



INFORME FINAL DEL PROYECTO

Título de la Investigación: Empleo de marcadores moleculares en la caracterización genética de cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz de la República Dominicana.

Responsable del Proyecto : Luis Enrique Rodríguez, M.Sc.

Agosto 2014

Título de la Investigación:

Empleo de marcadores moleculares en la caracterización genética de cinco poblaciones de *Pinus occidentalis* Swartz de la República Dominicana.

Responsable del Proyecto (Investigador/a principal)

Luis Enrique Rodríguez, M.Sc.

Investigadores del proyecto

Virgilio Miniño. PhD

Yolanda León. PhD

Liz A. Paulino. Bs.

Objetivos Principal.

Caracterizar genéticamente la estructura poblacional de *Pinus occidentalis* en cinco localidades de la República Dominicana, empleando marcadores moleculares.

Objetivos específicos.

- ✓ Desarrollar y caracterizar marcadores de microsatélites específicos para la especie *Pinus occidentalis*.
- ✓ Genotipar los marcadores de microsatélites seleccionados para 50 individuos de cada población.
- ✓ Determinar la variabilidad genética intra e inter poblacional que presenta cada población.
- ✓ Determinar la estructura poblacional de *P. occidentalis* en la isla.

Introducción

Una de las herramientas que ha permitido hacer una selección óptima de los recursos genéticos y asegurar el éxito en los programas de manejo y conservación a nivel mundial han sido los marcadores moleculares. La implementación de sistemas integrados que combine el mejoramiento genético clásico de especies forestales con las nuevas técnicas moleculares permite la optimización y la maximización de las ganancias genéticas. Estos marcadores detectan la variación genética directamente sobre la molécula de ADN, y determinan con un alto grado de precisión, el perfil genético de cada individuo (huella dactilar genética del ADN).

Una información fidedigna sobre la distribución de la variación genética es un requisito previo para programar debidamente la selección, mejora genética y conservación de árboles forestales. La variación genética de una especie se determina entre otros métodos por medio de los marcadores moleculares. Los microsatélites constituyen una poderosa herramienta para tratar cuestiones relacionadas con la mejora genética cuando es fundamental la distinción genética.

Todo esto es posible siempre y cuando se cuente con los protocolos de extracción y purificación de ADN estandarizado para la especie de interés, debido a que este proceso constituye una etapa clave en todos los estudios de genética molecular (Motte, 2001).

En la actualidad existen varios métodos de extracción de ADN vegetal, sin embargo, no se cuenta con la información del proceso para esta especie en particular.

Avances según Cronograma de ejecución.

Cronograma (unidad de tiempo: *meses*; justificación de la duración del proyecto si es necesario)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Toma de muestras	X		X									
Puesta a punto de la metodología de extracción y purificación de ADN	X	X	X	X	X							
Cuantificación y análisis de las muestras					X	X	X	X	X	X	X	
Realización de informes parciales					X							
Realización de informe final												X

Según el cronograma propuesto se han cumplimentando las siguientes actividades:

- ✓ Toma de muestras: se realizó la toma de muestras (fascículos, conos inmaduros y megagametófitos), y este material colectado fue el que se utilizó para poner a punto la extracción de ADN.
- ✓ Puesta a punto de la metodología de extracción y purificación de ADN: en el desarrollo del informe se podrá apreciar la metodología aplicada en la extracción y purificación del ADN. Este procedimiento se realizó aunque con los inconvenientes que en algunas partes muestreadas el ADN no corrió en el gel de agarosa, por lo que se planificó la compra de un nuevo Kits de extracción.
- ✓ Cuantificación y análisis de las muestras. Las muestras de ADN se cuantificaron mediante el **Qubit® 2.0 Fluorometer**, logrando una determinación de la

cantidad de DNA en la extracción, las muestras fueron corridas en un gel de agarosa y conservadas a -20 grados.

De forma general los resultados que se esperaban en el proyecto se cumplieron en un 100%, y como recomendación proponemos la aplicación del otro Kits para continuar con la experimentación.

Metodología y Resultados

En los meses de Julio y Agosto se realizaron viajes de campo a las zonas de Sierra de Neyba y Sierra de Bahoruco donde tomaron diferentes muestras en árboles de *Pinus occidentalis* (acículas, conos inmaduros, semillas y megagametófito) para iniciar la extracción de ADN y su posterior análisis.

La reacción en cadena de la polimerasa es un método para amplificar exponencialmente secuencias específicas de DNA, a través de una síntesis "in vitro" y consta de 3 etapas fundamentales, que son:

1. Separación de la cadena de DNA molde: esto significa que hay que separar las 2 cadenas de DNA en hebras sencillas, los enlaces de hidrógeno pueden ser fácilmente separados aplicando calor, 94 ° C, es una temperatura adecuada para este proceso.
2. Anillamiento de un par de iniciadores a las cadenas de DNA desnaturalizadas: la DNA polimerasa tiene como función sintetizar DNA a partir de DNA, y para ello requiere de una cadena preexistente de DNA desnaturalizado a la que se une un pequeño segmento sintético complementario a la cadena molde para iniciar la síntesis, la temperatura adecuada para que la hibridación ocurra generalmente oscila entre los 55 y 60 °C, aunque se puede emplear una temperatura menor, pero traería consigo menos especificidad.
3. Extensión del iniciador por medio de una enzima polimerasa DNA termoestable: en esta fase se emplea una DNA polimerasa y desoxinucleósidos trifosfatados (dNTP's). Esta extensión resultará en la síntesis de una copia adicional de DNA. La DNA polimerasa actúa de forma óptima a 72 ° C.

A continuación exponemos la metodología utilizada y los resultados obtenidos, se anexan las gráficas del gel de agarosa que se empleó para la observación de la extracción del ADN.

Extracción de ADN y Electroforesis

- ✓ Paso #1. Se identificó y tabularon las 5 muestras.

- ✓ Paso #2. Se cortó 25 mg de tejido en pedazos pequeños (lo más pequeños que se pudo), y se colocaron en un tubo de 1.5 ml de microcentrífuga. Luego se le agrego 180 μ L de buffer de digestión ATL, para destruir las membranas celulares.

- ✓ Paso #3. Para degradar las proteínas e inhibir cualquier actividad de las nucleasas, se agregó 20 μ L de proteinasa k y se mezcló bien en el vortex, mini 120 v.

- ✓ Paso #4. Las muestras fueron incubadas a 56 °C durante 4 horas hasta que el tejido quedó completamente desintegrado. Luego, se colocó en el vortex por 10 segundos durante el tiempo de incubación para así ayudar a su lisis o destrucción de membranas y la desnaturalización de proteínas. La muestra se incuba durante 24 horas.

Pasada las 24 horas se retiraron las muestras de la incubadora y se continúa la extracción como se detalla a continuación:

- ✓ Paso #5. Se añadió 200 μ l de buffer AL a las muestras y fueron puestas al vortex, luego se añadió 200 μ l de etanol y fue llevada al vortex. Terminado el vortex se extrajo con una pipeta la mezcla obtenida (incluyendo cualquier

precipitado) y colocarla en una columna de centrifugado empaquetada con una matriz de silicato.

- ✓ Paso #6. Centrifugar la columna a 8,000 rpm durante 1 minuto y luego descartar el líquido (que posee proteínas precipitadas, restos de sales y ARNasas) junto con el tubo de colección.
- ✓ Paso #7. Se colocó la columna en un nuevo tubo de colección de 2 ml, y agregar 500 µl del buffer AW1, que sirve para lavar la columna y eliminar proteínas, metabolitos y contaminantes.
- ✓ Paso #8. Se centrifugó durante 1 minuto a 8,000 rpm y se descartó el líquido junto con el tubo de colección.
- ✓ Paso #9. Se colocó nuevamente la columna en un nuevo tubo de colección de 2 ml y agregar 500 µl del buffer AW2, que sirve como un segundo lavado de la columna para eliminar toda impureza restante.
- ✓ Paso #10. Se centrifugó por 3 minutos a 14,000 rpm para secar la membrana (esto es para asegurarse de que no quede buffer con impurezas adheridos a la membrana de la columna) y descartar el líquido junto al tubo de colección.
- ✓ Paso #11. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 ml o 2 ml de microcentrífuga e introducir con una pipeta 200 µl del buffer AE de elución directamente sobre la membrana de la columna para liberar los ácidos nucleicos de la membrana de silicato.
- ✓ Paso #12. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 minuto a 8,000 rpm.

A continuación se conservó la muestra extraída en freezer a -20 °C, y luego se procedió a realizar la electroforesis como se explica a continuación:

Electroforesis para determinar presencia-ausencia de ADN.

- ✓ Paso #1. Se pesó en la balanza de precisión 3 gramos de agarosa y mezcló en un erlenmeyer con 300 mL de TAE Buffer.
- ✓ Paso #2. Se calentó el gel de agarosa en el microondas hasta que comenzó a hervir. Este paso se realizó 2 o 3 veces para asegurarse que el gel se encontrara bien líquido. Echar en el gel, una vez diluido, una gota de **bromuro de etidio**. Dejar el gel enfriándose.

OJO Esta solución es sumamente tóxica en caso de hacer contacto con los ojos o con la piel. Para la manipulación de esta solución se deben utilizar guantes especiales

- ✓ Paso #3. Una vez el gel se solidificó, en un cubreobjetos se colocó 1µl del tampón de carga para cada muestra.
- ✓ Paso #4. Luego con la micropipeta se tomó 5µl de su producto de ADN y pipeteo o mezcló su producto con el tinte para cargar y echo cuidadosamente en uno de los pozos marcados.
- ✓ Paso #5. Se cargó el primer pozo con el ADN marcador (ladder) 1 kb.
- ✓ Paso #6. Se corrió el gel a 120 voltios, 400 amperes de corriente y durante 45 minutos.
- ✓ Paso #7. Por último, se colocó el gel de agarosa en la cámara de rayos ultravioletas para poder visualizar la banda de ADN.

La extracción de ADN fue difícil de manejar debido a que los pinos contienen grandes cantidades de metabolitos secundarios tales como los polifenoles, taninos y polisacáridos, los cuales inhiben la acción enzimática, la misma que es esencial en el proceso de extracción y purificación de ADN (Collins y Symons, 1992; Varadarajan y Prakash, 1991). Por lo que los lavados en el proceso de extracción fueron vitales para la purificación del ADN, lográndose de este modo bandas bien definidas

Al seguir las indicaciones del protocolo original nos encontramos que el ADN tenía una consistencia algo chiclosa y que era difícil de diluir. Además, al hacer el chequeo por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, el ADN quedaba retenido en los pocillos (Figura III)

En las figuras III y IV se puede apreciar el gel de agarosa, donde se observa la extracción de ADN, este resultado permite contar con un procedimiento de extracción y cuantificación de ADN para iniciar los trabajos para desarrollar y caracterizar los marcadores de microsatélites y determinar la estructura poblacional del *Pinus occidentalis*.

Los resultados obtenidos en la obtención de la metodología de extracción de ADN en *P. occidentalis* da respuesta a los objetivos del presente proyecto.

La contribución de bosques y árboles a nivel de conservación de las especies, y para afrontar los retos presentes y futuros de la seguridad alimentaria, la mitigación de la pobreza y el desarrollo sostenible depende de la disponibilidad de una valiosa diversidad entre y dentro de las especies de árboles. La diversidad genética es necesaria para garantizar que los árboles forestales pueden sobrevivir, adaptarse y evolucionar en condiciones ambientales cambiantes. A la vez, mantiene la vitalidad de los bosques y proporciona resistencia a presiones como las plagas y enfermedades.

Conocer la diversidad genética es necesario para los programas de selección artificial, mejora genética y domesticación para el desarrollo de variedades adaptadas y para fortalecer los aspectos útiles. En muchos países, las perspectivas de desarrollo

sostenible en las zonas rurales se verán muy influenciadas por el estado de la diversidad de los ecosistemas y especies forestales.

Bibliografía

Cerda-Granados, D.A. and Verónica Díaz. 2013. Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. Encuentro No. 94, 82-92.

Collins, G.G. And Symons, R.H. 1992. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Mol. Biol. Rept.* 10:233-23.

Motte, E. 2001. Programa de biotecnología. Maestría en Biotecnología. Universidad de Guayaquil. 42 p.

Orozco, G., Ramón del Val Díaz., Mario González Chavira., Hipólito Jesús Muñoz Flores., M. Coria Avalos., Jesús García Magaña. 2010. Extracción de ADN y una prueba inicial de primers en *Pinus pseudostrobus* Lindl. *Foresta Veracruzana* 12(2):15-20.

Varadarajan, G.S. And Prakash, C.C. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Mol. Biol. Rept.* 9 (1):6-12.

M. Xander., Burgert V. 1997. DETERMINATION OF THE AGE OF *PINUS OCCIDENTALIS* IN LA CELESTINA, DOMINICAN REPUBLIC, BY THE USE OF GROWTH RINGS. *IAWA Journal*. Vol. 18 (2), 139-146.

C. Latta, Steven., M. Wunderle, Joseph, Jr. 1998. The Assemblage of Birds Foraging in Native West Indian Pine (*Pinus occidentalis*) Forests of the Dominican Republic during the Nonbreeding Season. *BIOTROPICA* 30(4): 645-656.

Echt. C.S., Deverno L.L., Anzidei M., Vendramin G.G., 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology*, 7, 307-316.

O. P. Rajora., M. H. Rahman., G. P. Buchert., B. P. Dancik. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology*, 9, 339–348.

S. Mariette., D. Chagné., S. Decroocq., G. G. Vendramin., C. Lalanne., D. Madur., C. Plomion. 2001. Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Ann. For. Science*. 58, 203–206.

S. Mariette., D. Chagnea., C. Leazier., P. Pastuzka., A. Raffin., C. Plomion & A. Kremer. 2001. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 86, 469-479.

A. Gómez., E. Aguiriano., R. Alía., M.A. Bueno. 2002. Análisis de los recursos genéticos de *Pinus pinea* L. en España mediante microsatélites del cloroplasto. *Agr. Sist. Recur. For.* Vol. 11 (1).

Speer, James H., Orvis, Kenneth H., Grissino-Mayer, H. D., Kennedy, Lisa M., Horn, Sally P. 2004. Assessing the dendrochronological potential of *Pinus occidentalis* Swartz in the Cordillera Central of the Dominican Republic. *The Holocene* 14,4, pp. 563-

S. E. Nijensohn., P. G. Schaberg., G. J. Hawley., D. H. DeHayes., 2005. Genetic subpopulation structuring and its implications in a mature eastern white pine stand. *Can. J. For. Res.* Vol. 35.

P. E. Marquardt., C.S. Echt., B. K. Epperson., D. M. Pubanz., 2008. Genetic Structure, diversity and inbreeding of eastern white pine under different management conditions. *Can. J. For. Res.* 37, 2652-2662.

W.S. Bueno L., B. Eddie. 2009. Modeling stem increment in individual *Pinus occidentalis* Sw. trees in La Sierra, Dominican Republic. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). ISSN: 2171-5068 e ISSN: 2171-9845.

G. O. Molina., 2010. Tesis., Estudio Filogeográfico de *Pinus hartwegii* Lindley (pinaceae). Instituto Politecnico Nacional, Mexico.

D. Agundez., CH. Burban., J.J. Robledo., S.C. González-Martínez., R.J. Pettit., R. Aliar., 2010. ESTUDIO DE POBLACIONES NATURALES ESPAÑOLAS DE *PINUS PINASTER* AIT. Y *PINUS HALEPENSIS* MILL. MEDIANTE ADN MITOCONDRIAL.

L. J. Barbolla., P. Delgado-Valerio., G. Geada-López., A. Vázquez-Lobo., D. Piñero., 2011. Phylogeography of *Pinus* subsection Australes in the Caribbean Basin. *Annals of Botany* 107: 229–241.

M. Parks., R. Cronn., A. Liston., 2012 Separating the wheat from the chaff: mitigating the effects of noise in a plastome phylogenomic data set from *Pinus* L. (Pinaceae). Parks et al. *BMC Evolutionary Biology*, 12:100 <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/12/100>.

H. Wang., J. A. Walla., S. Zhong., D. Huang., W. Dai., 2012. Development and cross-species/genera transferability of microsatellite markers discovered using 454 genome sequencing in chokecherry (*Prunus virginiana* L.). *Plant Cell Rep.* 31:2047–2055.

V. G. Teza., M. I. Fonseca., L. H. Walantus., P. Davalos., A. A. Toro., A. E. Cariaga-Martinez., L. L.Villalba., P.D. Zapata., 2012. Estandarización de marcadores moleculares microsatélites para su uso en la industria forestal de Misiones, Argentina. *Rev. Colombiana. Biotecnología* vol.14 no.1.

Control de Gastos

GASTOS INCURRIDOS HASTA EL MES DE AGOSTO 2014

CONCEPTO	Unidad de Medida	Costo Unitario	Gastos
1. Honorarios del personal profesional y de apoyo.			
Coordinador	meses (8)	9,000.00	72,000.00
Asistente 1	meses (10)	5,000.00	50,000.00
		Sub-total	122,000.00
2. Servicios personales de apoyo.			
Alimentación y Hospedaje		64,000.00	64,000.00
Transporte y combustible		26,667.00	26,667.00
Servicios de comunicaciones			
Procesamiento			
Pagos de Servicios		4,500.00	4,500.00
Fotocopias y reproducción 200 x 30			
3. Gastos en insumos, materiales y otros		Sub-total	95,167.00
Reactivos y materiales	varios	27,282.90	27,282.90
		Sub-total	27,282.90
		Total	244,449.90

ANEXOS

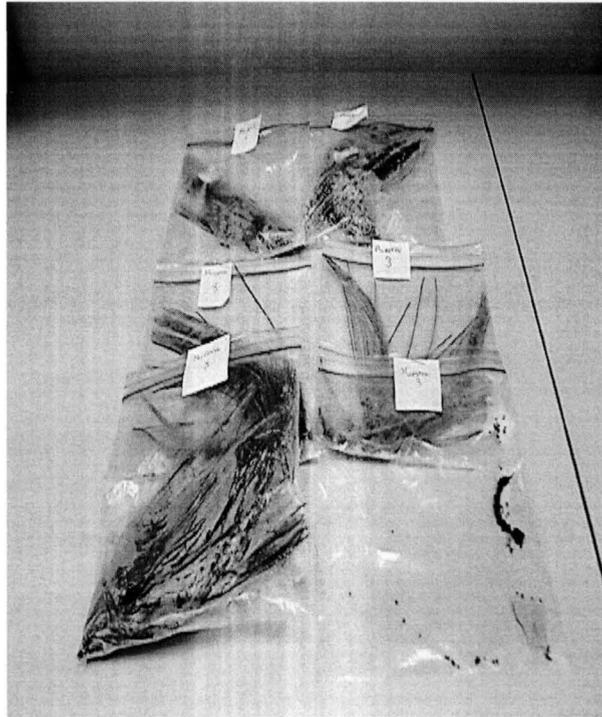


Figura I. Muestras de *P. occidentalis*, tomadas del hábitat natural.

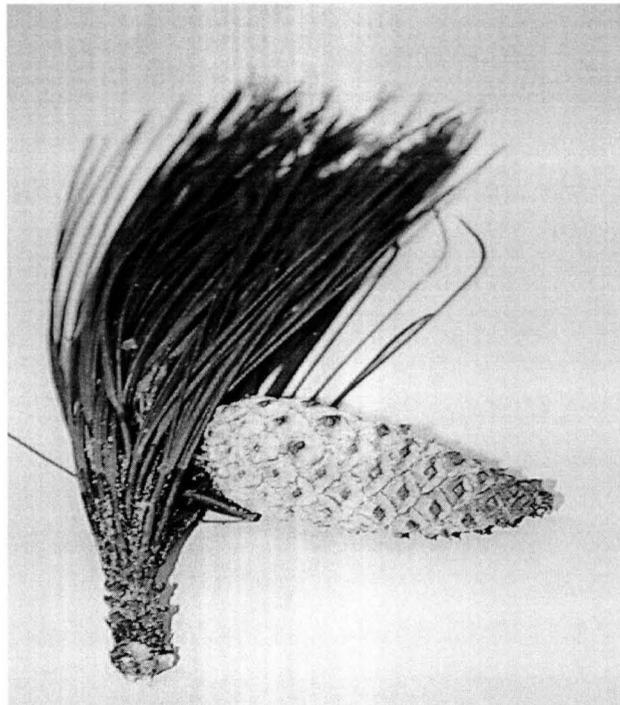


Figura II. Muestras de *P. occidentalis*, tomadas en la Sierra de Neyba.

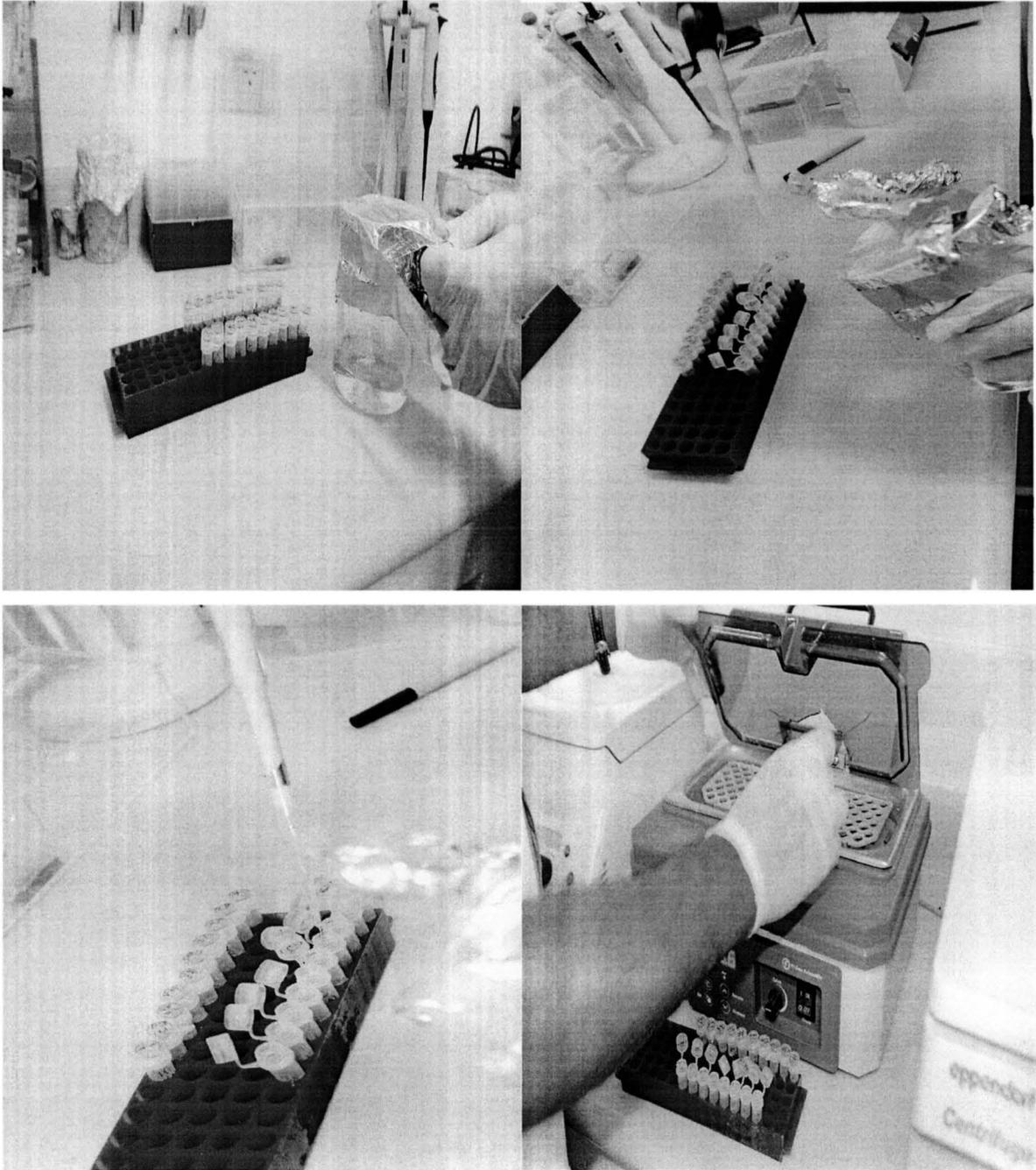


Figura III. Secuencia de extracción de ADN

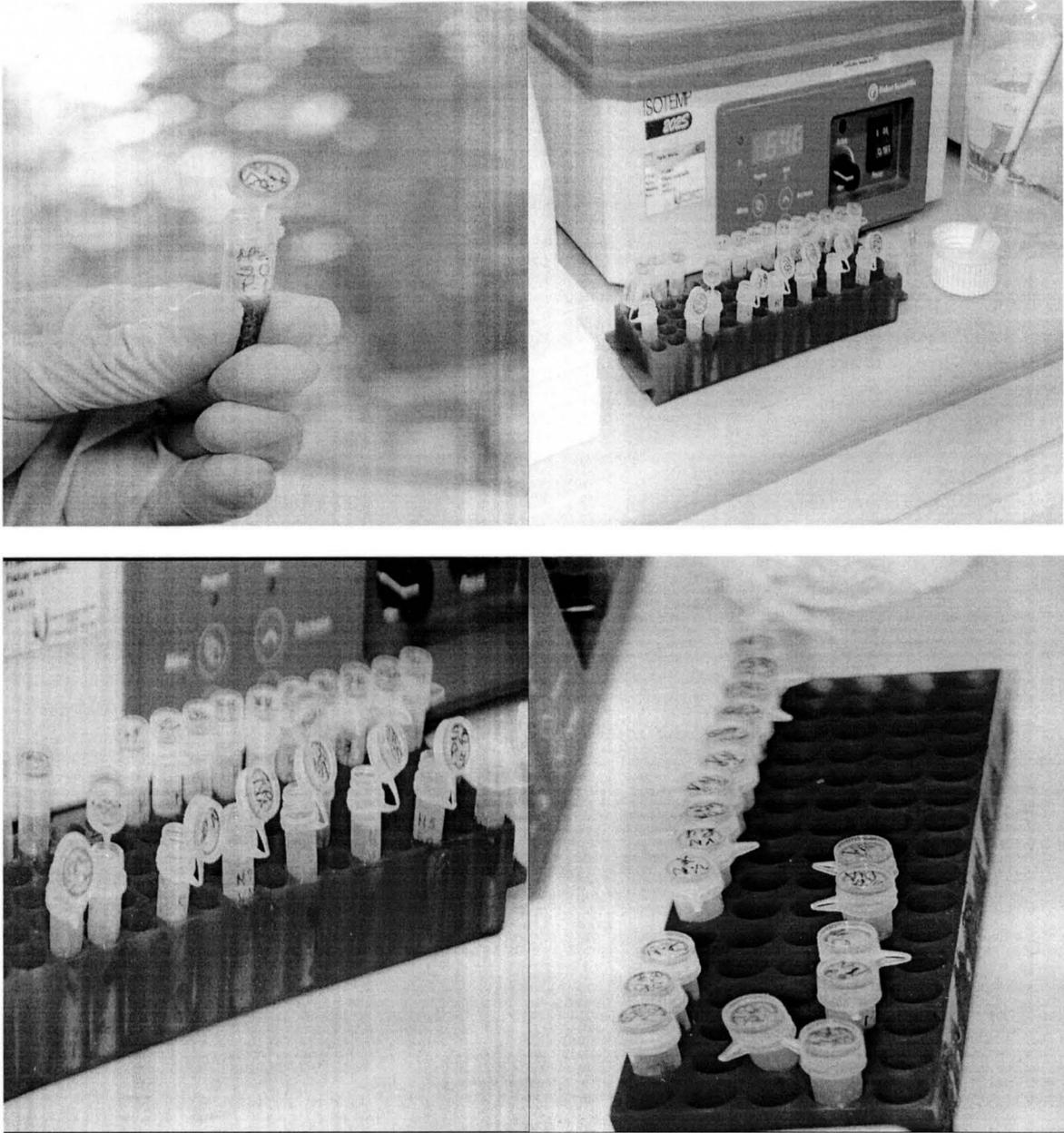


Figura IV. Secuencia de extracción de ADN

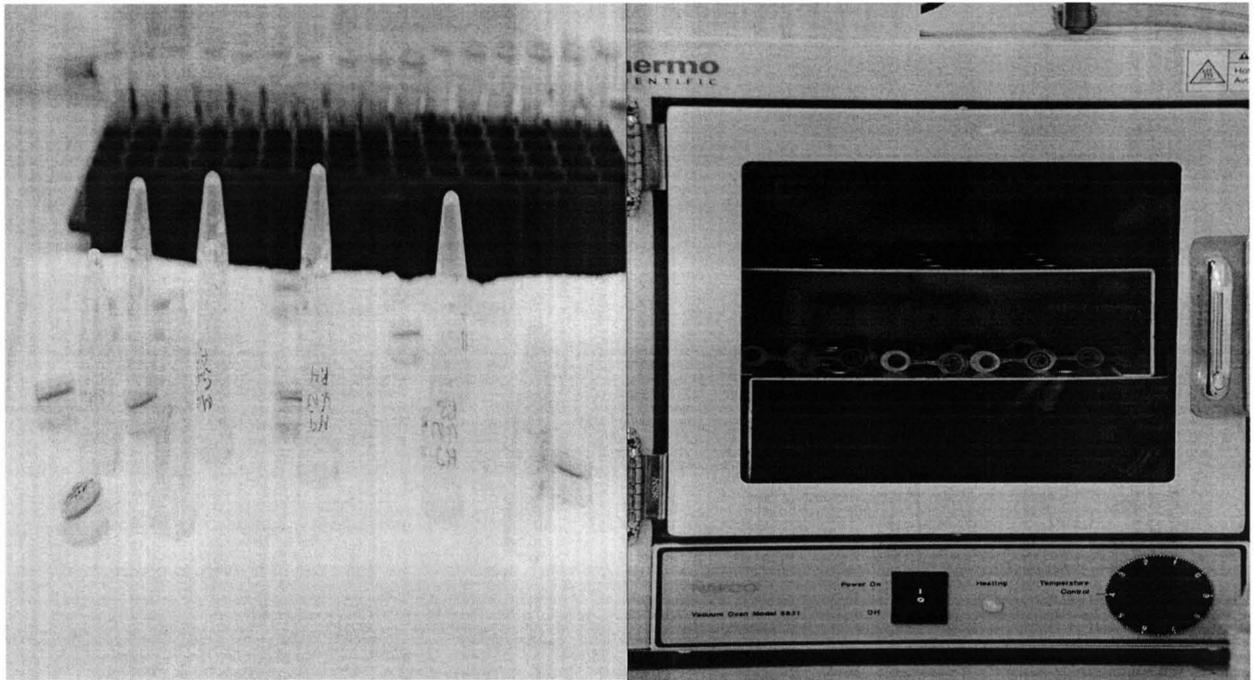
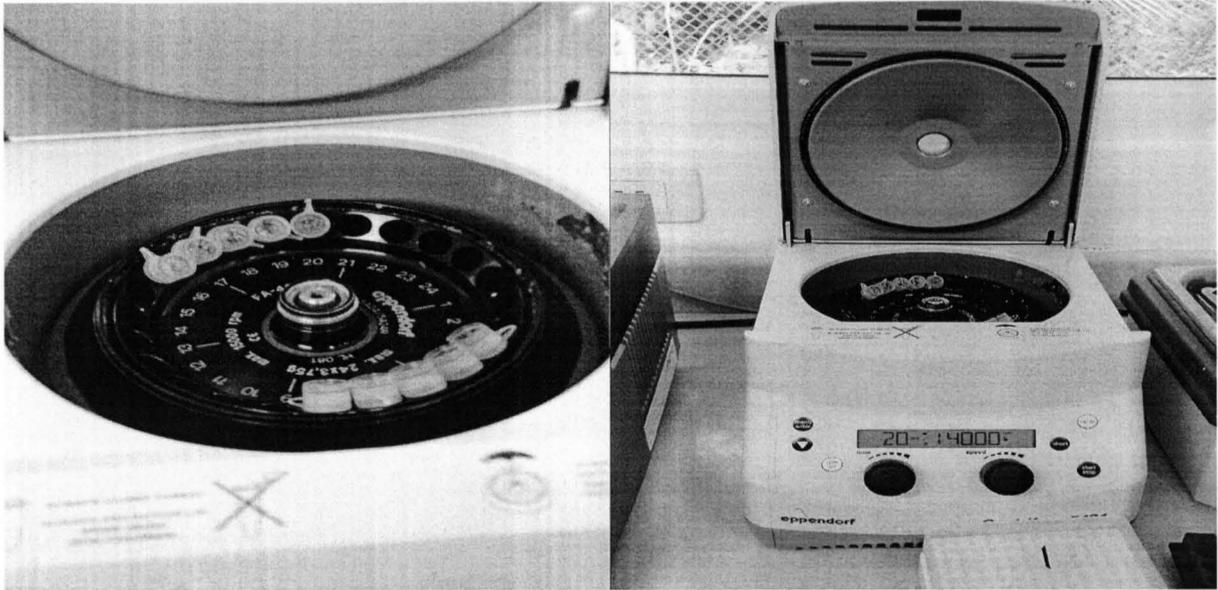


Figura V. Secuencia de extracción de ADN

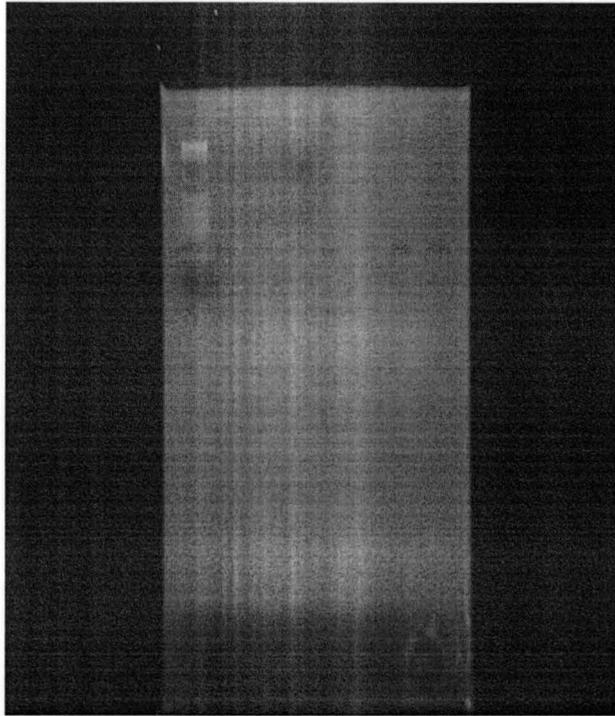


Figura VI. Gel de electroforesis con el marcador o leader

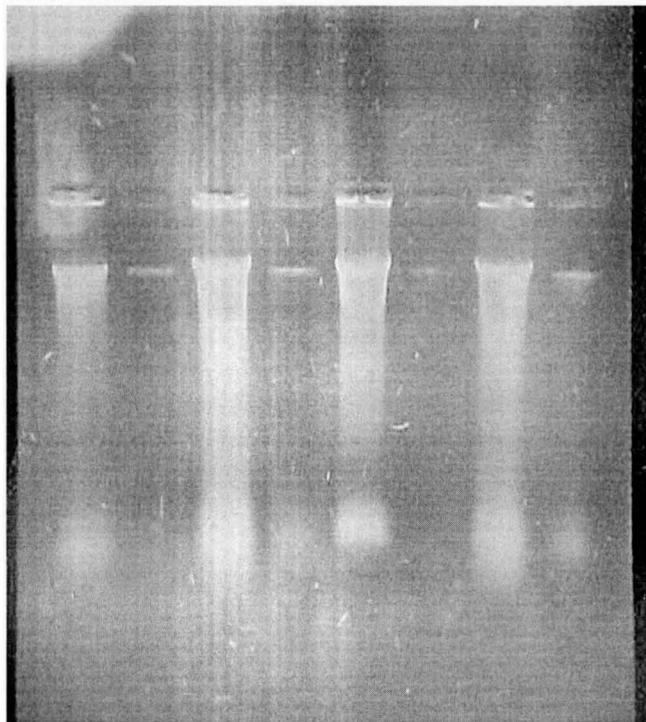


Figura VII. Gel de electroforesis cargado con cuatro muestras de ADN