



# Transferibilidad de marcadores de microsatélites en nueve especies de pinos

## Transferability of microsatellite markers among nine pine species

Isaac Sandoval-Padilla<sup>1,2</sup>, Aremi Rebeca Contreras-Toledo<sup>1</sup>, Luis Felipe Guzmán<sup>1</sup>, Blanca Amalia Amaro González<sup>1</sup> y Moisés Cortés-Cruz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

<sup>2</sup> Universidad de Guadalajara. Centro de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Doctorado en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Nextipac, Zapopan, México.

\* Autor de correspondencia.  
cortes.moises@inifap.gob.mx

### RESUMEN

En México se encuentran presentes 94 especies de coníferas, de las cuales el género *Pinus* L. destaca con 49. No obstante, los estudios de diversidad genética de poblaciones mexicanas de pinos son escasos, particularmente aquellos que incluyen marcadores moleculares, basados en secuencias simples repetidas (SSR), considerados especie-específicos, como los microsatélites. El costo inicial para su identificación es elevado cuando no se ha secuenciado el genoma de las especies, así como el diseño de cebadores que permitan la amplificación de las regiones SSR. Sin embargo, una alternativa es la evaluación de los SSRs en especies relacionadas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la transferibilidad de marcadores SSR desarrollados para *P. taeda* en diferentes especies de pinos. Se extrajo ADN genómico de *P. ayacahuite*, *P. cembroides*, *P. devoniana*, *P. hartwegii*, *P. lumboltzii*, *P. luzmariae*, *P. patula*, *P. jeffreyi* y *P. pseudostrobus*. basado en el método de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) a partir de tejido liofilizado. Los marcadores fueron seleccionados por grupos de ligamiento (GL), por su motivo de repetición y por su posición dentro de cada GL. Finalmente, los fragmentos amplificados por PCR fueron cuantificados. Treinta y siete marcadores (95%) amplificaron en al menos una de las nueve especies evaluadas. De ellos, 27 (69%) presentaron amplificación en más de 50% de las especies. Estos marcadores presentan cobertura en los 12 GL. Se observó amplificación de más de 75% en *P. jeffreyi*, *P. pseudostrobus* y *P. devoniana*. La transferibilidad de estos marcadores representa una alternativa para realizar estudios de diversidad genética en especies de pinos.

PALABRAS CLAVE: amplificación interespecífica, diversidad genética, *Pinus*, SSR.

### ABSTRACT

There are 94 species of conifers distributed in Mexico, from which *Pinus* L. species are the most abundant with 49 species. Nevertheless, the genetic diversity studies on Mexican populations of pines are limited, particularly those including molecular markers considered species-specific, such as microsatellites (SSR). The initial cost for their identification is high when the species' genome has not been sequenced, as well as the designing of primers that allow the amplification of the SSR regions. However, an alternative is the assessment of SSR in related species. The objective of this study was to evaluate the transferability of SSR markers developed for *P. taeda* in different pine species. Genomic DNA was isolated from *P. ayacahuite*, *P. cembroides*, *P. devoniana*, *P. hartwegii*, *P. lumboltzii*, *P. luzmariae*, *P. patula*, *P. jeffreyi* and *P. pseudostrobus*, based on CTAB method (ionic detergent cetyltrimethylammonium bromide) from lyophilized tissue. The markers were selected based on linkage group (LG), motif and position within the LG. Finally, fragments were amplified by PCR and products were quantified. Thirty-seven markers (95%) amplified in at least one of the nine species. From those, 27 (69%) amplified in more than 50% of the species. These markers were present in the 12 LG. Amplification of more than 75% was observed for *P. jeffreyi*, *P. pseudostrobus* and *P. devoniana*. The transferability of these markers represents an alternative for genetic diversity studies across pine species.

KEYWORDS: inter-specific amplification, genetic diversity, *Pinus*; SSR.

## INTRODUCCIÓN

Las coníferas son un grupo de árboles y arbustos de gran importancia económica y ecológica, ya que son los componentes dominantes de diversos tipos de vegetación. En México, se encuentran presentes 10 de los 71 géneros del grupo, con 94 especies, de las cuales, 43 son clasificadas como endémicas. Su distribución nacional ocurre desde el nivel del mar hasta los 4000 m s.n.m. Dentro de las coníferas, el género *Pinus* destaca con 49 especies (Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014).

Las especies del género *Pinus* han disminuido en número de poblaciones, por lo que, algunas de ellas se encuentran amenazadas o bajo protección. Esto es resultado de la tala indiscriminada, la pérdida del hábitat debido al cambio de uso de suelo para producción agrícola, el cambio climático que trae como consecuencia la reducción del área de distribución potencial por cambios en la temperatura, sequías y otros eventos extremos incendios forestales, incidencia de plagas y enfermedades y otros fenómenos naturales (Del Castillo, Pérez-de la Rosa, Vargas y Rivera, 2004). Proyecciones en *P. hartwegii* Lindley, por ejemplo, indican una reducción del hábitat de 86% para 2050, debido a los efectos del cambio climático (Gutiérrez y Trejo, 2014).

La drástica disminución poblacional puede afectar negativamente los niveles de diversidad genética, implicando una baja capacidad de adaptación al ambiente y hacer frente a factores adversos, acelerando el proceso de extinción (Rocha y Gasca, 2007). Esto es consecuencia del manejo antropogénico en la composición genética y genotípica de las poblaciones vegetales (Freeman y Herron, 2002). Asimismo, la baja diversidad genética y la ausencia de estructura genética en las especies puede ser un reflejo de cambios demográficos a lo largo de las generaciones (Freeman y Herron, 2002; Moreno, 2007). Lo anterior puede estar ocurriendo en las especies del género *Pinus* debido a la sobreexplotación, la disminución poblacional y la reducción del área de distribución, por lo que los análisis de la diversidad genética son indispensables. A pesar de ello,

en poblaciones mexicanas de *Pinus* estos estudios son escasos, particularmente aquellos que incluyen marcadores moleculares considerados especie-específicos, como los microsátelites o secuencias simples repetidas (SSR). Los SSR son secuencias de ADN formadas de uno a seis pares de bases, encontrándose en regiones codificantes y no codificantes. Estos marcadores son utilizados para estudios de caracterización genotípica en plantas por ser abundantes en el genoma, altamente informativos, multialélicos, codominantes y permiten su transferibilidad entre especies relacionadas (Mason, 2015; Carneiro, Santini, Lima y de Freitas, 2016). Este tipo de marcadores moleculares de ADN permiten inferir la diversidad y estructura genética, tamaños efectivos y mínimos variables de poblaciones para conservación (*in situ* o *ex situ*) y selección de genotipos para mejoramiento, eventos de cuellos de botella, cartografía genética, etc. (Rocha y Gasca, 2007; Geburek y Konrad, 2008). Sin embargo, la principal desventaja de estos marcadores es el costo de su generación cuando no se tiene información del genoma de la especie de interés, así como del diseño de cebadores que permitan la amplificación de las regiones SSR (Rentarúa, 2007; Rocha y Gasca, 2007; Valdés-Infante Herrero *et al.*, 2010; Carneiro *et al.*, 2016). Una alternativa es la evaluación de SSRs desarrollados para especies relacionadas a la especie de interés (transferibilidad) (Echt, Vendramin, Nelson y Marquardt, 1999; Chagne *et al.*, 2004; Celiński, Pawlaczyk, Wojnicka-Póltorak, Chudzińska y Prus-Głowacki, 2011; Lesser, Parchman y Buerkle, 2011; Feng, Yang, Wang, Luo y Li, 2014; Villalobos-Arámbula, Pérez de la Rosa, Arias y Rajora, 2014; Rai, Ginwal y Saha, 2018). Así, se pueden identificar marcadores útiles reduciendo el tiempo y consumo de recursos en estudios genéticos para diversas especies de pinos (Villalobos-Arámbula *et al.*, 2014).

## OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la transferibilidad de marcadores SSR desarrollados para *P. taeda* en nueve especies de pinos.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se emplearon las acículas de nueve especies del género *Pinus*: *P. cembroides* Zucc. (San José de Gracia, Aguascalientes), *P. devoniana* Lindl. (Tapalpa, Jalisco), *P. luzmariae* Pérez de la Rosa (Bosque La Primavera, Jalisco), *P. patula* Schltdl. & Cham. (Cruz Blanca, Veracruz), *P. ayacahuite* C. Ehrenb. ex Schltdl. (San Antonio Buenavista, Puebla), *P. hartwegii* Lindl. (Tapalpa, Jalisco), *P. jeffreyi* Balf. (Ejido Sierra de Juárez, Baja California), *P. lumboltzii* B.L. Rob. & Fernald (Sierra Escondida, Aguascalientes) y *P. pseudostrobus* Brongn. (San Cristóbal de las Casas, Chiapas). El proceso de extracción de ADN se realizó basado en el método de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) a partir de tejido liofilizado. Para las primeras cuatro especies se empleó la misma metodología que Saghai-Marooof, Soliman, Jorgensen y Allard, (1984); para el resto de las especies se siguió la metodología establecida por Huang, Guang, Kong, Guo y Guo, (2013). La concentración y calidad del ADN fue determinada mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) y corroborada mediante electroforesis en geles de agarosa, comparando el patrón de migración de las muestras con el del marcador de referencia, lambda sin cortar (New England Biolabs). Se emplearon tres árboles para cada especie, excepto para las especies *P. devoniana* Lindl. y *P. hartwegii* Lindl., para las cuales solamente se emplearon dos árboles.

### Selección de marcadores SSR

Se realizó la selección de los marcadores de SSR desarrollados para *P. taeda* (Echt *et al.*, 2011) con base en tres criterios: a) por grupo de ligamiento (GL) (marcadores distribuidos en todos los grupos de ligamiento de las especies del género *Pinus*), b) motivo de repetición (marcadores con repetición simple de dos o tres nucleótidos) y c) posición genética dentro de cada GL (marcadores ubicados en el brazo corto y largo). Se seleccionaron 39 marcadores, tres por cada uno de los 12 grupos de ligamiento y tres marcadores que no tienen asignación reportada (Tabla 1).

### Amplificación por PCR y análisis

Las reacciones de amplificación mediante PCR se realizaron en un volumen final de 10 µL conteniendo 40 ng de ADN, 1 µM de cada iniciador y 0.8 X de REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma- Aldrich). Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95° por 5 min., seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95° por 40 s, hibridación a 60° por 40 s y elongación a 72° por 2 min y una de extensión final a 72° por 10 min. La amplificación se realizó en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa a 2% previamente teñidos con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) en amortiguador TBE 1 X a 120 V constantes durante 2 horas. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó exponiendo los geles a luz UV en tanto que la captura de la imagen se realizó mediante el sistema Gel Logic (KODAK Carestream). Finalmente, se realizó el registro y cuantificación de fragmentos para determinar su tamaño y el porcentaje de amplificación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación de fragmentos de los 39 marcadores SSR fue variable. Treinta y siete (95%) amplificaron en al menos una de las nueve especies evaluadas. De ellos, 69.27% (27) presentó amplificación mayor a 50% a través de las especies, los cuales se encuentran distribuidos en los 12 grupos de ligamiento (GL). Diez de los marcadores (25.64%) amplificó entre 10% y 50% de las especies (Tabla 2). Los marcadores SsrPt\_ctg7141, PtRIP\_0630 y PtSIFG\_1062 amplificaron en las especies *P. jeffreyi* y *P. pseudostrobus* mientras que el marcador PtRIP\_1072 amplificó exclusivamente en la especie *P. lumboltzii*. Los marcadores PtTX3027 y PtTX3019 no amplificaron en ninguna especie. Los marcadores PtRIP\_9315, PtSIFG\_0265, PtTX3029, PtTX3045, PtSIFG\_0440, PtSIFG\_1018, PtSIFG\_0249 (17.95%) amplificaron en todas las especies, localizados en los grupos de ligamiento (GL) 2, 4, 5, 6, 8, 11 y uno sin mapear.

TABLA 1. Marcadores de microsatélites e iniciadores desarrollados para *P. taeda* (Echt *et al.*, 2011) utilizados para su amplificación en *Pinus* spp.

Número	Nombre	GL <sup>1</sup>	Posición (cM) <sup>2</sup>	Secuencias sentido y antisentido (5'-3')	Unidades de repetición
1	PtRIP_0540	1	51.60	TGTTGTCATTAGTGGTAGGATCA/ AAGCGATGTCACCTGTTGAGAA	(CA)10
2	PtRIP_0984	1	72.30	TGTGACCTGAAAATTCCT/ GGCTTGAACCAGTTCATA	(TG)18
3	PtRIP_1072	1	107.10	TTTCATGACCTTGGAGTGA/ ATTGATCCCATTGTTGCTCC	(CA)15
4	PtSIFG_4454	2	7.70	CTTGCTATGCCAACCAGACA/ CCCACACCAGCTCCATTTTA	(AT)6
5	PtRIP_9315	2	32.40	GGCTTAGGCATAGAGGGACC/ AACAAAGTTGGAAGCCACCAT	(TG)13
6	NZPRI078	2	107.70	TGGTGATCAAGCCTTTTCC/ GTTGATGAGTGATGGCATGG	(GT)10
7	PtRIP_0134	3	19.60	GTTTACATTTTCTGGGGCA/ GATTTACAAAAATCCCTGCCA	(AC)15
8	SsrPt_ctg7141	3	80.30	GAATGACGCATTATCAGGGG/ TCACCTTCTCACCTCTGCC	(CCG)8
9	PtTX4228	3	113.90	ATATCATGTTTAGGTTGGTGTG/ AGTTAGGCTTTTGTCC	(CA)14
10	PtRIP_0376	4	2.70	AGGAATTGGTGATTTCATGTGG/ ATAAAAGAATCGGCCCTGGT	(AC)14
11	PtSIFG_0265	4	53.90	CTGCTCATCATGCTTTTGA/ GAAGCCCTCAAGTGTCTGC	(CAG)5
12	PtTX3027	4	81.40	TCCATTTGAGAACTTTTT/ AGGAGCCACAACATAATA	(CAT)10
13	PtRIP_0630	5	19.30	CGCAAGCTATGATACAACGC/ TGTTGGCTGAGTGTGAAAGC	(AC)12
14	PtTX3029	5	44.00	CTTGTTGCTGCTTCTGC/ AACAAAATAATATAAATGCTCTGC	(GCT)8
15	PtTX4214	5	80.00	AACATTTCCCAAGCCTCAA/ ACATGGACATCAAGAAGAAGTG	(CA)20
16	PtRIP_0609	6	36.70	CAAAATGCAGAGGGGCTTAA/ CCAGTCCATCGAATCACGTA	(AC)12
17	PtRIP_0990	6	57.90	GACCTAAAGAGGTTACCGC/ TCAAATCTTGGGTTAGTATGCAGA	(CA)25
18	PtTX3045	6	101.90	CATCGCATATCGCAATCAGG/ AAGCAAGAGGGAAATGTAATAGA	(CA)12
19	PtTX3019	7	35.70	AAGAATATCAAGCACTCC/ CAAAGGCATAAAGAACT	(CAA)10
20	PtTX4056	7	66.30	TTAAGGCCAGTTCCAATACAAAAT/ GAGCCCAACAATAAAACAATGAG	(GA)17
21	PtSIFG_0203	7	121.90	GATGGCTACTGTTCCGGTGGT/ GGAGTACAGTGAGCAACTGAAGG	(TA)8
22	PtSIFG_0245	8	70.90	TTTCAAGGGGTGAGCACTG/ GAGGAGGAAGAAGGTTGGG	(GCC)7
23	PtSIFG_0440	8	99.90	CTGATCGAATCTTCCCCAAA/ AGTTCCAGTTGGGTTGCAC	(GCG)6
24	PtSIFG_4446	8	126.40	TCATGGCTTTGGACATGAAA/ ATGGGGCTCAAGTGTACTGC	(TC)6
25	PtSIFG_1062	9	59.50	ATTGAAAAATACAGCGGCTCA/ GCGAGCCACAGTTGATTATGT	(TA)9
26	PtTX4079	9	64.0	CACATTTCCCTCCAATAAAC/ GGGCATAATAGCTGTTCTAA	(CA)23
27	PtTX2123	9	105.60	GAAGAACCCACAAACACAAG/ GGGCAAGAATTCAATGATAA	(AGC)8
28	PtRIP_1035	10	28.80	AGCATAATGAGCCCTTCTCG/ AGAATATGTGTCCTCCCC	(GT)11
29	PtTX3047	10	43.80	TTGGAATACTGCACGATGAC/ ATTTAGATAGGAGATGGTTGTTTA	(AC)21
30	SsrPt_ctg946	10	78.90	TATCAGGTATAGGCCTCCGC/ AAATAGGAGCCCTTCTGGGA	(AGG)9
31	PtTX3063	11	35.20	CAATCAGAATCAGCGGCAAAACAAA/ TTCAACAACATTCATCACACTA	(CAA)15
32	PtSIFG_1018	11	85.00	CTCGTTGTGGCTGGTATTGT/ CTCTTCTGCACGATATCTCCG	(CGG)6
33	PtTX3117	11	92.20	GTGATTGATGAGGAGGCTTACT/ TAGGGACTGGCACCGATGAA	(CAT)9
34	PtSIFG_0424	12	8.50	CAGATTTGGGGAAACGTAGA/ ACGGACGCTTCGAGATCTTA	(CTG)7
35	PtSIFG_4304	12	25.80	CATGCATGTGTGGAGGAGTT/ CTCATGTGCTTTGATCCCCCT	(CT)6
36	PtRIP_1036	12	51.90	TGGTTGTGCGAGATCACAAT/ TTGAGGGAATTGAAATTGGG	(GT)29
37	PtSIFG_0249	N.M. <sup>3</sup>	N.M.	GGCCTGCAACAAAATGAAAT/ CCCTCTGAAAGCAGAATTGC	(CAG)5
38	PtSIFG_1032	N.M.	N.M.	TTTTGTTGGGTTCTGTCTGTT/ TGAGACCATAAGAGCAGCGAT	(CAG)3
39	PtSIFG_1185	N.M.	N.M.	GATTATCCACGGCGAAAAGA/ GGGAAATTCGACCTGTGAAGA	(AGC)7

<sup>1</sup>GL: grupo de ligamiento, <sup>2</sup>cM Centimorgan; <sup>3</sup>N.M.: No mapeado



TABLA 2. Amplificación de 39 marcadores de microsatélites en nueve especies de *Pinus* L. El valor “1” indica amplificación y “0” no amplificación.

Marcador	<i>Pinus jeffreyi</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Pinus devoniana</i>	<i>Pinus luzmariae</i>	<i>Pinus patula</i>	<i>Pinus lumholtzii</i>	<i>Pinus hartwegii</i>	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Pinus ayacahuite</i>	Amplificación (%)
PtRIP_9315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100
PtSIFG_0265	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100
PtTX3029	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100
PtTX3045	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100
PtSIFG_0440	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100
PtSIFG_1018	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100
PtSIFG_0249	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100
PtTX4056	1	1	1	1	1	1	1	1	0	88.89
PtSIFG_0424	1	1	1	1	1	1	1	1	0	88.89
PtRIP_0376	1	1	1	1	1	1	1	0	1	88.89
PtTX2123	1	1	1	1	1	1	1	0	1	88.89
PtSIFG_4304	1	1	1	1	1	1	0	1	1	88.89
PtSIFG_1032	1	1	1	1	1	1	1	1	0	88.89
PtSIFG_1185	1	1	1	1	1	1	1	1	0	88.89
PtRIP_0984	1	1	1	1	1	1	1	0	0	77.78
PtSIFG_0245	1	1	1	1	1	1	1	0	0	77.78
PtRIP_1036	1	1	1	1	1	1	1	0	0	77.78
PtSIFG_4454	1	1	1	1	1	0	1	0	1	77.78
SsrPt_ctg946	1	1	1	1	1	0	0	1	1	77.78
PtRIP_0540	1	1	1	1	1	1	0	0	0	66.67
PtRIP_0134	1	1	1	1	1	0	0	1	0	66.67
PtSIFG_4446	1	1	1	1	1	0	1	0	0	66.67
PtRIP_1035	1	1	1	1	0	1	1	0	0	66.67
PtTX3063	1	1	1	1	1	0	1	0	0	66.67
NZPRI078	0	0	1	1	1	1	1	0	0	55.56
PtTX4214	1	1	0	0	1	1	0	1	0	55.56
PtTX3047	1	0	1	1	1	1	0	0	0	55.56
PtRIP_0609	0	0	1	1	1	1	0	0	0	44.44
PtRIP_0990	0	0	1	1	1	1	0	0	0	44.44
PtSIFG_0203	1	1	0	0	0	1	0	1	0	44.44
PtTX4079	0	0	1	1	0	1	1	0	0	44.44
PtTX4228	0	0	1	0	1	1	0	0	0	33.33
PtTX3117	1	1	0	0	0	1	0	0	0	33.33
SsrPt_ctg7141	1	1	0	0	0	0	0	0	0	22.22
PtRIP_0630	1	1	0	0	0	0	0	0	0	22.22
PtSIFG_1062	1	1	0	0	0	0	0	0	0	22.22
PtRIP_1072	0	0	0	0	0	1	0	0	0	11.11
PtTX3027	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PtTX3019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Transferibilidad (%)	79.49	76.92	76.92	74.36	74.36	74.36	56.41	41.03	30.77	

Se observó un porcentaje de amplificación mayor a 30% en todas las especies. El mayor porcentaje de transferibilidad se observó en *P. jeffreyi* con 31 marcadores (79.49%), seguido de *P. devoniana* y *P. pseudostrobus* con 30 marcadores (76.92%). *P. luzmariae*, *P. patula* y *P. lumholtzii*, por otro lado, mostraron amplificación de 29 marcadores (74.36%), mientras que *P. hartwegii*, *P. cembroides* y *P. ayacahuite* mostraron amplificación en 22 (56.41%), 16 (41.03%) y 12 (30.67%) marcadores, respectivamente. Siete especies analizadas en el presente estudio tuvieron una transferibilidad de marcadores SSR mayor a 50%. Estas especies, así como *P. taeda*, pertenecen a la sección *Trifoliae* del subgénero *Pinus*. Por el contrario, las especies con menor transferibilidad (*P. ayacahuite* y *P. cembroides*) pertenecen al subgénero *Strobus* secciones *Quinquefoliae* y *Parrya*, respectivamente, siendo filogenéticamente más lejanas a *P. taeda* (Tabla 3). Las regiones complementarias de los iniciadores pudieron haber sufrido algún evento mutacional que impidió en ellos el proceso de hibridación durante el proceso de amplificación por PCR, con la

consecuente ausencia de ampliaciones (Chapuis y Estoup, 2007).

Estas tasas de transferibilidad son similares a las observadas en marcadores SSR de *P. strobus* evaluados en cinco especies de pinos (Villalobos-Arámula *et al.*, 2014), para las cuales se registró amplificación de entre 67% y 100%, dependiendo de la especie, aunque es importante considerar que el número de loci evaluados fue menor (solo 6 marcadores). Por el contrario, la transferibilidad de marcadores de *P. taeda*, *P. merkusii*, *P. resinosa* y *P. densiflora* en *P. kesiya* fue considerablemente baja (de 0% a 20%), debido posiblemente a la distancia filogenética de las especies originales con la especie objetivo (Rai *et al.*, 2018). El tamaño de los fragmentos generados en las diferentes especies fue variable (Fig. 1). Todos los marcadores presentaron polimorfismo a través de las especies en las se observó amplificación, con excepción de PtTX4079 y PtTX3063 (Tabla 4). Las diferencias entre los fragmentos obtenidos por un marcador se deben posiblemente al número de unidades de repetición que posee cada uno de ellos, producto de la adición o delección de dichas unidades.

TABLA 3. Clasificación taxonómica de las especies del género *Pinus* L. incluidas en el estudio (Gernandt, Geada, Ortiz y Liston, 2005; Kaundun y Lebreton, 2010; Hernández-León, Gernandt, Pérez de la Rosa y Jardón-Barbolla, 2013).

Especie	Subgénero	Sección	Subsección
<i>Pinus ayacahuite</i>	<i>Strobus</i>	Quinquefoliae	Strobus
<i>Pinus cembroides</i>	<i>Strobus</i>	Parrya	Cembroides
<i>Pinus devoniana</i>	<i>Pinus</i>	Trifoliae	Ponderosae
<i>Pinus hartwegii</i>	<i>Pinus</i>	Trifoliae	Ponderosae
<i>Pinus jeffreyi</i>	<i>Pinus</i>	Trifoliae	Ponderosae
<i>Pinus lumholtzii</i>	<i>Pinus</i>	Trifoliae	Australes
<i>Pinus luzmariae</i>	<i>Pinus</i>	Trifoliae	Australes
<i>Pinus patula</i>	<i>Pinus</i>	Trifoliae	Australes
<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Pinus</i>	Trifoliae	Ponderosae
<i>Pinus taeda</i>	<i>Pinus</i>	Trifoliae	Australes

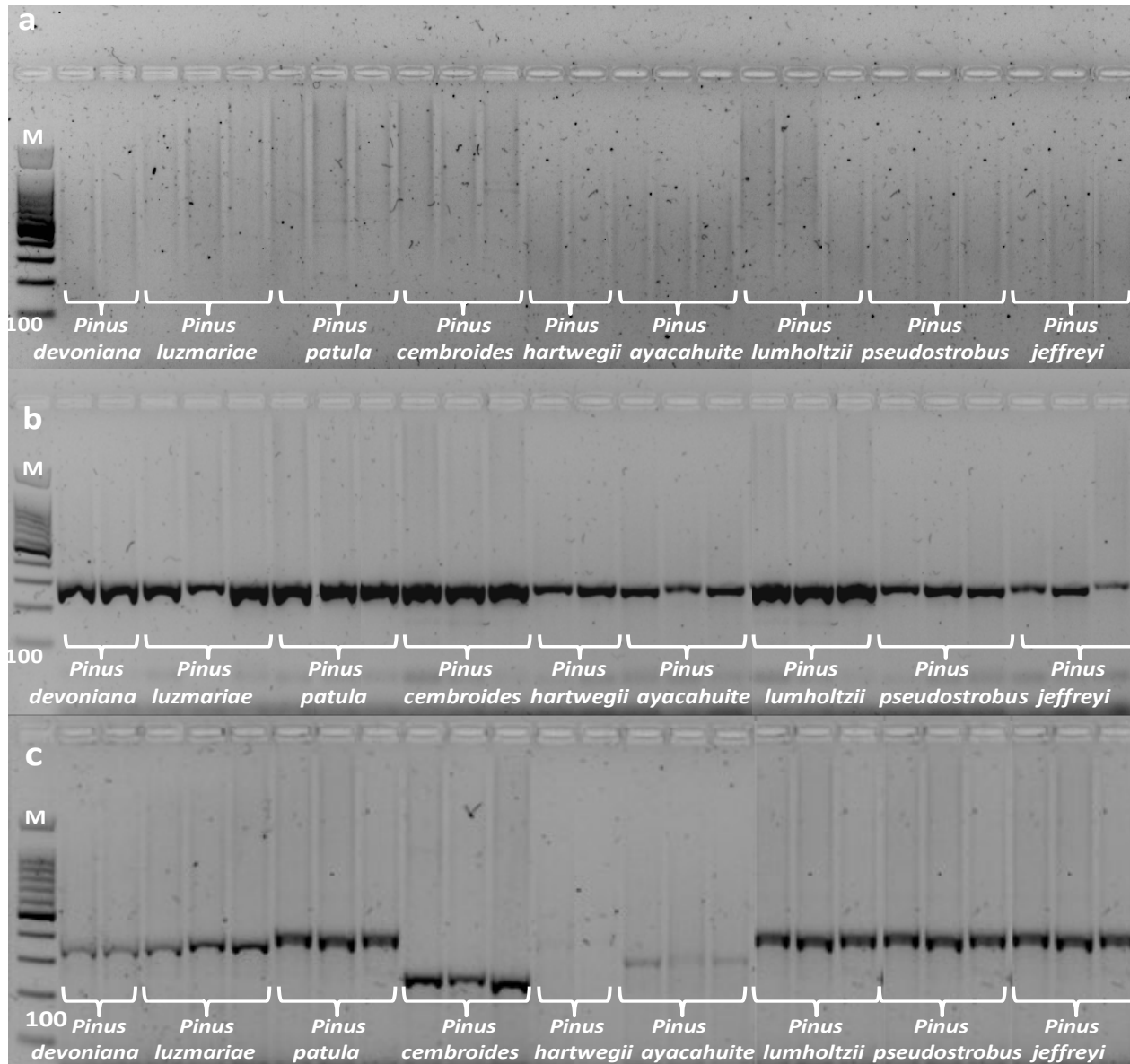


FIGURA 1. Amplificación de microsatélites (SSR) en nueve especies de *Pinus* L. a) Muestra ausencia de amplificación del marcador PtTX3019 en las nueve especies. b) Muestra presencia de amplificación del marcador PtSIFG\_0249 en las nueve especies. c) Muestra presencia y ausencia de amplificación del marcador PtSIFG\_4304 y productos con diferente peso molecular.

Los diferentes pesos moleculares también pueden ser resultado de errores de la polimerasa durante el proceso de replicación del ADN o durante la recombinación, obteniéndose cadenas hijas con longitudes desiguales a las parentales (Mason, 2015). Esto significa que alelos que difieren en una sola unidad de repetición están más relacionados por descendencia que alelos que difieren en

más de una repetición (Demarchi 2009; Carneiro *et al.*, 2016). Por lo tanto, las especies que se encuentran filogenéticamente más cercanas a la especie en la que se desarrollaron los iniciadores tendrían mayor éxito de transferibilidad que aquellas que se encuentran lejanas (Chapuis y Estoup, 2007).

TABLA 4. Tamaño observado en pares de bases de 39 marcadores de microsatélites amplificados en nueve especies de *Pinus* L.

Marcador	<i>Pinus taeda</i>	<i>Pinus jeffreyi</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Pinus devoniana</i>	<i>Pinus luzmariae</i>	<i>Pinus patula</i>	<i>Pinus lumholtzii</i>	<i>Pinus hartwegii</i>	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Pinus ayacahuite</i>
PtRIP_9315	207	242	220	200	200	200	200	200	200	200
PtSIFG_0265	395	370	378	300	300	300	350	310	300	310
PtTX3029	259	192	200	200	200	200	190	210	210	220
PtTX3045	255	250	250	200	200	200	250	200	180	100
PtSIFG_0440	309	300	300	260	260	260	300	260	260	260
PtSIFG_1018	311	310	320	290	290	290	300	250	250	250
PtSIFG_0249	297	300	300	290	290	290	300	290	290	290
PtTX4056	412	400	400	400	400	400	390	400	400	N/A <sup>1</sup>
PtSIFG_0424	368	370	370	350	350	350	380	370	370	N/A
PtRIP_0376	180	170	180	160	170	160	180	170	N/A	170
PtTX2123	194	190	200	200	200	200	200	200	N/A	200
PtSIFG_4304	393	382	374	340	360	400	390	N/A	260	300
PtSIFG_1032	282	278	290	300	300	300	390	270	270	N/A
PtSIFG_1185	377	390	390	200	200	200	380	200	200	N/A
PtRIP_0984	216	190	190	150	160	150	190	150	N/A	N/A
PtSIFG_0245	183	180	180	120	120	120	180	120	N/A	N/A
PtRIP_1036	184	180	168	100	100	100	170	100	N/A	N/A
PtSIFG_4454	297	318	306	280	280	280	N/A	280	N/A	280
SsrPt_ctg946	274	270	260	250	250	240	N/A	N/A	180	180
PtRIP_0540	204	180	180	180	180	180	170	N/A	N/A	N/A
PtRIP_0134	139	160	160	120	120	100	N/A	N/A	170	N/A
PtSIFG_4446	115	108	100	100	100	100	N/A	100	N/A	N/A
PtRIP_1035	170	160	160	180	180	N/A	140	160	N/A	N/A
PtTX3063	259	200	200	200	200	200	N/A	200	N/A	N/A
NZPRI078	336	N/A	N/A	280	290	290	320	310	N/A	N/A
PtTX4214	170	268	240	N/A	N/A	280	600	N/A	400	N/A
PtTX3047	347	410	N/A	320	350	320	300	N/A	N/A	N/A
PtRIP_0609	143	180	N/A	180	180	180	350	N/A	N/A	N/A
PtRIP_0990	207	N/A	N/A	120	120	120	100	N/A	N/A	N/A
PtSIFG_0203	110	108	100	N/A	N/A	N/A	100	N/A	100	N/A
PtTX4079	224	N/A	N/A	200	200	N/A	200	200	N/A	N/A
PtTX4228	156	N/A	N/A	120	N/A	120	150	N/A	N/A	N/A
PtTX3117	196	190	200	N/A	N/A	N/A	200	N/A	N/A	N/A
SsrPt_ctg7141	475	490	480	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PtRIP_0630	151	160	140	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PtSIFG_1062	205	190	190	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PtRIP_1072	213	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	300	N/A	N/A	N/A
PtTX3027	280	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PtTX3019	215	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

<sup>1</sup>N/A: no amplificación





Sin embargo, la transferibilidad entre especies cercanas no siempre ocurre. El concepto filogenético no necesariamente define el éxito de la amplificación interespecífica. En el presente trabajo, se podría esperar que *P. patula*, *P. luzmariae* y *P. lumboltzii* presentaran un mayor porcentaje de transferibilidad ya que pertenecen a la misma subsección (*Australes*) que *P. taeda* (Tabla 3). En contraste, *P. jeffrei*, *P. pseudostrobus* y *P. devoniana*, las cuales se encuentran en una subsección diferente a *P. taeda* (*Ponderosae*), registraron los mayores porcentajes de transferibilidad. Los bajos niveles de transferibilidad entre especies cercanas pueden ser explicados por el fenómeno de recombinación o de mutación en el sitio de unión de los iniciadores. La recombinación actúa mediante arreglos independientes de genes en diferentes cromosomas o por entrecruzamientos entre genes homólogos, contribuyendo a la generación de combinaciones de alelos en nuevos genomas (Salas, 2007). Las mutaciones en los sitios de unión de los cebadores podrían hacer que estos no se unan a la región complementaria y así evitar la amplificación de un fragmento, afectando la estimación de la diversidad genética y la diferenciación de las poblaciones (Chapuis y Estoup, 2007). Por otro lado, la identificación de los fragmentos (alelos) se basa, principalmente en la determinación de su tamaño, sin embargo, no todos los alelos que tienen la misma longitud presentan la misma secuencia. Estos alelos suelen dificultar la identificación de la diversidad alélica ya que pueden tener un origen genealógico diferente o, por el contrario, sobreestimar el flujo genético cuando la tasa de mutación es alta, particularmente cuando se usan en grupos altamente divergentes (Selkoe y Toonen, 2006). Es decir, el éxito de la transferibilidad no depende enteramente de la relación filogenética entre especies, ya que existen procesos que pueden modificar regiones puntuales en el genoma y sobreestimar el polimorfismo o reducir el porcentaje de amplificación inter-específica.

## CONCLUSIONES

Se identificaron entre 12 y 31 marcadores SSR óptimos para el análisis de las especies de pino estudiadas; no obstante,

se sugiere evaluar otros marcadores para las especies que registraron menor amplificación (*P. ayacahuite* y *P. cembroides*). La transferibilidad de estos marcadores representa una alternativa más económica y rápida comparada con el desarrollo de marcadores especie-específicos, permitiendo la selección de un grupo de marcadores microsatélites para la realización de estudios de diversidad genética en especies del género *Pinus* y la comparación de los resultados interlaboratorios a través de métodos estandarizados.

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Comisión Nacional Forestal (Conafor) a través del proyecto “Fomento y Operación del Subsistema de Recursos Genéticos Forestales dentro del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG)”

## REFERENCIAS

- Carneiro, M. L., Santini, L., Lima, A., & de Freitas, C. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 312-328. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027
- Celiński, K., Pawlaczyk, E. M., Wojnicka-Póltorak, A., Chudzińska, E., & Prus-Głowacki, W. (2013). Cross-species amplification and characterization of microsatellite loci in *Pinus mugo* Turra. *Biologia*, 68, 621-626. doi: 10.2478/s11756-013-0189-z
- Chagne, D., Chaumeil, P., Ramboer, A., Collada, C., Guevara, M. A., Cervera, M. T., Vendramin, G. G., Garcia, V., Frigerio, J. M., Echt, C., Richardson, T., & Plomion, C. (2004). Cross species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *TAG. Theoretical and Applied Genetics*, 109(6), 1204-1214. doi: 10.1007/s00122-004-1683-z
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621-31. doi: 10.1093/molbev/msl191
- Del Castillo, R. F., Pérez-de la Rosa, J. A., Vargas, G., & Rivera, R. (2004). Coníferas: En A. J. García-Mendoza, M. J. Ordóñez y M. Briones-Salas (Eds.), *Biodiversidad de Oaxaca* (pp. 141-158). México: Instituto de Biología, UNAM. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund.

- Demarchi, D. A. (2009). Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 1(1), 73-88.
- Echt, C. S., Vendramin, G. G., Nelson, C. D., & Marquardt, P. (1999). Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Canadian Journal of Forest Research*, 29, 365-371. doi: 10.1139/cjfr-29-3-365
- Echt, C. S., Saha, S., Krutovsky, K. V., Wimalanathan, K., Erpelding, J. E., Liang, C., & Nelson, C. D. (2011). An annotated genetic map of loblolly pine based. *BMC Genetics*, 12(17), 1-16. doi: 10.1186/1471-2156-12-17
- Freeman, S. & Herron, J. C. (2002). *Análisis Evolutivo*. Madrid, España: Pearson Educación.
- Feng, Y. H., Yang, Z. Q., Wang, J., Luo, Q. F., & Li, H. G. (2014). Development and characterization of SSR markers from *Pinus massoniana* and their transferability to *P. elliottii*, *P. caribaea* and *P. yunnanensis*. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 1508-1513. doi: 10.4238/2014
- Geburek, T., & Konrad, H. (2008). Why the conservation of Forest Genetic Resources has not worked. *Conservation Biology*, 22, 267-274. doi: 10.1111/j.1523-1739.2008.00900.x
- Gernandt, D. S., Geadá, G., Ortiz, S., & Liston, A. (2005). Phylogeny and Classification of *Pinus*. *Taxon*, 54(1), 29-42. doi: 10.2307/25065300
- Gernandt, D. S., & Pérez-de la Rosa, J. A. (2014). Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 126-133. doi: 10.7550/rmb.32195
- Gutiérrez, E., & Trejo, I. (2014). Efecto del cambio climático en la distribución potencial de cinco especies. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(1), 179-188.
- Hernández-León, S., Gernandt, D. S., Pérez de la Rosa, J. A., & Jardón-Barbolla, L. (2013). Phylogenetic Relationships and Species Delimitation in *Pinus* Section *Trifoliae* Inferred from Plastid DNA. *PLoS ONE*, 8(7), e70501. doi: 10.1371/journal.pone.0070501
- Huang, Q. X., Guang, X. C., Kong, H., Guo, Y. L., & Guo, A. P. (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*, 12(19), 2727-2732. doi: 10.5897/AJB12.524
- Kaundun, S. S., & Lebreton, P. (2010). Taxonomy and systematics of the genus *Pinus* based on morphological, biogeographical and biochemical characters. *Plant Systematics and Evolution*, 284, 1-15. doi: 10.1007/s00606-009-0228-y
- Lesser, M., Parchman, T., & Buerkle, C. (2011). Cross-species transferability of SSR loci developed from transcriptome sequencing in lodgepole pine. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 448-455. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03102.x
- Mason, A. S. (2015). SSR Genotyping. En J. Batley (Ed.), *Plant Genotyping: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology vol. 1245* (pp. 77-89). New York, NY: Humana Press.
- Moreno, L. A. (2007) Tamaño efectivo de la población: En L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (comps.), *Ecología molecular* (pp. 63-86). D.F., México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Rentaría, A. M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares: En L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Comps.), *Ecología molecular* (pp. 541-566). D.F., México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Rai, K. C., Ginwal, H. S., & Saha, R. (2018). Genetic diversity and population structure of *Pinus kesiya* through trans-specific amplification of nuclear SSR markers. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 11(5), 733-739. doi: 10.30954/0974-1712.10.2018.4
- Rocha, M., & Gasca, J. (2007). Ecología molecular de la conservación: En L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (comps.), *Ecología molecular* (pp. 251-280). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Salas, R. (2007). La recombinación: relevancia evolutiva y métodos de estimación, con énfasis en microorganismos: En L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.), *Ecología molecular* (pp. 281-311). D.F., México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Saghai-Marouf, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81(24), 8014-8018. doi: 10.1073/pnas.81.24.8014
- Selkoe, K., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615-629. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x
- Valdés-Infante Herrero, J., Rodríguez, N. N., Bautista, M., Ortiz, M. M., Quiroz, A., Sánchez, L. F., Risterucci, A. M., & Rohde, W. (2010). Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12, 64-76.



Villalobos-Arámbula, A. R., Pérez de la Rosa, J. A., Arias, A., & Rajora, O. P. (2014). Cross-species transferability of eastern white pine (*Pinus strobus*) nuclear microsatellite markers to five Mexican white pines. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 7571-7576. doi: 10.4238/2014

Este documento se debe citar como:

Sandoval-Padilla, I., Contreras-Toledo, A. R., Guzmán, L. F., Amaro González, B. A., & Cortés-Cruz, M. (2021). Transferibilidad de marcadores de microsatélites en nueve especies de pinos. *Madera y Bosques*, 27(3), e2732103. doi: 10.21829/myb.2021.2732103

Manuscrito recibido el 20 de enero de 2021

Aceptado el 03 de junio de 2021

Publicado el 31 de diciembre de 2021



Madera y Bosques por Instituto de Ecología, A.C. se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercialCompartirIgual 4.0 Internacional.