marcadores son: La especificidad del sustrato permite el análisis de un gen específico. Las aloenzimas son usualmente expresadas codominantemente por lo que los genotipos homo y heterocigotos pueden ser diferenciados. El análisis es

rápido y se puede realizar en animales y plantas (Stark-Muller, 1998).

Por otro lado, las limitaciones que tienen estos marcadores es que los genes codificantes representan una muestra no al azar, pues solo las sustituciones de nucleótidos que producen cambios en la movilidad electroforética de la proteína codificada son evidentes, y no se puede excluir que una misma banda represente dos alelos con la misma movilidad. Pero la principal limitante es que no es capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que además puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, y puede ser influida por el medio ambiente y variar de una época del año a otra (Becerra *et al.*, 2001).

2.8.3 Marcadores moleculares

El análisis de la variabilidad del ADN permite determinar puntos de referencia en los cromosomas conocidos como marcadores moleculares; los cuales se definen como cualquier fenotipo molecular proveniente de segmentos específicos de ADN que representan regiones del genoma que pueden o no ser expresadas (Tonon *et al.*, 2002).

Las técnicas para el estudio de la variabilidad del ADN, se basan en que cada organismo posee una secuencia característica de nucleótidos que componen su ADN, y la detección de estas

diferencias por medio de marcadores moleculares revela una "huella digital genética" (Genetic Fingerprinting) que permite identificar individuos (Tonon *et al.*, 2002).

Los marcadores basados en ADN permiten estudiar el genoma con una amplia cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del ADN (exones e intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con el análisis de las proteínas. Las principales ventajas radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, que no son afectados por el medio ambiente, no presentan efectos pleiotrópicos y que pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Becerra *et al.*, 2000).

Algunas de estas regiones no codificantes, parecen estar involucradas en mantener la estructura del cromosoma, recombinación y/o control regulatorio. Estas regiones no codificantes, pueden acumular mutaciones más rápidamente que las codificantes, donde las mutaciones pueden afectar la supervivencia del organismo, y por lo tanto tienden a no ser transmitidas a la siguiente generación. Como estas mutaciones ocurren al azar, cada individuo lleva un set único de estas secuencias repetitivas (Tonon *et al.*, 2002).

El uso de los marcadores de ADN puede proporcionar información que permita una clasificación y ayuda en casos donde hay duda o donde los datos morfológicos no son claros. Es imprescindible que exista una correlación entre la clasificación

morfológica y la basada en marcadores moleculares. También permiten el análisis de variación a nivel genómico y permite la detección de variación genética a nivel molecular, como en el caso de la variación somaclonal (Osipova *et al.*, 2003).

Las aplicaciones de los marcadores moleculares de DNA son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentren nuevos usos. Por ahora se vienen empleando en la diferenciación de individuos (Dangi *et al.*, 2004), discriminación entre clones (Osipova *et al.*, 2003), análisis filogenéticos y taxonómicos (Ma *et al.*, 2004), mapeo de genomas (Friesen *et al.*, 2004), cuantificación de variabilidad génica intra e ínter específica en poblaciones micropropagadas o naturales (Abbot, 2003), mejoramiento genético, detección de infecciones o propensión a sufrirlas (Liu *et al.*, 2004), localización de resistencia a enfermedades (Farinho *et al.*, 2004) y dispersión de especies (Baydar *et al.*, 2004).

Una serie de técnicas y marcadores han sido desarrollados para estimar la diversidad genética, pero ninguna es universalmente ideal; cada técnica tiene sus ventajas y desventajas. Por lo tanto, la elección de la técnica depende del investigador y de la resolución genética necesitada, así como también del presupuesto con que se cuenta y la experiencia técnica disponible (Mueller *et al.*, 1999).

Con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, se han incorporado marcadores para detectar cambios en el genotipo de los individuos, aquellos basados en Fragmentos de Restricción

Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta última ha derivado en múltiples técnicas, dentro de las cuales las más utilizadas son RAPD y AFLP.

2.8.4 Polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP)

En la década de los años 70s y 80s se identificaron las enzimas de restricción, que permiten cortar el ADN en lugares específicos y detectar los denominados polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Esta técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Las enzimas tipo II son capaces de reducir la complejidad del ADN, como el de plantas, a una población de fragmentos de diferente tamaño (Becerra *et al.*, 2000).

Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana se hibrida con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autorradiografía de rayos-X, de acuerdo al peso molecular de la banda. Básicamente, los RFLPs son causados por rearrreglos del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico al hibridar con la sonda seleccionada (Becerra *et al.*, 2000).

Cuando los patrones de RFLP de DNA nuclear son examinados en poblaciones segregantes se comportan como marcadores codominantes y pueden ser utilizados para crear mapas de ligamiento. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica (Botstein, 1980; Brettschneider, 1998; Becerra y Paredes, 2000).

Las sondas de DNA para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan ADN preparados a partir de amplificaciones inespecíficas. Aunque RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo, es decir un sitio de restricción si se utiliza una solo enzima, el resultado es muy preciso. Ya que los RFLPs se heredan en forma Mendeliana simple, si la sonda empleada representa una copia única, ella es considerada como un locus y las variaciones en patrones son analizados como alelos (bialélicos o multialélicos). El nivel de polimorfismo que esta técnica puede detectar depende en gran medida de la naturaleza de las sondas empleadas, enzimas de restricción utilizadas y de la complejidad en cuanto al tamaño del genoma de la especie en estudio (Brettschneider, 1998).

Dentro de las principales desventajas de los RFLP están la clonación de las sondas y el uso de radioactividad; que son tareas lentas y caras. Aunque últimamente, el desarrollo de la técnica no-radioactiva ha simplificado esta metodología (Becerra *et al.*, 2000). La aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos, diversidad genética (Singla *et al.*, 2004) e

identificación de cultivares con propósitos de protección varietal (Lombard *et al.*, 2000). En la década de los 80s la forma principal de estudiar la variación genética era por medio de RFLP, pero todo eso ha cambiado con el desarrollo de la PCR.

2.8.5 Uso de Marcadores Moleculares en plantas

El uso de marcadores moleculares para resolver problemas taxonómicos en plantas se inició en la década de los cincuenta con las isoenzimas (Market *et al.*, 1959), ya en los setenta fue la electroforésis de enzimas, y hacia los ochenta las técnicas de manipulación y análisis habían avanzado lo suficiente como para poder estudiar la variación del ADN y ARN. Las tres grandes áreas de aplicación de la sistemática molecular son en la estructura genética de poblaciones (como variación geográfica, heterogocidad), delimitación de especies (incluyendo híbridos) e inferencia filogenética (Lewin, 1999).

Actualmente el uso de estos marcadores se ha vuelto tan común, que de 71 trabajos publicados en la revista *Systematic Botany* en 2004 y 2005, el 52% incluían técnicas moleculares (Martínez, 2007).

Las técnicas moleculares que se han usado para resolver problemas taxonómicos en plantas son la secuencia de aminoácidos, serología, hibridación ADN - ADN, electroforesis de enzimas, cambios en sitios de restricción y secuencia de ácidos

nucleicos. Las dos primeras han tenido un impacto marginal debido a problemas de técnica o interpretación (Martínez, 1997).

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia notípica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio. Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante. Algunos ejemplos de ellos son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO) entre otras (Karp *et al.*, 1998).

Dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas dentro de los marcadores moleculares de ADN. Categoría 1: métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, RFLP y número variable de repeticiones en tandem (VNTRs). Categoría 2: técnicas que utilizan iniciadores ("primer") arbitrarios o semiarbitrarios. Por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP), RAPD, RAMPO. Categoría 3: PCR

con sitio "objetivo específico". Por ejemplo, SSR, Inter secuencias simples repetidas (ISSR). Las categorías 2 y 3 son marcadores basados en la PCR.

2.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis PCR es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN. Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN de longitudes variables, no mayores de 6 Kb en promedio. Usa, según la técnica, uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Spangler, 2002).

El análisis PCR, desde su invención, por Saiki *et al.*, 1985, ha sufrido modificaciones y en algunos casos ha generado incluso nuevas técnicas (Phillips *et al.*, 1995). Rallo *et al.*, 2002 mencionan que la gran mayoría de los marcadores moleculares del ADN, de uso actual, se basan en la técnica del PCR. La técnica PCR ha

suministrado un conjunto de marcadores como por ejemplo; los RAPDS, SSR, AFLPs, regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCARs), amplificación selectiva de loci polimórficos (SAMPLs), amplificación azarosa de las huellas del ADN "ADN Fingerprinting" (RAF) y amplificación directa con ADN microsatélites (DAMD) (Saxena *et al.*, 2005).

La ADN polimerasa ADN dependiente es una enzima que, en unas condiciones determinadas y en presencia de una pequeña cadena de ADN, que actúa como cebador, es capaz de producir millones de copias de determinados fragmentos del ADN. Estos fragmentos se separan posteriormente por peso molecular y conformación mediante técnicas electroforéticas, obteniéndose un patrón de bandas específico que nos permite diferenciar individuos (Spangler, 2002).

2.10 Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)

La técnica de RAPDS (Amplificación aleatoria del ADN polimórfico), fue descrita por primera vez en 1990 por dos grupos de investigadores independientes Williams *et al.*, (1990) y Welsh *et al.*, (1990). Phillips *et al.*, (1995) mencionan que en esencia es la misma metodología PCR, por lo que a veces se le refiere con este nombre. La modificación que les dio origen consistió en sustituir en la tecnología PCR, el uso de un par de iniciadores cuidadosamente diseñados y un poco largos, por un solo iniciador corto, de alrededor de 10 nucleótidos de longitud y de secuencia arbitraria, con la capacidad de unirse a regiones específicas en el genoma

(Waugh *et al.*, 2000). En el análisis PCR los dos iniciadores son usados para amplificar una secuencia específica del genoma, y en el análisis RAPD, el iniciador se usa para amplificar secuencias al azar de un patrón complejo de ADN (Phillips *et al.*, 1995).

Los polimorfismos producidos con la técnica RAPD se denominan marcadores RAPD, y pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde. Como regla general, el tamaño de las variantes se detecta muy escasamente y los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus. En los estudios de herencia, los productos de amplificación se comportan como marcadores dominantes (Waugh *et al.*, 1992).

Los RAPDS generan un número inmenso de marcadores y, al contrario de los RFLPs, no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor (Phillips *et al.*, 1995).

El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos: 1). ADN molde: ADN proveniente de la muestra a analizar. 2). El iniciador: que es un oligonucleótido, con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Debe tener un contenido de al menos un 50% de guanina-citocina para funcionar correctamente. 3). Desoxirribonucleótidos: se requiere de concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la

síntesis de la cadena. 4). Solución buffer. 5). Taq-polimerasa: es una enzima ADN polimerasa, ADN dependiente termoestable. Tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN usando una cadena simple como molde a partir de un punto determinado, fijado en este caso, por el iniciador (Phillips *et al.*, 1995).

Durante el análisis RAPD se dan una serie de reacciones químicas en forma cíclica de manera similar a lo que ocurre en una reacción PCR pero contemplando la modificación mencionada anteriormente. La eficiencia de los marcadores RAPDS puede estar influenciada por varios factores, entre ellos: El número de ciclos de amplificación, la cantidad de ADN inicial, la longitud del ADN, el iniciador y la temperatura (Phillips *et al.*, 1995).

Los RAPDS, como se mencionó anteriormente, es un técnica usada en Biología Molecular para la amplificación de fragmentos de ADN, basándose principalmente en la PCR, donde se utilizan oligonucleótidos sintéticos de secuencias al azar con una longitud corta entre 10 y 12 pares de bases. Estos oligonucleótidos, actúan a la vez como inverso y reverso y pueden amplificar fragmentos simultáneos que se localizan desde 1 a 10 sitios geonómicos. Los fragmentos amplificados usualmente están dentro de un rango de longitud de 0.5 - 5 kb, y luego son separados por electroforesis en gel de agarosa. El polimorfismo se detecta como la presencia o ausencia de bandas de un tamaño específico esperado, después de que el gel ha sido teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. Sin embargo, para realizar un buen análisis mediante RAPDS, se requiere que las muestras de ADN a analizar sean lo suficientemente puras. Al igual que muchas especies de

plantas, en Laurel silvestre se producen metabolitos secundarios tales como: alcaloides, flavonoides, terpenos, compuestos fenólicos y polisacáridos. Durante la extracción del ADN en este tipo de plantas, la presencia de estos compuestos se consideran contaminantes ya que pueden afectar el uso de esta muestra para los análisis de restricción, amplificación y clonación. Los problemas que comúnmente se presentan en los procesos de extracción de ADN de alto peso molecular en plantas son: la degradación debido a la presencia de endonucleasas y polisacáridos. Los polisacáridos presentes durante la extracción de ADN, inhiben las reacciones de RAPD, RFLP, clonación, creación de bancos genómicos y otras técnicas que son sensibles a la calidad del ADN (Pandey, 1996). Adicionalmente algunos compuestos como los polifenoles son poderosos agentes oxidantes y pueden unirse de una manera irreversible a proteínas y ácidos nucleicos produciendo un material gelatinoso, el cual reduce la solubilidad de los ácidos nucleicos (Porebski, 1997).

Existen actualmente una gran cantidad de protocolos para la extracción de ADN en plantas como ejemplo se tiene: el descrito por Dellaporta *et al.*, 1984, Doyle and Doyle, 1990 y Porebsky 1997, sin embargo, no existe un protocolo de extracción de ADN para Laurel Silvestre por lo que es necesario estandarizar un protocolo útil para nuestros propósitos.

2.11 Aplicaciones del método RAPD

El método RAPD, es uno de los métodos más utilizados para detectar polimorfismos entre organismos, establecer identidades y construir mapas de ligamiento entre otros como:

2.11.1 Detección de híbridos

Uno de los problemas a los que debe enfrentarse quien trabaja con poblaciones vegetales naturales o cultivadas es la de la presencia de especies de presumible origen híbrido. La búsqueda de caracteres diagnósticos contrastantes en los supuestos parentales y la comprobación de su presencia en el híbrido era frecuentemente engorrosa e imprecisa. La obtención de los patrones de bandas RAPD en los taxa involucrados en un aparente proceso de hibridación y la comparación de los mismos proporciona resultados fáciles de obtener y generalmente concluyentes, tanto en especies silvestres como en plantas cultivadas. En algunos casos los autores proponen varias especies (del mismo género o de géneros diferentes) como supuestos parentales y los marcadores RAPD (especies específicos) demuestran sin ambigüedad las especies implicadas en la formación del híbrido por poseer un patrón de bandas completamente aditivo. En otros casos las especies señaladas en el origen del híbrido son descartadas por no poseer ninguna de las bandas marcadoras de los supuestos parentales. También puede observarse que los híbridos no posean un patrón totalmente aditivo, lo cual es atribuido a la presencia de

polimorfismo en las poblaciones parentales, a la herencia dominante de los marcadores RAPD, a sucesivos cruces y retrocruces o a la amplificación de fragmentos provenientes de ADN citoplasmático, como es el caso presentado en el trabajo de Scheepers y col.57; estos autores sostienen que las críticas que comúnmente se hacen contra la tecnología RAPD no son generalizables en cuanto a la reproducción de los resultados, pues en sus investigaciones ellos los han repetido utilizando diversos tejidos de las plantas, diferentes tipos de Taq polimerasas y diferentes máquinas PCR obteniendo siempre los mismos resultados (Nereida, 2000).

2.11.2 Diversidad genética intra e interpoblacional (intraespecífica)

El método RAPD está siendo utilizado con éxito para determinar los niveles y modelos de diversidad genética tanto en especies sexuales como clonales. Debemos a Chalmers *et al.*,(1992) un trabajo pionero sobre la utilización de los marcadores RAPD para estimar la variación genética intra e interpoblacional en poblaciones naturales de especies de *Gliricidia* (árbol leguminoso americano, alógamo, de múltiples usos) como un prerrequisito para optimizar estrategias de muestreo y conservación de recursos genéticos; los RAPD revelaron en este caso una alta diversidad interpoblacional, mayor que la intrapoblacional; el caso contrario, se ha encontrado frecuentemente en árboles de reproducción alógama utilizando análisis isoenzimático donde sólo están representadas regiones codificantes del genoma. Sin embargo, un

estudio de variación intra e interpoblacional utilizando marcadores en la especie medicinal *Digitalis obscura* L., también alógama, mostró que la mayor variación ocurría entre individuos dentro de las poblaciones, que según los autores es lo esperado en especies de fertilización cruzada (Nereida, 2000).

En un análisis de variación genética entre diferentes poblaciones de la conífera *Picea mariana* en Canadá los autores reportan una total congruencia entre los estimados de diversidad genética obtenidos tanto por datos enzimáticos como por los loci RAPD. Comparando dos subespecies norteamericanas y una suramericana de *Fragaria chiloensis* los autores aportan por medio de RAPD la prueba que la mayor diversidad genética se encuentra en las poblaciones de la subespecie canadiense, sugiriendo que el germoplasma de la *Fragaria salvaje* canadiense debe ser protegido y utilizado para mejorar los cultivos (Nereida, 2000).

En todos los casos con la información aportada por los patrones RAPD (presencia o ausencia de una determinada banda) se elabora una matriz de similitud calculada utilizando índices de similitud apropiados (distancia de Jaccard; índice de similitud de Nei y Li's; coeficiente de similitud de Sorensen-Dice, entre otros). Los resultados se expresan luego por análisis de agrupamiento (generalmente utilizando el programa UPGMA) en forma de dendograma (o fenograma). Algunos de estos trabajos de investigación de relaciones genéticas entre cultivares han servido como comparación de la eficiencia entre diversos métodos utilizados para evaluarla. Entre ellos podemos citar la determinación de las relaciones genéticas entre cultivares de la

avena (*Avena sterilis*) tanto por análisis isoenzimático como por análisis RAPD; la correspondencia entre las matrices de distancia obtenida fue moderada, aunque la representación de las relaciones totales entre los cultivares en el análisis de agrupamiento fue considerablemente coincidente; sin embargo, los autores señalan que el análisis RAPD produjo una mejor separación de los grupos de cultivares (Moura,1999).

2.11.3 Diversidad genética interespecífica

Se han realizado varios trabajos en lo referente al estudio de la diversidad genética en diferentes plantas mediante el empleo de marcadores moleculares por RAPDS con la finalidad de detectar polimorfismo y diferenciar genotipos. Este método se ha utilizado abundantemente durante la década de los 90's en el análisis de relaciones genéticas interespecíficas (intragenéricas en la mayoría de los casos), tanto en plantas silvestres como cultivadas, pudiendo decirse con bastante seguridad que la mayoría de los trabajos publicados sobre RAPD (utilizando sólo este método o en combinación con otros métodos moleculares, frecuentemente RFLP) hasta el momento, pertenecen a este tipo de análisis. En los trabajos dedicados a plantas silvestres los objetivos son casi siempre taxonómicos, por ejemplo una comparación entre álamos (*Populus tremuloides* y *P. grandidentata*) detectada por RAPD, RFLP y aloenzimas demostró que *P. tremuloides* presenta mayor variación genética y que ambos presentan la capacidad de originar híbridos en sus zonas de contacto (Liu y Furnier, 1993). En el caso de especies africanas del género *Acacia* sp el método RAPD logró dilucidar la división y distribución de las especies con y sin nódulos

(Harrier *et al.*, 1997). En otro caso el método se utiliza para confirmar o rechazar relaciones entre una supuesta especie progenitora (del género *Senecio*) y sus especies derivadas (Purps y Kadereit, 1998). En el caso de las hepáticas del complejo *Pellia epiphylla* el método resuelve las relaciones genéticas entre tres especies del complejo y apoya el origen híbrido aloploide de una de ellas (Pacak *et al.*, 1998).

Los trabajos con géneros de plantas cultivadas en los cuales se utilizan los patrones RAPD tienen como objetivo, en un buen número de casos, el comparar el nivel de variación intraespecífica entre especies silvestres y cultivadas (siempre el nivel de variación genética es mayor en las plantas silvestres) y reconocer él o los progenitores de las especies cultivadas. Para ello se calcula a partir de los patrones RAPD la matriz de distancias genéticas y se construye el dendograma para visualizar las relaciones de similitud entre las muestras utilizadas. Podemos mencionar como ejemplos, los trabajos de Abo-elwafa *et al.*, 1995, con el género *Lens* (lenteja); Hilu y Stalker, 1995, con el género *Arachis* sect. *arachis* (maní, cacahuete), en el cual los autores examinan la homología de las bandas comigrantes (del mismo peso) encontrando hibridación entre ellas (prueba de la homología entre ellas), pero también encontraron hibridación entre bandas de diferentes movilidades, situación que ellos interpretan como que, en este caso, el ADN amplificado puede representar ADN repetitivo distribuido a lo largo del genoma; Reddy y Soliman, 1997, con especies cultivadas de *Hordeum* (cebada); Song *et al.*, 1999 comparan la variación genética en poblaciones de arroz salvaje (*Oryza rufipogon*) de China y Brasil, encontrando mucho más polimorfismo en las

poblaciones y regiones chinas que en las brasileñas, y además el 61.8% de la diversidad genética se sitúa entre los dos continentes, situación que apoya la creación de una nueva especie (*Oryza glumaepatula*) para la forma brasileña; Taylor-Grant y Soliman, 1998 con la soya salvaje (*Glycine* subgénero *glycine*), este trabajo tiene la particularidad que trabajan con plantas obtenidas *in vitro* a partir de semillas representando 10 especies de plantas de soya perennes de la "Soybeans Germplasm Collection" de la Universidad de Illinois; Rodríguez *et al.*, 1999, con el género *Capsicum sp* utilizando también muestras provenientes de un banco genético.

2.11.4 Polimorfismo en plantas regeneradas por embriogénesis somática

El método RAPD también se utiliza con éxito para determinar los niveles de variación somaclonal. El método es suficientemente específico para diferenciar entre líneas de plantas y suficientemente sensitivo para discriminar entre tejidos en diferentes estadios de cultivo y entre plantas regeneradas, aún cuando entre ellas no se detecten anomalías morfológicas (Brown *et al.*, 1993). La aparición de fragmentos únicos entre los regenerantes podría ser indicativa de la presencia de loci hipervariables o de secuencias de genes con una gran susceptibilidad a la inducción de stress durante el cultivo de tejidos. Estas secuencias deben clonarse e investigarse como posibles marcadores de dicho stress. También pueden correlacionarse con la tolerancia a condiciones de crecimiento adversas, o específicamente con caracteres bioquímicos o morfológicos (Brown *et al.*, 1993). En arroz (*Oriza sativa* L. cv B-370), al aplicar el método RAPD para determinar la influencia de las

condiciones de cultivo *in vitro*, específicamente de las concentraciones del ácido 2,4 di cloro fenol acético (2,4-D) en el medio utilizado para formar callos, se analizaron 12 somaclones de esta variedad de arroz, no encontrándose ninguna diferencia en el patrón de bandas RAPD en relación a la concentración de este producto; sin embargo, sí se detectó una pequeña cantidad (10%) de polimorfismo (9 bandas polimórficas de las 88 amplificadas) entre las plantas regenerantes. Este porcentaje de polimorfismo obtenido en arroz es mayor que el reportado en somaclones de remolacha (Munthali *et al.*, 1996).

Así, el cultivo *in vitro* parece incrementar el número de sitios donde los iniciadores pueden anclarse para iniciar la amplificación del ADN, si se compara con el número de sitios en las plantas control; esto trae como consecuencia que el método es válido para detectar semejanzas y diferencias entre los somaclones, pero no para identificar en forma precisa cada uno de ellos, pues ninguno de los iniciadores utilizados produce patrones de amplificación únicos para cada línea (Banerjee *et al.*, 1998). Este resultado coincide con el reportado en el análisis de somaclones de tomate (Rus-Kortekaas *et al.*, 2004). Sin embargo, otros investigadores, utilizando el método RAPD en un análisis de la integridad genética de poblaciones derivadas por embriogénesis somática de la conífera *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. no detectaron (utilizando 11 iniciadores para comparar material *in vivo* e *in vitro*) ninguna variación somaclonal entre los embriones somáticos y las líneas celulares embriogénicas de las cuales fueron producidos.

2.11.5 Elaboración de mapas genéticos

El método RAPD mostró ser, desde el inicio de su aplicación, una herramienta poderosa para el establecimiento de mapas genéticos y mapas de ligamiento, al combinarse con otras técnicas. En algunos casos se propone combinar el uso de los marcadores RAPD y la configuración de pruebas de entrecruzamiento como una estrategia para la construcción de mapas genéticos individuales de ligamiento en cualquier organismo sexual altamente heterocigoto (árboles alógamos de importancia forestal, por ejemplo); esta estrategia puede extenderse para elaborar mapas de loci pertenecientes a caracteres cuantitativos (QTLs) que afecten detalles importantes de su mantenimiento o propagación (como por ejemplo, la reproducción vegetativa). En otros casos se utiliza el ligamiento de marcadores RAPD a un gen único que confiere resistencia a una enfermedad determinada; la generación F1 (a la cual se le aplica el análisis RAPD) se obtiene del cruce de individuos presentando (resistente) o no (susceptible) la resistencia, escogiéndose los marcadores presentes en los individuos resistentes; para identificar los marcadores más cercanamente ligados se utiliza el análisis BSA. Otros autores utilizan la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para revelar la organización intracromosómica de los marcadores RAPD localizados en los mapas genéticos elaborados previamente; estos marcadores pueden tener más de una localización o bien una localización única en el cariotipo; cuando la localización es única esta información puede utilizarse para comparar distancias físicas y genéticas en los cromosomas (Nereida, 2000).

2.11.6 Algunos trabajos importantes con RAPD

Mediante el uso de la técnica RAPD se evaluó la estabilidad genética de las selecciones regeneradas *in vitro* de *Annona cherimola* y *A. muricata*, 29 iniciadores de la serie OP-A (*Operon Technology*) fueron evaluados, de ellos seis fueron seleccionados (OPA-1, OPA-3, OPA-5, OPA-8, OPA-12, OPA-14) por su patrón de repetición en ambas especies y selecciones. Los resultados confirmaron la estabilidad genética de las plantas micropropagadas de acuerdo con los iniciadores seleccionados. Esta investigación presenta por primera vez, hasta donde es conocido, un protocolo que permite analizar la variabilidad genética de organismos propagados *in vitro* de *A. cherimola* y *A. muricata*, el cual fue confirmado por la técnica molecular RAPD. Este análisis molecular dio la pauta para que se pueden regenerar y propagar árboles selectos de *A. cherimola* y *A. muricata* conservando la estabilidad genética de los mismos, por lo que se puede garantizar que el material propagado es "fiel al tipo" (Azofeita, 2006).

Se utilizó la tecnología RAPD para estudiar la variabilidad existente en un banco de germoplasma de *Pisum sativum*, con objeto de establecer una colección de genotipos, además para la identificación de genes de interés agronómico, los cuales fueron utilizados en los programas de mejora (SIDTA, 1999).

En plantas de cacao con el análisis RAPD y la utilización de los oligonucleótidos OPA-04, OPB-07 y OPC-14, fue posible la caracterización de los genotipos *Theobroma cacao*. Los resultados

permitieron la clasificación de los árboles de cacao en dos grandes grupos; cacaos criollos antiguos y cacaos criollos actuales. Además, se evidenció que los materiales que provienen de la misma localidad presentan patrones de banda similares y conforman grupos locales, posiblemente por presentar un origen común (Salazar y Efraín, 2002).

Para extraer el ADN y poder caracterizar la población de árboles de cacao, utilizaron diferentes tipos de tejido foliar; tierno y fresco, sazón y fresco, tierno y almacenado en congelación y sazón y almacenado en congelación. Determinaron que el tejido idóneo para realizar la extracción es el tejido joven y fresco, ya que presentó menos problemas de oxidación y contenido de mucílago en las muestras procesadas, lo que favorece el proceso de extracción de los ácidos nucleicos. También encontraron que concentraciones de ADN por encima de 25 ng/μl resultan inhibitorias para el proceso de amplificación al azar del ADN y que los geles de agarosa al 2% permiten la mejor separación de los productos de amplificación así como una mayor resolución de los mismos. De los iniciadores evaluados, tres fueron los que produjeron la mayor cantidad de fragmentos amplificados, polimórficos y reproducibles (Salazar y Efraín, 2002).

En plantas de mango (*Mangifera indica*) la técnica de RAPD fue efectiva para caracterizar genotípicamente diferentes variedades. Para la extracción del ADN, en mango, fue preferible usar el tejido foliar proveniente de hojas verdes con textura suave y tierna, evitando las de color bronce o rojizas. Las concentraciones de ADN genómico por debajo de 20 ng/μl y por encima de 25 ng/μl

resultaron ser inhibitorias para la amplificación mediante PCR. Los iniciadores que produjeron mayor cantidad de fragmentos polimórficos fueron OPA-04, OPA-15, OPB-06, OPB-07 y OPM-05. Para lograr una mejor resolución y definición de las bandas se usó un gel de agarosa al 1.4% con el bromuro de etidio incluido en concentraciones de 0.1-0.5 µg/ml. Cada uno de los genotipos estudiados presentó un conjunto de patrones de bandas RAPD que le son característicos y permite su identificación. A pesar de la gran uniformidad morfológica que se observó en la población de árboles, con solo el uso de los iniciadores mencionados se logró separar genotípica los materiales de la colección, lo que demuestra el poder de resolución de la técnica para discriminar, a nivel de variedad, en esta especie (Salazar y Efraín, 2002).

Galderisi *et al.*, (1999), utilizaron 21 marcadores RAPD de los cuales 11 sirvieron para distinguir entre varios clones de seis cultivares de *Ficus carica*, estos oligonucleótidos fueron los siguientes: OPA-11, OPA-16, OPA-18, OPH-11, OPK-17, OPX-5, OPX-11, OPY-4, OPY-11, OPY-14 y OPZ-12. La utilización de los marcadores moleculares permitió la identificación exacta, luego se estimó la relación genética entre los cultivares y sus clones.

También se han hecho trabajos de caracterización genética de pitahaya (*Hylocereus undatus*) donde el análisis RAPD indicó la existencia de variabilidad genética entre las colectas de la misma, donde de los 20 oligonucleótidos probados de la serie OP-A1-OP-A20, se seleccionaron 15 que mostraron polimorfismo y

complejidad en el patrón de bandeo, lo que permitió la identificación de cada uno de los materiales. En total se analizaron 134 bandas amplificadas de las que 124 fueron polimórficas, utilizando únicamente los oligonucleótidos (Legaria *et al.*, 2005).

Trabajos realizados en piña (*Ananas spp*) utilizando los oligonucleótidos W-06, T-08, Z-20 y R-13 por Tapia-Campos *et al.*, 2005 permitieron detectar una alta variabilidad genética entre los materiales de piña evaluados sobre todo en los pertenecientes a *A. comosus* de modo que no se encontraron duplicados entre los genotipos y por lo tanto se pueden conservar como materiales individuales en el banco de germoplasma.

3. HIPÓTESIS

Es posible conocer la diversidad genética existente en algunas de las poblaciones de Laurel Silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) en el Estado de Aguascalientes a través del uso de marcadores moleculares (RAPDS). Esta técnica también permitiría comparar genéticamente estas poblaciones con otras de fuera del Estado y con plantas generadas a través del cultivo *in vitro*.



4. JUSTIFICACIÓN

La Sierra del Laurel y Sierra Fría, ubicadas en el Estado de Aguascalientes son las áreas forestales más importantes del Estado, en ellas se encuentran especies protegidas. Entre éstas se encuentra el Laurel Silvestre (*Litsea glaucescens Kunth*) que se caracteriza por tener varios usos desde medicinales hasta gastronómicos y también en rituales religiosos. Debido al saqueo y la tala inmoderada de esta planta, ha provocado que se catalogue como una especie en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2001.

Como alternativa para evitar la extinción, se requiere de la caracterización y clasificación detallada de la diversidad genética, ya que de ello depende el potencial para la permanencia y el cambio evolutivo de la especie. Sin embargo, para el laurel no se tiene datos registrados sobre estudios de diversidad genética, y sólo se han descrito procedimientos de selección del material en base a características morfológicas. Actualmente, con los avances de la biología molecular, mediante PCR, se han desarrollado técnicas que se pueden utilizar en la caracterización y evaluación de la diversidad genética. Entre estas técnicas se encuentra los marcadores RAPDS (polimorfismo en el ADN amplificados al azar) que han sido de gran utilidad en estudios evolutivos, construcción de mapas y marcadores genéticos, relación filogenéticos y de parentesco, identificación de clones y variedades cultivadas y en estudios de dinámica de poblaciones. Por lo que en este trabajo se analizaron varios individuos de diferentes poblaciones de Laurel Silvestre provenientes de Sierra Fría, Sierra del Laurel y Estación Biológica UAA, mediante estudios de biología molecular, para

determinar su diversidad genética. Así mismo, se realizó una comparación genética de estas plantas con Laurel Silvestre procedente del estado de San Luis Potosí y plantas generadas *in vitro*.



5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Conocer la diversidad genética presente en las poblaciones de Laurel (*Litsea glaucescens*) en el Estado de Aguascalientes y San Luis Potosí, así como de materiales establecidos *in vitro* a través del uso de marcadores moleculares tipo RAPDS.

5.2 Objetivos específicos.

- Localizar y ubicar poblaciones de laurel en Sierra Fría, Sierra del Laurel, Estación Biológica UAA y Sierra de Álvarez S.L.P.
- Optimizar la técnica para el aislamiento de ADN de laurel.
- Optimizar la técnica RAPD para el análisis de las muestras de ADN de laurel.
- Realizar Análisis RAPD de poblaciones de laurel del estado de Aguascalientes y comparar los resultados obtenidos con los del estado de San Luis Potosí y de material *in vitro*.
- Realizar análisis estadístico para determinar variabilidad genética entre poblaciones de Laurel

6. METODOLOGÍA.

6.1 UBICACIÓN DE LAS POBLACIONES Y COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se localizaron poblaciones de Laurel Silvestre, en Sierra Fría (municipio de San José de Gracia), Sierra de Laurel (municipio de Calvillo), Estación Biológica UAA (municipio de San José de Gracia) y Sierra de Álvarez (San Luis Potosí), mismas que fueron ubicadas mediante un sistema de posicionamiento global (GPS; Garmin eTrex Legend GPS Navigator). Una vez que se tomaron los datos de su localización, se realizó la colecta de 20 muestras de laurel, provenientes de Sierra Fría, 20 muestras provenientes de Sierra de Laurel, 15 muestras provenientes de la Sierra de Álvarez, S.L.P y 5 muestras provenientes de la Estación Biológica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Así mismo se tomaron 5 muestras provenientes de material *in vitro* tomadas del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de Universidad Autónoma de Aguascalientes y finalmente se utilizó una muestra de tejido de papaya para ser usada como referencia en el análisis estadístico. Una vez identificadas las poblaciones de laurel, se realizaron colectas de hojas de laurel mismas que fueron colocadas en una hielera para después ser almacenadas a -80°C . Este material se etiquetó con el fin de identificar el individuo y la población de la que procedía.

6.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN de laurel, se probaron 5 diferentes protocolos: Protocolo para extracción de guayaba, papa y nopal (Morales *et al.*, en prensa), protocolo para agave (Keb *et al.*,

2002), protocolo para plantas mucilaginosas (Echevarria *et al.*, 2005), protocolo para diferentes especies usando sílica (Tapia *et al.*, 2005) y protocolo del kit comercial de Fermentas "Genomic DNA Purification Kit # 0512".

El primer protocolo que se probó fue el de **Morales *et al.***, **(en prensa)** el cual consiste en pulverizar tejido vegetal de laurel (hojas de laurel) con nitrógeno líquido. Se pesó 0.3 g de muestra y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, al cual se le adicionó 600 µl de buffer de extracción (100mM tris HCl, 1.4 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8, 0.2% CTAB, 0.5% beta-mercaptoetanol, 0.1%). La muestra se agitó suavemente durante 2 minutos. Posteriormente se incubó a 65°C con agitación durante 10 minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Al sobrenadante, se le agregó 0.5 volumen de NaCl 5 M y un volumen de isopropanol frío, se mezcló suavemente y se dejó en hielo por 20 minutos. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y se dejó secar la pastilla para posteriormente hacer dos lavados a la misma con etanol al 70% y al final se resuspendió en 400 µl de agua estéril. Se extrajo el ADN una vez con un volumen de fenol-cloroformo (1:1) y una más con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó dos volúmenes de alcohol absoluto y 1/9 de acetato de amonio, se agitó suavemente. Se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 10 minutos y se realizaron dos lavados con etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril. Se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría a 260 nm

y se verificó la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa.

El segundo protocolo que se probó fue para agave (**Keb et al., 2002**) el cual consiste en pulverizar tejido vegetal (hojas de laurel) con nitrógeno líquido y pesar 0.3 g de tejido. La muestra fue transferida a un tubo Eppendorf y se añadió 300 µl de buffer A (CTAB 2%, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 4% PVP-40, 0.1% ácido ascórbico, 10 mM de beta-mercaptoetanol). Posteriormente se añadió 900 µl de buffer B (100 mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM beta-mercaptoetanol) y 100 µl de SDS 20%. La muestra se agitó mediante un vortex y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió 410 µl de acetato de potasio frío y se mezcló completamente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 540 µl de isopropanol frío y se dejó en hielo durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol 70%. La pastilla que contenía el ADN se resuspendió en 600 µl de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH8). Se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría a 260 nm y se verificó la integridad de la molécula por electroforesis en gel de agarosa.

El tercer protocolo fue **para diferentes especies usando sílica (Tapia et al., 2005)** el cual consistió en pulverizar tejido vegetal (hojas de laurel) con nitrógeno líquido y se pesó 0.1 gr de la muestra. Se colocó 1 ml de buffer de extracción (10 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM de beta-mercaptoetanol pH 7)

y se añadieron 2 ml de SDS 20%, se mezcló suavemente y se incubó a 65°C durante 10 minutos. A la muestra se le adicionaron 500 µl de acetato de potasio 5 M y se dejó en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 12,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 300 µl de sílica (Sigma S-5631) mezclando suavemente por inversión de 3 a 5 minutos. Se centrifugó la muestra a 15,000 rpm durante 10 segundos y se lavó la pastilla que contenía el ADN dos veces con etanol al 70%. Se resuspendió la pastilla en 50 µl de agua destilada y se incubó a 55°C durante 5 minutos. Se centrifugó a 15,000 rpm durante 2 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría a 260 nm y se verificó la integridad del mismo, con electroforesis en gel de agarosa.

El cuarto método fue **para plantas mucilaginosas (Echevarria *et al.*, 2005)** en el cual se pulverizó tejido vegetal (hojas de laurel) con nitrógeno líquido y se pesó de 30 a 40 mg. La muestra se colocó en un tubo Eppendorf y se añadió 1 ml de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH7.5, 1% de CTAB, 140 mM beta-mercaptoetanol) a 65°C para mezclar posteriormente en vortex. Se incubó a 65°C por 15 minutos invirtiendo el tubo ocasionalmente. Posteriormente, se añadieron 600 µl de cloroformo y se mezcló por inversión durante 10 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 15,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo donde se le colocó 700 µl de isopropanol frío, se mezcló gentilmente y se colocó a -80°C durante 10 minutos. Se centrifugó durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en buffer TE

(10 mM Tris, 1 mM EDTA pH8). Se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría a 260 nm y se verificó la integridad de la molécula mediante electroforesis en gel de agarosa.

El quinto protocolo utilizado fue **del kit comercial Fermentas "Genomic DNA Purification Kit # 0512"**, el cual consintió en pulverizar tejido vegetal (hojas de laurel) con nitrógeno líquido y se pesó de 50 a 100 mg de tejido, posteriormente este material se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se resuspendió en 200 μ l de buffer TE (Tris-EDTA). Posteriormente se añadió 400 μ l de solución de lisis al tubo con la muestra de material vegetal y éste se incubó en un baño maría a 65°C durante 10 minutos con agitaciones constantes. Inmediatamente se adicionó 600 μ l cloroformo y se mezcló el tubo mediante inversión de 3 a 5 veces. Para posteriormente centrifugar a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se preparó una solución de precipitado, mezclando 720 μ l de agua estéril desionizada con 80 μ l de solución concentra 10x. Una vez centrifugada la muestra, se separó la fase acuosa y ésta se colocó en un tubo nuevo para adicionar 800 μ l de la solución de precipitado ya preparada en el paso anterior. Se mezcló gentilmente varias veces por inversión a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se removió el sobrenadante por completo y se disolvió la pastilla que contenía el ADN en 100 μ l de la solución de NaCl 1.2 M y se mezcló gentilmente en vortex. Se añadieron 300 μ l de etanol frío para dejar que el ADN se precipitara y la muestra se incubó durante 10 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos, se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%, se secó la misma y se disolvió el 100 μ l de agua

estéril desionizada. Se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría a 260 nm y se verificó la integridad de la molécula mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se realizó extracción de ADN de papaya (Morales *et al.*, en prensa) para ser utilizado como control dentro del análisis estadístico, la cual consistió en congelar tejido de papaya y posteriormente se pulverizó para colocar de 3 a 5 mg de tejido en un tubo Eppendorf al cual se le agregaron 600 μ l de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.5 M CTAB, 2% beta-mercaptoetanol). Se incubó la muestra a 65°C durante 10 minutos agitando constantemente para después colocar en hielo por 5 minutos, a la cual se le agregó 100 μ l de NaCl 5M y se dejó reposar durante 5 minutos, se agregó un volumen de fenol-cloroformo 1:1 y se agitó vigorosamente. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos para obtener la fase acuosa y colocarla en un tubo nuevo, se agregaron 4 μ l de RNAasa y se dejó incubar a 37°C durante 1 hora. Se aforó la muestra a 200 μ l con agua estéril y se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó para centrifugar durante 5 minutos a 12,000 rpm. Se precipitaron los ácidos nucleicos con 200 μ l de NaCl 5M y un volumen de isopropanol, se incubó durante 20 minutos a -20°C y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos para descartar el sobrenadante. Posteriormente se realizaron tres lavados de la pastilla con etanol al 70%, se decantó y se dejó secar la misma para posteriormente resuspender en 50 μ l de agua estéril desionizada. Se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría a 260 nm y se verificó la integridad de la molécula mediante electroforesis en gel de agarosa. Para establecer la pureza y

cantidad de ADN se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS con el cual se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, datos que se utilizaron en la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] = D.0260 * 50 * \text{factor de dilución}/1000$$

La pureza se estableció mediante la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm de la muestra de ADN, cuando la relación se encuentra en el rango de 1.7 a 2.0 se considera que el ADN es puro, cuando el valor sale de ese rango se considera que la muestra aún esta contaminada.

6.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA TECNICA RAPD

Como análisis preliminar se trabajó con los oligonucleótidos OPA-01, OPA-03, OPA-11 y OPA-13. Los cuales fueron utilizados primeramente para la amplificación de cactáceas (De la Rosa M., 2004), sin embargo, debido a que con dichos oligonucleótidos no se obtuvo amplificación, se procedió a probar varios ciclos de temperaturas utilizados para otras especies (Simioniuc D., *et al.*, 2002., Fuentes G., *et al.*, 2000., Rojas G., *et al.*, 2007, Ferreyra L., *et al.*, 2006., Arroyo-García R., *et al.*, 2001., Oginuma K., *et al.*, 2006.), sin resultados relevantes, por lo que se procedió a comprar la serie completa de los 20 oligonucleótidos OPA (Operon Technologies) (Tabla 1), así como determinar las temperaturas de amplificación de acuerdo a nuestro propio criterio y se establecieron las siguientes condiciones de amplificación:

94°C (3 min.)
94°C (1 min.)
40°C (1 min.)
72°C (1 min.)
72°C (5 min.)

Tabla 1. Temperaturas de alineamiento para la amplificación de *Litsea glaucescens* K.

Se probaron los 20 oligonucleótidos que se mandaron sintetizar, en muestras de ADN de laurel. Para la realización de este análisis se utilizó el ADN de laurel extraído con el método comercial del kit Fermentas*. Se usaron 100 ng de ADN por reacción. Para la mezcla de reacción PCR se siguió el protocolo comercial Fermentas-PCR Master Mix (2X), el cual contiene la enzima Taq polimerasa, nucleótidos, magnesio y amortiguadores para la reacción, los ingredientes se mezclaron en tubos para PCR de 500 µl con tapa plana con las siguientes cantidades de acuerdo al oligonucleótido utilizado (véase Tabla 2):

PCR Master Mix	12.5 µl
ADN	100 nm
Oligonucleótido*	4.5 µl
Agua (aforar a)	25 µl

Tabla 2 Mezcla de reacción para amplificación de fragmentos RAPDS en *Litsea glaucescens* Kunth

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador TECHNE TC 412, el que se programó para 45 ciclos con las condiciones de temperatura anteriormente mencionadas. Para la electroforesis se realizó un gel de agarosa 1.7% en TAE 1.7x. Se cargaron en el gel 12.5 µl de la muestra de cada reacción y a la vez

se utilizó un marcador de peso molecular (PCR marker No. P9577 de SIGMA). Se corrió cada gel a 50 V durante 4 horas. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 5 minutos, posteriormente se destiñó, colocando el gel en TAE durante 10 a 15 minutos, una vez desteñido el gel fue colocado en un transiluminador con luz ultravioleta para observar las regiones amplificadas por los oligonucleótidos utilizados.

Los geles se digitalizaron y se analizaron, los que dieron más amplificaciones; de éstos fueron los: OPA-3, OPA-4, OPA-10, OPA-13, OPA-18. Dichos oligonucleótidos o iniciadores fueron utilizados en las muestras de ADN de laurel colectadas de las diferentes regiones del estado como son 20 muestras de sierra fría, 20 muestras de Sierra de Laurel, 5 muestras de la estación biológica UAA, 5 muestras de material de laurel *in vitro*, así como 15 muestras colectadas en la sierra de Álvarez del estado del San Luis Potosí y una muestra de papaya utilizada como referencia para el análisis estadístico. Con lo cual se realizaron un total de 326 reacciones de PCR con las condiciones anteriormente mencionadas usando 5 oligonucleótidos diferentes para cada muestra. Los geles obtenidos de los 325 análisis RAPD fueron digitalizados mediante un analizador de imágenes con transiluminador marca UVP con software Doc-it-LS y almacenado en un disco duro para su posterior análisis estadístico.

Tabla 3. Secuencia del juego de oligonucleótidos OPA de la marca Operon Technologies*

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Concentración del oligonucleótido	Cantidad utilizada en la reacción
OPA01	5' -CAGGCCCTTC-3'	150.25 µg/ µm	4.5 µl
OPA02	5' -TGCCGAGCTG-3'	148.18 µg/ µm	4.5 µl
OPA03	5' -AGTCAGCCAC-3'	143.00 µg/ µm	4.8 µl
OPA04	5' -AATCGGGCTG-3'	157.47 µg/ µm	4.5 µl
OPA05	5' -AGGGGTCTTG-3'	152.39 µg/ µm	4.5 µl
OPA06	5' -GGTCCCTGAC-3'	187.41 µg/ µm	3.6 µl
OPA07	5' -GAAACGGGTG-3'	158.97 µg/ µm	4.5 µl
OPA08	5' -GTGACGTAGG-3'	139.37 µg/ µm	5.1 µl
OPA09	5' -GGGTAACGCC-3'	152.20 µg/ µm	4.5 µl
OPA10	5' -GTGATCGCAG-3'	138.28 µg/ µm	5.1 µl
OPA11	5' -CAATCGCCGT-3'	181.69 µg/ µm	3.6 µl
OPA12	5' -TCGGCGATAG-3'	150.26 µg/ µm	4.5 µl
OPA13	5' -CAGCACCCAC-3'	147.78 µg/ µm	4.5 µl
OPA14	5' -TCTGTGCTGG-3'	167.26 µg/ µm	4.2 µl
OPA15	5' -TTCCGAACCC-3'	158.61 µg/ µm	4.2 µl
OPA16	5' -AGCCAGCGAA-3'	141.57 µg/ µm	4.8 µl
OPA17	5' -GACCGCTTGT-3'	186.48 µg/ µm	3.6 µl
OPA18	5' -AGGTGACCGT-3'	243.68 µg/ µm	2.7 µl
OPA19	5' -CAAAGCTCGG-3'	192.84 µg/ µm	3.6 µl
OPA 20	5' -GTTGCGATCC-3'	154.80 µg/ µm	4.5 µl

6.4 TIPO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA

Se integraron los resultados obtenidos de los 326 geles digitalizados de 20 muestras de laurel, provenientes de Sierra Fría, 20 muestras provenientes de Sierra de Laurel, 15 muestras provenientes de la Sierra de Álvarez, S.L.P, 5 muestras provenientes de la Estación Biológica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, 5 muestras provenientes de material *in vitro* tomadas del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de Universidad

Autónoma de Aguascalientes y una muestra de papaya como referencia.

Las bandas obtenidas del análisis RAPD para cada gel se enumeraron con el número 1 para la primera banda y así sucesivamente en orden ascendente hasta llegar a la banda con menos peso molecular. Se asumió que las bandas con el mismo peso molecular en individuos diferentes fueron idénticas. Para cada individuo, la presencia ó ausencia de cada banda se determinó designando el número 1 a la banda presente y con el número 0 a la banda ausente y de esta manera obtener una matriz de ceros y unos que fue utilizada en el programa STATISTICA versión 7.0 para calcular las distancias genéticas entre individuos realizando un análisis de similaridad (distancias euclideanas) estimando el coeficiente de apareamiento simple. La matriz de distancias genéticas se utilizó para producir un dendograma por el método de Ward. Dicho dendograma se realizó utilizando la matriz de ceros y unos obtenidas de los resultados de los análisis RAPD usando los comandos *Statistics – multivariate exploratory techniques – Cluster analysis* y finalmente el comando *joining (tree crustering)* para obtener la grafica final que agrupa a todos los individuos de Laurel Silvestre muestreados, en diferentes grupos según su localización y similaridad genética.

7. RESULTADOS

7.1 UBICACIÓN DE LAS POBLACIONES Y COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se ubicaron poblaciones de laurel en Sierra Fría (Tabla 4, Figura 2) y en Sierra de Laurel (Tabla 5, Figura 3), Estación Biológica UAA (Tabla 6, Figura 4) y Sierra de Álvarez, S.L.P. (Tabla 7, Figura 5). En la primera, se localizaron tres poblaciones; dos de ellas entre 30 y 40 arbustos, de estas poblaciones se tomaron 20 muestras de hojas, las cuales fueron almacenadas a 4°C en una hielera para su posterior traslado al laboratorio, donde se congelaron a -80°C. Cabe señalar que la situación en esta área es la más afectada ya que se encontraron pocos individuos de Laurel Silvestre adultos y los que se localizaron se encontraban adentrados en zonas de difícil acceso que sin embargo, presentaban señales evidentes de saqueo (Figura 6).

En Sierra de Laurel se tomaron muestras de hojas provenientes de 20 individuos de laurel. La mayoría de ellos mostraban apariencia de arbustos de aproximadamente 1 a 1.5 m de alto, excepto 5 muestras que pertenecen a individuos adultos (Árboles) de aproximadamente 15 m de altura (Figura 8). La situación del Laurel Silvestre no es diferente a la encontrada en Sierra Fría ya que también se encontró evidencia de saqueo (Figura 7) sin embargo, en esta zona se observó que hay más arbustos y árboles de laurel que los encontrados en Sierra Fría.

Se colectaron 5 individuos de la estación Biológica UAA así como 20 de la Sierra de Álvarez en San Luis Potosí. En esta última

área la situación con el Laurel Silvestre fue muy diferente a la encontrada en el estado de Aguascalientes ya que mientras que en este último, los pocos representantes de la especie *Litsea glauscecens* Kunth se encuentra en zonas de difícil acceso, en la Sierra de Álvarez, S.L.P., se pudieron encontrar arbustos incluso en las inmediaciones de los pueblos cercanos a la Sierra (Figura 9).



Tabla 4. Localización de poblaciones la laurel en Sierra Fría, San José de gracia, Aguascalientes.

	Coordenadas	No. De muestras
Población 1	22° 09´ 277´´ 102° 35´ 154´´	8
Población 2	22° 09´ 248´´ 102° 35´ 106´´	8
Población 3	22° 09´ 015´´ 102° 35´ 106´´	4
TOTAL		20

*Donde la primera coordenada es igual a latitud grados norte y la segunda a longitud grados oeste

MAPA SIERRA FRÍA, AGUASCALIENTES

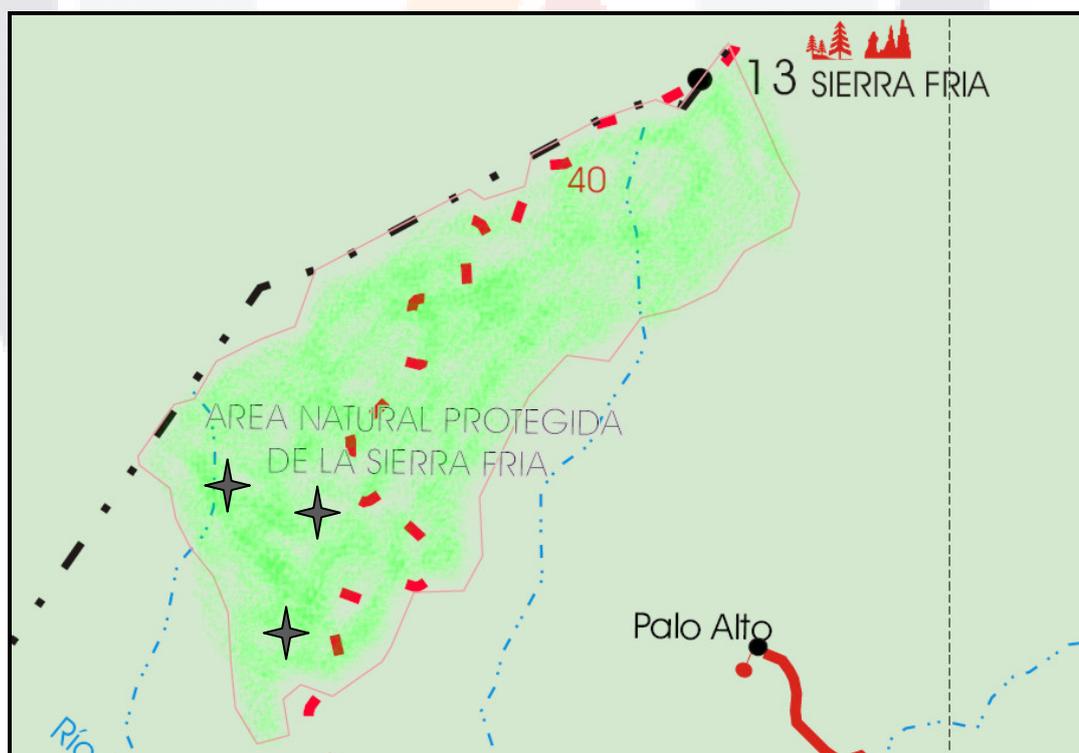


Figura 2. Mapa de área natural protegida de la Sierra Fría donde se observan los puntos de colecta de hojas de laurel en dicha zona. Las estrellas representan las coordenadas aproximadas de las coordenadas de la Tabla 1.

Tabla 5. Localización de poblaciones la laurel en Sierra del Laurel, Calvillo, Ags.

	Coordenadas	No. De muestras
Población 1	21° 46.947 ' 102° 39.255 '	6
Población 2	21° 47.158 ' 102° 39.081 '	8
Población 3	21° 06.466 ' 100° 36.741 '	6
TOTAL		20

*Donde la primera coordenada es igual a latitud grados norte y la segunda a longitud grados oeste.

MAPA SIERRA DE LAUREL , AGUASCALIENTES

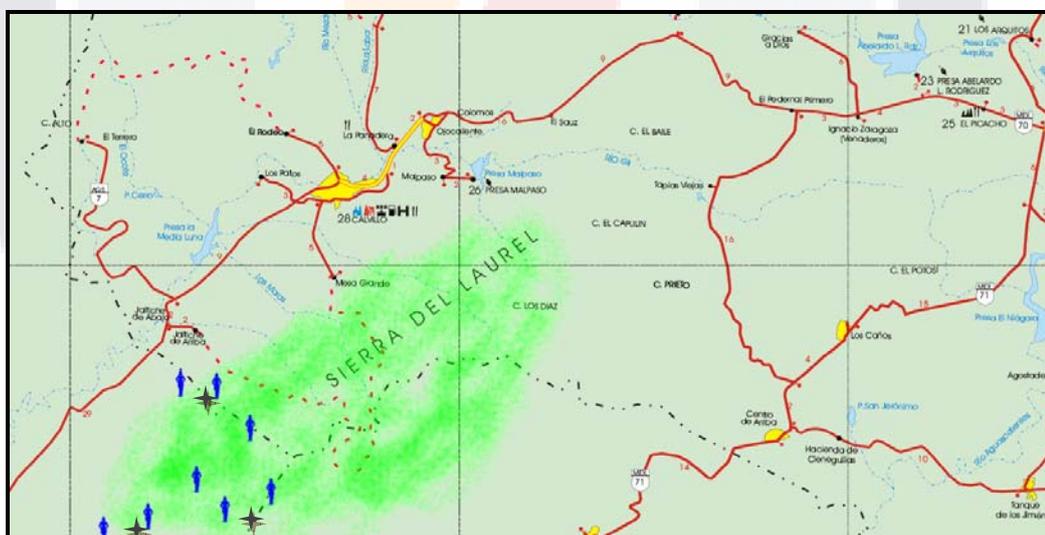


Figura 3. Puntos de colecta en Sierra de Laurel. Las figuras azules representan el área de colecta de las hojas de laurel y las estrellas corresponden a las coordenadas de la Tabla 2.

Tabla 7. Localización de poblaciones la laurel en Sierra de Álvarez, San Luis Potosí

	Coordenadas	No. De muestras
Población 1	22° 09.376 ' 100° 37.469 '	5
Población 2	22° 09.189 ' 100° 37.439 '	5
Población 3	22° 06.466 ' 100° 36.741 '	5
TOTAL		15

*Donde la primera coordenada es igual a latitud grados norte y la segunda a longitud grados oeste

MAPA SIERRA DE ÁLVAREZ, SAN LUIS POTOSI



Figura 5. Mapa que muestra el área natural protegida Sierra de Álvarez, S.L.P. Las estrellas representan las coordenadas aproximadas de colecta de hojas de Laurel silvestre.



Figura 6.- Planta de laurel en Sierra Fría. Se aprecia una rama que fue cortada y un nuevo arbusto creciendo a un costado de la misma, coordenadas: $22^{\circ} 09' 277''$ / $102^{\circ} 35' 154''$.



Figura 7.- Planta de laurel en Sierra de Laurel. Se aprecia el tronco de un árbol que fue talado por completo, coordenadas: $21^{\circ} 06.466'$ / $100^{\circ} 36.741'$



Figura 8.- Árbol de laurel en área protegida Sierra de Laurel. Coordenadas: 21° 47.158' / 102° 39.081'



**Figura 9.- Arbusto de laurel en área protegida Sierra de Álvarez, San Luis Potosí.
Coordenadas: 22° 09.376' / 100° 37.469'**

7.2 IMPLEMENTACION DE LA TECNICA PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

Se probaron 5 diferentes protocolos para extracción de ADN de laurel: Protocolo para extracción de guayaba, papa y nopal (Morales *et al.*, en prensa), protocolo para agave (Keb *et al.*, 2002), protocolo para plantas mucilaginosas (Echevarria *et al.*, 2005), protocolo para diferentes especies usando sílica (Tapia *et al.*, 2005) y protocolo del kit comercial de Fermentas "Genomic DNA Purification Kit # 0512". El protocolo del Kit Fermentas y la modificación del protocolo Tapia *et al.*; 2005, son los que dieron los mejores resultados, con este último método se obtuvo un rendimiento de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN con 300 mg de muestra. Así mismo el kit de extracción Fermentas nos dio rendimientos de 2-10 μg de DNA con 100 mg de tejido. Las muestras de ADN fueron visualizadas en geles de agarosa al 0.8% bajo luz ultravioleta (Figura 10).

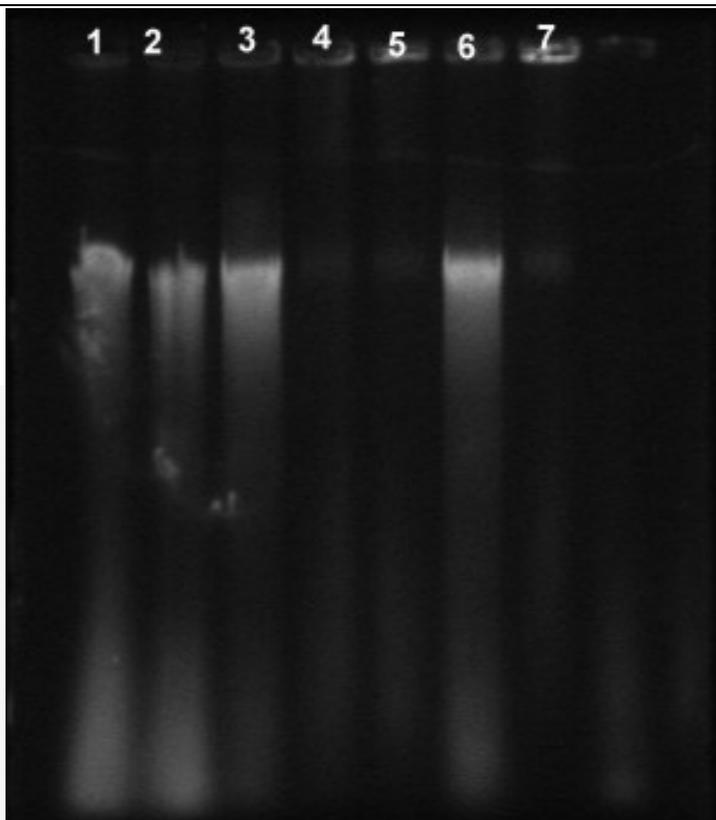


Figura 10.- Electroforesis de ADN de laurel en gel de agarosa 0.8%. Carriles 1, 2, 3 y 6 corresponden a extracción con método comercial, mientras que los carriles 4, 5 y 7 muestran extracción con método sílica modificado en laboratorio.

7.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA TECNICA RAPD

Como análisis preliminar se trabajó con los oligonucleótidos OPA-01, OPA-03, OPA-11 y OPA-13. Los cuales fueron utilizados primeramente para la amplificación de cactáceas (De la Rosa M., 2004), sin embargo, debido a que con dichos oligonucleótidos no se obtuvo amplificación, se procedió a probar varios ciclos de temperaturas utilizados para otras especies (Simioniuc D., *et al.*, 2002., Fuentes G., *et al.*, 2000., Rojas G., *et al.*, 2007, Ferreyra L., *et al.*, 2006., Arroyo-García R., *et al.*, 2001., Oginuma K., *et al.*, 2006.), sin resultados relevantes, aunque estableciendo de esta manera las temperaturas de alineamiento para la especie de *Litsea glauscescens* K. (Figura 11) posterior a esto se procedió a comprar la serie completa de los 20 oligonucleótidos OPA (Operon Technologies) (Tabla 1), así como determinar las temperaturas de amplificación de acuerdo a nuestro propio criterio tomando en cuenta diversos artículos mencionados anteriormente (Tabla 8) y se establecieron las siguientes condiciones de amplificación:

94°C (3 min.)
94°C (1 min.)
40°C (1 min.)
72°C (1 min.)
72°C (5 min.)

Tabla 8. Temperaturas de amplificación del Laurel silvestre utilizando oligonucleótidos de la serie OP-A.

Se adecuaron las condiciones para los análisis RAPD . De los 20 oligonucleótidos decámeros de la serie OPA, 5 fueron útiles para el propósito del trabajo (Figura 12). El resto se descartó por no tener buena resolución o no detectar polimorfismo. En la Tabla 9 se presentan los resultados del polimorfismo detectado para cada

iniciador. En total se generaron 72 bandas de las cuales en su mayoría fueron bandas polimórficas. Los iniciadores OPA-3 (13 bandas), OPA-04 (12 bandas), OPA-10 (10 bandas), OPA-13 (16 bandas), OPA-18 (12 bandas), OPA-20 (9 bandas), fueron los que generaron mayor número de bandas (Figura 12, Tabla 9).

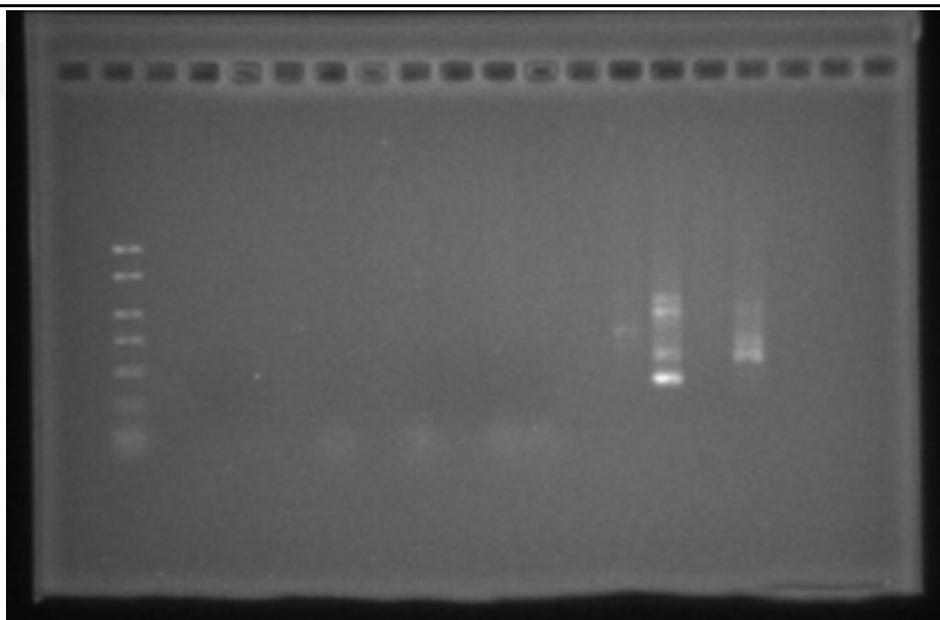


Figura 11. Análisis preliminar RAPDS para laurel, donde se estableció la temperatura de alineamiento. En los primeros carriles se colocó ADN de cactáceas y en los últimos ADN de laurel.

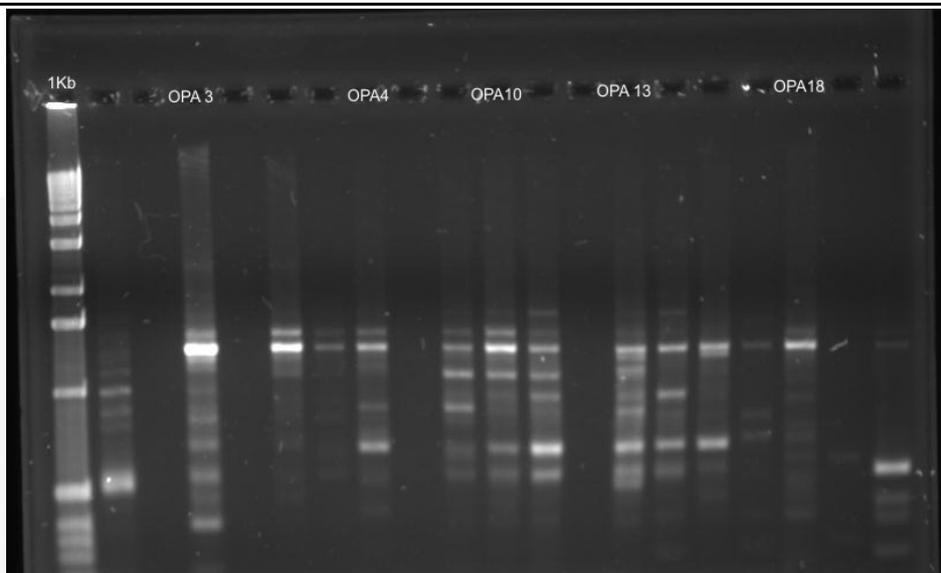


Figura 12. Análisis RAPDS de laurel, de la serie de 20 oligos OPA se seleccionaron 5 que dieron mayor número de bandas.

Tabla 9. Lista de iniciadores y sus secuencias, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por región geográfica y polimorfismo total.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Productos amplificados	Polimorfismo por región geográfica					Polimorfismo total (%)
			Sierra fría	Sierra laurel	Estación Biol.	Sierra Álvarez	Material in vitro	
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	**NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	13	50.0	16.7	25.0	41.7	16.7	66.7
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	12	40.0	80.0	30.0	70.0	8.0	90.0
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-06	5'-GGTCCTGAC-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	10	33.3	33.3	11.1	33.3	22.2	77.0
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	16	35.3	17.7	5.9	11.8	17.6	64.7
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-17	5'-GACCGCTTGT-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'	12	46.7	26.7	33.3	33.3	25.0	86.7
OPA-19	5'-CAAAGCTCGG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'	9	25.0	12.5	35.9	25.0	25.0	62.5

**NA= No amplificó

Una vez establecida la temperatura de alineamiento y los oligonucleótidos que más bandas amplificaron, se procedió a realizar el análisis RAPD a los individuos de todas las poblaciones que se colectaron tanto de Sierra Fría (Figura13), Sierra de Laurel (Figura 14), Estación Biológica UAA (Figura 16), materiales *in vitro* (Figura 17) e individuos provenientes de sierra de Álvarez, San Luis Potosí (Figura 15) obteniendo los siguientes resultados:

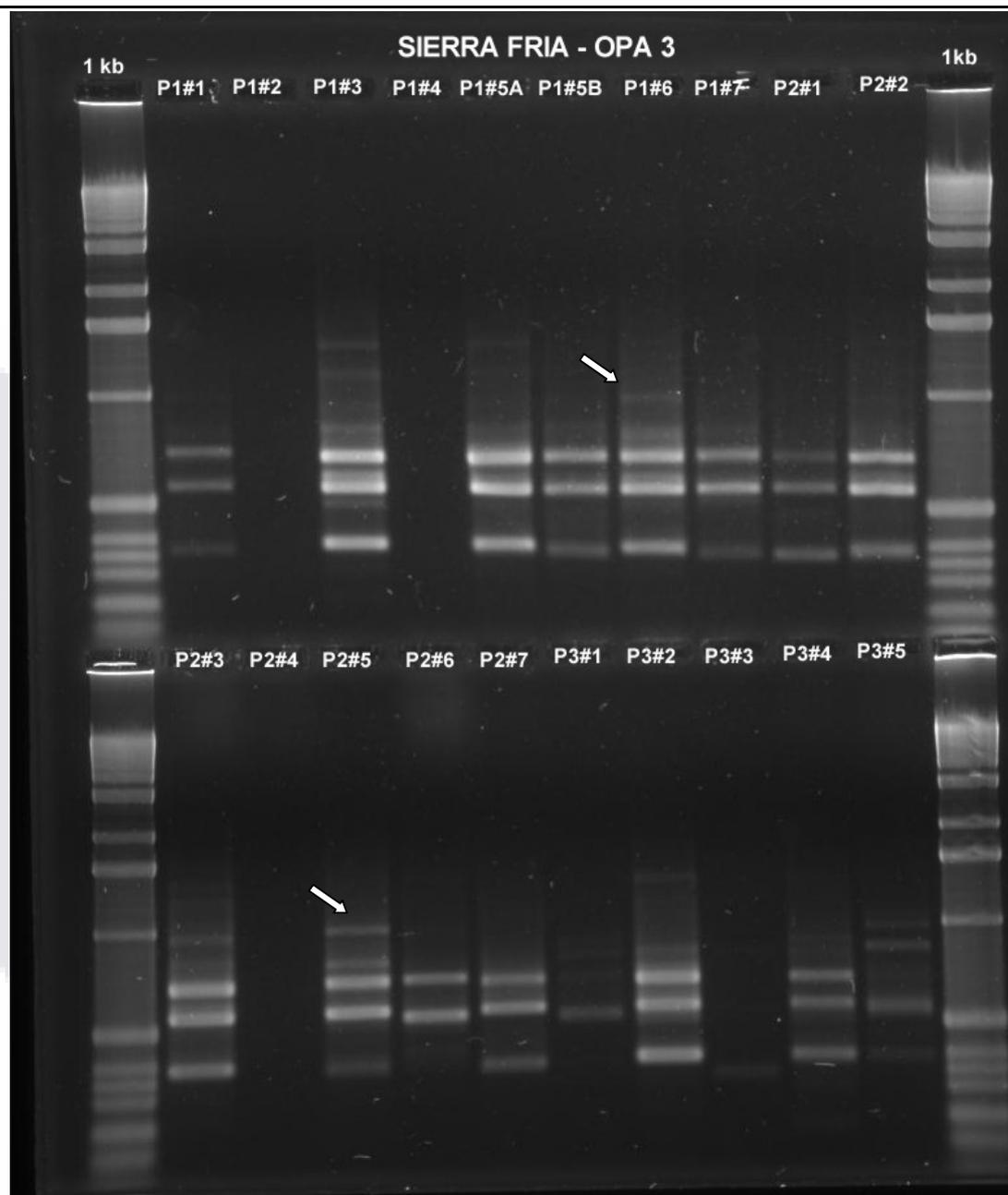


Figura 13. Análisis RAPDS de laurel, utilizando el oligo OPA 3 para muestras provenientes de Sierra Fría, municipio de San José de Gracia, Aguascalientes. A manera de ejemplo la fecha señala una de las bandas que resultaron polimórficas.

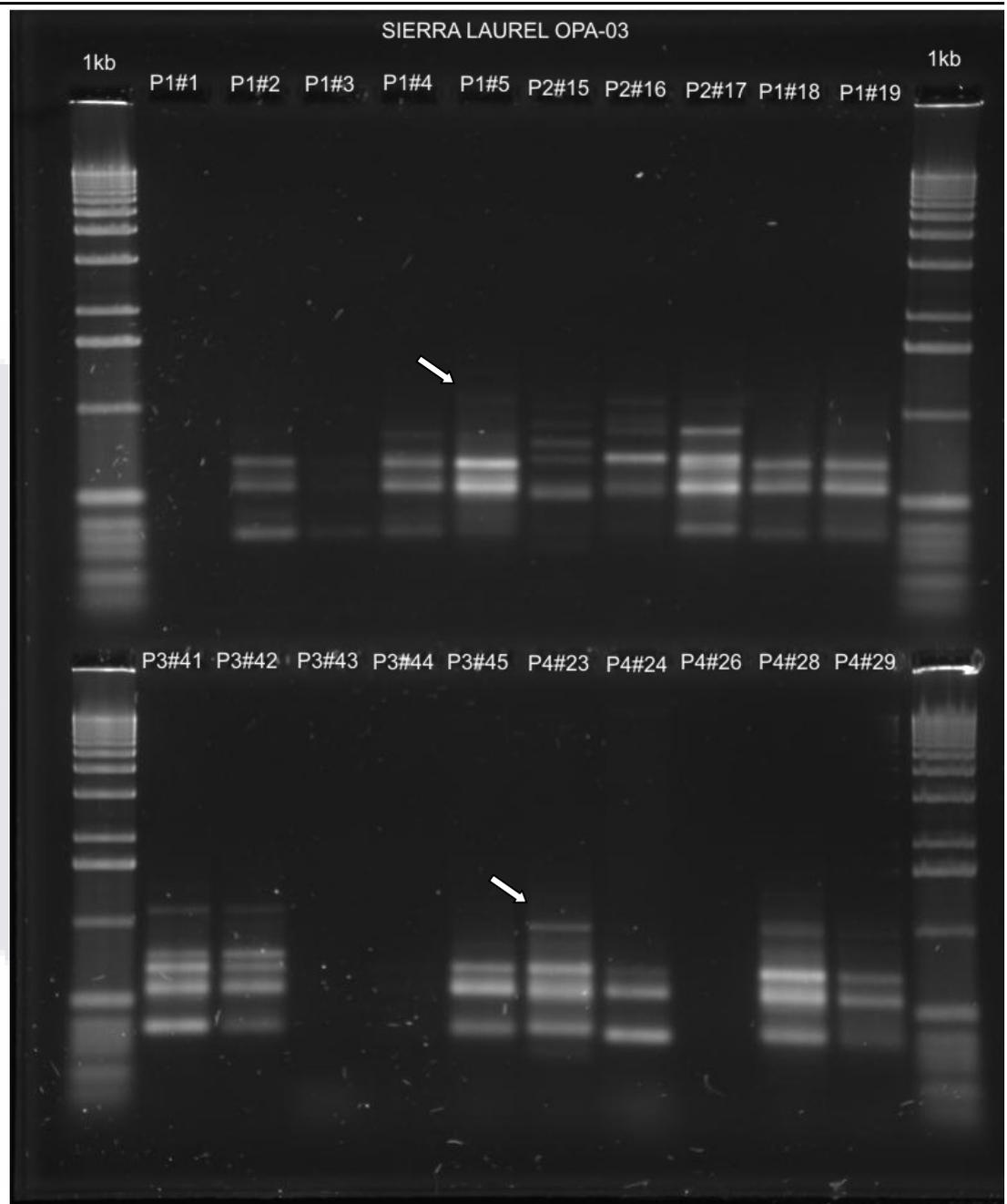


Figura 14. Análisis RAPDS de laurel, utilizando el oligo OPA 3 para muestras provenientes de Sierra de Laurel, municipio de Calvillo, Aguascalientes. A manera de ejemplo la fecha señala una de las bandas que resultaron polimórficas.

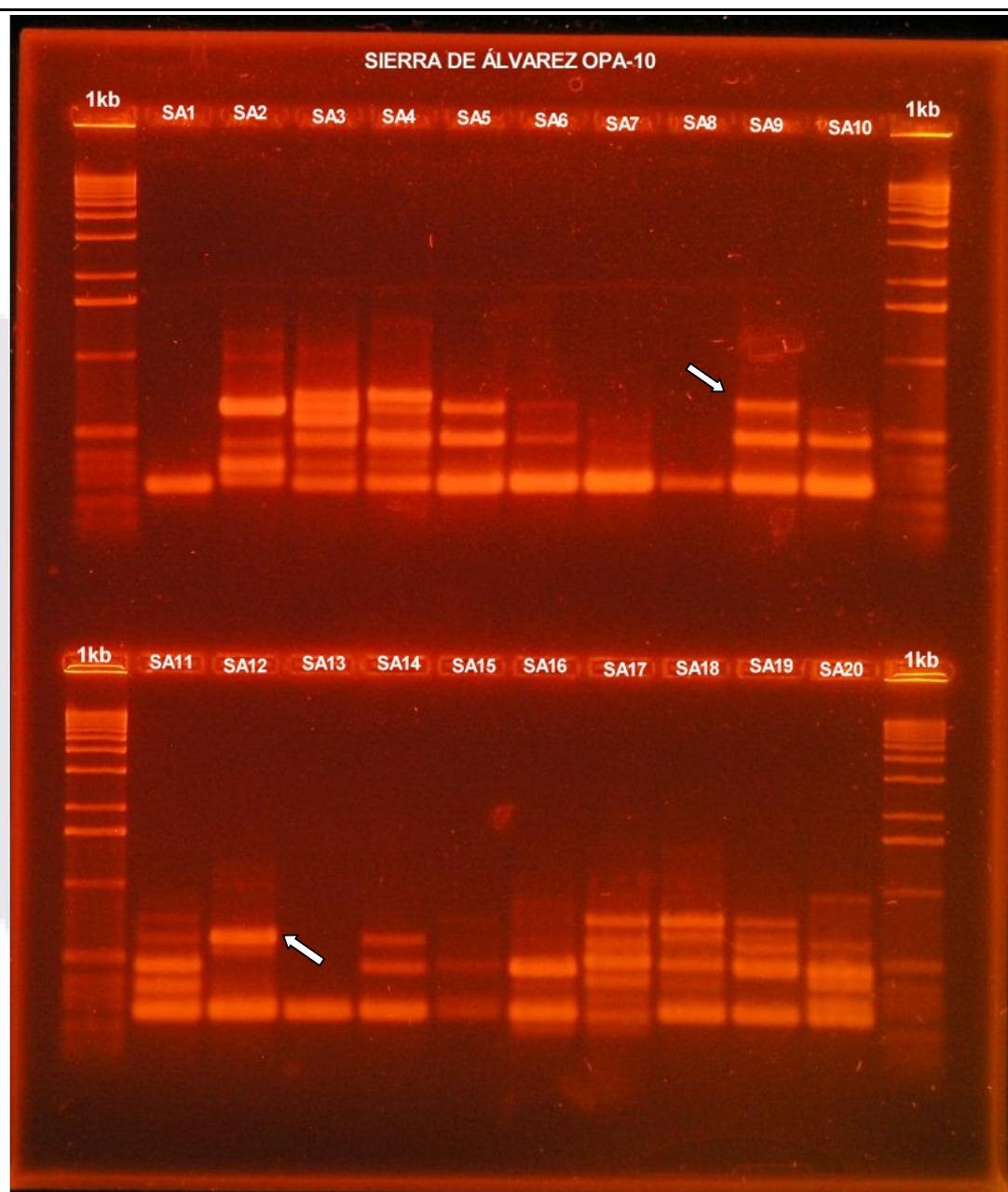


Figura 15. Análisis RAPDS de laurel, utilizando el oligo OPA 10 para muestras provenientes de sierra de Álvarez, San Luis potosí. A manera de ejemplo la fecha señala una de las bandas que resultaron polimórficas.

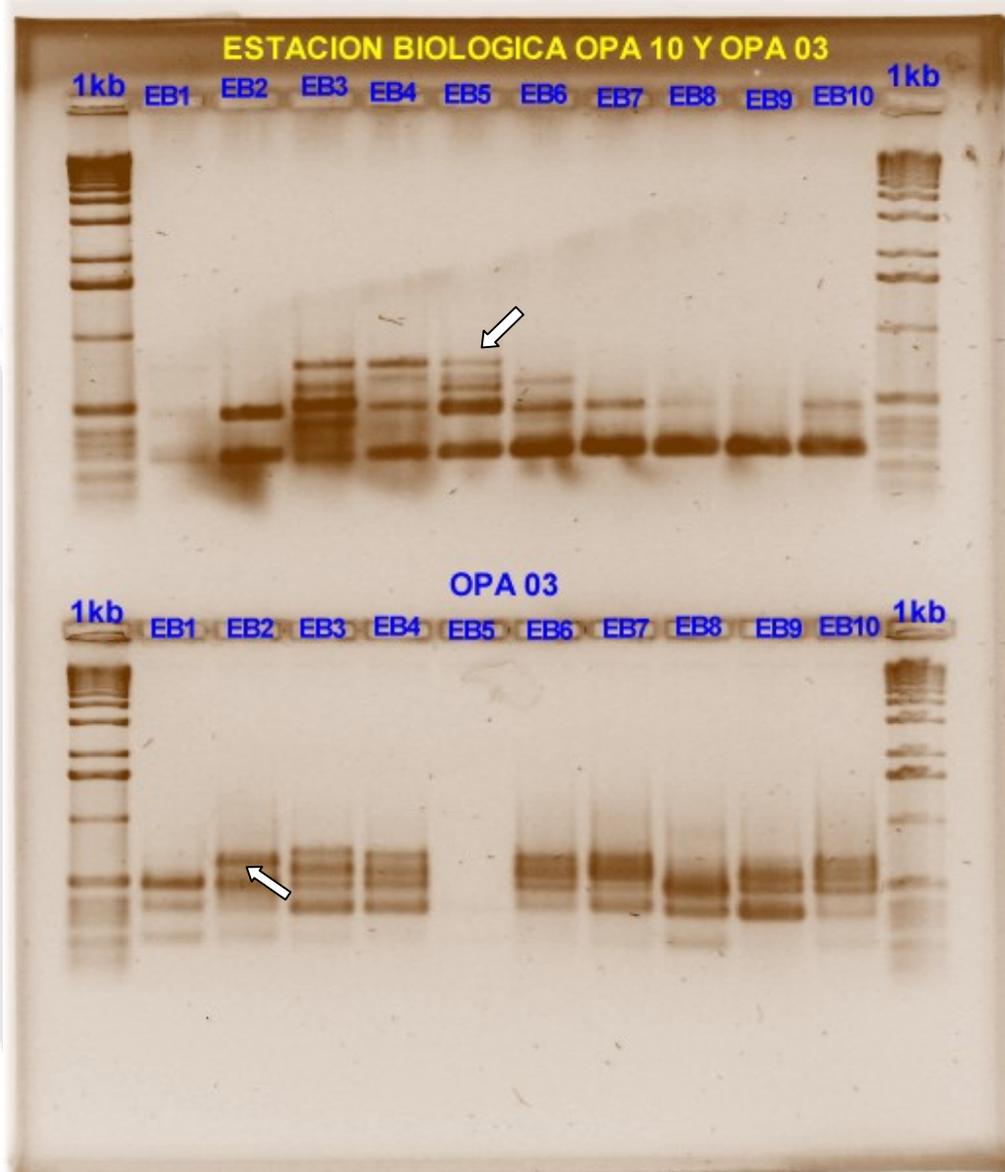


Figura. 16. Análisis RAPDS de laurel, utilizando los oligos OPA-10 y OPA-3 para muestras provenientes de la Estación Biológica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, localizada en Aguas Zarca, municipio de San Jose de Gracia. A manera de ejemplo la fecha señala una de las bandas que resultaron polimórficas.

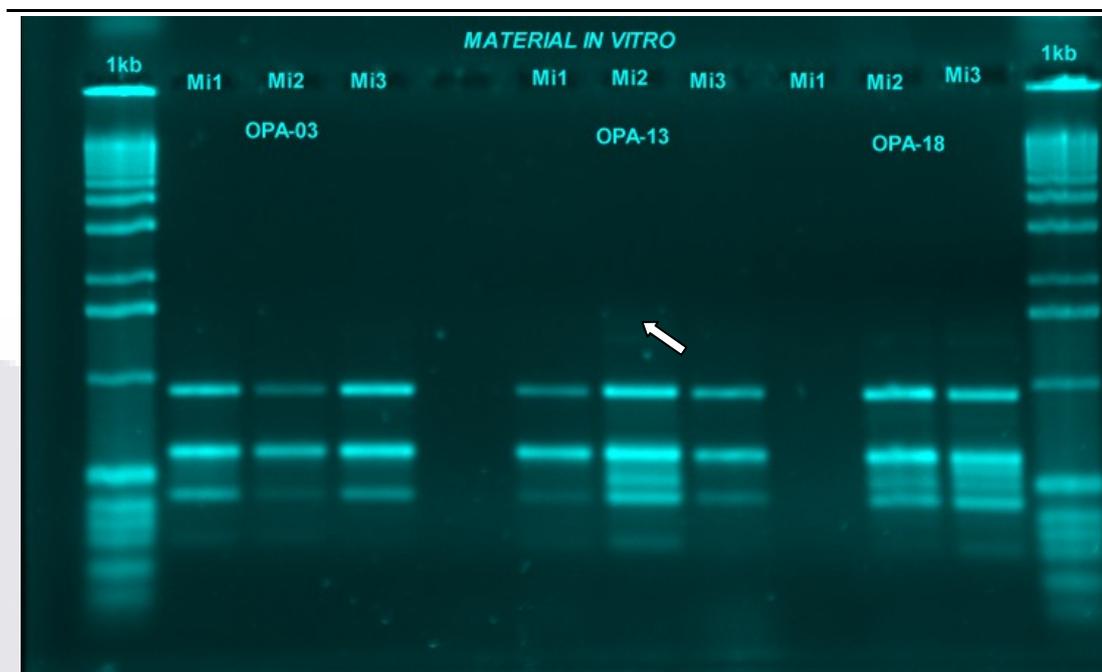


Figura 17. Análisis RAPDS de laurel, utilizando los oligos OPA-03, OPA-13 y OPA-18 para muestras provenientes de material *in vitro* del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. A manera de ejemplo la fecha señala una de las bandas que resultaron polimórficas.

Así mismo se realizó un comparativo entre análisis RAPD con ADN de laurel y análisis RAPD con ADN de papaya utilizando los 5 de los oligonucleótidos que amplificaron para laurel (Figura 18), obteniendo de esta manera un control que fue utilizado en el análisis estadístico como ancla para el dendograma final.

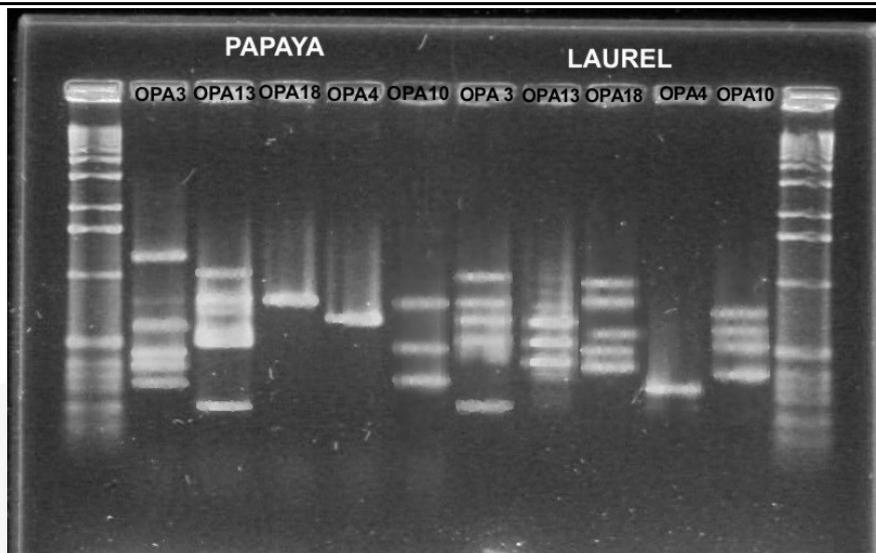


Figura 18. Análisis RAPDS, utilizando los oligos OPA-3, OPA-13, OPA-18, OPA-4 y OPA-10 para muestras de papaya y Laurel.

7.4 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico (Figura 19) mostró que todos los individuos que fueron sometidos a la prueba se trataban de la misma especie ya que todos éstos, se ubicaron por debajo del 5% de variación en un mismo grupo alejando a este grupo del material de papaya fue utilizado como control y ancla del dendograma. La Figura 19 muestra que en general, éste, divide a los laureles en dos grandes grupos, individuos provenientes de la sierra de Álvarez de San Luis Potosí e individuos provenientes del la Sierra de Laurel y de la Sierra Fría, la grafica agrupa a todos los individuos tanto de sierra fría como de Sierra de Laurel en niveles diferentes a los de sierra de Álvarez, también observa que los individuos proveniente de material de laurel *in vitro* encajan perfectamente entre los laureles provenientes de Sierra del Laurel de donde fueron recolectados inicialmente.

ANALISIS ESTADISTICO

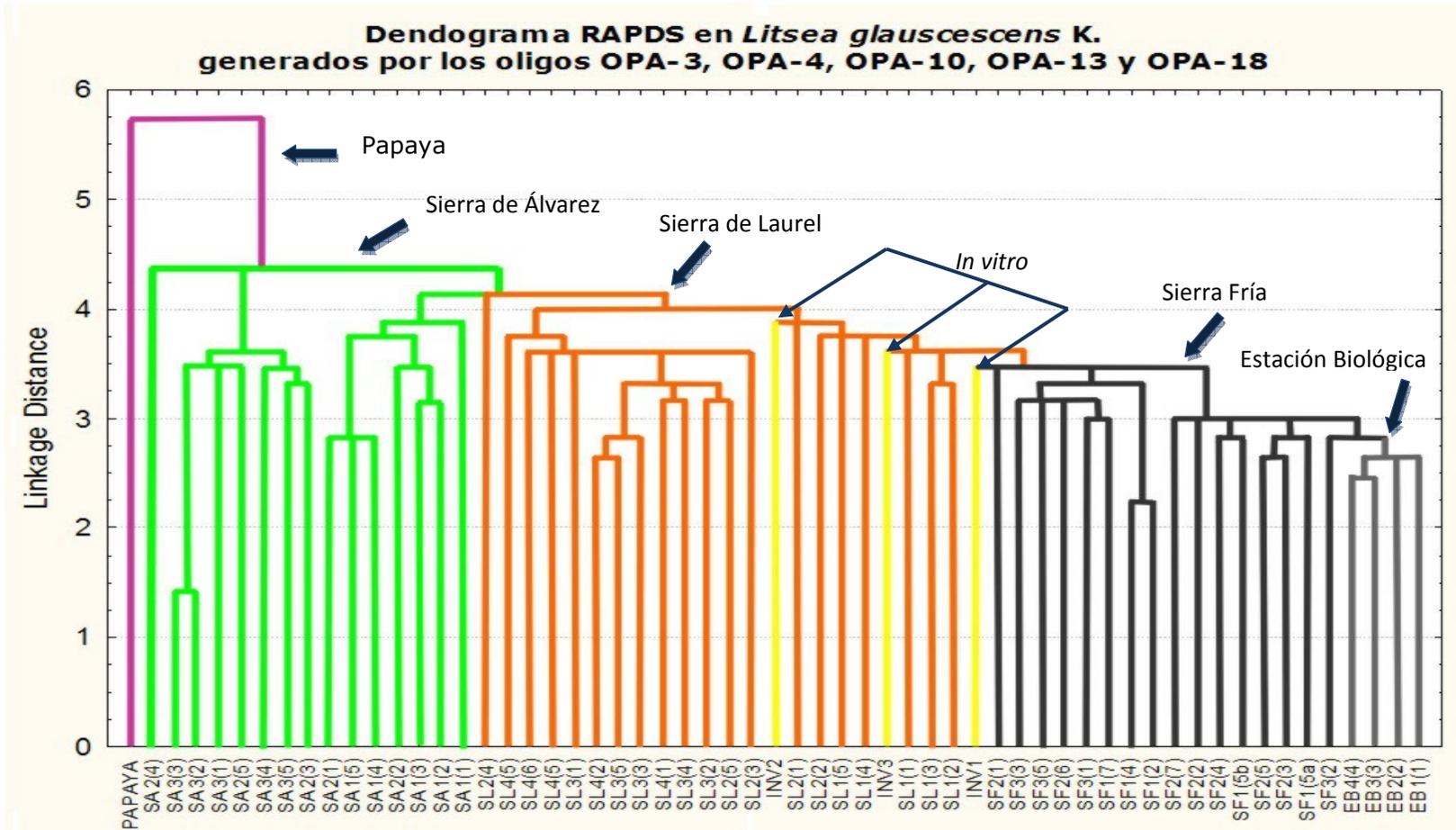


Figura 19. Dendograma obtenido del análisis estadístico para individuos de Laurel provenientes de Sierra Fría (SF), Sierra de Laurel (SL), Sierra de Álvarez (SA), Estación Biológica UAA (EB) y material *in vitro* (INV), usando como material de control una muestra de ADN de papaya.

8. DISCUSIONES

Se localizaron tres poblaciones de Laurel en Sierra Fría, dos de ellas con aproximadamente 30-35 individuos de la cuales se tomaron muestras de hoja de 15 individuos y en la tercera, que fue una población aislada, de aproximadamente 8 individuos se tomó muestra de 5 de ellos. Las poblaciones encontradas en Sierra Fría son en su mayoría arbustos de 1 a 1.5 m de altura y no se localizó ningún árbol; se identificaron secuelas del saqueo inmoderado que ha sufrido el laurel ya que las poblaciones encontradas en este lugar son de difícil acceso y aun así se identificaron arbustos de laurel con ramas cortadas a la mitad lo cual impide su desarrollo normal (Figura 6). Por otro lado, las poblaciones localizadas en Sierra de Laurel son en su mayoría arbustos de aproximadamente 1 a 2 m de altura los cuales presentaban también secuelas de saqueo como troncos secos de laurel y ramas cortadas a la mitad (Figura 7) sin embargo, se encontraron algunos de los pocos árboles de laurel que quedan en el estado, tratándose de individuos de aproximadamente 15 m de altura (Figura 8). Se observó que posiblemente la mayoría de estos árboles son hembras ya que presentaban floración y fruto. Esto puede ser explicado posiblemente a la gran presión de selección que ha sufrido la especie y la obliga de alguna manera a tener mayor número de hembras. Se ubicaron en Sierra de Álvarez, San Luis Potosí poblaciones de Laurel, cabe mencionar que en esta área natural protegida la situación ecológica del laurel es totalmente diferente a la de Aguascalientes ya que si bien no hay grandes arboles de laurel en esta Sierra, si hay mayor conservación ya que se podía encontrar arbustos de laurel cercanos a poblaciones e incluso

cercanos a los caminos de terracería que cruzan la Sierra (Figura 9), esto nos hace pensar que el Laurel Silvestre en dicha zona se esta recuperando poco a poco del saqueo que se produjo en años pasados.

En cuanto a la extracción de ADN de Laurel se probaron 5 protocolos diferentes: Protocolo para extracción de guayaba, papa y nopal (Morales *et al.*, en prensa), protocolo para agave (Keb *et al.*, 2002), protocolo para plantas mucilaginosas (Echevarria *et al.*, 2005), protocolo para diferentes especies usando sílica (Tapia *et al.*, 2005) y protocolo del kit comercial de Fermentas "Genomic DNA Purification Kit # 0512", con este último se obtuvo rendimientos de 2-10 µg de DNA con 100 mg de tejido procesado, por lo tanto, se procedió a realizar la extracción de ADN con este método y en seguida la implementación del análisis RAPD.

Para los análisis tipo RAPDS se utilizaron primeramente 7 oligonucleótidos de la serie OPA (Operon Technologies) esto fue con el fin de estandarizar las condiciones de amplificación y posteriormente trabajar con los 20 oligonucleótidos completos. En la primera amplificación se probaron las condiciones utilizadas por De la Rosa Carrillo M. (2003), para diferentes especies de cactáceas. Trabajando con estas condiciones no hubo amplificación ya que el laurel y las cactáceas no son especies relacionadas. De tal modo, se procedió a implementar un gradiente de temperaturas de alineamiento tomados de diferentes publicaciones como Li Je, *et al.*, 2004, Borrone J. W. *et al.* 2007, quienes utilizaron especies mas relacionadas con el Laurel Silvestre como lo son *Persea americana* y *Litsea complex*. Sobre estos datos se encontró que a

una temperatura de alineamiento de 40°C es posible la amplificación de los 7 oligos de la serie OPA, específicamente los OPA-1, OPA-3, OPA-11, OPA-13, OPA-16, OPA-18 y OPA-20 de los cuales solo OPA-1, OPA-13 y OPA-18 dieron mayor amplificación (Figura 12, Tabla 9). Se mandaron sintetizar la serie completa de los oligonucleótidos OPA y se probaron los 20 iniciadores de los cuales se seleccionaron 5 de ellos que son los que dieron mayor número de bandas polimórficas (Figura 12). Esta serie de amplificaciones mostró que el DNA obtenido es útil para el análisis RAPD y que las temperaturas de alineamiento son las correctas.

Una vez seleccionados los 5 oligonucleótidos con los que se trabajaría se procedió a realizar el análisis a las muestras de Sierra Fría (Figura 13), Sierra de Laurel (Figura 14), Sierra de Álvarez, S.L.P. (Figura 15), Estación Biológica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Figura 16), material de Laurel establecido *in vitro* proveniente del laboratorio de Biotecnología Vegetal del la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Figura 17), respectivamente. Así mismo se realizó un análisis RAPD con ADN de papaya (Figura 18) con el fin de tener una muestra control en el análisis estadístico.

En años recientes se ha reconocido que los marcadores de ADN basados en PCR son una herramienta poderosa para los análisis genéticos, así como para los programas de mejoramiento por su simplicidad y facilidad de manejo. La técnica RAPD ha sido la más usada en los últimos años, pese a sus problemas de reproductibilidad y a su carácter dominante (Tapia-Campos et al., 2005), sin embargo, en el presente trabajo se detectó que la

técnica RAPD es bastante buena y sencilla; siempre y cuando se tenga un buen control de los tiempos y de los materiales de laboratorio utilizados para la misma, ya que se observó que al cambiar algún componente de la técnica, ya fuera el tiempo de corrida en la electroforesis ó el tiempo de tinción del gel se observaban cambios drásticos, incluso con la misma muestra, por lo que se procedió a estandarizar tiempos y concentraciones de las soluciones utilizadas y la técnica no tuvo mayor problema.

Los polimorfismos producidos con la técnica RAPD se denominan marcadores RAPD y pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde. Como regla general, el tamaño de las variantes se detecta muy escasamente y los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus. En los estudios de herencia, los productos de amplificación se comportan como marcadores dominantes (Azofeita D. 2006). En el presente trabajo se encontró que los individuos provenientes de Sierra de Álvarez en San Luis Potosí, se dividían en diferentes grupos que los individuos provenientes de estado de Aguascalientes, esto debido precisamente una de las características de la técnica RAPD ya que esta detecta mutaciones puntuales.

Los RAPDS generan un número inmenso de marcadores y al contrario de los RFLPs, no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor (Phillips et al. 2005). Durante el análisis RAPD se dan

una serie de reacciones químicas en forma cíclica de manera similar a lo que ocurre en una reacción PCR pero contemplando la modificación mencionada anteriormente. La eficiencia de los marcadores RAPD puede estar influenciada por varios factores, entre ellos: El número de ciclos de amplificación, la cantidad de ADN inicial, la longitud del ADN, el iniciador y la temperatura.

Los marcadores RAPD han probado su utilidad en estudios aplicados y de tipo evolutivo, que incluyen construcción de mapas genéticos, obtención de marcadores genéticos ligados a caracteres fenotípicos específicos, determinación de relaciones filogenéticas y de parentesco, identificación de clones y de variables cultivadas e incluso se ha utilizado esta técnica como una herramienta forense para identificar variedades de fresa con un alto valor comercial que fueron utilizadas ilegalmente en regiones del sur de Italia sin contar los registros adecuados para su cultivo (Congiu L., *et al.*, 2000). Otros ejemplos son: la determinación de la variabilidad genética entre dos variedades de *Eucalyptus urophylla* mediante el uso de marcadores RAPDS (Gaiotto F., *et al.*, 2007), variabilidad morfométrica y molecular en una plantación de *Pinus patula* en Veracruz, México por medio de la técnica RAPD (Luna-Rodríguez M., *et al.*, 2005), Coherencia de la genética de poblaciones a partir de parámetros estimados con isoenzimas y RAPDs en las especies del género *Prosopis ssp.* (Ferreyra M., *et al.*, 2006), Diversidad genética entre diversos cultivares de chícharo mediante RAPDS (Simioniuc D., 2002). Así mismo dicha técnica se utilizó para el análisis de la diversidad genética de Laurel Silvestre en el presente trabajo.

De acuerdo con el análisis estadístico (Figura 19) se muestra que en general, éste, divide a los laureles en dos grandes grupos: el primero de ellos se trata de individuos provenientes de la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí y el segundo agrupa individuos provenientes de las Sierras de Aguascalientes (Sierra de Laurel y de la Sierra Fría), en la Sierra de Álvarez, se ven dos grupos claramente separados, el primero es completamente diferente a los de Aguascalientes, pero el segundo grupo de Sierra de Álvarez, SLP si es similar, esto puede ser explicado por dos razones, la primera, es que los individuos más cercanos a los de Aguascalientes son individuos provenientes de regiones distintas de Sierra de Álvarez que pudiera tener un hábitat parecido al de Aguascalientes y esto hace que los separe en dos, la segunda razón, puede ser que en Sierra de Álvarez se encuentren dos tipos de *Litsea* diferentes, pues investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México han observado que es posible que esta especie tenga una variante diferente a la que hoy en día conocemos como *Litsea glaucescens* Kunth, ya que una de las características distintivas de esta especie es que presentan la hoja glauca y sin embargo, en Sierra de Álvarez, se han encontrado individuos con todas las características de *Litsea glaucescens*, excepto por la hoja, que la presenta pubescente, aunque se necesitarían mas estudios para poder comprobar esta teoría.

En cuanto a los resultados de los individuos provenientes de Aguascalientes, el análisis estadístico divide a los laureles en dos grupos, el primero de ellos se trata de laureles de Sierra de Laurel y el segundo a laureles de Sierra Fría. Dentro de los organismos de

Sierra de Laurel se encuentran laureles colectados en dicha área que posteriormente fueron establecidos *in vitro* mediante técnicas biotecnológicas de cultivo de tejido vegetal. Dentro de los laureles de Sierra Fría se encuentran los organismos colectados de la Estación Biológica de la UAA esto resulta evidente ya que dicha Estación Biológica se encuentra ubicada dentro de los límites de Sierra Fría.

De manera general, los resultados agrupan a todos los individuos de Aguascalientes en niveles diferentes a los San Luis Potosí, lo que nos hace pensar que difieren en su constitución genética al menos en cuanto a la adaptación de éstos a su hábitat ya que las características de Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, si bien es muy parecida a la de las Sierras de Aguascalientes, la poblaciones de Laurel Silvestre en este último, ha estado mas expuestas al saqueo, lo que les restringe el espacio para su reproducción, generando de esta manera una presión medioambiental que los ha ido relegando a espacios sumamente reducidos para su reproducción, esto ha traído como consecuencia una cierta divergencia genética ya que el dendograma derivado del análisis estadístico nos indica que aunque las poblaciones de Sierra de Laurel son mas estrechas en cuanto a su diversidad genética estos tienen mas relación con laureles provenientes de Sierra de Fría que con laureles provenientes de Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, así mismo, en la grafica se puede observar que los individuos provenientes de material de laurel *in vitro* encajan perfectamente entre los laureles provenientes de Sierra del Laurel de donde fueron recolectados inicialmente, lo cual nos da la pauta

para poder programar una reforestación a futuro con estos individuos sin afectar en gran medida la composición genética de las poblaciones originales, no así con los arboles provenientes de la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, que nos muestran claramente que aunque sean la misma especie, no tienen las condiciones genéticas similares a los arboles de Aguascalientes como para poder trasladarlos de una región a otra.

Este trabajo se enfocó al estudio de la diversidad genética existente en poblaciones naturales de Laurel Silvestre (*Litsea glaucenscens* Kunth) que crecen en diferentes regiones de Aguascalientes comparando las mismas con laureles provenientes de otra región del país como es San Luis potosí. Las perspectivas de este trabajo son que en algún futuro se pueda reforestar las zonas con mayor saqueo en áreas de Sierra Fría y de Sierra de Laurel en Aguascalientes, con individuos provenientes de la misma zona pero establecidos previamente *in vitro* para no generar un desequilibrio ecológico en dichas zonas, el estudio molecular realizado en esta tesis nos marca una pauta para seguir realizando análisis de tipo filogenético dentro de la familia *Laurecea* ya que en esta familia se encuentran clasificados especies tan diferentes como lo son el *Persea americana* (aguacate), *Laurus spp* (laurel de la india) y el *Litsea glaucenscens* (Laurel silvestre).

9. CONCLUSION

El análisis RAPD detectó variabilidad genética en las poblaciones de laurel originarias de diferentes partes del estado de Aguascalientes así como de poblaciones identificadas en el estado de San Luis Potosí. Las huellas genéticas obtenidas permitieron la identificación de cada uno de los materiales colectados. Se detectaron varios grupos de colectas entre ellos los provenientes de Sierra Fría junto con estación biológica, otro grupo con individuos de Sierra Fría y un tercer grupo con muestras provenientes de Sierra de Álvarez del estado de S.L.P. encontrando que los especímenes de laurel establecidos *in vitro* quedaron inmersos dentro del los individuos colectados de Sierra Fría.

10. BIBLIOGRAFIA

Abbot P. 2003. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*. 1: 1-3.

Abo-Elwafa, A., Murai, K. and Shimada, T. 1995. Intra and interspecific variation in *Lens* revealed by RAPD markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 90:335-340.

Arroyo-García R., *et al.*, 2001. AFLP evaluation of genetic similarity among laurel populations (*Laurus L.*). *Euphytica* 122: 155-164.

Azofeita D. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. Revisión bibliográfica. *Agronomía mesoamericana* 17(2): 221-242.

Banerjee, H., Chimote, V. and Raina, S.K. 1998. DNA polymorphism among rice somaclones. *Biologia Plantarum* 40: 543- 533.

Baydar N. *et al.*, 2004. Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. *J. Biotechnol.* 111: 263-267.

Becerra y Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc.* 60: 270-281.

Becerra *et al.*, 2001. Diversidad bioquímica y molecular en frutillas chilenas (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) y su implicancia en el mejoramiento genético de la especie. *Agric. Téc.* 61: 413-428.

Bermúdez y Sánchez, 2000. Identificación de vacíos botánicos en Centroamérica. Ed. Prisma. Centroamérica. Costa Rica.

Brettschneider R. 1998. RFLP analysis. En *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. Karp A, Isaac PG y Ingram DS. Eds 1a ed. Kluwer Academic Publishers. p 83-96.

Brown, P.T.H., Lange, F.D., Franz, E. and Lörz, H. 1993. Analysis of single protoplast and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *MGG Molecular and General Genetics*. 237:311-317.

Congiu L., *et al.*, 2000. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Molecular Ecology*. 9, 229–232.

Dangi *et al.*, 2004. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. *BMC Plant Biology*. 4: 13

Farinho M. *et al.*, 2004. Mapping of a locus for adult plant resistance to downy mildew in broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*). *Theor Appl Genet*. 109:1392-1398

Ferreira L., *et al.*, 2006. Consistency of population genetics parameters estimated from isozyme and RAPDS dataset in species of genus *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae). *Genetica*. DOI 10.1007/s10709-006-9132-3

Friesen T. y Faris J. 2004. Molecular mapping of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 and sensitivity to Ptr Toxb in wheat. *Theor. Appl. Genet*. 109: 464-471.

Fuentes G., *et al.*, 2000. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 109: 107–115.

Gaiotto F., *et al.*, 2007. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet*. 95: 842–849.

Harrier, L.A., Whitty, P.W., Sutherland, J.M. and Sprent J.I. 1997. Phenetic investigation of non-nodulating African species of *Acacia* (*Leguminosae*) using morphological and molecular markers. *Pl. Syst. Evol.* 205: 27-51.

Hillis, D. y Holder, M. 2000. Reconstructing the tree of life. *Trends in Ecology and Evolution, Review.* 47-50.

Hilu, K.W. and Stalker, H.T. 1995. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (Fabaceae): evidence from RAPDS. *Pl. Syst. Evol.* 198: 167-178.

Karp, A.; Edwards, K. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano- Anollés, P.M. eds. *DNA markers: protocols, aplicaciones and overviews.* Gresshoff. New York. p. 1-13.

Legaria J.P. et al., 2005. Diversidad Genética en Pitahaya (*Hylocereus undatus*). *Revista Fitotecnia Mexicana.* Año/vol. 28, número 003. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Chapingo, México. Pag. 179-185.

Lewin, D. et al. 1999. *Patterns in evolution: the new molecular view.* American Scientific Library. U.S.A.

Liu C. et al., 2004. The molecular markers for prognostic evaluation of areca-associated buccal squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 33:327-34.

Liu, Z. and Furnier, G.R. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* 87: 97-105.

Luna-Rodríguez M., et al., 2005. Variabilidad morfométrica y molecular (RAPD) en una plantación de *Pinus patula* en Veracruz, México. *Agrociencia.* 39: 231-235.

Ma *et al.*, 2004. Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryes (*Secale cereale* L.) determined by RAPD-PCR markers. *Hereditas* 140: 210-221

Maltoweni, O. et al. 2000. Genetic Diversity and gene flow in the morphologically variable, rare endemics *Begonia dregei* and *B. homonyma*. *American Journal of Botany*, 87: 431-439.

Mangolin C., Ottoboni L., Machado M. 2004. RAPD Markers to Evaluate Callus Tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (*Cactaceae*) Maintained in Different Growth Regulator Combinations. *Journal of Biochemical Genetic*, 40: 351-358.

Market, C. y Moller F. 1999. Multiple forms of enzyme: tissue ontogenics and species specific patterns. *Proceeding of the national academy of science*, 47: 753-763.

Martínez, C. 1997. Sistemática Molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botanica de México*, 60: 123-136.

Moura Duarte, J., Bosco dos Santos, J. and Cunha Melo, L. 1999. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genet. Mol. Biol.* 22: 427-432.

Mueller G. y Wolfenbarger L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol.*14:389-394

Munthali, M., Newbury, H.J. and Ford-Lloyd, B.V. 1996. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. *Plant Cell Rep.* 15: 474-478.

Nereida X. 2000. Una década de aplicación del método RAPD: Alcances y limites en el estudio de relaciones Genéticas en plantas. *Revisión Biológica. Acta Científica Venezolana*, 51: 197-206

Oginuma K., *et al.*, 2006. Chromosome evolution in the *Laurales* based on analyses of original and published data. J Plant Res. 119:309-320.

Osipova *et al.*, 2003. Analysis of specific RAPD- and ISSR-fragments in somaclonal maize (*Zea mays* L.) and development of SCAR markers based on them. Genetika. 39: 1664-72.

Pacak, A., Fiedorow, P., Dabert, J. and Szweykowska- Kulinska, Z. 1998. RAPD technique for taxonomic studies of *Pellia epiphylla* - complex (*Hepaticae, Metzgeriales*). Genetica 104: 179-187.

Pandey, R.N.; Adams, R. and Flournoy, L. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDS) by plant polysaccharides. Plant Mol. Biol. Rep.14: 17-22.

Phillips W. *et al.*, 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Turrialba, Costa Rica. 183 p.

Porebski, S., L. G Bailey and B. R. Baum. 1997. Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Molecular Biology Reporter. 15(1):8-15.

PROESPA, 2006. Especies protegidas en el estado de Aguascalientes caso: Sierra de Laurel en el municipio de Calvillo. <http://www.proespa.gob.mx/pfnm/index.html>

Purps, D.M.L. and Kadereit, J.W. 1998. RAPD evidence for a sister group relationship of the presumed progenitor-derivate species pair *Senecio nebrodensis* and *S. viscosus* (*Asteraceae*). Pl. Syst. Evol. 211: 57-70

Ramírez-Ramírez M. 2003. Análisis molecular de la diversidad genética de *Agave tequilana* y especies relacionadas mediante marcadores RAPD y DNAr. Instituto Tecnológico Agropecuario de Jalisco. Tesis de maestría. 32-42

Reddy, P.V. and Soliman, K.M. 1997. Identification of wild and cultivated *Hordeum* species using two-primer fragments. *Biologia Plantarum* 39: 543-552.

Rodriguez, J.M., Berke, T., Engle, L. and Nienhuis, J. 1999. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 147-156.

Rojas G., *et al.*, 2007. Diversidad Genética en Agaves pulqueros del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotécnica Mexicana* 30-001, 1-12.

Rus-Kortekaas, W., Smulders, M.J.M., Arens, P. and Vosman, B. 2004. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by GACA-containing microsatellite probe and random amplified polymorphic DNA. *Genome* 37: 375- 381.

Rzedowski G. y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda edición revisada, actualizada e integrada en un solo volumen. Co-edición entre el Instituto de Ecología, A.C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Salazar, y.; Efraín, G. 2002. Caracterización molecular de genotipos de mango y cacao. *Acta Científica Venezolana*, 65: 134-138.

Saxena, S. *et al.*, 2005. Analysis of genetic diversity among papaya cultivar using Single Primer Amplification Reaction (SPAR) methods. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80(32):291-296.

Simioniuc D., *et al.*, 2002. Genetic diversity and relationships among *pea* cultivars revealed by RAPDS and AFLPs. *Plant Breeding* 121, 429-435.

Singh, C. 1999. *Plant Systematic*. Enfield, NH: Science. Publisher Inc.

Singla S. *et al.*, 2004. Genetic variability and taxonomic position of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* from India. *Microbiol Res.* 159: 203-210.

Spangler B. 2002. *Methods in Molecular Biology and Protein Chemistry: Cloning and Characterization.* Wiley Publications. USA.

Sri-Ngernyuang K. *et al.* 2003. Habitat differentiation of Lauraceae species in a tropical lower montane forest in northern Thailand, *Ecological Research* 18, 1-14.

Stark-Muller G. 1998. Isozymes. En *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals.* Karp A, Isaac PG y Ingram DS. Eds. 1a ed. Kluwer Academic Publishers. p 73-82.

Tang W. 2001. *In vitro* regeneration of loblolly pine and random amplified polymorphic DNA analyses of regenerated plantlets. *Plant Cell Reports.* 20: 163-168.

Taylor-Grant, N. and Soliman, K.M. 1999. Detection of polymorphic DNA and taxonomic relationships among 10 wild perennial soybean species using specific and arbitrary nucleotide primers. *Biologia Plantarum* 42: 25-37.

Tonon *et al.*, 2002. Utilidad de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies forestales. *Novenas Jornadas Técnicas Forestales, Eldorado, Misiones, Argentina*

Waugh, R., Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology.* Vol. 10, No. 6, pp. 186-191.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research,* Vol. 18, No. 22 6531-6535.

APENDICE DE ABREVIATURAS

- ADN = Ácido desoxirribonucleico
 AFLP = Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados
 ARN = Ácido ribonucleico
 BSA = análisis de segregantes agrupados
 CONABIO = Comisión Nacional para la Biodiversidad
 DAMD = amplificación directa con ADN microsatélites
 FISH= hibridación in situ fluorescente
 GPS = Sistema de geo posicionamiento global, por sus siglas en ingles
 IUCN = Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza por sus siglas en inglés
 MSNM = Metros sobre nivel del mar
 OP-A = Operon Technology serie A
 OP-B = Operon Technology serie B
 OP-C = Operon Technology serie C
 OP-H = Operon Technology serie H
 OP-K = Operon Technology serie K
 OP-M = Operon Technology serie C
 OP-X = Operon Technology serie X
 OP-Y = Operon Technology serie Y
 OP-Z = Operon Technology serie Z
 PCR = Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en ingles
 PROESPA = Procuraduría Estatal de Protección al Ambiente
 RAF = amplificación azarosa de las huellas del ADN, por sus siglas en ingles
 RAMPO = Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites
 RAPD = Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
 RFLP = Fragmentos de Restricción Polimórficos
 SAMPL = Amplificación selectiva de loci polimórficos
 SCAR = Regiones amplificadas de secuencias caracterizadas
 SEMARNAT = Secretaria de marina y recursos naturales
 SLP = San Luis Potosí
 SSR = Secuencias simples repetidas
 UAA = Universidad Autónoma de Aguascalientes

UPGMA = Agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética, por sus siglas en ingles

UV/VIS = luz ultra violeta / luz visible

μL = micro litro

μg = micro gramo

mM = mili molar

m = metros

ml = mililitro

mg = miligramo

msnm = metros sobre el nivel del mar

M = molar

Min. = minutos

ng = nanogramo

nm = nanometro

$^{\circ}\text{C}$ = grados centígrados

rpm = revoluciones por minuto

pH = potencial de hidrogeno

gr = gramo

kb = kilo bases

