



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



CARRERA DE BIOLOGÍA

T E S I S

“Análisis de la diversidad genética  
del Mezquite (*Prosopis laevigata*) en el  
valle de Tehuacán - Cuicatlán”

Que para obtener el grado de

**B I Ó L O G O**

p r e s e n t a :

Héctor Javier Tapia Salcido

Directora de Tesis:

Dra. Sofía Solórzano Lujano

Unidad de Biología, tecnología y Prototipos (UBIPRO)

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA MOLECULAR

Tlalnepantla, Estado de México.

Noviembre de 2007





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Macroproyecto

“Programa de Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano”

(UNAM, SDEI-PTID-02)

### **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mis profesores por su sapiencia y a mis camaradas por sus desvelos;

al Macroproyecto: Programa de Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano (UNAM, SDEI-PTID-02), por el financiamiento y la oportunidad para realizar este proyecto;

a la Dra. Patricia Dávila, coordinadora del programa, por sus valiosas observaciones;

a la Dra. Sofía Solórzano, por su guía en este proceso, menos largo y menos complicado;

al Dr. Jorge Campos, por sus apreciables consejos y por el espacio dentro del Laboratorio de Bioquímica molecular a su cargo;

a todos mis compañeros y amigos de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), por el apoyo y las atenciones;

a los que faltan en la lista,... pero están presentes.

¡Muchas gracias!

**DEDICATORIA**

**A ti Berenice,** por tu ejemplo,  
por tu coraje,  
por tus días.

**A mis Padres,** por su juicio,  
por su apoyo.

**A mis hermanos:**

**Jesús,** por tu perseverancia;

**Víctor,** por tu sabiduría;

**Jessica,** por tu fortaleza;

**Jennifer,** por tu alegría.

**A todos,** por su inspiración.

HéctorjTS

"Lo poco que he aprendido  
carece de valor, comparado  
con lo que ignoro y no  
desespero en aprender".

---

René Descartes

"La vida es el vehículo del  
hombre que trasciende".

---

HéctorjTS

## ÍNDICE

Agradecimientos	II
Dedicatoria	III
Resumen	VI
Abstract	VII
ÍNDICE	VIII
PRESENTACIÓN	- 10 -
INTRODUCCIÓN	- 11 -
Importancia de la Diversidad Genética	- 16 -
Conservación de la diversidad	- 19 -
El género <i>Prosopis</i>	- 21 -
ÁREA DE ESTUDIO	- 24 -
OBJETIVOS	- 26 -
MÉTODOS	- 27 -
Colecta de material biológico	- 27 -
Extracción de ADN genómico	- 28 -

Condiciones de amplificación	- 28 -
Asignación de genotipos y estimadores	- 31 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 33 -
Diversidad genética	- 33 -
Estructuración y Flujo génico	- 37 -
CONCLUSIONES	- 40 -
RECOMENDACIONES	- 42 -
BIBLIOGRAFÍA	- 43 -
ANEXOS	- 50 -

**RESUMEN**

En algunas comunidades rurales de México, la leña de Mezquite (*Prosopis laevigata*) se emplea para cubrir necesidades domésticas de energía y como artículo de comercio e intercambio. La sobreexplotación de este recurso, puede ocasionar efectos adversos sobre algunos atributos demográficos, reproductivos y de diversidad genética de sus poblaciones. El objetivo de este estudio es analizar la diversidad genética del Mezquite en cuatro localidades con distintos niveles de aprovechamiento en la comunidad Colonia San Martín, Puebla. El análisis genético incluyó tres regiones de microsatélites. La amplificación de fragmentos fue realizada mediante la técnica de PCR, usando oligonucleótidos marcados con el fluorocromo HEX; separados posteriormente por electroforesis, en un secuenciador ABI PRISM 3100. Se estimó la diversidad genética y alélica dentro de cada localidad, así como la distancia genética y flujo génico entre localidades. El mayor porcentaje de variación (73%) se encontró a nivel individual. La diversidad genética en Mantequera fue la más alta ( $H = 0.52$ ), mientras que el promedio fue de 0.48. Cooperativa presentó la mayor diversidad alélica ( $A = 3.5$ ); y el flujo de genes entre localidades fue alto también ( $Nm = 3.59$ ). Los resultados obtenidos no revelan diferencias significativas en cuanto a diversidad genética entre los sitios de estudio, lo que puede deberse a que la comunidad de Colonia San Martín tiene pocos años de haberse establecido; en este periodo el efecto sobre el genoma de las poblaciones es casi indetectable. Otro factor a considerar es la escasa distancia entre las localidades estudiadas, ya que podrían ser parte de una sola población recientemente fragmentada.

### ABSTRACT

In some rural communities of Mexico, the firewood of Mesquite (*Prosopis laevigata*) is used to supply the domestic energy necessities as well as an article for trade and interchange. The overexploitation of this resource can cause negative effects on demographic and reproductive attributes, as on genetic diversity of their populations. The objective of this study is to analyze the genetic diversity of Mesquite in four localities with different levels of use in Colonia San Martín, Puebla. Genetic analysis includes three regions of microsatellites. The amplification was performed by PCR technique, using primers fluorescent labeled (HEX), subsequently separated by electrophoresis in a sequencer ABI PRISM 3100. The genetic diversity and allelic diversity were estimated within and among localities; genetic distance and gene flow were estimated among localities. The highest variation percentage (73%) was found at the individual level. The genetic diversity in Mantequera was the highest ( $H = 0.52$ ), while the average was a little smaller ( $H = 0.48$ ). Cooperativa had the highest allelic diversity ( $A = 3.5$ ), and gene flow among localities was also high ( $Nm = 3.59$ ). The results do not show significant differences in genetic diversity among the study sites, which may be caused by Colonia San Martín community, because it has established just a few years ago, so it is a short period to detect effects on the genome. Another factor to consider is that studied localities are very close among them, which could represent a single population that was recently fragmented.

## PRESENTACIÓN

**D**entro de la estrategia general del Macroproyecto: “Manejo de Ecosistemas Desarrollo Humano” (UNAM, SDEI-PTID-02), se contempla la realización de estudios interdisciplinarios en la localidad de Colonia San Martín, perteneciente al municipio de Zapotitlán de las Salinas, en el estado de Puebla. Con ello se pretende atender de forma integral, algunas de las problemáticas más apremiantes en esta área marginada del centro del país.

Anteriormente se ha diagnosticado, mediante la aplicación de encuestas, el nivel de aprovechamiento de los recursos leñosos de la zona. Se ha elaborado un listado de las especies más utilizadas, indicando la forma de extracción y el volumen de producción; adicionalmente, se han señalado las rutas y zonas de extracción de leña y carbón. El Mezquite (*Prosopis laevigata*) aparece como uno de las especies más utilizadas para la extracción de leña y carbón, y como la segunda en cuanto a su índice acumulado de importancia (Sánchez-Paredes, 2007).

El presente estudio describe la condición actual de la diversidad y la composición genética del Mezquite, en localidades sujetas a diferentes niveles de extracción de leña, por parte de los habitantes de Colonia San Martín.

## INTRODUCCIÓN

**M**éxico representa un caso excepcional pues posee cerca del 10% de la diversidad biológica del planeta, en una extensión territorial cercana a los 2,000,000 de km<sup>2</sup> (Mittermeier y Goettsch, 1997). El territorio mexicano sobresale en cuanto a los tipos de ecosistemas, el número de especies y la variación genética, dentro y entre las especies que contiene (Conabio, 2000). Junto con Brasil, Colombia, Indonesia y Australia, México es uno de los países con mayor diversidad biológica respecto al número de especies de plantas, anfibios, reptiles y mamíferos (Tabla 1; Mittermeier y Goettsch, 1997), producto de la confluencia de dos grandes provincias biogeográficas: la neártica y la neotropical, y de la diversificación de las especies que ocuparon estos nuevos territorios (Neyra-González y Durand-Smith, 1998).

A pesar de que México es considerado un país tropical, su territorio está formado por zonas áridas y semiáridas en un 70% aproximadamente, con una marcada heterogeneidad ambiental (Rzedowski, 1988). La ubicación geográfica, la geomorfología y las condiciones climáticas de nuestro país, han favorecido la conformación y el mantenimiento de este mosaico biológico (Rzedowski, 1981; Toledo, 1988).

La reserva de la biosfera de Tehuacán - Cuicatlán es un ejemplo de la riqueza biológica que alberga nuestro país (Valiente-Banuet et al., 2000). La flora vascular de esta región incluye 2621 especies, distribuidas en 891 géneros y 180 familias, lo que constituye el 10 % de la diversidad de plantas de todo el país (Tabla 2; Dávila et al., 2002).

**Tabla 1.** Países con mayor diversidad biológica (Mittermeier y Goettsch, 1997).

Grupo	País y número de especies				
	Brasil	Colombia	Indonesia	China	México
<b>Plantas</b>	53000	48000	35000	28000	26000
<b>Anfibios</b>	Colombia	Brasil	Ecuador	México	China
	583	517	402	284	274
<b>Reptiles</b>	Australia	México	Colombia	Indonesia	Brasil
	755	717	520	511	468
<b>Aves</b>	Colombia	Perú	Brasil	Ecuador	Indonesia
	1815	1703	1622	1559	1531
<b>Mamíferos</b>	Brasil	Indonesia	China	Colombia	México
	524	515	499	456	450

A pesar de la riqueza de especies señalada, en la reserva de la biosfera de Tehuacán - Cuicatlán predomina un clima árido que es desfavorable para la agricultura y la ganadería (Arriaga et al., 2000). La

falta de vocación productiva de los suelos y de recursos técnicos adecuados, limitan el desarrollo económico y social de sus habitantes.

En comunidades rurales, las condiciones de marginación y extrema pobreza aumentan la disposición de los pobladores para aprovechar otros recursos naturales, de donde obtienen bienes y servicios, en actividades alternas que les permiten sobrevivir (Rzedowski, 1981).

Un caso relevante es la leña que, como recurso natural renovable, constituye una excelente alternativa como fuente de energía para cocinar, como calefacción y en la industria rural; además, la leña tiene una alta disponibilidad a un bajo costo. La leña es la materia leñosa y celulósica de árboles y arbustos, como ramas y troncos, incluyendo al carbón, las raíces, las cortezas y las hojas, residuos agrícolas como paja, cáscaras y productos de la poda o la tala de árboles frutales (de Montalembert y Clément, 1983).

El Mezquite (*Prosopis laevigata*) es muy apreciado debido al enorme contenido calórico y a la baja humedad de su madera, generando una preferencia hacia la leña de esta especie, sobre otros tipos. Aunado a esto, la enorme diversidad de usos que se dan a este árbol (Seth, 2004) propicia la explotación intensa por parte de los pobladores de las áreas rurales.

**Tabla 2.** Riqueza de plantas vasculares, considerando tres niveles taxonómicos de los principales grupos representados en el valle Tehuacán - Cuicatlán (Dávila et al., 2002).

Taxa (*)	Grupo	Riqueza
Familias: (180)	Musgos	-
	Helechos y grupos cercanos:	15
	Gimnospermas:	4
	Angiospermas:	161
	Monocotiledóneas:	33
	Dicotiledóneas:	128
Géneros: (891)	Musgos	28
	Helechos y grupos cercanos:	47
	Gimnospermas:	5
	Angiospermas:	862
	Monocotiledóneas:	183
	Dicotiledóneas:	679
Especies: (2621)	Musgos	57
	Helechos y grupos cercanos:	156
	Gimnospermas:	9
	Angiospermas:	2521
	Monocotiledóneas:	509
	Dicotiledóneas:	2012

\* = Riqueza, considerando sólo la flora vascular.

La extracción de leña en zonas rurales ocurre en una escala pequeña, pero representa una importante fuente de energía y recursos económicos para muchas naciones en desarrollo, sobre todo para aquellas que tienen problemas con otras fuentes de energía. La leña es uno de los recursos energéticos renovables más extendidos en todo el mundo y puede influir en la sustentabilidad de las naciones, aunque no se ha reconocido su valor pues también se considera como una causa de degradación ambiental (O'Neal-Campbell, 2005).

La explotación excesiva de los recursos biológicos es una de las principales causas de su deterioro genético. En algunas especies produce efectos negativos como la disminución en el número de individuos y modifica las relaciones reproductivas, poniendo en peligro la viabilidad de poblaciones y especies (Newton et al., 1999). El agotamiento de un recurso biológico ocurre de forma natural, mediante procesos genéticos y ecológicos que pueden acentuarse debido a la acción del hombre (Primack, 2002). Algunas de las principales actividades que perturban o destruyen los ambientes naturales son la agricultura, la ganadería, la explotación forestal y la minería, las cuales suelen acompañarse por el desmonte, el sobre-pastoreo, la tala desmedida, los incendios provocados o la explotación selectiva de especies (Rzedowski, 1981).

La conservación de los recursos leñosos nos presenta dos interrogantes a resolver a escala global: ¿Qué tan importante es la

contribución de la leña al sostenimiento energético y económico del hombre, en relación con la degradación que produce en las especies y en los ambientes? y, ¿De qué forma podemos contrarrestar la pérdida de recursos genéticos y de ecosistemas?

### IMPORTANCIA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

**L**as poblaciones poseen distintos alelos en proporciones determinadas, los cuales se distribuyen en combinaciones específicas llamadas genotipos, dentro de cada individuo. Esta organización de los genes en genotipos y su variabilidad, producen una amplia gama de respuestas fenotípicas (Hartl y Jones, 2001). La diversidad genética se encarga de liberar la presión de selección que algunos factores ambientales pueden imponer con base en sus variaciones. En algunos casos, cabe esperar que la proporción de supervivientes sea mayor, mientras la diversidad genética mantenga valores elevados (Parker et al., 1998).

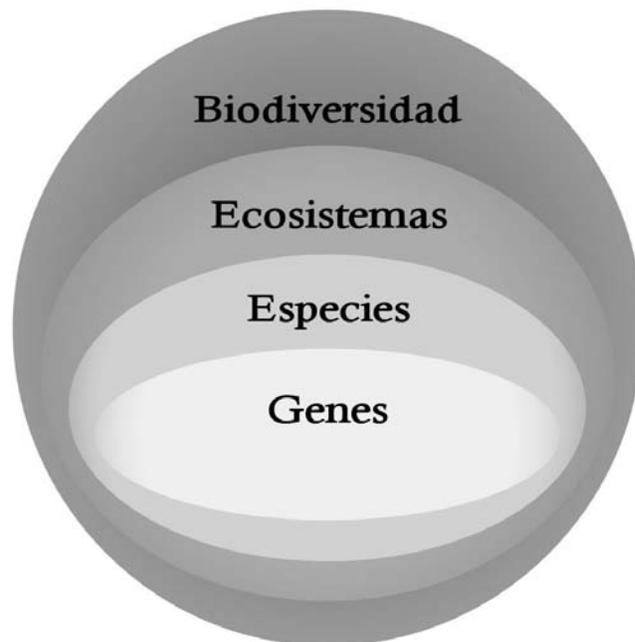
La diversidad es una medida de la variabilidad, contenida en un grupo o población; los parámetros que se analizan son estimaciones sobre la distribución de la diversidad entre las fracciones, poblaciones o subpoblaciones. La diversidad es un concepto que se aplica en varios niveles biológicos: desde los genes en una población o en una especie, las especies que habitan un ecosistema, hasta la totalidad de los ecosistemas

del mundo (Fig. 1; Loa-Loza et al., 1998). Por tanto, el término diversidad biológica se emplea para indicar la riqueza de especies, genes y ecosistemas (Toledo, 1988; Tunes, 2005). Algunas disciplinas biológicas, como la taxonomía, se encargan de identificar y enumerar la riqueza biológica, mientras otras se enfocan en el estudio de las cualidades de la diversidad, tales como la manera en que se genera y se deteriora, y ayudan a prevenir su pérdida (Ennos et al., 2005).

---

**Figura 1.** Estructura de la diversidad biológica (Loa-Loza et al., 1998).

---



Los ecosistemas, sus espacios y sus recursos naturales son nuestro sustento, ya que satisfacen necesidades básicas como la alimentación, el aire y el agua, o secundarias como las necesidades de recreación y energéticas (Mock et al., 2000). Sin embargo, el régimen de explotación, aunado a los cambios en el ambiente, puede afectar a las poblaciones pequeñas o con poca diversidad, ocasionando la desaparición de una especie para fines comerciales. En el extremo del empobrecimiento genético, el desgaste puede conducir a la extinción de la especie, en poblaciones locales o a nivel global, con repercusiones ecológicas (Primack, 2001).

Por tanto, el conocimiento de los recursos genéticos es una necesidad fundamental para aprovechar y conservar los recursos bióticos. Las especies del género *Prosopis* cubren propósitos tan diversos como la alimentación y la producción de combustibles (Galindo y García-Moya, 1986), sin embargo, aun son muchos los factores que se desconocen, en la dinámica de regeneración de las poblaciones de este recurso natural (Hastings y Harrison, 1994).

Uno de los retos más importantes en los próximos años, será el mantenimiento de los recursos naturales, renovables y no-renovables, para garantizar la sustentabilidad alimenticia y energética de las naciones, principalmente aquellas que se encuentran en desarrollo (Conabio, 2000).

### CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD

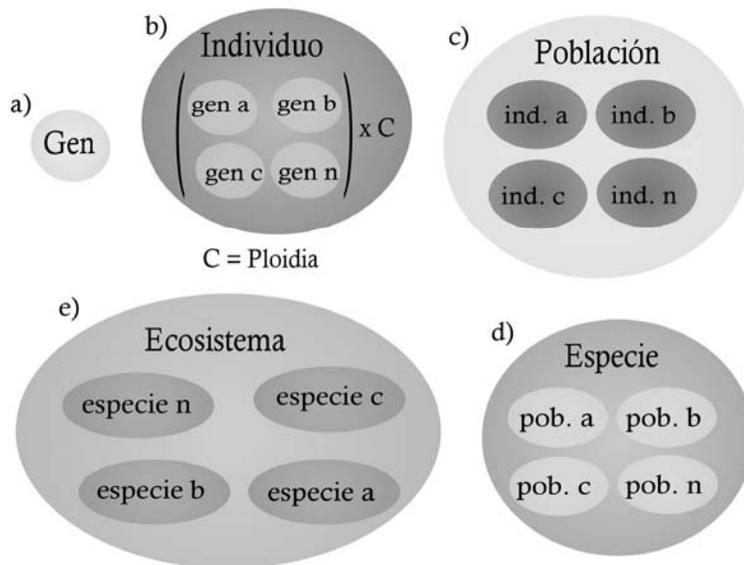
**M**uchos autores han tratado de establecer un parámetro confiable y fácil de medir, para tratar de predecir la viabilidad de una especie. Entre estos factores resaltan el tamaño efectivo de la población y la ocurrencia de emparejamiento con entrecruzamiento exitoso, además de la disponibilidad de un espacio para el establecimiento de la población (Primack, 2002).

En algunas comunidades rurales se aprovecha la leña como único recurso combustible, por lo que la explotación que experimenta el Mezquite se ha elevado en los últimos años. En otras zonas, la capacidad de colonización de esta planta, hace que se considere como una plaga (Gomez-Lorence et al., 1970; Robinson, 2007). Actualmente, se cuenta con diversos parámetros para discernir los individuos con una mayor adaptación a los distintos ambientes y con estimadores que ayudan a conocer el potencial de supervivencia de las poblaciones silvestres o cultivadas (Jaseniuk y Maxwell 2001; Selkoe y Toonen, 2006).

La diversidad genética, sus diferentes niveles de estudio (Fig. 2) y sus estimaciones, permiten analizar aspectos de relevancia sobre el estado que conservan las poblaciones antes, durante y después de ser aprovechadas, y así ayudan a establecer programas de conservación de los recursos genéticos. En la actualidad, se cuenta con técnicas que aportan datos muy sólidos, sobre las condiciones de diversidad y

estructuración genética de especies sujetas a aprovechamiento, de forma rutinaria, a un bajo costo y con resultados estandarizados, que permiten un análisis confiable (Haig, 1998; Parker et al., 1998). Este conocimiento resulta de gran utilidad para la elaboración de planes y programas de manejo, que ayuden a restablecer las condiciones favorables para la supervivencia o para mantenerlas estables.

**Figura 2.** Distribución de la diversidad biológica desde los genes (a) en los individuos (b), en las poblaciones (c), en las especies (d) y en los ecosistemas (e) (Loa-Loza et al., 1998).



### EL GÉNERO *PROSOPIS*

La familia Fabaceae contiene muchas de las especies vegetales más importantes para el ser humano. Algunos de los principales géneros que representan a esta familia en zonas áridas son: *Acacia*, *Parkinsonia* y *Prosopis*, pertenecientes a la subfamilia Mimosoideae. De estas plantas se aprovechan productos como madera, leña, carbón, frutos, flores, hojas y cortezas (Seth, 2004).

El género *Prosopis* está representado por especies arbóreas y arbustivas, que alcanzan alturas de 1 a 15 metros. Este género presenta hojas bipinnadas, espinas notables, raíces profundas y copas anchas; estas características les permiten sobrevivir en condiciones de escasez de agua y elevada radiación solar (Fig. 3). Además, algunas especies exhiben cierta tolerancia o resistencia a altas concentraciones de sal, por lo que son muy apreciadas para la reforestación en sitios con suelos degradados (Rzedowski, 1981).

Las especies del género *Prosopis* ocupan extensas regiones en los trópicos de casi todo el mundo. Su distribución natural va desde el continente Americano, hasta el norte de África y el sur de Asia. En América, ocupa amplias zonas desde el sur de los Estados Unidos, hasta la región de la Patagonia, en Argentina (Burkart, 1976; Rzedowski, 1988). Las especies arbóreas han tenido una importancia vital desde tiempos muy remotos para las etnias precolombinas, quienes usaban estas plantas

como alimento, combustible y medicina. El Mezquite tiene un enorme potencial agro-económico, pues se considera como un recurso multi-propósito, a partir del cual se extrae material para la construcción, combustible, forraje, alimentos y presta una gran cantidad de servicios ecológicos y recreativos (Seth, 2004).

---

**Figura 3.** Individuo adulto del género *Prosopis* (Mezquite).



La especie *Prosopis laevigata* se distribuye ampliamente en México, desde Durango y Tamaulipas hasta Oaxaca (Fig. 4), cubriendo la mayoría de los estados a lo ancho de su territorio (Rzedowski, 1981). Este amplio gradiente geográfico de distribución convierte a esta especie en un modelo excepcional para los estudios de diversidad y variabilidad genética.

**Figura 4.** Área de distribución comprobada de *Prosopis laevigata* en México (Rzedowski, 1988), incluyendo parte del estado de Puebla.



## ÁREA DE ESTUDIO

La cuenca del Río Zapotitlán, se encuentra en el valle de Tehuacán - Cuicatlán, en el estado de Puebla, entre los 14° 12' - 18° 26' de latitud norte y los 92° 24' - 97° 40' longitud oeste. Esta región presenta un clima seco, con lluvias en verano, una precipitación de 400 a 450 mm y una temperatura media de 21°C (Arriaga et al., 2000). Algunos de los principales tipos de vegetación en esta región son: matorral espinoso, selva baja, tetechera y cardonal (Rzedowski, 1978).

La comunidad de Colonia San Martín se encuentra 10 km al suroeste de la cabecera municipal del Municipio de Zapotitlán (Figura 5).

## MÉTODOS

### COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Los sitios de estudio se seleccionaron previamente de acuerdo a los niveles de explotación reportados por Sánchez-Paredes (2007; Tabla 3). Se consideraron únicamente individuos adultos y sanos de la especie *P. laevigata* identificados con anterioridad. Se colectaron 30 muestras de tejido foliar en cada sitio de estudio con excepción de la localidad de Reforestación, donde se encontraron sólo 17 individuos con las características necesarias para hacer el muestreo. Las hojas se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta depositarlas en el laboratorio, donde permanecieron a -70 °C antes de su análisis genético.

**Tabla 3.** Niveles de consumo de leña, reportados por Sánchez-Paredes (2007). N = muestras analizadas en el presente estudio.

Sitio de estudio	Nivel de consumo de leña	N
Cooperativa	Mayor	13
Mantequera	Medio	16
Mogote León	Bajo	16
Reforestación	Nulo	13

### EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

**E**l ADN se aisló de las muestras colectadas mediante un procedimiento estándar, basado en Fenol-Cloroformo-SDS (Anexo 1; Doyle y Doyle, 1990). Los productos obtenidos se resolvieron en geles de agarosa (0.8%), teñidos con bromuro de etidio para comprobar la presencia de ADN. Finalmente, las muestras se diluyeron y homogeneizaron para realizar las reacciones de amplificación mediante PCR.

### CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

**S**e usaron oligonucleótidos de microsátélites diseñados para las especies *P. chilensis* y *P. flexuosa* (Tabla 4), los cuales fueron ensayados en la especie *P. hassleri* (Mottura et al., 2005), la cual muestra afinidad por *P. laevigata* (Bessega et al., 2005; Bessega et al., 2006). Los oligonucleótidos “Forward” (dirección 5’–3’), se designaron como ‘primer F’ y los oligonucleótidos “Reverse” (dirección 3’–5’), como ‘primer R’. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, California, USA), bajo las siguientes condiciones: 95°C/3min., (94°C/10seg., Ta/10seg., 72°C/10seg.) x 30, 72°C/3min., 4°C/∞; ajustando la temperatura de alineamiento (Ta) para cada pareja de oligonucleótidos (Tabla 4). Las

concentraciones de los reactivos fueron: buffer PCR [1 X],  $MgCl_2$  [4  $\mu M$ ], DNTPs [4 mM] (c/u), primer F [5  $\mu M$ ], primer R [5  $\mu M$ ], taq polimerasa [1 U] y ADN [5-20 ng].

Se emplearon únicamente los loci polimórficos Mo05, Mo07 y Mo09 (Mottura et al., 2005), marcando los oligonucleótidos “Forward” (5’-3’) con el fluorocromo ‘Hex’. Se llevó a cabo la electroforesis por capilaridad en el secuenciador ABI PRISM™ 3100 ‘Genetic Analyzer’ (Applied Biosystems, California, USA), para separar los alelos amplificados de acuerdo a su tamaño, distinguiendo fragmentos con un par de bases de diferencia.

**Tabla 4.** Secuencias de los oligonucleótidos de microsatélites empleados (Mottura, et al. 2005). Ta = temperatura de alineamiento.

Locus	Secuencias del Primer (5'-3')	Ta (°C)	GenBank
Mo05	F: AATTCTGCAGTCTCTTCGCC	64	AJ879505
	R: GATCCCTCGTGACTCCTCAG		
Mo07	F: GAAGCTCCCTCACATTTTGC	59	AJ879506
	R: CTATTTGCGCAACACACAGC		
Mo08	F: TATCCTAAACGCCGGGCTAC	59	AJ879507
	R: TCCCATTCATGCATACTTAAACC		
Mo09	F: ATTCCTCCCTCACATTTTGC	59	AJ879508
	R: CATTATGCCAGCCTTTGTGTG		
Mo13	F: TTGATTAGAGTTGCATGTGGATG	58	AJ879509
	R: TGCAGTCCCAAGTGTCAGAG		
Mo16	F: CATTGCCCCAATATCACTCC	60	AJ879510
	R: GGGTCCATCCAGAGTAGTGG		

### ASIGNACIÓN DE GENOTIPOS Y ESTIMADORES

Los alelos amplificados mediante PCR se identificaron usando el programa informático Peak Scanner™ versión: 1.0 (2006, Applied Biosystems); posteriormente se ordenaron y clasificaron de acuerdo a su tamaño. Los alelos presentes en cada muestra se enlistaron, distinguiendo los fragmentos de igual tamaño con la misma letra o número. En el caso del programa Arlequín 3.0 (Excoffier, 2007) los alelos se designaron de acuerdo al tamaño del fragmento observado en pares de bases. Los genotipos obtenidos se formularon siguiendo los formatos de ingreso para los diferentes programas estadísticos.

Con estos genotipos se estimó la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), se realizó el análisis molecular de varianza (AMOVA) y de distancias genéticas, usando el programa Arlequín 3.0 (Excoffier, 2007). Así mismo, se analizó la estructuración de las poblaciones, se realizó un agrupamiento UPGMA usando la distancia genética de Nei, (1978), y se calculó la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) usando el programa TFGPA 1.3 (Miller, 1997); Se obtuvieron los índices  $F_{it}$ ,  $F_{is}$  y  $F_{st}$ , el flujo de genes ( $Nm$ ), el número de alelos ( $n_A$ ), el número efectivo de alelos ( $n_E$ ) y el índice informativo de Shannon, mediante el programa POPGEN (Yeh y Yang, 1999). El flujo de genes se calculó a partir de los valores de  $F_{st}$ , usando la fórmula:  $Nm=0.25(1-F_{st})/F_{st}$ .

Los estadísticos  $F$  se emplearon para reconocer la posible fragmentación de *P. laevigata* en poblaciones separadas y la reducción en el número efectivo de individuos en cada población (Weir y Hill, 2002). Los estadísticos  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  y  $F_{st}$  indican la proporción de la variación que existe en los individuos dentro de las poblaciones, en los individuos dentro del total y en las poblaciones dentro del total, respectivamente.

Se compararon estimadores, como la heterocigosidad ( $H$ ) y el flujo génico ( $Nm$ ), entre el total de los datos y los obtenidos para cada sitio de estudio y para cada loci por separado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### DIVERSIDAD GENÉTICA

En total se analizaron 56 muestras, procedentes de los cuatro sitios de estudio, con un promedio de 14.5 muestras por localidad y una desviación estándar de 3.464. De acuerdo al análisis estadístico efectuado mediante el programa Arlequín ver. 3.0 (Excoffier, 2007), los tres loci utilizados (Mo05, Mo07 y Mo09) resultaron polimórficos. La heterocigosidad observada (Ho), mostró alta variabilidad entre los loci, mientras que la variabilidad entre los sitios de estudio fue baja. La Ho arrojó resultados muy variables, desde 0.09 en el locus Mo05, hasta 0.76 en el locus Mo09, con una desviación estándar de 0.35 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Homocigosidad (Hom) y heterocigosidad (Het). O = observada, E = esperada, N = número de individuos; s = desviación estándar. Método de Levene.

Locus	N	Hom O*	Hom E*	Het O*	Het E*
Mo05	116	0.91	0.49	0.09	0.51
Mo07	116	0.40	0.41	0.60	0.59
Mo09	116	0.24	0.14	0.76	0.86
Media	116	0.52	0.34	0.48	0.65
s		0.35	0.18	0.35	0.18

Sin embargo, al comparar los cuatro sitios encontramos que los valores observados en los diferentes loci presentan valores semejantes. El promedio de  $H_o$  para los cuatro sitios fue de 0.48, mientras que su desviación estándar fue de apenas 0.047 (Tabla 6). A pesar de que la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) mostró valores ligeramente más elevados que la heterocigosidad observada, no reveló diferencias entre las localidades de acuerdo a su nivel de extracción. La heterocigosidad de *P. laevigata* en Colonia San Martín alcanzó valores más elevados que los reportados para otras especies del mismo género (Bessega et al., 2000b).

**Tabla 6.** Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ). Valores encontrados entre poblaciones y entre loci. n = número de individuos por loci; s = desviación estándar

Locus (n)	Mo05 (60)	Mo07 (62)	Mo09 (64)	Total (62)	
Sitio	$H_o$	$H_o$	$H_o$	$H_o$	$H_e$
Reforestación	0.06	0.50	0.81	0.46	0.63
Mogote León	0.00	0.62	0.75	0.46	0.58
Mantequera	0.13	0.60	0.82	0.52	0.63
Cooperativa	0.15	0.60	0.67	0.47	0.69
Promedio	0.09	0.58	0.76	0.48	0.63
s	0.150	0.079	0.020	0.047	0.047

En la actualidad, la localidad de Reforestación presenta muy pocos individuos, por lo que no se extrae leña de este sitio y se ha tratado de reforestar con árboles de otras localidades. Esta localidad se encuentra en recuperación, mientras que la localidad de Cooperativa, que es la más aislada, experimenta la mayor tasa de explotación de los cuatro sitios estudiados (Sánchez-Paredes, 2007). No obstante, la localidad de Cooperativa muestra los valores más elevados en cuanto a la diversidad alélica, número efectivo de alelos ( $n_E = 3.509$ ) e índice de Shannon ( $I_s = 1.392$ ); enseguida encontramos a la localidad de Reforestación con un  $n_E = 3.470$  (Tabla 7).

**Tabla 7.** Promedio del número de alelos ( $n_A$ ), número efectivo de alelos ( $n_E$ ) e índice de diversidad de Shannon (I).

Locus	Mo05	Mo07	Mo09	$n_A$	$n_E$	I
Reforestación	2	5	9	5.333	3.470	1.249
Mogote León	3	5	10	6.000	3.102	1.241
Mantequera	2	4	11	5.667	3.297	1.216
Cooperativa	3	6	10	6.333	3.509	1.392

Los valores de diversidad encontrados concuerdan con los esperados, de acuerdo al modelo de estudio; el género *Prosopis* contiene plantas con forma de vida arbórea, con tendencia a la fecundación cruzada o a la autoincompatibilidad, que suelen tener niveles elevados de diversidad (Hamrick y Godt, 1996; Bessega et al., 2000a). En otras especies de este género, como *P. ruscifolia*, *P. flexuosa* y *P. glandulosa*, se han reportado valores de heterocigosidad más bajos (Bessega et al., 2000b).

En general, se presume una diferencia mínima en la diversidad genética entre los sitios con un bajo grado de explotación y aquellos que son explotados más intensamente. Sin embargo, existen diferencias entre la heterocigosidad esperada y la observada, debido al efecto de los loci Mo05 y Mo09, pues su alta variabilidad en la cantidad de alelos modifica sustancialmente el valor esperado de heterocigosidad.

## ESTRUCTURACIÓN Y FLUJO GÉNICO

**E**n el análisis molecular de varianza (AMOVA) encontramos que la mayor proporción de la variación se halla entre los individuos del total de la muestra (72.7%) y entre los individuos de las poblaciones (22.7%). La menor cantidad de variación se encontró entre las poblaciones (4.6%).

El flujo génico estimado es de 3.597, indicando un adecuado intercambio de genes entre los cuatro sitios de estudio; aunque una parte de este flujo puede deberse a la traslocación artificial de individuos procedentes de otras localidades, hacia Reforestación. Un valor de flujo génico bajo indicaría una limitación en el intercambio de genes, lo que conduce a procesos endogámicos o de cuello de botella, que ocasionan un empobrecimiento genético acelerado (Griffiths, 2000).

Los estadísticos  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  y  $F_{st}$ , muestran un patrón semejante al de la heterocigosidad ( $H$ ), explicada más arriba. Los cuatro sitios de estudio tienen un índice de diferenciación bajo,  $F_{st}=0.065$ , es decir, son muy similares. La mayor parte de la diversidad se distribuye entre los individuos, considerando los cuatro sitios de estudio, y entre los individuos dentro de cada sitio. El locus Mo07 exhibe un exceso de heterocigotos pues los valores de  $F_{is}$  y de  $F_{it}$  muestran valores negativos (Tabla 9). Estudios realizados en otras especies del género *Prosopis*, usando RAPD's como marcadores moleculares a nivel intra e

interespecifico, han mostrado niveles de variabilidad semejantes a los observados en *P. laevigata*, y una baja diferenciación (Juárez et al., 2002; Ferreyra et al, 2004).

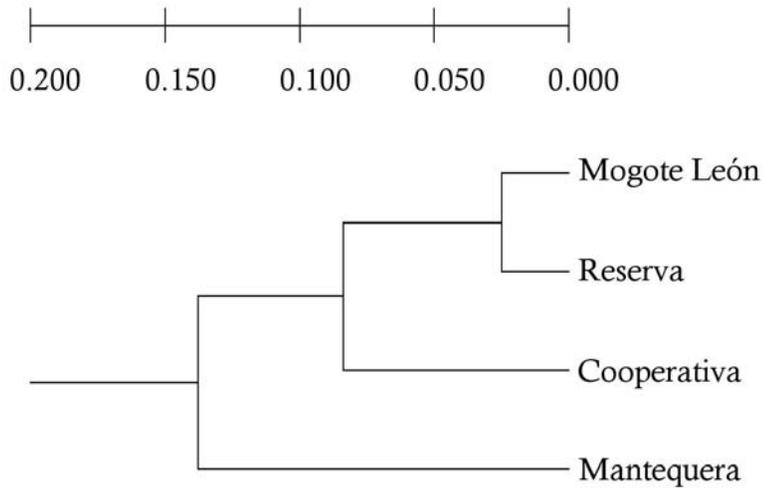
**Tabla 8.** Estimadores de distribución de la diversidad de los individuos entre las subpoblaciones (Fis), de los individuos entre la población (Fit), y de las subpoblaciones en la población. El flujo génico (Nm) se calculó a partir del valor de Fst.

Locus	N	Fis	Fit	Fst	Nm
Mo05	116	0.7831	0.8197	0.1689	1.2303
Mo07	116	-0.0575	-0.0346	0.0217	11.2916
Mo09	116	0.0851	0.1152	0.0329	7.3518
Promedio	116	0.202	0.2539	0.0650	3.5971

El agrupamiento UPGMA, muestra a las localidades de Mogote León y Reforestación como las más similares (0.073), formando un grupo separado (Fig. 7). A continuación se asocian a este nodo las localidades de Cooperativa (0.146) y Mantequera (0.192). La localidad de Reforestación, a pesar de tener una densidad de individuos muy baja, contiene material genético de los otros sitios debido a la reforestación, lo que puede ser una causa del agrupamiento observado.

**Figura 6.** Agrupamiento UPGMA, usando la distancia genética de Nei (1978).

Distancia Genética



## CONCLUSIONES

Los valores de diversidad genética son contrastantes entre los loci examinados, mientras que los sitios de estudio son muy homogéneos, indicio de que las localidades estudiadas pertenecen, o dejaron de pertenecer recientemente, a una población más extensa que las incluía. En general, las diferencias en la diversidad son imperceptibles entre los sitios estudiados, sin importar su nivel de aprovechamiento, lo que puede explicarse por la cercanía geográfica de las cuatro localidades.

El flujo de genes revela un intercambio importante a nivel local, en Colonia San Martín, impidiendo la diferenciación de las poblaciones. Estos resultados son consistentes con los obtenidos para otras especies emparentadas, aunque debemos considerar las diferencias en las condiciones ambientales y la temporalidad de los estudios.

La distancia genética corresponde aproximadamente con la distancia y la distribución espacial de *P. laevigata* en Colonia San Martín, aunque la separación geográfica no es suficiente para definir claramente esta relación. La localidad de Reforestación no encaja en este esquema debido al manejo que se le ha dado e intercambia su posición con Mantequera.

Algo que no se debe descuidar es el manejo de esta especie, considerando múltiples puntos de vista, de forma integral.

Fundamentalmente, se debe atender la demanda actual de leña de los pobladores de Colonia San Martín y la forma de mantener las relaciones reproductivas de las poblaciones de *P. laevigata*.

Si se pretende aumentar el volumen de aprovechamiento de la leña, es necesario formular un sistema de reproducción artificial, usando el conocimiento de las relaciones genéticas de los individuos de cada población.

La planeación en la reproducción del Mezquite es indispensable, para reducir riesgos ecológicos como los cuellos de botella o la endogamia, ocasionados por el número reducido de organismos reproductivos o por la falta de diversidad en los organismos empleados para la reforestación.

## RECOMENDACIONES

**L**a viabilidad de las poblaciones de Mezquite dependerá del adecuado control que se imponga sobre la extracción de leña y en la recuperación de los individuos extraídos, para facilitar su reproducción. La movilización de plantas entre todas las localidades o la reforestación, ayudarían a mantener un número suficientemente grande de individuos reproductivos y a transferir genes de forma artificial entre las diferentes localidades.

Es conveniente aprovechar únicamente las partes muertas de las plantas, que no produzcan estructuras reproductivas ni hojas, y las plantas viejas o enfermas. Sin embargo, para mantener la diversidad, se pueden tomar pocas ramas de cada árbol y aprovechar árboles diferentes, de preferencia, que no sean contiguos. Siguiendo estas indicaciones se evitaría la destrucción de individuos potencialmente reproductivos, permitiéndoles aportar sus genes a las siguientes generaciones. Otro beneficio sería el mayor número de individuos en edad adulta y un mayor número de organismos en cada población, asegurando una reproducción exitosa, y con ello una mayor viabilidad de la especie.

En caso de realizar una reforestación de las localidades, se sugiere evitar el uso de árboles cercanamente emparentados, considerando el análisis de genotipos de las plantas empleadas para la reproducción en un invernadero o vivero local.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arriaga L.**, J.M. Espinoza, C. Aguilar, E. Martínez, L. Gómez y E. Loa (coordinadores). (2000). Regiones terrestres prioritarias de México: RTP-121. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México. p. 472–475.
- Bessega C.**, L. Ferreira, N. Julio, S. Montoya, B. Saidman y J. C. Vilardi. (2000a). Mating system parameters in species of genus *Prosopis* (Leguminosae). *Hereditas*. **132**: 19–27.
- Bessega C.**, L. Ferreira, J. C. Vilardi y B. O. Saidman. (2000b). Unexpected low genetic differentiation among allopatric species of section *Algarobia* of *Prosopis* (Leguminosae). *Genetica*. **109**: 255–266.
- Bessega C.**, B. O. Saidman y J. C. Vilardi. (2005). Genetic relationships among American species of *Prosopis* (Leguminosae) based on enzyme markers. *Genetics and Molecular Biology*. **28**: 277–286.
- Bessega C.**, J. C. Vilardi y B. O. Saidman. (2006). Genetic relationships among American species of the genus *Prosopis* (Mimosoideae, Leguminosae) inferred from ITS sequences: evidence for long-distance dispersal. *Journal of Biogeography*. **33**: 1905–1915.

- Burkart A.** (1976). A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoidae). Journal of Arnold Arboretum. **57**: 219–249 y 450–525.
- Conabio.** (2000). Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 103 pp.
- Dávila P., M. del C. Arizmendi, A. Valiente-Banuet, J. L. Villaseñor, A. Casas y R. Lira.** (2002). Biological diversity in the Tehuacán - Cuicatlán Valley, Mexico. Biodiversity and Conservation. **11**: 421–442.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle.** (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus **12**: 13–15.
- Ennos R. A., G. C. French, y P. M. Hollingsworth.** (2005). Conserving taxonomic complexity. Trends in Ecology and Evolution. **20**: 164–168.
- Excoffier, L.** (2007). Arlequin ver 3.11: Computational and Molecular Population Genetics LAB CMPG. Zoological Institute, University of Berne. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/> (liberado, 19 de Febrero de 2007).
- Ferreira L. I., C. Bessega, J. C. Vilardi y B. O. Saidman.** (2004). First report on RAPDs patterns able to differentiate some Argentinean

- species of section *Algarobia* (*Prosopis*, Leguminosae). *Genetica*. **121**: 33–42.
- Galindo S.** y E. García-Moya. (1986). The uses of Mesquite (*Prosopis* spp.) in the highlands of San Luis Potosi, Mexico. *Forest Ecology & Management*. **16**: 49–56.
- Gomez-Lorence F.,** J. Signoret Poillon y M. C. Abuin Moreiras. (1970). Mezquites y huizaches: Algunos aspectos de la economía, ecología y taxonomía de los géneros *Prosopis* y *Acacia* en México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, AC. México, DF. 192 pp.
- Griffiths A.** (2000). An introduction to Genetic Analysis. 7th ed. W. H. Freeman. USA. 860 pp.
- Jaseniuk M.** y B. D. Maxwell. (2001). Plant diversity: new insights from molecular biology and genomics technologies. *Weed Science*. **49**: 257–265.
- Juarez-Muñoz, J.,** G. Carrillo-Castañeda, R. Arreguin y A. Rubluo. (2002). Inter- and intra-genetic variation of four wild populations of *Prosopis* using rapd-pcr fingerprints . *Biodiversity and Conservation*. **11**: 921–930.
- Haig S. M.** (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology*. **79**: 413–425.

- Hamrick J. L.** y M. J. W. Godt. (1996). Effects of Life history Traits on Genetic Diversity in Plant Species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. **351**: 1291–1298.
- Hartl D. L.** y E. W. Jones. (2001). *Genetics: Analysis of genes and genomes*. 5th Ed. Jones and Bartlett Publishers. 858 pp. USA.
- Hastings A.** y S. Harrison. (1994). Metapopulation dynamics and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **25**: 167–188.
- Loa-Loza E.,** M. Cervantes, L. Durand y A. Peña. (1998). Cap IV. Uso de la Biodiversidad. En: *La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. SEMARNAP, México DF. p. 104–154.
- Miller, M. P.** (1997). Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Software de computadora distribuido por el autor.
- Mittermeier R. A.** y C. Goettsch. (1997). *Megadiversidad: los países biológicamente más ricos del mundo*. Traducción de Teresa Segovia. CEMEX: Agrupación Sierra Madre. 501 pp. México.
- Mock G.,** J. Dixon, K. Hamilton, S. Pagiola y C. Mlot. (2000). Cap I. Linking people and ecosystems. En: *World resources 2000-2001, People and ecosystems: the fraying web of life*. World Resource Institute. USA. 389 pp.

- de Montalembert M. R.** y J. Clément. (1983). Disponibilidad de leña en los países en desarrollo. Estudio FAO, Serie Montes 42. <http://www.fao.org/docrep/X5329s/x5329s00.htm>. (revisado, 15 de Octubre de 2007)
- Mottura M. C.,** R. Finkeldey, A. R. Verga y O. Gailing. (2005). PRIMER NOTE. Development and characterization of microsatellite markers for *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* and cross–species amplification. *Molecular Ecology Notes*. **5**: 487–489.
- Newton A. C.,** T. R. Allnutt, A. C. M. Gillies, A. J. Lowe y R. A. Ennos. (1999). Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in ecology and evolution*. **14**: 140–145.
- Neyra-González L.** y L. Durand-Smith. (1998). Cap III. Biodiversidad. En: La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, DF. p. 62–102.
- O'Neal-Campbell M.** (2005). The impact of small–scale wood harvesting on neem *Azadirachta indica* A. Juss stands in the coastal savanna of Ghana. *Area*. **37**: 8–16.

- Parker P. G.**, A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton y P. A. Fuerst. (1998). What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology*. **79**: 361–382.
- Primack R. B.** (2002). *Essentials of conservation biology*. 3rd Ed. Sinauer. USA. 698 pp.
- Robinson T. P.** (2007). Spatial and temporal rates and patterns of mesquite (*Prosopis* species) invasion in Western Australia. *Journal of Arid Environments*. In Press. doi:10.1016/j.jaridenv.2007.05.011
- Rzedowski J.** (1981). *La vegetación de México*. Limusa. México. 432 pp.
- Rzedowski J.** (1988). Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosioideae) en norte América. *Acta Botánica Mexicana*. **3**: 7–19.
- Sánchez-Paredes L.** (2007). *Diagnóstico y Consecuencias Ecológicas de la Extracción y Consumo de la leña en Colonia San Martín, Valle de Zapotitlán, Pue.* Tesis de Maestría. UNAM-FES Iztacala. México. 58 pp.
- Selkoe K. A.** y R. J. Toonen. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. **9**: 615–629

- Seth M. K.** (2004). Trees and Their Economic Importance. *The Botanical Review*. **69**: 321–376
- Toledo V. M.** (1988). La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo* **81**: 17–30.
- Tunes M.** (2005). El convenio sobre la diversidad biológica, el acceso a los recursos genéticos y la distribución de beneficios. Su aplicación y su problemática en la Argentina. *ProDiversitas*. <http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota54.htm>.
- Valiente-Banuet A.,** A. Casas, A. Alcántara, P. Dávila, N. Flores-Hernández, del Coro Arizmendi M., Villaseñor J. L. y Ortega-Ramírez J. (2000). La vegetación del valle de Tehuacán - Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica*. **67**: 24–74.
- Weir B. S.** y W. G. Hill. (2002). Estimating F-Statistics. *Annual Review of genetics*. **36**: 721–750.
- Yeh F.C.** y R.C. Yang. (1999) POPGENE v 1.31. University of Albert and Center for International Research.

## ANEXOS

### **Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN**

#### Fenol-Cloroformo-SDS (Doyle y Doyle, 1990)

1. Pesar 100 a 120 mg de tejido.
2. Macerar en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
3. Inmediatamente añadir 160  $\mu$ l de solución CTAB previamente calentado en baño maría a 65°C.
4. Moler hasta que se obtenga una consistencia pastosa.
5. Añadir 600  $\mu$ l de Solución de la Porta.
6. Moler hasta que se obtenga una consistencia homogénea y líquida.
7. Transferir a tubos eppendorf de 1.5 ml esterilizados y etiquetados.
8. Agregar 100  $\mu$ l de SDS al 20%.
9. Agitar vigorosamente (en vortex) durante 2 minutos.
10. Incubar los tubos en baño maría a 65°C.
11. A los 5 minutos de incubación agitar vigorosamente los tubos por 1 minuto e incubar otros 5 minutos en baño maría a 65°C.
12. Destapar los tubos y dejar enfriar un poco.
13. Agregar 180  $\mu$ l de Solución de Acetato de Potasio mantenida a -20°C.

14. Agitar los tubos durante 2 minutos.
15. Refrigerar durante 5 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
16. Centrifugar durante 20 minutos a 13,000 rpm.
17. Transferir el sobrenadante (aprox. 600  $\mu\text{l}$ ) a tubos nuevos.
18. Añadir 600  $\mu\text{l}$  de isopropanol previamente frío a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
19. Agitar suavemente los tubos.
20. Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos o toda la noche.
21. Centrifugar a 13,000 rpm durante 20 minutos.
22. Tirar el sobrenadante y decantar los tubos invirtiéndolos sobre una sanita.
23. Agregar 600  $\mu\text{l}$  de TE pH 8 y agitar hasta que la pastilla se disuelva.
24. Agregar 1  $\mu\text{l}$  de ARNasa e incubar durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .
25. Agregar 600 $\mu\text{l}$  de Fenol-cloroformo agitar y centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm.
26. Transferir la fase acuosa a tubos nuevos y agregar 600  $\mu\text{l}$  de cloroformo - isoamílico, centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm.
27. Transferir nuevamente la fase acuosa a tubos nuevos.
28. Agregar 60  $\mu\text{l}$  de Acetato de Sodio 3 M y 600  $\mu\text{l}$  de Isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
29. Agitar suavemente los tubos.

30. Incubar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
31. Centrifugar durante 10 minutos a 13,000 rpm.
32. Tirar el sobrenadante y decantar los tubos invirtiéndolos sobre una sanita.
33. Secar la pastilla durante 30 minutos en la estufa a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
34. Resuspender la pastilla en  $100\text{ }\mu\text{l}$  de TE pH. 8.
35. Almacenar la alícuota a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nota: Resuspender con agua inyectable estéril, en lugar de buffer TE.

## **Anexo 2. Buffers de uso común.**

### Solución de la Porta

TRIS-Base	100mM
EDTA (Ácido Etilen di-Amino tetra-Acético)	50mM
NaCl	500mM
Mercaptoetanol	1%

### Solución de CTAB

CTAB (Bromuro de Cetil tri-Metil Amonio)	2%
TRIS-Base	100mM
EDTA	50mM
NaCl	500mM
Mercaptoetanol	1%
PVP 40 (Polivinil Pirrolidona)	4%
Acido Ascórbico	.5%
DIECA	.5%

### Solución de SDS

SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)	20%
--------------------------------	-----

### Solución de Acetato de Sodio

Acetato de Sodio	3M
------------------	----

### Solución de Acetato de Potasio

Acetato de Potasio	3M
Ácido Acético	11.5%

Buffer TE (Tris-EDTA)

TRIS-Base	10mM
EDTA	2mM

Buffer TBE

TRIS-Base	89mM
Ácido Bórico	89mM
EDTA	2mM

Buffer de Carga para electroforesis

Glicerol	30%
H <sub>2</sub> O	70%
Azul de Bromofenol	~.01%