
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES RAPDs EN *Pinus*
chiapensis Y EN EL COMPLEJO *Pinus ayacahuite- P.*
*strobiformis***

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

LUIS ENRIQUE ARVIZU FRANKLIN

Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio de 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. LUIS ENRIQUE ARVIZU FRANKLIN
P R E S E N T E .**

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES opción Tesis** con el título "**CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES RAPDs EN *Pinus chiapensis* Y EN EL COMPLEJO *Pinus ayacahuite-P. strobiformis***", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA** y como Asesor el/la **M.C. PATRICIA CASTRO FÉLIX** y **M.C. ALEJANDOR MUÑOZ URIAS**.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 14 de julio del 2003



**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA**.- Director del Trabajo
c.c.p. **M.C. PATRICIA CASTRO FÉLIX**.- Asesor del Trabajo
c.c.p. **M.C. ALEJANDOR MUÑOZ URIAS**.- Asesor del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ.
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVESIDAD DE GUADALAJARA.
PRESENTE.


Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de TESIS que realizó el pasante LUIS ENRIQUE ARVIZU FRANKLIN, con el título CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES RAPDs EN *Pinus chiapensis* Y EN EL COMPLEJO, *Pinus ayacahuite- P. strobiformis*, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

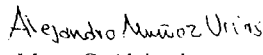
ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 15 de julio de 2003.

DIRECTOR DEL TRABAJO.


Dra. Alma Rosa Villalobos
Arámbula

ASESOR.


M. en C. Alejandro
Muñoz Urías

ASESOR.


M. en C. Patricia Castro
Félix

SINODALES.


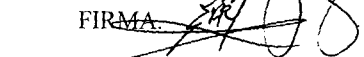
1.- DR. AARÓN RODRÍGUEZ CONTRERAS
SINODAL TITULAR.

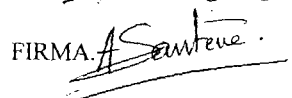
2.- DR. JORGE A. PÉREZ DE LA ROSA
SINODAL TITULAR.

3.- DRA. ANNE SANTERRE LUCAS
SINODAL TITULAR.

4.- DRA. LAURA GUZMÁN DÁVALOS
SINODAL SUPLENTE.



FIRMA 
FIRMA 

FIRMA 

FIRMA 

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara; bajo la dirección de la Dra. en C. Alma Rosa Villalobos Arámbula y con la asesoría de la M. en C. Patricia Castro Félix y del M. en C. Alejandro Muñoz Urías.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la Beca de Investigación otorgada a Luis Enrique Arvizu Franklin (No.3597) dentro del proyecto CONACYT número 33129 B, titulado: Pinos blancos mexicanos: diversidad genética, química y ubicación taxonómica.

AGRADECIMIENTOS

A mis maestras Alma Rosa Villalobos y Anne Santerre por haberme permitido aprender y crecer en su laboratorio. A la maestra Patricia Castro por sus consejos y su apoyo incondicional a mi y a mi familia.

RESUMEN

El grupo de pinos conocido colectivamente como pinos blancos se encuentra representado en México por *Pinus chiapensis*, *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*, entre otros. Económicamente, debido a la dimensión de los árboles y la calidad de la madera, las especies de pinos blancos constituyen un recurso natural importante. Taxonómicamente, se encuentran ubicados dentro del subgénero *Strobus*, sección *Strobus*, subsección *Strobi*. Sin embargo como en ocurre con varias especies de pinos del subgénero *Strobus*, existe controversia con relación a la taxonomía de las especies que forman el complejo.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica para detectar polimorfismos de DNA amplificadas al azar (RAPD), para la amplificación de este tipo de marcadores en genoma de pinos blancos, con la finalidad de caracterizar el patrón de amplificación de marcadores RAPD del árbol tipo de *Pinus ayacahuite* y de dos poblaciones de cada uno de los siguientes taxa: *P. chiapensis*, *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*. Para la caracterización se empleó la estrategia de genoma acumulado y se utilizaron 60 cebadores o iniciadores, correspondientes a los grupos OPA, OPB, y OPBB (Operon Technologies, Inc., Alameda, Calif.). El análisis de los marcadores se realizó utilizando como herramienta el sistema de fotodocumentación Kodak EDAS. Se produjo una matriz de datos binarios y a partir de ésta, se calculó el índice de similitud genética de Jaccard y el índice de Nei y Li. Se obtuvieron las distancias genéticas correspondientes y se analizaron las relaciones genéticas entre los taxa.

Finalmente, se seleccionaron 25 iniciadores con base en la reproducibilidad de los patrones electroforéticos, el número de fragmentos amplificados, la intensidad y la separación de éstos en el gel, para realizar, en un trabajo posterior, el estudio de diversidad genética en poblaciones del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis*.

INDICE	Pag.
Introducción	1
Antecedentes	
1. Complejo <i>Pinus ayacahuite</i> – <i>P. strobiformis</i> y <i>P. chiapensis</i>	
1.1. Taxonomía y distribución geográfica.....	3
1.2. Caracterización morfológica	5
1.3. Ecología e importancia económica.....	7
2. Polimorfismos de DNA amplificado al azar (RAPD)	
2.1. Generalidades de los marcadores RAPD.....	8
2.2. Ventajas de los marcadores RAPD.....	9
2.3. Desventajas de los marcadores RAPD.....	9
2.4. Utilidad de los marcadores RAPD	
2.4.1. RAPD en estudios taxonómicos.....	10
2.4.2. RAPD en estudios de diversidad genética.....	11
2.5. Análisis de datos.....	11
Justificación.....	13
Objetivos	14
Materiales y métodos	
1. Recolección de muestras y poblaciones estudiadas.....	15
2. Extracción del DNA.....	15
3. Muestras de DNA utilizadas en la caracterización de marcadores.....	15
4. Polimorfismos de DNA amplificados al azar (RAPD)	
4.1. Estandarización y optimización.....	16
5. Caracterización de marcadores RAPD en genoma acumulado.....	17

6. Análisis y registro de los fragmentos amplificados.....	18
7. Selección de marcadores RAPD para el análisis poblacional del complejo <i>P. ayacahuite</i> - <i>P. strobiformis</i>	18
8. Análisis de datos en genoma acumulado.....	18

Resultados

1. Polimorfismos de productos amplificados al azar (RAPD).....	20
2. Caracterización de marcadores RAPD.....	21
3. Índices de similitud de Jaccard y Nei	26
4. Selección de iniciadores para el análisis poblacional.....	28

Discusión

1. Condiciones de la amplificación de RAPD.....	29
2. Caracterización de marcadores RAPD en <i>P. chiapensis</i> y el complejo <i>P.</i> <i>ayacahuite</i> - <i>P. strobiformis</i>	30
3. Relaciones genéticas de los taxa del complejo <i>P. ayacahuite</i> - <i>P. strobiformis</i> y de <i>P. chiapensis</i>	32

Conclusiones	35
---------------------------	----

Literatura citada	36
--------------------------------	----

Anexo I

1. Técnica de RAPD.....	40
2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa al 1.8 %.....	41
2.1. Reactivos de electroforésis.....	42
2.2. Buffer TBE 1X.....	42
2.3. Agarosa 1.8 %.....	42
2.4. Buffer de carga.....	43
2.5. Solución concentrada de bromuro de etidio 5mg/ml.....	43
2.6. Solución de tinción de bromuro de etidio 1 µg/ml.....	44
3. Sistema de Fotodocumentación Kodak EDAS.....	44

Anexo II

Matriz de datos binarios.....	46
-------------------------------	----

Anexo III

Iniciadores que mostraron diferencias entre *Pinus chiapensis* y el complejo

<i>P. ayacahuite</i> - <i>P. strobiformis</i>	51
---	----

Anexo IV

Iniciadores seleccionados para el análisis poblacional de *Pinus ayacahuite*-*P. strobiformis*.....

53

INTRODUCCIÓN

Los pinos (*Pinus spp.*), ya sea que provengan de bosques naturales o plantaciones, son los árboles maderables y para producción de pulpa y papel de mayor importancia en muchos países. El género *Pinus* con cerca de 120 especies reconocidas es el más grande de la familia Pinaceae, el grupo tiene una distribución geográfica casi exclusiva en el hemisferio norte desde las zonas boreales hasta las francamente tropicales. Hay alrededor de 65 especies en Centro y Norte América, de las cuales 43 crecen en México (Farjon y Styles, 1997), razón por la cual, México es considerado el país más rico en especies de pinos del mundo. Más aún, si se toman en cuenta variedades y formas reconocidas, el número de taxones aumenta a 70 aproximadamente (Perry, 1991).

El grupo de pinos conocido colectivamente como pinos blancos se encuentra representado en México por *P. chiapensis* (Martínez) Andresen, *P. ayacahuite* Ehrenberg ex Schlechtendal, *P. strobiformis* Engelmann, *P. lambertiana* D. Douglas y probablemente *P. flexilis* E. James var. *reflexa* Engelmann. Económicamente y debido a la dimensión de los árboles, los fustes rectos y la calidad de la madera, las especies de pinos blancos constituyen un recurso natural importante (Farjon y Styles, 1997). Ecológicamente, en algunos casos, representan las especies dominantes en el ecosistema de bosque húmedo templado (Newton *et al.*, 2002).

Aunque el fundamento del valor económico y biológico de cualquier especie se encuentra determinado por su riqueza genética, son escasos los estudios de diversidad genética realizados en especies de pinos en México. En los últimos años, el estudio de la estructura genética de las poblaciones ha recibido una mayor atención, debido a su importancia dentro del área de la biología de la conservación, para la cual la dinámica poblacional y variabilidad genética son de gran interés. El proyecto de investigación "Pinos blancos mexicanos: diversidad genética, química y ubicación taxonómica" apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 33129 B), del cual ésta contribución forma parte, tiene entre sus objetivos investigar los niveles de variación y diferenciación genética presente en las especies y poblaciones de pinos blancos mexicanos.

Los marcadores moleculares RAPD han sido ampliamente utilizados, tanto en estudios taxonómicos como en estudios de diversidad genética en una gran variedad de especies (Otero, 1997). Una de las principales desventajas que presenta el empleo de

estos marcadores es su sensibilidad a factores como la concentración de cloruro de magnesio, la relación cebador- molde de DNA, el tipo de polimerasa termoestable empleado en la reacción de amplificación, así como las diferencias en las temperaturas de alineamiento que ocasionan variación en los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Wolfe y Liston, 1998). Así, con el objeto de obtener reproducibilidad en el patrón de marcadores RAPD, se recomienda utilizar las mejores condiciones para la amplificación del genoma de interés y para el laboratorio donde se realizará el estudio (Wolfe y Liston, 1998). Por lo que es necesario determinar las condiciones de la reacción de RAPD y la temperatura de alineamiento óptimas para la amplificación del genoma de pinos blancos.

Se sugiere conocer los patrones de amplificación de los marcadores RAPD para utilizarlos en estudios taxonómicos o de genética de poblaciones (Wolfe y Liston, 1998). En la mayoría de las especies de pinos blancos se desconocen los productos de la amplificación generados con iniciadores RAPD, por lo tanto es importante caracterizar estos productos en genoma de poblaciones de *P. chiapensis*, *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*. Una de las principales recomendaciones para realizar estudios de variación poblacional con estos marcadores moleculares, es la preselección de los cebadores que se utilizarán en la amplificación del genoma de interés (Skroch y Nienhuis, 1995), por lo que la caracterización de marcadores RAPD es indispensable para seleccionar el grupo de iniciadores, con base en el número de bandas y la intensidad de la amplificación, los cuales se utilizarán posteriormente en el estudio de la variación genética de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*.

ANTECEDENTES

1. Complejo *Pinus ayacahuite*-*P. strobiformis* y *P. chiapensis*

1.1 Taxonomía y distribución geográfica

El complejo *Pinus ayacahuite*-*P. strobiformis* y *P. chiapensis* forman parte del grupo de pinos conocido como pinos blancos o blandos. Taxonómicamente, se encuentran ubicados dentro del subgénero *Strobus*, sección *Strobus*, subsección *Strobi* (Little y Critchfield, 1969).

El árbol tipo de *Pinus ayacahuite* fue recolectado en 1837 por Carl August Ehrenberg en la hacienda Guerrero, cerca de la población de Omitlán, Hidalgo (Farjon y Styles, 1997). Desde entonces, con base en la variación en caracteres morfológicos, se han reconocido dos variedades de *P. ayacahuite*: *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) Shaw y *P. ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw (Martínez, 1948). Sin embargo, como ocurre con varias especies de pinos del subgénero *Strobus*, existe controversia con relación a la taxonomía de las especies que forman el complejo (Pérez de la Rosa 1993). Silba en 1990 reconoció a *Pinus novo-galiciana*, reportado inicialmente por Carvajal en 1986 en el Occidente de México como *P. strobiformis* var. *carvajalii* y posteriormente por Carvajal y McVaugh en 1992 como *P. ayacahuite* var. *novogaliciana*. Además Silba propone la existencia de otras dos variedades; *P. ayacahuite* var. *oaxacana* y *P. strobiformis* var. *potosiensis* (Pérez de la Rosa 1993). Sin embargo, Pérez de la Rosa (1993) consideró que estas variedades son solamente ecotipos favorecidos por la amplia distribución geográfica que presentan las especies del complejo. Hernández (1990), a través de un estudio de variación aloenzimática, reconoció a *P. strobiformis* como una especie diferente de *P. ayacahuite*.

P. ayacahuite var. *veitchii* fue descrito por primera vez por Roetzl como *Pinus veitchii* y como *Pinus bonapartea* en 1858 y por Gordon, en 1858 como *P. loudoniana*. Anteriormente, Engelmann en 1848 había descrito a *P. ayacahuite* var. *brachyptera* como *Pinus strobiformis*; fue Shaw en 1909 quien redujo ambas especies a variedades de *P. ayacahuite*. Martínez (1948; Pérez de la Rosa, 1993).

Little y Soto et al. en 1962, así como Mirov en 1967 y Farjon en 1984, siguen la misma nomenclatura de Shaw (Pérez de la Rosa 1993), sin embargo Little y Critchfield (1969) reconocen a *P. strobiformis* como especie y señalan que representa un eslabón geográfico y morfológico entre *P. flexilis* que se ubica al norte y *P. ayacahuite*. En

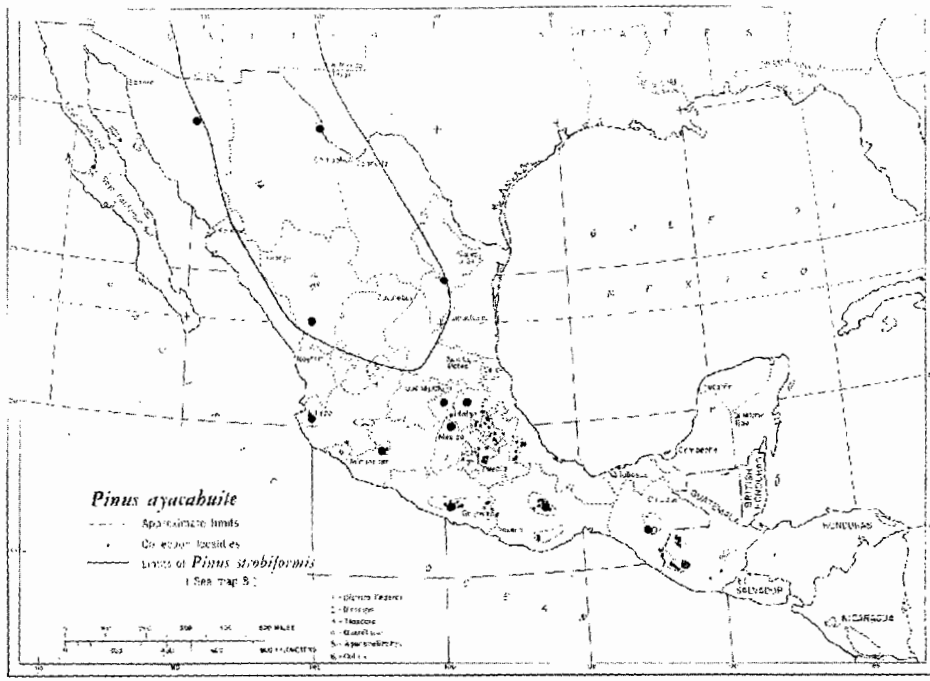
trabajos más recientes, *P. strobiformis* es reconocido como una especie distinta a *P. ayacahuite* (Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997; Farjon et al., 1997).

Pinus chiapensis fue descrito en 1940 por Martínez como una variedad de *P. strobus*. La condición de variedad fue mantenida por Critchfield y Little (1966) y Little y Critchfield (1969). En 1964, Andresen realizó un estudio fenético y concluyó que este taxón debería ser elevado al nivel de especie. Estudios taxonómicos posteriores han apoyado el estatus de especie de *P. chiapensis* (Price et al., 1996) y esta posición ha sido recientemente confirmada a través del análisis de las secuencias de los espaciadores internos transcritos (ITS) de los genes ribosomales (Liston et al., 1999).

El complejo de pinos *ayacahuite-strobiformis* presenta una amplia distribución geográfica en el centro de América (Figura 1) Las especies que lo forman se encuentran divididas por el Eje Volcánico Transversal. *Pinus ayacahuite* se localiza en el Eje Volcánico y en la Sierra Madre del Sur, su distribución se extiende hacia el Sur hasta El Salvador y Honduras. *Pinus strobiformis* crece en las Sierras Madre Occidental y Madre Oriental y su área de distribución se extiende hacia el Norte hasta el Sur de los Estados Unidos (Critchfield y Little, 1966). En México la presencia de *P. ayacahuite* var. *ayacahuite* ha sido registrada en los estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz, Tlaxcala, México, Morelos, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. La variedad *ayacahuite* se encuentra en forma más o menos simpátrica con *P. ayacahuite* var. *vietchii*, que se localiza además en los estados de Guanajuato y Querétaro. Poblaciones de *P. strobiformis* han sido reportadas en Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Durango, Jalisco y en forma muy localizada en Zacatecas y San Luis Potosí (Farjon y Styles, 1997). Poblaciones de *P. chiapensis* se encuentran en Guerrero, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas, su distribución abarca hasta el Norte de Guatemala.



Figura 1. Distribución en México del complejo *Pinus ayacahuite*- *P. strobiformis* (Critchfield y Little, 1966)



1.2 Caracterización morfológica

En pinos, la caracterización morfológica se basa principalmente en el tamaño de los árboles, la forma de crecimiento y el análisis de acículas, conos y semillas. En general, *Pinus ayacahuite* y *P. strobiformis* comparten muchas de estas características lo que dificulta frecuentemente su correcta identificación. Son árboles de troncos rectos que llegan a medir de 25 a 45 m de altura con diámetros de hasta 2 m. Las ramillas son delgadas, pueden ser ligeramente pubescentes, de color verde-amarillento, rojizas o grisáceas, con acículas de color verde, en fascículos de 5, de tamaño muy semejante, generalmente rectas, laxas con los márgenes débilmente aserrados. Los conos son de color café opaco y se pueden encontrar solitarios o en verticilios de 2-4, en pedúnculos cortos, péndulos deciduos, generalmente cilíndricos, el tamaño presenta variación entre los taxa (Cuadro I). Las escamas varían ligeramente en el número y la forma de la apófisis, se abren pronto y ampliamente, son delgadas, flexibles y muy resinosas. Las

semillas son de color café, con ala adnada, generalmente solamente una de las semillas se desarrolla completamente. Aunque se presentan diferencias en el tamaño de la semilla entre los taxa del complejo, es en el tamaño del ala donde se presentan las principales diferencias entre *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* (Cuadro I) (Farjon, Pérez de la Rosa y Styles, 1997; Farjon y Styles, 1997).

Los árboles de *Pinus chiapensis* pueden alcanzar hasta 35 m de altura con diámetros de más de 1 m. *P. chiapensis* es morfológicamente similar al complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*, presenta un tronco recto monopodial, algunas veces bifurcado. Las ramillas son delgadas. Sus acículas se presentan en fascículos de 5, son de color verde amarillento a blanquecino. Los conos son de color café, cilíndricos con ápices obtusos y con escamas de tamaño similar alrededor del cono. El ala de las semillas es adnada oblicuamente ovalada.

Cuadro I. Principales características morfométricas del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis* y *P. chiapensis*. X = Tamaño de la semilla.

	<i>P. ayacahuite</i> var. <i>ayacahuite</i>	<i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	<i>P. strobiformis</i>	<i>P. chiapensis</i>
Árbol				
Altura (m)	40-45(-50?)	40-45(-50?)	20-30	30-35
Diámetro (m) del tronco	150-200	150-200	80-100	100-150
Acículas				
Longitud (cm)	(8-)10-15(-18)	(8-)10-15(-18)	(5-)7-11(-12)	(5-)6-12(-13)
Ancho (mm)	0.7-1.0	0.7-1.0	(0.6-)0.8-1.1(1.2)	
Conos				
Longitud (cm)	(10-)15-40	10-50	12-30(-60)	(6-)8-16(-25)
Ancho (cm)	7-15	10-15	7-11	4-8
Número de escamas del cono	100-150	100-150	70-120	40-100
Semillas				
Longitud (mm)	8-10	10-15	12-18	7-9
Ancho (mm)	6-8	7-9	8-11	4-5
Ala				
Longitud en relación al tamaño de la semilla	2-3.5 X	2 X	0-0.5 X	1.5X

1.3 Ecología e importancia económica

A diferencia de otras especies de pinos, los árboles del complejo *P. ayacahuite-strobiformis* tienen preferencia por lugares sombreados y húmedos. Crecen en suelos fértiles, profundos y bien drenados. Eguiluz (1982) señaló que los árboles prosperan en alturas de 2000 a 3700 m, en sitios con niveles de precipitación anual de 600 a 2200 mm y temperaturas que oscilan entre -15 y 30° C. Pérez de la Rosa (1993) los encontró en alturas superiores a los 2000 m y reportó su presencia en laderas de exposición norte y en el fondo de cañadas, asimismo indicó que en la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental, lugares en los que se localiza *P. strobiformis*, el clima es más seco y frío que en el Eje Volcánico Transversal y en latitudes al sur de este último.

Se ha observado que en áreas planas, los árboles se encuentran asociados con especies del género *Abies*, y *Quercus* (Pérez de la Rosa, 1993). Ern (1976) señaló que en la Sierra Nevada, lugar ubicado al este del Valle de México con una gran abundancia de *Abies religiosa*, los suelos ácidos son un factor limitante importante para el desarrollo de *Pinus ayacahuite*.

Aunque *Pinus strobiformis* se encuentra entre los pinos cuyas semillas son dispersadas por animales (Lanner, 1996), la especie no ha sido lo suficientemente estudiada para identificar plenamente a sus dispersores. Se ha reportado que aves de varios géneros de la familia Corvidae y pequeños mamíferos llevan a cabo, a través de una relación mutualista, la dispersión de las semillas de varias especies de pinos del subgénero *Strobis* que presentan al igual que *P. strobiformis* semillas con alas reducidas o rudimentarias; se considera que ambas características han coevolucionado a través del tiempo (Bruederle *et al.*, 2001).

Pinus chiapensis crece tanto en suelos fértiles como infértiles, profundos y bien drenados. Actualmente, la especie se encuentra restringida a poblaciones pequeñas, remanentes en bosques templados de montaña y subtropicales con abundante precipitación. El rango altitudinal es de (500-)800- 2000 (-2200) metros, en donde no llega a formarse escarcha de hielo, ya que no es resistente a la congelación. *Pinus chiapensis* se encuentra en bosques asociado a otras especies de pinos y a árboles de hojas anchas. Los pinos con los que se asocia son *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus*, *P. ayacahuite* y de forma más localizada, *P. tecunumanii* y *P. patula*. Las especies dominantes de árboles de hoja ancha son: *Quercus* spp., *Liquidambar styraciflua*, *Magnolia*, *Platanus mexicana*, *Ulmus mexicana*, *Carpinus caroliniana*, *Fagus*

mexicana, *Clethra* spp., y *Brosimum*. Existe una afinidad definitiva, especialmente en Veracruz y Chiapas, con la flora del Este de los Estados Unidos de Norteamérica, la cual se encuentra representada por *Pinus strobus* (Farjon y Styles, 1997).

En general, las especies de pinos blancos son utilizadas como fuente de madera. El tamaño de los árboles, sus fustes rectos y la calidad de la madera son características que favorecen el uso de *P. strobiformis* en el Norte de México y *P. ayacahuite* y *P. chiapensis* en el Sur para trabajos de construcción, manufactura de muebles y como combustible. La resina de los árboles ha sido utilizada con fines medicinales (Farjon y Styles, 1997; Newton *et al.*, 2002). Especialmente en el estado de Chiapas, la explotación de *P. ayacahuite* ha ocasionado una seria disminución de las poblaciones originales. *Pinus chiapensis* es explotado por al menos 11 grupos étnicos, lo que ha provocado que la especie se encuentre en peligro de extinción. Actualmente la especie se encuentra restringida a poblaciones pequeñas, fragmentadas y frecuentemente degradadas, usualmente rodeadas de áreas agrícolas (Newton *et al.*, 2002).

2. Polimorfismos de DNA amplificado al azar (RAPDs)

2.1 Generalidades de los marcadores RAPD

Los RAPD (de sus siglas en inglés Random Amplified Polymorphic DNA) son marcadores moleculares generados por la amplificación de segmentos aleatorios de DNA. La técnica se basa en la posibilidad estadística de que se presenten, sitios complementarios a un iniciador a lo largo del genoma. Los polimorfismos (*e.g.* las diferencias en el número de bandas) entre individuos se deben a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento a la inserción o delección de los fragmentos en éstos sitios (Williams *et al.*, 1993).

La aplicación de la metodología de RAPDs permite realizar un muestreo al azar y eficiente del genoma. Se amplifican pequeñas cantidades del material genético por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando iniciadores sintéticos de secuencias al azar de 10 b (Operon Technologies, Inc., Alameda, Calif.). El iniciador o cebador permite buscar en el genoma sitios invertidos, resultando en la amplificación de segmentos de DNA de longitudes variables. El corto tamaño del cebador aumenta considerablemente la probabilidad de encontrar sitios de unión a lo largo del genoma. El protocolo de amplificación difiere de las condiciones clásicas para PCR en que se

emplea un único cebador por reacción, por lo que no es necesario conocer la secuencia del genoma sometido al análisis (Williams *et al.*, 1990).

2.2 Ventajas de los marcadores RAPD

Los RAPD se encuentran junto con los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) entre las técnicas moleculares consideradas como multilocus, ya que permiten el análisis de varios loci a la vez (Harris, 1999). Ambos marcadores se heredan en forma mendeliana, pero los marcadores RAPD son más utilizados para el estudio de la diversidad genética debido a que la metodología es más sencilla, por lo tanto más rápida y menos costosa que la de los AFLP. Williams *et al.* (1993) demostraron que aproximadamente el 95 % de los productos RAPD se comportan como marcadores dominantes.

La gran ventaja de los RAPD es que es posible detectar polimorfismos sin secuenciar o caracterizar el genoma de interés (Williams *et al.*, 1990). Aplicando la metodología de RAPD en forma adecuada es posible resolver una cantidad considerable de marcadores neutros y detectar polimorfismos en la molécula de DNA.

2.3 Desventajas de los marcadores RAPD

Se han detectado problemas prácticos en el empleo de los marcadores RAPD. La presencia de bandas erróneas, la reproducibilidad de la amplificación y la comigración de las bandas no homologas, se encuentran entre los principales problemas reportados (Otero *et al.*, 1997; Wolfe y Liston, 1998). Los dos primeros problemas pueden reducirse si se optimizan las condiciones de la amplificación. Dowling *et al.* (1996) señalaron que es necesaria una rigurosa estandarización del protocolo de RAPD para reducir la variación provocada por los componentes de la reacción. Weeden *et al.* (1992) y Skroch y Nieuhuis (1995) reportan una marcada mejoría en la reproducibilidad si se reducen las diferencias en las condiciones de la reacción entre réplicas. Además, sugirieron como estrategia para disminuir los problemas de replicación de los patrones de bandeo, seleccionar los iniciadores utilizados con base en la reproducibilidad de los datos generados. Más aún, se ha reportado una reducción de errores en el registro de las bandas si se considera la intensidad de los fragmentos amplificados, bandas débiles generalmente son menos robustas que bandas intensas (Wolfe y Liston, 1998).

El problema de la comigración de las bandas puede reducirse si se utilizan geles de poliacrilamida y tinción con plata, ya que se genera una mejor resolución del tamaño de los fragmentos. Entre las formas de comprobar la homología se encuentra la

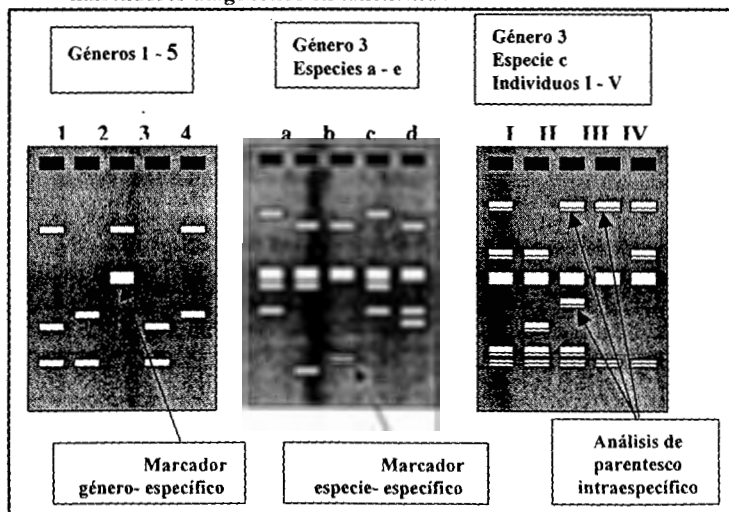
hibridación Southern y la digestión de los fragmentos amplificados con enzimas de digestión. Sin embargo, cualquiera de las alternativas mencionadas encarecen la técnica y consumen una considerable cantidad de tiempo (Wolfe y Liston, 1998). Algunos estudios han mostrado que existe homología en bandas co-migrantes entre especies cercanas (Catalán *et al.*, 1995; Reisenberg, 1996), por lo que se recomienda utilizar este marcador específicamente en estudios de este tipo.

2.4 Utilidad de los marcadores RAPD

2.4.1 RAPD en estudios taxonómicos

Empleando diferentes oligonucleótidos como cebadores para la amplificación, se pueden generar caracteres moleculares, los cuales sirven para diagnosticar diferentes niveles taxonómicos (Hadrys *et al.*, 1992). Para cada cebador, los productos de RAPD amplificados se pueden clasificar en dos grupos: aquellos que son variables (polimórficos) y los que son constantes (monomórficos). La determinación de relaciones taxonómicas sólo es válida entre taxa para los cuales ya se ha determinado un patrón de productos de RAPD. Del mismo modo, los fragmentos polimórficos a nivel de especies, identificarán operacionalmente a miembros de la misma especie, sólo si el fragmento está presente en todos los miembros de dicha especie (Figura 2

Figura 2. Utilidad de fragmentos RAPD polimórficos y no polimórficos como marcadores diagnóstico en taxonomía.



Furman *et al.* (1997) utilizaron la estrategia de genoma acumulado para analizar las relaciones genéticas de pinos de México y Centro América con marcadores RAPD. Ésta consiste en realizar la amplificación de un acumulado (mezcla) del material genético de pinos de la misma especie, eliminando de esta manera el polimorfismo intraespecífico debido a diferencias entre individuos de una especie determinada.

2.4.2 RAPD en estudios de diversidad genética

La técnica de RAPD ha sido ampliamente utilizada para estudios de genética de poblaciones de un gran número de especies vegetales incluyendo pinos (Szmidl *et al.*, 1996; Furman *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2001; Newton *et al.*, 2002). Es sin duda una de las técnicas más aplicadas para determinar los niveles de variación dentro y entre poblaciones. La mayoría de los polimorfismos revelados por RAPD son probablemente neutrales (Díaz *et al.*, 2001). En los casos en que hay poca variabilidad, el uso de marcadores RAPD es más adecuado en relación a RFLP e isoenzimas, ya que detectan una mayor variación genética (Mosseler *et al.*, 1992). Además, tienen la ventaja de presentar un número mayor de loci que los que se pueden obtener con los otros marcadores.

2.5 Análisis de datos

Una de las principales diferencias que presentan los marcadores RAPD en relación a isoenzimas y RFLP es su condición de dominancia (Harris, 1999). En el análisis electroforético, se observa solamente la presencia o la ausencia del marcador, los individuos heterocigotos (+ -) para una determinada mutación se mezclan con los homocigotos dominantes (+ +). El que dos individuos compartan la ausencia de una banda no significa necesariamente que compartan la misma mutación, pueden ser homocigotos o heterocigotos para mutaciones o alelos diferentes. La ausencia de una banda puede tener su origen en uno o varios cambios en el genoma y estos cambios pueden ocurrir en cualquiera de los nucleótidos que se alinean al cebador (Wolfe y Liston, 1998).

Lo anterior dificulta el análisis de datos de este tipo de marcadores ya que no es posible aplicar los modelos de genética de poblaciones que se utilizan para alelos codominantes. Sin embargo, se cuenta con una serie de métodos que permiten obtener estimaciones de la diversidad genética. Para estudios de diferenciación y relaciones genéticas se utilizan medidas de similitud y de diferencias. La distancia genética puede

estimarse como el número de diferencias dividido entre el total de comparaciones. La proporción de diferencias encontradas para los loci RAPD entre dos genomas se considera una buena medida de las diferencias entre los genomas (Harris, 1999).

Los estimadores de distancia genética más utilizados son el índice de Jaccard (Jaccard, 1908) y el coeficiente de similitud Dice (Dice, 1945). El coeficiente de Nei y Li (Nei y Li, 1979) y el de Lynch y Milligan (Lynch y Milligan, 1994) son equivalentes al coeficiente de Dice. Las distancias genéticas obtenidas pueden ser utilizadas para un análisis de agrupamiento, aplicando la media aritmética no ponderada (UPGMA), y/o para un análisis de componentes principales para revelar las afinidades genéticas. Cuando se incluye un número grande de marcadores y el análisis se restringe a taxa en los cuales la homología de las bandas es altamente probable (infragénico) los resultados del análisis de RAPD han sido aplicados con éxito en la determinación de las relaciones filogenéticas (Wolfe y Liston, 1998).

En estudios de variación poblacional es frecuente aplicar un análisis de varianza molecular (AMOVA). El programa AMOVA genera estadísticas Φ (Excoffier *et al.*, 1992) las cuales son análogas a F_{ST} de Wright (Wright, 1951). Esta aproximación ha sido ampliamente utilizada en el análisis de datos RAPD (Gillies *et al.*, 1997; Newton *et al.*, 2002), lo que permite la comparación de los resultados con una importante variedad de estudios. La comparación de la diversidad entre poblaciones estimada con AMOVA y con G_{ST} de Nei en un amplio rango de estudios con RAPD, indica una alta correlación de los resultados de ambos métodos de análisis (Nybom y Bartish, 2000). Es frecuente encontrar trabajos en donde se aplica el índice de diversidad de Shannon (Lewontin, 1972) para estimar la proporción de la variación en cada población y la proporción de la variación entre las poblaciones (Gillies *et al.*, 1997).

JUSTIFICACIÓN

Debido al tamaño de los árboles y a la calidad de la madera, los pinos blancos se encuentran entre las especies de pinos más explotadas en México. La sobreexplotación de muchas de las poblaciones distribuidas en el país ha provocado su disminución, fragmentación y frecuentemente su aislamiento (Pérez de la Rosa, 1993). Genéticamente, se asume que estas poblaciones presenten una disminución de la variación genética y una mayor diferenciación entre ellas. Es conocido que la capacidad de respuesta a enfermedades, depredadores y cambios ambientales de una especie depende de su diversidad genética. Hasta ahora, en México son escasos los estudios de diversidad genética realizados con especies de pinos (Ledig, 1998; Newton *et al.*, 2002), por lo que un estudio de este tipo en especies de pinos blancos será sumamente importante en biología de la conservación, ya que permitirá establecer las bases para proteger su diversidad genética y planear un mejor manejo del recurso.

Los RAPD han sido ampliamente empleados en los últimos años para realizar estudios de diversidad genética. Sin embargo, los problemas de reproducibilidad que presenta este tipo de marcador hacen necesario estandarizar y optimizar la técnica en el genoma de interés para las condiciones de cada laboratorio; se ha observado que la variación artificial puede reducirse considerablemente si se controlan los parámetros de la amplificación. En el caso de estudios de diversidad genética, se recomienda además, la caracterización de un número grande de cebadores y seleccionar aquellos que produzcan un patrón de bandeo reproducible. Las diferencias en el registro de las bandas, entre experimentos o entre laboratorios, pueden reducirse considerablemente si solamente se analizan bandas intensas y discretas. Por lo anterior, es necesario determinar las mejores condiciones para la amplificación del genoma de pinos blancos y seleccionar un grupo de cebadores que permita realizar el estudio de variación genética en poblaciones del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis*.

La caracterización de marcadores RAPD en genoma acumulado de *P. chiapensis*, *P. ayacahuite* var. *ayacahuite*, *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. strobiformis* permitirá inferir sus relaciones genéticas, lo que será de gran utilidad en la definición taxonómica de éste complejo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el genoma diploide de *Pinus chiapensis*, *P. ayacahuite* var. *ayacahuite*, *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. strobiformis* empleando marcadores RAPD.

Objetivos particulares

- 1) Estandarizar y optimizar la técnica de RAPD en pinos blancos.
- 2) Seleccionar un grupo de cebadores útiles para realizar el análisis poblacional del complejo *Pinus ayacahuite* –*P. strobiformis*.
- 3) Determinar las identidades taxonómicas de seis poblaciones representativas de *P. chiapensis*, *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* y del árbol tipo de *P. ayacahuite*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección de muestras y poblaciones estudiadas

Las muestras de acículas de árboles perfectamente caracterizados, de *P. strobiformis* de las poblaciones de Pueblo Nuevo Durango (PSD) Bocoyna, Chihuahua (PSC); de *P. ayacahuite* de Tuxtepec, Oaxaca (PAO) y el árbol tipo de *P.* localizado en Omitlán, Hidalgo (PAT); de *P. ayacahuite* var. *veitchii* de San Rafael, Edo. de México (PVM); y de *P. chiapensis* de Tlapacoyan, Ver. (PCHV) y El Mohon, Puebla (PCHP), fueron colectadas por Jorge Alberto Pérez de la Rosa y Georgina Vargas Amado del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (Cuadro II).

Cuadro II. Poblaciones y muestras de DNA empleadas en la caracterización de marcadores RAPDs.

Población	Lat N/Long O	Muestras seleccionadas para genotipo acumulado	Muestras individuales	Grupo de amplificación
PSD	23° 45' / 105° 30'	Pst 20-23	22, 23	1
PVM	19° 10' / 98° 30'	Pay 1-4	3, 4	
PCHV	19° 55' / 97° 15'	Pch 10-14	10, 13	
PSC	30° 43' / 107° 40'	PSst 34-37	-	2
PAO	17° 24' / 96° 30'	Pay 41 a, 42, 44, 45	-	
PCHP	19° 53' / 97° 16'	Pch 15, 16, Y21, 18	-	3
PAT	20° 09' / 98° 39'	-	Pay 09	

2. Extracción del DNA

La extracción de DNA a partir de tejido fresco de acículas, se realizó con el método descrito por Doyle & Doyle (1990), con algunas modificaciones (Palomera 2002). La concentración de DNA se determinó en ng/μl por espectrofotometría (Sambrook *et al.*, 1989).

3. Muestras de DNA utilizadas en la caracterización de marcadores

Para la caracterización de marcadores RAPDs se seleccionaron cuatro muestras de DNA de pinos de diferentes poblaciones y se incluyó el árbol tipo de *Pinus ayacahuite*,

(Cuadro II). Las muestras se diluyeron con agua de calidad para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) hasta una concentración de 40 ng/μl en aquellos casos en que las muestras de DNA no se trataron con Rnasa, o 10 ng/μl si se realizó el tratamiento. Para formar la muestra del genoma acumulado, se mezclaron volúmenes iguales de cuatro genomas individuales diploides de la misma población. Es importante señalar que las muestras se trabajaron por duplicado. Dos muestras de las primeras 3 poblaciones indicadas en el cuadro II se trabajaron de forma individual.

4. Polimorfismos de DNA amplificados al azar (RAPD)

4.1 Estandarización y optimización

Para estandarizar la técnica de RAPD se siguió el procedimiento básico de Williams *et al.*, (1990). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25μl. Las condiciones de la PCR se encuentran descritas en el cuadro III. Las reacciones se desarrollaron en un termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC 100, con el programa de amplificación descrito en el cuadro IV.

Cuadro III. Condiciones de la reacción de RAPD.

Reactivos	Método de Williams	Modificaciones
Tris- Cl, pH 8.3	10 mM	10 mM
KCl	50 mM	50 mM
Gelatina	0.001%	0.001%
MgCl ₂	2 mM	1.5, 2.5, 3.5, 4.5 mM
DNA molde	25 ng/μl	2.5, 5, 10, 20 ng
DNTPs	100 μM	100, 200 μM
Cebador	0.2 μM	0.2, 0.3 μM
Taq pol	0.5 U	0.5, 0.75, 1 U

Cuadro IV. Programas de amplificación.

Fase de PCR	Método de Williams	Modificaciones	
Desnaturalización prolongada		94 C° 3 min.	94 C° 3 min
Desnaturalización	94 C° 1 min.	94 C° 1 min.	94 C° 1 min
Alineación	35 C° 1 min.	36 C° 1 min.	40 C° 1 min
Elongación	72 C° 2 min.	72 C° 2 min.	72 C° 2 min
Elongación prolongada		72 C° 10 min.	72 C° 10 min
Num. de ciclos	40	40	40

Para la optimización, se emplearon diferentes concentraciones de $MgCl_2$, templete e iniciador. Se añadieron los volúmenes necesarios de $MgCl_2$ (50mM), iniciador (6 pmoles/ μ l) y templete (40 ng/ μ l) para obtener las concentraciones indicadas en el cuadro III. Las amplificaciones se llevaron a cabo empleando *Taq* DNA polimerasas marca comercial Gibco y Perkin Elmer. Se utilizaron dos programas de amplificación adicionales al método de Williams (1990), el primero incluía un paso inicial de desnaturalización prolongada y un paso final de elongación prolongada y una temperatura de alineación de 36 °C; la temperatura de alineamiento del segundo programa fue de 40 °C (Cuadro IV).

Los fragmentos se separaron en geles de agarosa al 1.8 % y los geles se tñeron durante 30 min en una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 μ g/ μ l y se destñeron en agua destilada durante aproximadamente 2 hr.

5. Caracterización de marcadores RAPD en genoma acumulado

Para la caracterización de los marcadores RAPD se utilizaron seis mezclas de genoma acumulado por duplicado y una muestra por duplicado del topotipo. La amplificación se realizó con 60 cebadores (OPA 1-20, OPB 1-20 y OPBB 1- 20, Operon Technologies Inc., Alameda, Calif.), como se señala en el protocolo del anexo 1. Para la caracterización se formaron tres grupos de amplificación con dos o tres taxa (Cuadro II). Además, con el objetivo de comprobar la reproducibilidad de los patrones de bandeado, se amplificaron con 60 iniciadores, dos muestras individuales de DNA de cada una de las poblaciones que formaron el primer grupo de amplificación.

6. Análisis y registro de los fragmentos amplificados

Se analizaron los productos en forma visual y utilizando el sistema de fotodocumentación Kodak EDAS, el cual permite la captura de imágenes en los formatos digitales de mapa de bits y de archivo de intercambio JPEG, mismos que pueden ser enviados por medios electrónicos o imprimirse a una fracción del costo de una fotografía instantánea. Asimismo, el programa Kodak ID toma control de la cámara en cuanto a la distancia focal, tiempo de exposición y campo visual, para la obtención de una imagen de calidad.

Para el registro de las bandas se utilizó el mínimo nivel de sensibilidad del sistema de fotodocumentación (0) y un máximo nivel (3) para verificar su ausencia en un taxón determinado. Las bandas se registraron de acuerdo a un número asignado por el sistema de fotodocumentación con base en su posición en el gel de agarosa, en relación a una mezcla de fragmentos de tamaño conocido (marcador de 100 pb). Se determinó el número de bandas amplificadas por cada cebador y la calidad de la amplificación en base a la intensidad de las bandas (+, ++, y +++) y a la separación de los fragmentos en el gel de agarosa (buena, regular o mala).

7. Selección de marcadores RAPDs para el análisis poblacional del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*.

A partir de la caracterización de los marcadores RAPDs en el complejo *ayacahuite-strobiformis* se seleccionaron los cebadores que produjeron patrones de bandeo adecuados para realizar el análisis de diversidad genética. La selección se basó en la reproducibilidad de los patrones electroforéticos del cebador y en la amplificación de al menos tres bandas intensas o de mediana intensidad que presentaran una buena separación en el gel.

8. Análisis de datos en genoma acumulado

Se creó una matriz de datos binarios formada por los siete taxa y el número de bandas registradas para cada uno de los oligonucleótidos. Las bandas se registraron como presentes o ausentes (1 o 0). Se determinó la similitud entre los taxa utilizando dos coeficientes de similitud, el coeficiente de Jaccard (1908), $F = M_{xy} / (M_t - M_{xy0})$, y el coeficiente de Nei y Li (1979), $S = 2 M_{xy} / (M_x + M_y)$. Donde, M_{xy} representa el número de fragmentos compartidos entre dos taxa, M_t , es total de bandas en la matriz de datos,

M_{xy0} el número de bandas que no son compartidas por los taxa, M_x el total de bandas en un taxa y M_y total de bandas en el otro taxa. Se calculó la distancia genética con las fórmulas 1-F y 1-S, respectivamente. Los valores obtenidos aplicando el coeficiente de Jaccard se utilizaron para obtener un dendograma con el programa Biodiversity pro Downloads.

RESULTADOS

1. Polimorfismos de productos amplificados al azar (RAPD)

En relación a la cantidad de material genético, el análisis de los geles mostró amplificación con todas las concentraciones empleadas. Sin embargo, se observó una mejor resolución de las bandas cuando se añadieron 10 o 20 ng de DNA a la mezcla de reacción (Cuadro V).

La cantidad del $MgCl_2$ fue determinante para la amplificación y la resolución de los marcadores. La mezcla de reacción con una concentración de cofactor 1.5 mM produjo una débil amplificación y una pobre resolución. Se observa mejoría en la amplificación cuando la cantidad del cofactor aumenta. Una concentración de $MgCl_2$ de 2.5 mM produjo la mejor resolución de las bandas en el gel.

No se observaron diferencias en la amplificación y resolución de los marcadores con las dos concentraciones de dNTPs empleadas. En relación a la cantidad del iniciador se observó una mejoría tanto en la amplificación como en la resolución cuando se añadieron a la mezcla de reacción a una concentración final 0.3 μM . La adición de 0.75 U de enzima Taq Pol (Perkin-Elmer) fue suficiente para obtener una amplificación y una resolución adecuada, 0.5 U de la enzima produjeron una amplificación débil (Cuadro V).

El programa de amplificación que proporcionó mejores resultados fue el que consistió de: desnaturalización prolongada, 3 min. a 94° C; 40 ciclos de desnaturalización, 1 min. a 94°; alineación, 1 min. a 36° C; elongación, 2 min. a 72° C y una fase de elongación prolongada de 10 min. a 72° C.

Cuadro V. Efecto de las concentraciones de los componentes de la reacción de PCR en la amplificación/resolución de marcadores RAPD: - negativa, + débil y barrida, ++ débil, +++ tres o más bandas medias y/o intensas.

Concentración	Amplificación	Resolución
DNA ng		
2.5	+	+
5	+	+
10	+	++
20	+	++
dNTPs μM		
100	++	++
200	++	++
MgCl₂ mM		
1.5	+	-
2.5	++	++
3.5	++	+
4.5	++	+
Iniciador μM		
0.2	+	+
0.3	++	++
TaqPol		
0.5 U	+	+
0.75 U	++	++
1 U	++	++

2. Caracterización de marcadores RAPD

De un total de 60 iniciadores empleados, tres no mostraron amplificación o la amplificación no permitió el análisis de las bandas en todos los taxones. Algunos iniciadores mostraron amplificación positiva, pero las bandas no eran intensas y/o presentaban una gran cantidad de barrimiento, otros amplificaron bien pero el número de bandas era reducido y/o presentaban un ligero abrimiento. Un grupo importante de iniciadores produjo bandas definidas e intensas (Cuadros VI – VIII). Los iniciadores se caracterizaron además de acuerdo a la separación observada en el patrón electroforético de los fragmentos amplificados. La cantidad y la especificidad de los iniciadores, con las características señaladas anteriormente, fue diferente en *P. chiapensis* y en el complejo de *P. ayacahuite*-*P. strobiformis*.

Cuadro VI. Características de la amplificación con el grupo de indicadores OPA.
Amplificación/Resolución: - negativa, + débil y barrida, ++ débil, +++ tres o más
bandas medias y/o intensas.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	<i>P. chiapensis</i>			Complejo <i>P. ayacahuite- P.strobiformis</i>		
		Num. de bandas	Amplificación	Separación	Num. de bandas	Amplificación	Separación
A-01	CAGGCCCTTC	5	++	Regular	5	++	Buena
A-02	TGCCGAGCTG	4	+++	Buena	4	+++	Regular
A-03	AGTCAGCCAC	2	+	Regular	2	+	Regular
A-04	AATCGGGCTG	3	+++	Buena	5	++	Buena
A-05	AGGGGTCTTG	2	+	Mala	2	+	Buena
A-06	GGTCCCTGAC	3	++	Buena	3	++	Regular
A-07	GAAACGGGTG	3	++	Buena	3	+++	Buena
A-08	GTGACGTAGG	4	+++	Buena	6	+++	Regular
A-09	GGGTAACGCC	4	+++	Buena	4	+++	Buena
A-10	GTGATCGCAG	3	++	Buena	3	++	Buena
A-11	CAATCGCCGT	1	++	Buena	8	+++	Regular
A-12	TCGGCGATAG	1	++	Buena	1	+	Buena
A-13	CAGCACCCAC	2	+	Mala	2	+	Mala
A-14	TCTGTGCTGG	0	-	-	0	-	-
A-15	TTCCGAACCC	1	++	Buena	1	++	Buena
A-16	AGCCAGCGAA	3	++	Buena	1	++	Buena
A-17	GACCGCTTGT	2	++	Regular	3	+++	Regular
A-18	AGGTGACCGT	3	+	Regular	4	++	Regular
A-19	CAAACGTCGG	4	+	Mala	4	+	Mala
A-20	GTTGCGATCC	0	-	-	0	-	-

Cuadro VII. Características de la amplificación con los iniciadores del grupo OPB. Amplificación/Resolución: - negativa, + débil y barrida, ++ débil, +++ tres o más bandas medias y/o intensas.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	<i>P. chiapensis</i>			Complejo <i>P. ayacahuite- P. strobiformis</i>		
		Num. de bandas	Amplificación	Separación	Num. de bandas	Amplificación	Separación
B-01	GTTTCGCTCC	3	+++	Regular	3	+++	Buena
B-02	TGATCCCTGG	2	+	Regular	5	+	Buena
B-03	CATCCCCCTG	3	++	Regular	3	+++	Regular
B-04	GGACTGGAGT	5	+++	Buena	6	+++	Buena
B-05	TGCGCCCTTC	2	++	Buena	2	++	Buena
B-06	TGCTCTGCC	2	+	Regular	2	++	Mala
B-07	GGTGACGCAG	0	-	-	0	-	-
B-08	GTCCACACGG	2	+	Buena	2	++	Buena
B-09	TGGGGGACTC	1	++	Buena	1	++	Buena
B-10	CTGCTGGGAC	3	++	Buena	3	++	Buena
B-11	GTAGACCCGT	4	++	Buena	4	++	Buena
B-12	CCTTGACGCA	4	++	Buena	4	++	Buena
B-13	TTCCCCGCT	1	+	Buena	1	++	Buena
B-14	TCCGCTCTGG	3	++	Buena	2	++	Buena
B-15	GGAGGGTGTT	2	+	Mala	2	+	Mala
B-16	TTTGCCCGGA	1	+	Buena	1	++	Buena
B-17	AGGGAACGAG	4	+	Mala	4	+++	Buena
B-18	CCACAGCAGT	4	+	Mala	4	+++	Buena
B-19	ACCCCCGAAG	6	++	Regular	6	+++	Buena
B-20	GGACCCTTAC	5	+	Regular	5	+	Regular

Cuadro VIII. Características de la amplificación con el grupo de iniciadores OPBB. Amplificación/Resolución: - negativa, + débil y barrida, ++ débil, +++ tres o más bandas medias y/o intensas.

Indicador	Secuencia 5' - 3'	<i>P. chiapensis</i>			Complejo <i>P. ayacahuite- P. strobiformis</i>		
		Num. de bandas	Amplificación	Separación	Num. de bandas	Amplificación	Separación
BB-01	ACACTGGCTG	4	+++	Buena	4	++	Buena
BB-02	CCCCGTTAG	3	+	Mala	2	++	Buena
BB-03	TCACGTGGCT	4	+	Buena	3	+	Buena
BB-04	ACCAGGTCAC	2	++	Buena	2	++	Buena
BB-05	GGGCCGAACA	4	++	Regular	4	++	Regular
BB-06	CTGAAGCTGG	4	+	Mala	4	+	Mala
BB-07	GAAGGCTGGG	4	+++	Buena	4	+++	Buena
BB-08	TCGTCAAGG	2	+	Regular	2	+	Regular
BB-09	AGGCCGGTCA	3	+++	Buena	3	+++	Buena
BB-10	ACTTGCCTGG	2	+++	Buena	2	+++	Buena
BB-11	TGCGGGTTCC	2	++	Buena	2	++	Buena
BB-12	TTCGGCCGAC	3	++	Mala	4	+++	Buena
BB-13	CTTCGGTGTG	5	++	Mala	4	+++	Buena
BB-14	GTGGGACCTG	1	+++	Buena	1	+++	Buena
BB-15	AAGTGCCTG	1	++	Buena	1	++	Buena
BB-16	TCGGCACCGT	5	+++	Buena	4	+++	Buena
BB-17	ACACCGTGCC	3	+	Regular	3	++	Buena
BB-18	CAACCGTCT	1	++	Buena	1	+++	Buena
BB-19	TTGCGGACAG	2	++	Buena	2	++	Buena
BB-20	CCAGGTGTAG	2	+	Mala	3	++	Mala

Con excepción de un número reducido de bandas, producto probablemente de variación individual, se observó reproducibilidad de los patrones de bandeo obtenidos en la amplificación del genoma acumulado y en la amplificación de genomas individuales con los 60 iniciadores empleados.

Se formó una matriz de datos binarios con aquellas bandas que mostraron reproducibilidad y una amplificación mediana o intensa en los genomas acumulados (Anexo 2). El análisis de la matriz muestra que un total de 26 oligonucleótidos (43 %) presentaron al menos una banda polimórfica en alguno de los taxa (Cuadro IX).

Cuadro IX. Marcadores que produjeron fragmentos polimórficos.

Iniciadores	Num. total de fragmentos analizados por iniciador	<i>P. Chiapensis</i> -Complejo	Entre los taxa del
		<i>P. Ay.- P. St.</i>	Complejo <i>P. Ay.- P. St.</i>
		Num. de fragmentos polimórficos	Num. De fragmentos Polimórficos
B01	4	2	0
B02	5	3	1
B04	6	1	1
B05	4	4	0
B08	3	2	0
B11	5	2	0
B12	4	2	2
B14	4	3	0
B17	6	4	1
BB02	3	1	0
BB03	4	1	0
BB04	2	0	1
BB05	4	1	0
BB12	5	3	0
BB13	7	5	0
BB16	6	4	0
BB20	3	1	0
A04	6	4	0
A06	5	4	3
A07	3	0	1
A08	6	2	2
A11	8	7	2
A16	4	4	0
A17	6	5	2
A18	5	3	0
A19	3	0	2
Total 26	121	68	18

De 203 fragmentos amplificados en *P. chiapensis* y el complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*, el 67 % fueron compartidos por todos los taxa. En contraste, el 33 % mostraron polimorfismo entre *P. chiapensis* y el complejo *ayacahuite-strobiformis*. En el caso de los taxa del complejo, el 90 % de los fragmentos fueron compartidos y solamente un 10 % mostró algún polimorfismo (Cuadro X).

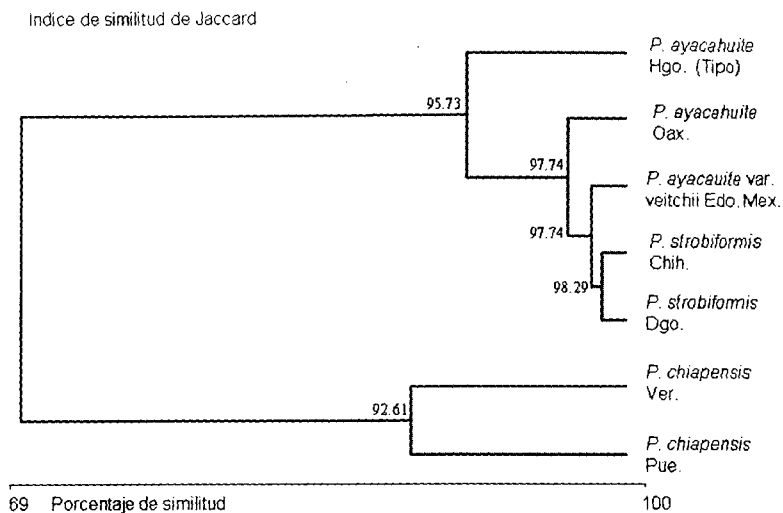
Cuadro X. Porcentajes de marcadores compartidos y polimórficos entre taxa.

Taxa	Fragmentos Compartidos	Fragmentos polimórficos	Total de fragmentos analizados
<i>Pinus chiapensis</i> PCHP - PCHV	95%	5%	164
<i>P. chiapensis</i> –complejo <i>P. ayacahuite</i> - <i>P. strobiformis</i>	67%	33%	203
Complejo <i>P. ayacahuite</i> - <i>P. strobiformis</i>	90%	10%	176

3. Índices de similitud de Jaccard y Nei

Los cuadros XI y XII muestran los coeficientes de similitud de Jaccard y de Nei y Li obtenidos a partir de la matriz de datos binarios. A partir de las distancias génicas que revelan estos coeficientes de similitud se obtuvo el dendograma que se muestra en la figura 3.

Figura 3. Dendograma obtenido a partir del Índice de similitud de Jaccard



4. Selección de oligonucleótidos para el análisis poblacional

El cuadro XIII

muestra el grupo de 25 oligonucleótidos seleccionados para realizar el estudio poblacional en *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*.

Cuadro XIII. Iniciadores preseleccionados para el estudio de variación poblacional en el complejo *ayacahuite-strobiformis*

	Grupo OPB	Grupo OPBB	Grupo OPA
	B-01	BB-01	A-02
	B-03	BB-02	A-04
	B-04	BB-05	A-07
	B-11	BB-07	A-08
	B-12	BB-09	A-09
	B-17	BB-10	A-11
	B-18	BB-12	A-17
	B-19	BB13	A-18
		BB-16	
Total	8	9	8

DISCUSIÓN

1. Condiciones de la amplificación de RAPD

Las muestras de DNA de pinos blancos utilizadas en este trabajo, fueron aisladas con el protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1997) y modificado por Palomera (2002). Debido a que la pureza y la calidad del material genético dependen del método de extracción empleado, fue necesario determinar la cantidad óptima de DNA para la reacción de amplificación por PCR. En éste trabajo, los mejores resultados fueron obtenidos al utilizar 20 ng de DNA, concentración similar utilizada en otros trabajos con diversas especies de pinos (Díaz *et al*, 2001; Mosseler, 1992). Durante el proceso de optimización, se emplearon tanto muestras tratadas con RNasa como no tratadas, los resultados no mostraron diferencias en los patrones de bandeo, por lo tanto, es posible llevar a cabo la reacción de RAPD en material genético total, reduciendo así el costo de la extracción. Sin embargo, con el objeto de disminuir variaciones en la cantidad de DNA molde en la reacción, es importante considerar que aproximadamente un tercio del material genético total extraído en ausencia de RNasa es DNA (Palomera, 2002).

Como había sido previamente reportado (Bowditch *et al.*, 1993), se observó que la concentración de $MgCl_2$ (cofactor de la *Taq* polimerasa), es determinante para la intensidad, el patrón de amplificación y la reproducibilidad de los resultados. La concentración del cofactor utilizada en la reacción de RAPD, en diversos trabajos, varía de 1.5 a 3.5 mM. Las concentraciones comúnmente empleadas en la amplificación de genoma de pinos son 1.5 y 2.5 mM (Díaz *et al*, 2001; Furman *et al*, 1997; Mosseler, *et al.*, 1992). En este trabajo se observó, con algunos iniciadores, una correlación directa entre la cantidad del cofactor y la cantidad de barrimiento presente en el gel; además de que una mayor cantidad de cofactor produce una mejor amplificación y reproducibilidad de las bandas.

Las cantidades de cebadores o iniciadores y de dNTPs empleadas en este trabajo, no alteraron los patrones de bandeo y se encuentran dentro de los intervalos empleados en trabajos con RAPD. Williams *et al.* (1993), indicaron que las concentraciones óptimas de iniciadores se encuentran entre 0.1 y 2 μM y que 100 μM de cada una de los cuatro nucleótidos es suficiente para que se lleve a cabo la amplificación.

Se ha reportado que cantidades excesivas de *Taq* polimerasa pueden provocar barrimiento del DNA amplificado; sin embargo, las concentraciones utilizadas en nuestros experimentos no provocaron ese efecto. Es necesario determinar la cantidad

mínima de polimerasa en la reacción, ya que debido a su costo puede ser un factor limitante para llevar a cabo este tipo de estudios. La cantidad mínima de enzima que se ha utilizado en trabajos con RAPDs es de 0.5 U (Isabel *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 2002). La adición de 0.75 U de la enzima Perkin Elmer a la mezcla de reacción fue suficiente para obtener una buena amplificación del genoma de pinos.

En relación a las temperaturas y ciclos de la amplificación, se observó una buena amplificación con una temperatura de alineamiento de 36 °C (Bowditch *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1993). Bowditch *et al.* (1993) reportaron que cuando se emplean iniciadores con una longitud de 10 bases, temperaturas superiores a 40° C reducen el número de productos amplificados pero aumentan la reproducibilidad de las bandas. En nuestro caso tanto el número como la calidad de los fragmentos amplificados se redujeron considerablemente. Sin embargo, Newton *et al.* (2002) obtuvieron buenos resultados al amplificar el genoma de *P. chiapensis* con una temperatura de alineamiento de 40 °C; probablemente la separación de sus amplificados en geles de poliacrilamida explique sus resultados. Un paso de desnaturalización prolongada al iniciar la reacción y un paso prolongado de elongación al terminar, produjeron mejores resultados. Como en la mayoría de los estudios realizados con RAPDs, 35 ciclos fueron suficientes para obtener una cantidad considerable de amplificado (Williams *et al.*, 1993).

2. Caracterización de marcadores RAPDs en *P. chiapensis* y el complejo *P. ayacahuite-strobiformis*

La estrategia de genoma acumulado utilizada en este estudio permitió eliminar la variación producida por diferencias individuales dentro de la población y considerar solamente aquellos marcadores que presentaron una alta frecuencia dentro de los taxa (Furman *et al.*, 1997). La competencia que se presenta entre los diferentes templetos de DNA que forman el acumulado impide la amplificación de los polimorfismos de DNA que presentan una baja frecuencia.

El número de muestras con el que se formó el acumulado estuvo determinado por el número de árboles recolectados en las poblaciones de *P. chiapensis*. Actualmente esta especie se encuentra restringida a poblaciones pequeñas y fragmentadas (Newton *et al.*, 2002), lo que dificultó el muestreo de un mayor número de árboles. Por otro lado, un número reducido de muestras en el acumulado disminuye las probabilidades de

contaminación o diferencias en las condiciones del DNA que pudieran afectar la amplificación.

Aunque se han realizado un número considerable de estudios en genoma acumulado con marcadores RAPD a nivel interespecífico e intraespecífico (Wolfe y Liston, 1998), las comparaciones entre estos estudios son prácticamente imposibles debido a las diferencias en las estrategias de muestreo, los iniciadores empleados, las condiciones de la reacción, y las formas de registrar los productos amplificados. En nuestro trabajo, solamente se registraron bandas detectadas por el sistema de fotodocumentación Kodak EDAS con un nivel de sensibilidad intermedio (0). Lo anterior implica que la banda presente un nivel de intensidad fuerte o intermedio. No se consideraron aquellas bandas que no se encontraron presentes en los dos acumulados de cada población. La ausencia de una banda con el nivel de sensibilidad de 0 se comprobó aumentando el nivel de sensibilidad del sistema al máximo (3). Las condiciones anteriores redujeron tanto el número de bandas totales registradas como el número de bandas polimórficas por iniciador. Con relación a trabajos realizados en genoma acumulado de diversos géneros y/o especies, frecuentemente el número de marcadores identificados por iniciador es de 5 a 20, independientemente de la intensidad y la reproducibilidad (Wolfe y Liston 1998; Furman *et al.*, 1997). En el estudio de las relaciones genéticas de pinos mexicanos y centroamericanos, Furman *et al.* (1997) encontraron un promedio de 1.85 bandas intensas por iniciador informativo. El número reducido de iniciadores empleados en nuestro estudio no nos permitió obtener una cantidad alta de bandas intensas, por lo que se registraron además, bandas medianamente amplificadas, obteniendo un promedio de 4.65 bandas por iniciador informativo.

A pesar de sus desventajas, los RAPD siguen siendo uno de los marcadores más utilizados en el estudio de la diversidad genética. Una de las recomendaciones para mejorar la reproducibilidad de la amplificación consiste en uniformizar las condiciones de la amplificación entre los experimentos (Wolfe y Liston, 1998). Además, el seleccionar los iniciadores que se emplearán en estudios de la diversidad genética, con base en el número y en la intensidad de las bandas, mejora significativamente la reproducibilidad del registro de los datos. Skroch y Nienhuis (1995) recomendaron utilizar aquellos cebadores que produzcan el mayor número de bandas y reportaron una disminución en el porcentaje de bandas que se registran en forma errónea si se evita

considerar bandas que amplifican débilmente. En el caso del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*, el tamizaje de los 60 iniciadores reveló que 25 de ellos amplifican aproximadamente el 60 % de los fragmentos totales y producen patrones de bandeo adecuados, en cuanto a intensidad y resolución, para emplearse en el estudio de la diversidad genética. Posteriormente se analizará la reproducibilidad de los patrones de amplificación en genomas individuales y se seleccionarán aquellos iniciadores que produzcan los mejores resultados.

3. Relaciones genéticas de los taxa del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis* y *Pinus chiapensis*

Una de las principales aplicaciones de los marcadores RAPDs ha sido en la inferencia de las relaciones genéticas entre poblaciones y especies de plantas silvestres y cultivadas (Furman *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 1997). Sin embargo, el uso de estos marcadores en filogenia ha sido fuertemente cuestionado. Entre las limitaciones de los datos generados para este tipo de análisis se encuentra la probable falta de homología entre bandas comigrantes de diferentes especies. Se recomienda corroborar homología de los marcadores o limitar su uso a estudios filogenéticos a nivel intraespecífico o entre especies cercanamente relacionadas (Risenberg, 1996).

En nuestro estudio no fue posible determinar la homología entre los productos de la amplificación. Sin embargo, Risenberg (1996) mostró que en tres especies de *Helianthus* el 91 % de los productos comigrantes fueron homólogos, lo que sugiere que el tamaño del producto puede ser un buen indicador de homología. El sistema de fotodocumentación EDAS permite registrar el tamaño de los amplificados, en donde fragmentos del mismo tamaño entre individuos, poblaciones o especies cercanas son probablemente productos homólogos.

Otro de los problemas detectados con el uso de RAPDs en filogenia se debe a diferencias en el registro de las bandas. Empleando una prueba estadística de confiabilidad Skroch y Nienhuis (1995) demostraron que el error debido a problemas en el registro de los marcadores como presente o ausente tiene un rango entre 0 y 8 %, dependiendo de la intensidad relativa de la amplificación, la cual es medida por la calidad de la tinción con bromuro de etidio. Es importante descartar este tipo de error de registro, ya que puede influenciar las conclusiones del estudio. Además de registrar al marcador como ausente o presente algunos estudios clasifican los marcadores por la

intensidad de la amplificación. Nosotros intentamos registrar ambos parámetros para emplearlos en el análisis de las relaciones genéticas entre los taxa. Sin embargo, no observamos reproducibilidad en la intensidad de las bandas entre experimentos.

La delimitación de especies es uno de los motivos más importantes de debate en complejos de especies de reciente evolución. Los estudios morfológicos convencionales frecuentemente llevan a diferentes conclusiones taxonómicas. Tal es el caso del complejo de pinos blancos mexicanos *P. ayacahuite*-*P. strobiformis*, cuya caracterización morfológica no ha permitido una clara definición de *P. strobiformis* como una especie diferente a *P. ayacahuite* o como una variedad más de este último (Farjon y Styles, 1997). Los datos generados en nuestro estudio se utilizaron para identificar marcadores específicos de cada taxón y estimar el grado de diferenciación entre los taxa a través del cálculo de las distancias genéticas.

El coeficiente de similitud de Jaccard y el coeficiente de Nei y Li, empleados para obtener las distancias genéticas, solamente toman en cuenta bandas presentes entre dos perfiles de RAPDs. Otros coeficientes consideran tanto presencias como ausencias a pesar de que se desconocen las razones por las que los productos se encuentran ausentes. Además, el coeficiente de Nei y Li puede interpretarse biológicamente como la proporción esperada de productos compartidos debido a que se heredan de un ancestro común (Harris, 1999).

Nuestros resultados no nos permitieron identificar marcadores específicos dentro del complejo y ubicar a *P. strobiformis* como una especie diferente a *P. ayacahuite*. Furman *et al.* (1997) propusieron que un alto número de marcadores generaría un patrón de relaciones genéticas más confiable. Por lo que sería conveniente aumentar el número de iniciadores empleados en la caracterización de los taxa del complejo.

Como se señaló anteriormente, la comparación de los resultados entre diferentes estudios se dificulta debido a los problemas de reproducibilidad de este tipo de marcadores entre diferentes laboratorios y a las diferencias en el análisis y registro de los datos. Sin embargo, las distancias genéticas observadas entre los taxa del complejo *Pinus ayacahuite*- *P. strobiformis*, son similares a las obtenidas por Furman *et al.* (1997) entre poblaciones de pinos de la misma especie (0.07-0.11). La distancia genética obtenida entre *P. chiapensis* y los taxa del complejo, se encuentra entre los valores reflejados por diferentes especies en el estudio señalado (0.18 - 0.74).

De acuerdo a nuestros resultados la distancia genética que separa a *P. chiapensis* del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis* es aproximadamente 10 veces más grande que la que separa a los taxa del complejo, mientras que la distancia genética que separa a *P. ayacahuite* var. *ayacahuite* de *P. ayacahuite* var. *veitchii* es muy similar que la que separa a estos dos taxa de *P. strobiformis*. Lo anterior no concuerda con lo reportado por Hernández (1990) en su estudio de variación isoenzimática en el complejo, ya que sus resultados indicaron que la distancia genética que separa a *P. ayacahuite* de *P. strobiformis* es aproximadamente dos veces la distancia que separa a *P. ayacahuite* var. típica de *P. ayacahuite* var. *vietchii*. Sin embargo, en su análisis solamente incluyó dos poblaciones de *P. strobiformis* del estado de Durango, y no se consideraron poblaciones de *P. strobiformis* del norte del país. Las diferencias obtenidas entre nuestro trabajo y el de Hernández pueden ser resultado de variación genética dentro de las poblaciones de Durango, por lo que sería conveniente estudiar los taxa del complejo con un tercer marcador molecular.

Finalmente, la mayor diferencia genética del árbol tipo de *P. ayacahuite* de las poblaciones del complejo incluidas en este estudio, aunque es ligera, puede ser explicada por la variación individual del topotipo, el uso de genoma acumulado elimina precisamente este tipo de variación.

CONCLUSIONES

La técnica de RAPDs es extremadamente sensible a variaciones, por lo tanto el control de las condiciones de la reacción de PCR y la calidad de los reactivos es esencial para obtener una amplificación adecuada.

En lo que se refiere a la cantidad y calidad de DNA para la reacción de PCR, fue necesaria la estandarización y optimización de la técnica para el genoma de *Pinus*, por lo que fue posible caracterizar marcadores RAPD para genoma de pinos blancos.

El sistema de fotodocumentación Kodak EDAS permitió eliminar la subjetividad en el registro de los marcadores RAPD, además fue extremadamente útil en la determinación de reproducibilidad de los productos de amplificación.

La técnica de RAPD generó además información que permitió la separación de los taxa de estudio a nivel interespecífico, pero no a nivel intraespecífico.

Finalmente se recomienda aumentar el número de iniciadores a 100 en estudios poblacionales en estos taxa.

LITERATURA CITADA

Andresen, J.W. 1964. The taxonomic status of *Pinus chiapensis*, *Phytologia* 10: 417-421.

Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G. 1993. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods in Enzymology*. pp 295-309

Bruederle, L .P., Rogers, D. L., Krutovskii, K. V., Politov, D. V. 2001. Population genetics and evolutionary implications. En: Tomback D.F., Arno S.F., Keane R.E., (eds.) *Whitebark pine communities*,. Island Press, pp 137-153.

Catalán, P., Shi, Y., Armstrong, L., Draper, J., Stace, C. A. 1995. Molecular phylogeny of the grass genus *Brachipodium* P. Beauv. based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 117: 263-280.

Critchfield, W. B, Little, E., L. 1966. Geographic distribution of the pines of the world. USDA Forest Service Miscellaneous Publications 991.

Díaz, V., Muñiz, M., Ferrer, E. 2001. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology* 10: 2593-2603.

Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.

Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D., Risenberg, L.H. 1996. *Nucleic acids III: Analysis of basements and restriction sites*. Molecular Systematics. Sinauer Associates, pp 249-230.

Eguiluz, P. T. 1982. Clima distribución del género *Pinus* en México. *Ciencia Forestal* 38: 30-44.

Ern, H. 1976. Descripción de la vegetación montañosa de los Estados Mexicanos de Puebla y Tlaxcala. *Willdenowia* 10: 128.

Excoffier, L., Smousse, P. E., Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics* 131: 479-491.

Farjon, A., Pérez de la Rosa, J. A., Styles, B. 1997. *Guía de campo de los Pinos de México y América Central*. Royal Botanic Gardens, Kew. Universidad de Oxford.

Farjon, A., Styles B. 1997. *Flora Neotropica Pinus (Pinacea)*. Monograph 75.

Farjon, A., Styles, B. 1997. *Pinus* (Pinace). The New York Botanical Garden. New York

Furman, B. J., Grattapaglia, D., Dvorak, W. S., O'Malley D. M. 1997. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican Pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology* 6:321-331

Gillies, A. C. M., Cornelius, J. P., Newton, A. C., Navarro, C., Hernández, M., Wilson, J. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrella odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*, 6: 1133-1145.

Hadrys, M., Balick, M., Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55- 63

Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., Sherman-Broyles, S. L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plants species. *New Forests* 6: 95-124.

Harris, S. A. 1999. RAPDs in systematics – a useful methodology? En: *Molecular systematics and plant evolution*. P. M. Hollingsworth, R. M. Batesman, R. J. Gornall (eds.), Taylor y Francis. Londón, pp 211-228.

Hernández, J. J. 1990. Variación genética isoenzimática en *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades de México y Centroamérica. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Chapingo, México.

Hu, J., Quiros, C. F. 1991. Identification of brócoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Report*, 10: 505-511.

Isabel, N., Beaulieu, J., Bousquet, J. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data, alloenzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92: 6369-6373.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudense des Sciences Naturelles* 44 : 223-270.

Lanner, R. M. 1996. *Made for each other: A symbiosis of birds and pines*. Oxford University Press, New York.

Ledig, F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. En: Richardson D. M. (ed), *Ecology and biogeography of pinus*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 251-280.

Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 6: 381-398.

Liston, A., Robinson, W. A., Piñero, D., Álvarez-Buylla, E. R. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 11: 95-109

Little, E. L., Jr., Critchfield, W. B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus*. U. S. Forest Service Miscellaneous Publications 1144, Washington, D. C., 51

Lynch, M., Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99.

Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos. Subsecretaría de Recursos Forestales y de Caza, Secretaría de Agricultura y Ganadería. 2ª edición, ediciones Botas, México

Mosseler, A., Egger, K. N., Hughes, G. A. 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research*, 22:1332-1337

Nei, M., Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 5269-5273.

Newton, A. C., Allnut, T. R., Dvorak, W. C., Del Castillo R. F., Ennos, R. A. 2002. Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity*, 89: 191-198

Nybom, H., Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives on Plant Ecology Evolution and Systematic*, 3/2: 93-114.

Otero, A. A., De la Cruz, M. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad de Botánica*, 60: 85-117.

Palomera, V. 2002. Comparación de métodos de extracción de DNA en diferentes tejidos de tres especies de pinos blancos (*Pinus* spp.). Tesis Licenciatura. CUCBA, Universidad de Guadalajara.

Pérez de la Rosa, J. A. 1993. Taxonomía de *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México

Perry, J. P. 1991. The pines of Mexico and Central America. The Timber Press, Inc. Portland.

Price, R. A., Liston, A. L., Strauss, S. H. 1998. The history of pines in Mexico and Central America. En: Richardson, D. M. (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 49-68.

Reisenberg, L. H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology*, 5: 99-105.

Sambrook J, Fritsh E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor.

Skroch, P., Nienhuis, J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical Applied Genetics*, 91: 1086-1091.

Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman: San Francisco.

Szmidt A. E., Wang, X. R., Lu, M. Z. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestri* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity*, 76: 412-420.

Weeden, N. F., Timmerman, G. M., Hemmat, M., Kneen, B. E., Lofhi, M. A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. En: *Applications of RAPD markers to plant breeding*. Crop Science Society of America, pp 12-17.

Williams, J. G. F., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18: 6531-6535.

Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 218: 704-740.

Wolfe, A. D., Liston, A. 1998. Contributions of PCR- based methods to plant systematics and evolutionary biology. En: Soltis D. E., Soltis P. S., Doyle J. J., (eds.) *Molecular Systematics of Plants II*, Kluwe Academic Publishers, pp 43-86

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals Eugenics*, 15: 323-354.



ANEXO I

1. Técnica de RAPD

- 1- Encender el termociclador para su estabilización.
- 2- Preparar la mezcla de reacción (Solución A), para el total de reacciones planeadas (21µl de volumen para cada reacción).

Mezcla de reacción (Solución A) Volúmenes por reacción		Concentraciones finales
Amortiguador Taq (10 X)	2.5 µl	
Tris- Cl, pH 8.3		10 mM
KCl		50 mM
Gelatina		0.001 %
MgCl ₂ (mM)	0.5 µl	2.5 mM
dNTPs (5 mM)	0.75 µl	150 µM
Agua HPLC	17.25 µl	-
Volúmen total	21µl	

- 3- Mezclar y centrifugar
- 4- Numerar tubos de 0.2 ml y adicionar la solución A.
- 5- Preparar la mezcla Cebador-*Taq* polimerasa (Solución B), para el total de reacciones (2 µl de volumen por cada reacción).

Mezcla cebador- <i>Taq</i> - pol (Solución B) Volúmenes por reacción		Concentraciones finales
Iniciador	1.5 µl	0.3 µM
<i>Taq</i> polimerasa	0.15 µl	0.5 U
Agua HPLC	0.35 µl	-
Volúmen total	2 µl	

- 6- Mezclar y centrifugar
- 7- Añadir 2 µl la solución B a los tubos que contienen la solución A.
- 8- Agregar 2 µl de la solución del DNA molde previamente diluido a una concentración de 40 ng/µl.

- 9- Mezclar, centrifugar 30 segundos a 12000 rpm y cubrir cada reacción con 1 gota de aceite mineral.
- 10- Centrifugar brevemente en una microcentrifuga durante 30 segundos e iniciar la reacción en cadena de la polimerasa con el siguiente programa.

Ciclos	Tiempo (min.)	Temperatura
Predesnaturalización	3	94° C
40 ciclos	1	94° C
	2	36° C
	2	72° C
Extensión final	10	72° C
Almacenamiento	∞	4° C

2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa al 1.8 %

- 1- Añadir 4 μ l del amortiguador de carga al tubo donde se realizó la amplificación.
- 2- Centrifugar brevemente los tubos durante 10 a 15 segundos.
- 3- Cubrir un gel de agarosa al 1.8 % con amortiguador TBE 1 X, cuidando que el volumen del amortiguador se encuentre entre 5 a 7 mm por encima del gel.
- 4- Tomar entre 15 a 20 μ l del amplificado y colocar las muestras en los pozos.
- 5- Colocar en un pozo de 4 a 5 μ l del marcador de 100 pb (Gibco)
- 6- Llevar a cabo la electroforesis a temperatura ambiente, aplicando aproximadamente 3 Volts por centímetro o hasta que el indicador (azul de bromo fenol) haya migrado 5 cm, lo cual ocurre en aproximadamente 3 – 3 $\frac{1}{2}$ h.
- 7- Teñir en una solución con una concentración de Bromuro de Etidio de 1 μ g/ml durante 30 minutos.
- 8- Desteñir el gel con suficiente agua durante aproximadamente 2 hrs.
- 9- Observar en gel en el transiluminador
- 10- Tomar una fotografía como cámara Polaroid y con el sistema de fotodocumentación EDAS.

2.1. Reactivos de electroforesis.

Buffer de electroforesis Tris/EDTA/Borato (TBE) 10x

Para preparar 1 litro. Guardar en refrigeración o a temperatura ambiente indefinidamente.

NaOH (pm 40.00)	1 g
Trizma base (pm 121.10)	108 g
Acido bórico (pm 61.83)	55 g
EDTA sal disódica (pm 372.24)	7.4 g

1. Agregar todos los reactivos en 700 ml de agua desionizada en un vaso de precipitado de 2 L.
2. Agitar para disolver, con una barra magnética en una plancha con agitación.
3. Aforar a 1000 ml con agua desionizada.

Nota: Evite inhalar el trisma base.

2.2 Buffer TBE 1X

Para preparar 2 litros. Guardar en refrigeración o a temperatura ambiente indefinidamente.

1. Agregar 1800 ml de agua desionizada y 200 ml de buffer TBE 10x.
2. Agitar para mezclar

2.3 Agarosa 1.8%

Para preparar 200 ml. Guardar en refrigeración por algunas semanas.

1. Agregar 3.6 g (1.8%) de agarosa (grado electroforesis) y 200 ml de buffer TBE 1X en un matraz Erlenmeyer de 500 ml.
2. Agitar suave para suspender la agarosa
3. Calentar la agarosa en una plancha por 10 min o en el microondas a temperatura alta de 3 a 5 min hasta disolver.

4. Dejar reposar por unos minutos hasta que la agarosa tenga una temperatura aproximada de 50°C y vaciar a la charola del gel o mantener la agarosa en baño maría a 60°C hasta que este lista para usarse.

Nota:

- a. La agarosa puede pesarse y guardarse en bolsas o tubos hasta que se necesite.
- b. Si se prepara la agarosa en el microondas puede formarse una nata en la superficie, elimine esta “nata” antes de preparar el gel.
- c. La agarosa gelificada puede guardarse en refrigeración y fundirse en la plancha o en el microondas antes de usarse.
- d. Cuando la agarosa se funde, la evaporación puede elevar la concentración. Si es necesario, compense añadiendo un pequeño volumen de agua.

2.4 Buffer de carga

Para preparar 100 ml. Almacenar en congelación o refrigeración indefinidamente.

Azul de bromofenol (pm 669.96)	0.25 g
Xilen cianol (pm 538.60)	0.25 g
Glicerol o Sucrosa (pm 342.30)	50 ml o 50.00 g
Tris 1 M (pH 8.0)	1 ml

Si usa glicerol:

1. Disolver el azul de bromofenol, el xilen cianol y el Tris en 49 ml de agua desionizada.
2. Agregar 50 ml de glicerol y disolver completamente.

2.5 Solución concentrada de bromuro de etidio 5 mg/ml

Para preparar 50 ml. Almacenar en frasco ámbar en refrigeración o temperatura ambiente indefinidamente.

1. Disolver 250 mg de bromuro de etidio en 50 ml de agua desionizada en un frasco ámbar con tapa hermética

2. Marcar el frasco con la leyenda "PRECAUCIÓN" : Bromuro de Etidio, mutágeno y carcinógeno.
3. Utilizar guantes y cubre-boca cuando prepare la solución.

PRECAUCIÓN

El bromuro de etidio es un mutágeno por la prueba de microsomas de Ames y se sospecha carcinógeno. Debido a que pesar el bromuro es muy peligroso, se recomienda obtener soluciones concentradas ya preparadas o pastillas para diluir.

2.6 Solución de tinción de bromuro de etidio 1 µg/ml

Para preparar 500 ml. Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente indefinidamente.

1. Disolver 100 µl de la solución de bromuro 5 mg/ml en 500 ml de agua desionizada
2. Marcar el frasco con la leyenda "PRECAUCIÓN" : Bromuro de Etidio, mutágeno y carcinógeno.
3. Utilizar lentes, guantes y cubreboca cuando prepare la solución.

3. Sistema de fotodocumentación EDAS

El sistema de fotodocumentación y análisis electroforéticos Kodak EDAS consta de los siguientes componentes:

- Programa de análisis de imágenes Kodak 1D.
- Cámara digital Kodak DC120.
- Filtros EDAS 590 nm, para UV.
- Cable de puerto serial para PC.
- Adaptador universal AC.
- Caperuza para montar al transiluminador UV.
- Adaptadores de campo visual para geles.

1. Encender la cámara.
2. Verificar que el filtro UV esté colocado en la cámara.
3. Conectar la cámara con el cable de puerto serial al CPU.

4. Colocar la cámara en la caperuza.
5. Colocar el gel en el transiluminador UV, junto con el adaptador de campo visual correspondiente al tamaño del gel.
6. Montar el ensamblaje cámara- caperuza sobre el transiluminador, centrándolo con el adaptador de campo visual.
7. Prender el transiluminador.
8. Entrar al programa ID.
9. Hacer clic en archivo (file).
10. Hacer clic en adquirir imagen (acquire).
11. Cuando se abre el diálogo de la cámara aparece la fotografía de gel con opción de tinción de bromuro de etídio, en caso contrario seleccionar.
12. Seleccionar el tiempo de exposición del menú, de acuerdo a la intensidad de las bandas del gel.
13. Hacer clic en tomar fotografía (take picture).
14. Guardar el archivo.

ANEXO II

Matriz de datos binarios

	Chiap-1	Strobi-Centro	Aya-veitchii	Strobi-Norte	Aya-Sur	Chiap-2	Topotipo
B01-1	1	1	1	1	1	1	1
B01-2	0	1	1	1	1	0	1
B01-3	1	0	0	0	0	1	0
B01-4	1	1	1	1	1	1	1
B02-1	1	1	1	1	1	1	1
B02-2	0	1	0	1	1	0	1
B02-3	1	1	1	1	1	1	1
B02-4	0	1	1	1	1	0	1
B02-5	0	1	1	1	1	0	1
B03-1	1	1	1	1	1	1	1
B03-2	1	1	1	1	1	1	1
B03-3	1	1	1	1	1	1	1
B04-1	1	1	1	1	1	1	1
B04-2	1	1	1	1	1	1	1
B04-3	1	1	1	1	0	1	1
B04-4	0	1	1	1	1	0	1
B04-5	1	1	1	1	1	1	0
B04-6	1	1	1	1	1	1	1
B05-1	1	0	0	0	0	1	0
B05-2	0	1	1	1	1	0	1
B05-3	1	0	0	0	0	1	0
B05-4	0	1	1	1	1	0	1
B06-1	1	1	1	1	1	1	1
B06-2	1	1	1	1	1	1	1
B08-1	1	1	1	1	1	1	1
B08-2	1	0	0	0	0	1	0
B08-3	0	1	1	1	1	0	1
B09-1	1	1	1	1	1	1	1
B10-1	1	1	1	1	1	1	1
B10-2	1	1	1	1	1	1	1
B10-3	1	1	1	1	1	1	1
B11-1	1	1	1	1	1	1	1
B11-2	1	1	1	1	1	1	1
B11-3	0	1	1	1	1	0	1
B11-4	1	0	0	0	0	1	0
B11-5	1	1	1	1	1	1	1
B12-1	1	1	1	1	1	0	0
B12-2	1	1	1	1	1	1	1
B12-3	1	1	0	1	1	0	1
B12-4	1	1	1	1	1	0	1
B13-1	1	1	1	1	1	1	1
B14-1	1	0	0	0	0	1	0
B14-2	1	1	1	1	1	1	1

B14-3	0	0	0	0	0	1	0
B14-4	0	1	1	1	1	0	1
B15-1	1	1	1	1	1	1	1
B15-2	1	1	1	1	1	1	1
B16-1	1	1	1	1	1	1	1
B17-1	1	1	1	1	1	1	1
B17-2	1	1	1	1	1	1	1
B17-3	1	0	0	0	0	1	0
B17-4	1	0	0	0	0	1	0
B17-5	0	1	1	0	0	0	1
B17-6	0	1	1	1	1	0	1
B18-1	1	1	1	1	1	1	1
B18-2	1	1	1	1	1	1	1
B18-3	1	1	1	1	1	1	1
B18-4	1	1	1	1	1	1	1
B19-1	1	1	1	1	1	1	1
B19-2	1	1	1	1	1	1	1
B19-3	1	1	1	1	1	1	1
B19-4	1	1	1	1	1	1	1
B19-5	1	1	1	1	1	1	1
B19-6	1	1	1	1	1	1	1
B20-1	1	1	1	1	1	1	1
B20-2	1	1	1	1	1	1	1
B20-3	1	1	1	1	1	1	1
B20-4	1	1	1	1	1	1	1
B20-5	1	1	1	1	1	1	1
BB1-1	1	1	1	1	1	1	1
BB1-2	1	1	1	1	1	1	1
BB1-3	1	1	1	1	1	1	1
BB1-4	1	1	1	1	1	1	1
BB2-1	1	0	0	0	0	1	0
BB2-2	1	1	1	1	1	1	1
BB2-3	1	1	1	1	1	1	1
BB3-1	1	0	0	0	0	1	0
BB3-2	1	1	1	1	1	1	1
BB3-3	1	1	1	1	1	1	1
BB3-4	1	1	1	1	1	1	1
BB4-1	1	1	1	1	1	1	1
BB4-2	1	1	1	1	1	1	0
BB5-1	1	1	1	1	1	1	1
BB5-2	1	1	1	1	1	1	1
BB5-3	0	1	1	1	1	1	1
BB5-4	1	1	1	1	1	1	1
BB6-1	1	1	1	1	1	1	1
BB6-2	1	1	1	1	1	1	1
BB6-3	1	1	1	1	1	1	1
BB6-4	1	1	1	1	1	1	1
BB7-1	1	1	1	1	1	1	1
BB7-2	1	1	1	1	1	1	1
BB7-3	1	1	1	1	1	1	1
BB7-4	1	1	1	1	1	1	1
BB8-1	1	1	1	1	1	1	1

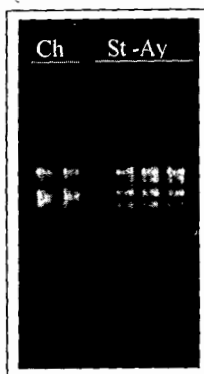
BB8-2	1	1	1	1	1	1	1
BB9-1	1	1	1	1	1	1	1
BB9-2	1	1	1	1	1	1	1
BB9-3	1	1	1	1	1	1	1
BB10-1	1	1	1	1	1	1	1
BB10-2	1	1	1	1	1	1	1
BB11-1	1	1	1	1	1	1	1
BB11-2	1	1	1	1	1	1	1
BB12-1	0	1	1	1	1	0	1
BB12-2	1	0	0	0	0	1	0
BB12-3	1	1	1	1	1	1	1
BB12-4	1	1	1	1	1	1	1
BB12-5	0	1	1	1	1	0	1
BB13-1	1	0	0	0	0	1	0
BB13-2	0	1	1	1	1	0	1
BB13-3	1	0	0	0	0	1	0
BB13-4	1	1	1	1	1	1	1
BB13-5	1	0	0	0	0	1	0
BB13-6	1	1	1	1	1	1	1
BB13-7	0	1	1	1	1	0	1
BB14-1	1	1	1	1	1	1	1
BB15-1	1	1	1	1	1	1	1
BB16-1	1	0	0	0	0	0	0
BB16-2	1	0	0	0	0	1	0
BB16-3	1	1	1	1	1	1	1
BB16-4	1	1	1	1	1	1	1
BB16-5	1	1	1	1	1	0	1
BB16-6	0	1	1	1	1	0	1
BB17-1	1	1	1	1	1	1	1
BB17-2	1	1	1	1	1	1	1
BB17-3	1	1	1	1	1	1	1
BB18-1	1	1	1	1	1	1	1
BB19-1	1	1	1	1	1	1	1
BB19-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-1	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	0	1	1	1	1	0	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	0	1	1	1	1	0	1
BB20-2	0	1	1	1	1	0	1
BB20-2	1	0	0	0	0	1	0

BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	0
BB20-2	1	1	1	1	1	1	1
BB20-2	1	1	1	1	1	1	0

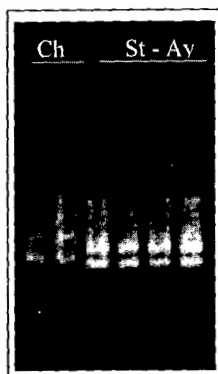
Anexo III

Iniciadores que mostraron diferencias entre *Pinus chiapensis* y el complejo *P. ayacahuite* - *P. strobiformis*

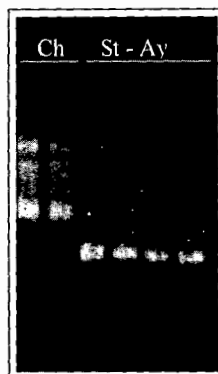
OPB-01



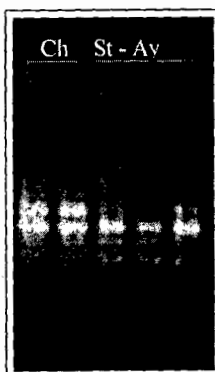
OPB-05



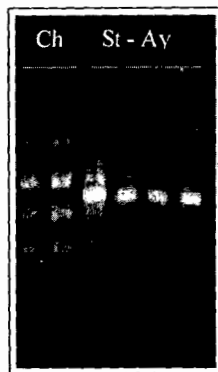
OPB-08



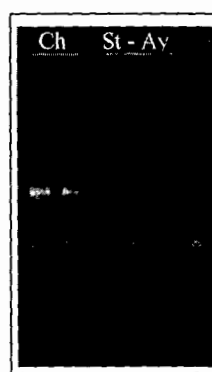
OPB-12



OPA-16



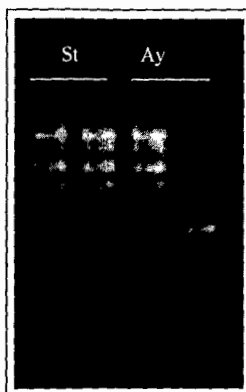
OPB-14



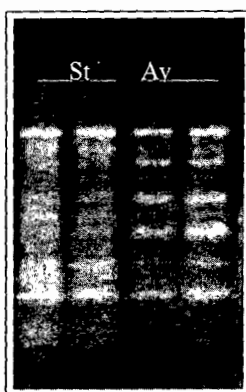
Anexo IV

Iniciadores seleccionados para el análisis poblacional de *Pinus ayacahuite*-*P. strobiformis*

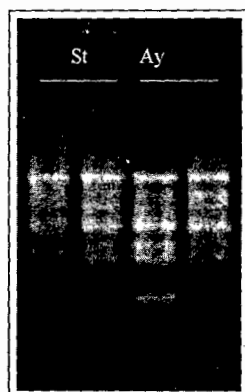
OPB- 01



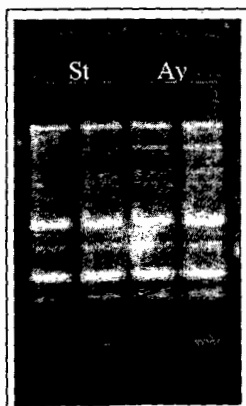
OPB-04



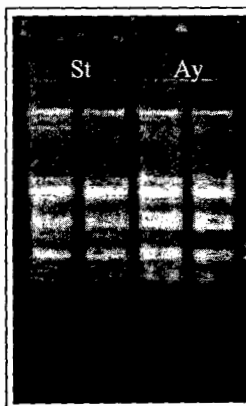
OPBB-05



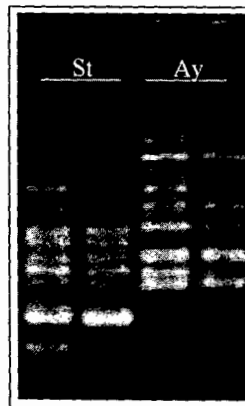
OPBB-07



OPBB-09



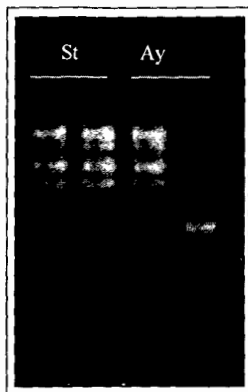
OPA-11



Anexo IV

Iniciadores seleccionados para el análisis poblacional de *Pinus ayacahuite*-*P. strobiformis*

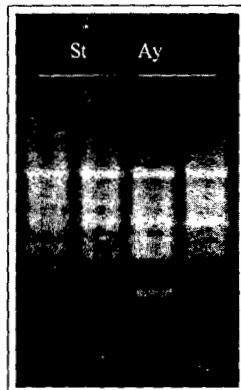
OPB- 01



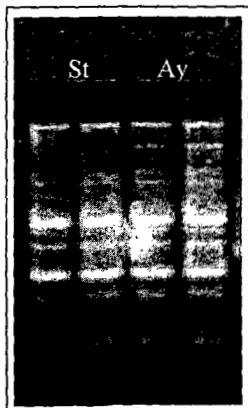
OPB-04



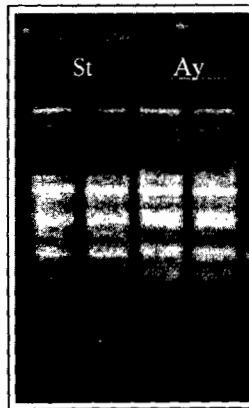
OPBB-05



OPBB-07



OPBB-09



OPA-11

