

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LOS PINOS  
BLANCOS MEXICANOS REVELADAS CON MARCADORES RAPDs  
por**

**Luz Patricia Castro Félix**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS  
(ÁREA ECOLOGÍA)**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN; JALISCO.**

**MAYO DE 2006**



Diversidad y Diferenciación Genética de los Pinos Blancos Mexicanos  
Reveladas con Marcadores RAPDs

por

**LUZ PATRICIA CASTRO FÉLIX**

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de


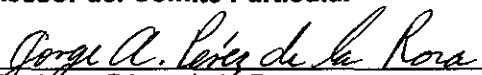
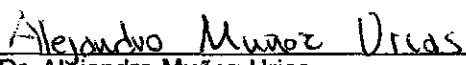
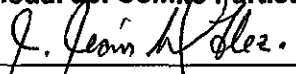



**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ORIENTACIÓN ECOLOGÍA)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**

**ABRIL DE 2006**

Aprobada por:

 _____	<u>26 Abril 2006</u>
<b>Dra. Anne Santerre Lucas</b> <b>Asesor del Comité Particular</b>	Fecha
 _____	<u>Abril 26 del 2006</u>
<b>Dr. Jorge Pérez de la Rosa</b> <b>Asesor del Comité Particular</b>	Fecha
 _____	<u>26-abril-2006</u>
<b>Dr. Alejandro Muñoz Urias</b> <b>Sinodal del Comité Particular</b>	Fecha
 _____	<u>27-Abril-2006</u>
<b>Dr. José de Jesús Sánchez</b> <b>Sinodal del Comité Particular</b>	Fecha
 _____	<u>26 abril 2006</u>
<b>Dr. Eulogio Pimienta Barrios</b> <b>Sinodal del Comité Particular</b>	Fecha
 _____	<u>Abril 26 / 2006</u>
<b>Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula</b> <b>Presidente del Comité Particular</b>	Fecha
 _____	<u>Mayo 2, 2006</u>
<b>Dra. Laura Guzmán Dávalos</b> <b>Coordinadora de la Maestría y Doctorado en Ciencias Biológicas</b>	Fecha

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Molecular, División de Ciencias Biológicas y Ambientales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula y la asesoría de la Dra. Anne Santerre y el Dr. Jorge Pérez de la Rosa.

Se llevó a cabo gracias a los apoyos recibidos de CONACYT, financiamiento 33129-B, Universidad de Guadalajara (02/SA-CI/DBCM/4.2/083).

*A tí Pozitos*

*Tu ausencia duele.....*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	1
<b>Capítulo I: Introducción: Generalidades y diversidad genética de los pinos blancos mexicanos</b>	4
Generalidades sobre los pinos blancos mexicanos	5
Diversidad genética en pinos	13
Planteamiento del problema	17
Objetivos	18
Literatura citada	19
<b>Capítulo II: Marcadores RAPDs: Optimización de la técnica PCR-RAPD, reproducción y segregación en <i>Pinus ayacahuite</i></b>	23
Introducción	24
Planteamiento del problema	33
Objetivos	34
Materiales y métodos	35
Recolección de las muestras de acículas y semillas	35
Obtención de megagametofitos y embriones	35
Extracción del DNA	36
Optimización de la reacción PCR-RAPD	36
Separación, tinción y registro de los productos de la amplificación	38
Selección de iniciadores y optimización de las concentraciones de MgCl <sub>2</sub> por iniciador	38
Amplificación de marcadores RAPDs	38
Definición del perfil de amplificación en acículas, megagametofitos y embriones	39
Reproducción de la amplificación de marcadores RAPDs	40
Análisis de Segregación	40
Resultados y discusión	41
Optimización de la reacción PCR-RAPD	41
Optimización del programa de amplificación	44
Resultados de la amplificación	45
Selección de iniciadores y optimización de la concentración de MgCl <sub>2</sub> por iniciador	46
Amplificación de RAPDs en acículas, megagametofitos y embriones	47
Reproducción de la amplificación	50
Análisis de segregación	54
Conclusiones	57
Literatura citada	59

<b>Capítulo III: Genetic relationships among Mexican white pines (<i>Pinus</i>, <i>Pinaceae</i>) based on RAPD markers</b>	<b>64</b>
Abstract	65
Introduction	66
Materials and methods	68
Plant material	68
DNA extraction and pooled samples	69
RAPD amplification	70
RAPD data analysis	70
Results	71
RAPD amplification	71
Genetic relationships	74
Discussion	77
Referentes	81
<b>Chapter IV: Diversity and genetic structure of the <i>Pinus ayacahuite</i> and <i>P.</i> <i>strobiformis</i> complex as revealed by RAPDs</b>	<b>84</b>
Abstract	85
Introduction	86
Materials and methods	88
Plant material	88
DNA extraction	89
PCR-RAPD reactions	89
RAPD data analysis	91
Results	92
RAPD profile	92
Genotypic and phenotypic diversity	93
Distribution of variation	94
Discussion	98
References	103
<b>Apéndice 1: High yield of good quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (<i>Pinus ayacahuite</i>)</b>	<b>106</b>
Abstract	107
Introduction	108
Materials and methods	109
Plant material	109
Reagents and solutions	109
Isolation of DNA from needles	110
Isolation of DNA from gametophyte and embryo	111
Results and discussion	112
Literature cited	117
<b>Apéndice 2: Diversidad genética de <i>Pinus ayacahuite</i> utilizando marcadores RAPDs en genoma diploide y haploide</b>	<b>119</b>
Resumen	120
Abstract	121
Introducción	122
Materiales y métodos	124
Obtención de megagametofitos	125

Extracción de DNA	126
Marcadores RAPDs	127
Análisis de datos	128
1. Método indirecto	128
2. Método directo	129
Resultados y discusión	129
Diversidad genética	130
1. Método indirecto	131
2. Método directo	132
Conclusiones	137
Literatura citada	138

## ÍNDICE DE CUADROS, TABLAS Y FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Capítulo I: Pinos blancos mexicanos: Generalidades y diversidad genética</b>	
Cuadro 1. Principales características morfológicas de los pinos blancos de México.	9
 <b>Capítulo II: Marcadores RAPDs: Optimización de la técnica PCR-RAPD, reproducción y segregación en <i>Pinus ayacahuite</i></b>	
Cuadro 1. Condiciones de la reacción PCR-RAPDs.	37
Cuadro 2. Programas empleados en la amplificación de fragmentos RAPDs.	37
Cuadro 3. Iniciadores y concentraciones mínimas de MgCl <sub>2</sub> .	39
Cuadro 4. Optimización por iniciador de la concentración de MgCl <sub>2</sub> en la mezcla de reacción PCR-RAPD.	47
Cuadro 5. Perfiles de bandeado obtenidos con cada cebador en <i>P. ayacahuite</i> .	48
Cuadro 6. Fragmentos que mostraron diferencias en la intensidad de la amplificación.	49
Cuadro 7. Porcentaje de reproducción (R) de los fragmentos en réplicas de la amplificación.	51
Cuadro 8. Porcentaje de reproducción (R) de los fragmentos por iniciador en réplicas de la extracción de DNA de acículas.	53
Cuadro 9. Loci que mostraron distorsión de la segregación alélica.	55
 Fig. 1. Representación de la utilidad de fragmentos RAPDs como marcadores diagnóstico en taxonomía.	 30
Fig. 2. Esquema de la semilla de pino germinada.	36
Fig. 3. Amplificación PCR-RAPDs con OPB-01 a diferentes concentraciones de DNA.	42
Fig. 4. Amplificación PCR-RAPDs con OPB-01 a diferentes concentraciones de MgCl <sub>2</sub> .	43
Fig. 5. Amplificación PCR-RAPDs con OPB-01 a diferentes concentraciones de <i>Taq pol.</i>	44
Fig. 6. Optimización de la amplificación PCR-RAPD a concentraciones de MgCl <sub>2</sub> 2.5, 3.5 y 4.5 mM.	46
Fig. 7. Patrones de amplificación de los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en acículas, megagametofito y embriones de <i>P. ayacahuite</i> .	48
Fig. 8. Diferencias en la intensidad de la amplificación del fregmento OPC-06 en acículas, megagametofitos y embriones de <i>P. ayacahuite</i> .	49
Fig. 9. Réplicas de la amplificación con el iniciador OPA-11.	51
Fig. 10. Réplicas de la amplificación con el iniciador OPA-08.	52
Fig. 11. Amplificación de RAPDs con OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en réplicas de la extracción de DNA de acículas.	53



### Capítulo III: Genetic relationships among Mexican white pines (*Pinus*, Pinaceae) based on RAPD markers

Table 1. Sampled populations on Mexican white pines, number of plants sampled at each site and exact locality.	68
Table 2. AMOVA analysis results for differentiation of Mexican white pines.	76
Fig. 1. Geographical location of the 10 Mexican white pine populations sampled in a latitudinal gradient.	69
Fig. 2. RAPD amplification patterns with primers A-08 (A) and A-16 (B).	73
Fig. 3. UPGMA dendrogram based on RAPD data generated from DNA pooled samples of ten Mexican white pine populations.	75
Fig. 4. UPGMA dendrogram based on RAPD data generated from individual samples of four Mexican white pine species.	77

### Chapter IV: Diversity and genetic structure of the *Pinus ayacahuite* and *P. strobiformis* complex as revealed by RAPDs

Table 1. Details of <i>Pinus strobiformis</i> and <i>Pinus ayacahuite</i> populations sampled for molecular analysis.	88
Table 2. RAPD primers and optimal concentrations of MgCl <sub>2</sub> used in PCR reactions.	90
Table 3. Total number of bands amplified per selected primer, number and percentage of polymorphic bands.	93
Table 4. Estimates of genotypic and phenotypic diversity (%P, H <sub>j</sub> ) within populations of <i>Pinus ayacahuite</i> and <i>Pinus strobiformis</i> based in RAPD markers.	94
Table 5. Partitioning of genotypic diversity within and among populations of <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>Pinus strobiformis</i> and all populations.	95
Table 6. Analysis of molecular variance (AMOVA) using 51 RAPD markers, conducted within and among populations of <i>Pinus ayacahuite</i> , <i>Pinus strobiformis</i> and the whole complex (P<0.05).	96
Table 7. Analysis of molecular variance (AMOVA) using 51 RAPD markers, conducted among and within regions and within all populations, among and within populations of the Northern, Central and Southern regions (P<0.05).	97
Fig. 1. Map illustrating the positions of <i>Pinus strobiformis</i> and <i>Pinus ayacahuite</i> populations sampled for assessment of genetic variation.	89
Fig. 2. Neighbour-joining dendrogram based on RAPD data showing genetic relationships of 11 populations of the complex <i>Pinus ayacahuite</i> - <i>Pinus strobiformis</i> .	98

### Apéndice 1: High yield of good quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*)

Table 1. Average yields and qualities of DNA extracted from <i>P. ayacahuite</i> tissues using the CTAB or SDS protocol.	114
Fig. 1. Total DNA from needles (a), gametophytes (b), and embryos (c) of <i>Pinus ayacahuite</i> .	113

Fig. 2. PCR amplifications of DNA from needles, gametophytes and embryos of *P. ayacahuite*, RAPDs (OPA-06) (a), SSR (RPS 50) (b). 116

## **Apéndice 2: Diversidad genética de *Pinus ayacahuite* utilizando marcadores RAPDs en genoma diploide y haploide**

Cuadro 1. Secuencia y concentraciones de cloruro de magnesio de los iniciadores utilizados en la amplificación del genoma de *Pinus ayacahuite*. 128

Cuadro 2. Perfil de amplificación de marcadores RAPDs obtenidos con los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en *Pinus ayacahuite*. 130

Cuadro 3. Diversidad genética con marcadores RAPDs en material diploide de *Pinus ayacahuite*. 132

Cuadro 4. Diversidad genética utilizando RAPDs en material haploide de *Pinus ayacahuite*. 134

Fig. 1. Semilla germinada de pino.

Fig. 2 Perfil de amplificación de marcadores RAPDs obtenidos con los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en *Pinus ayacahuite*. 126  
130

Fig. 3. Marcadores RAPDs (OPC-06) en genoma diploide (a) y haploide (b) de *Pinus ayacahuite*. 131

## Resumen

Este trabajo consta de cinco capítulos, en el primer capítulo se presentan generalidades sobre los pinos blancos en México y el marcador molecular DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD). Además, se profundiza en la problemática que actualmente presenta este grupo de pinos, deteniéndose cuidadosamente en el análisis del complejo formado por *Pinus ayacahuite* y *P. strobiformis* debido a su importancia económica y a que presenta controversias taxonómicas.

El capítulo II contiene la parte práctica del trabajo ya que se incluyen los resultados de la optimización de la técnica PCR-RAPD y la selección de los iniciadores utilizados en el análisis de la diversidad genética de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*. Además se muestran las concentraciones óptimas del cofactor ( $MgCl_2$ ) por iniciador en las reacciones PCR-RAPD. Se presentan los resultados de la reproducción del perfil de amplificación de un grupo de RAPDs en acículas, gametofitos y embriones de *P. ayacahuite* y la reproducción de los marcadores en dos replicas de la extracción de DNA y en dos replicas de la amplificación. Por último, se obtiene el patrón de segregación de los RAPDs. Los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06, produjeron el mismo perfil de amplificación en acículas, gametofitos y embriones de pinos. Con excepción de dos fragmentos de un total de 20, la reproducción de los fragmentos amplificados fue igual o superior al 90 %, tanto en las réplicas de la reacción de amplificación como en las réplicas de la extracción. Solamente uno del total de *loci* polimórficos analizados no segregó mendelianamente. La segregación mendeliana demostró indirectamente el origen nuclear de los marcadores RAPDs.

El capítulo III está formado por los resultados del análisis de las relaciones genéticas de diez poblaciones representativas de cuatro especies de pinos blancos mexicanos. Se siguió la estrategia de amplificación de marcadores RAPDs en genoma acumulado de cada una de las poblaciones. El uso de 69 iniciadores produjo más de 247 fragmentos. Se identificaron y registraron los fragmentos polimórficos, se determinaron los índices de similitud de Jaccard a nivel poblacional y se generó un dendograma UPGMA. Además, se utilizaron cuatro iniciadores seleccionados con base en el patrón de amplificación, para analizar 176 genomas diploides, representativos de las poblaciones estudiadas. Se obtuvieron los índices de diversidad genética a nivel poblacional, se generó una matriz de distancias Euclidianas, se calculó un promedio por especie y se construyó un dendograma UPGMA. Los resultados de los marcadores en genoma acumulado mostraron la diferenciación de las poblaciones de pinos blancos y la formación de dos grupos en un dendograma: 1) el grupo de *P. chiapensis* y 2) el grupo *P. ayacahuite-P. strobiformis*. La población de *P. lambertiana* se diferenció claramente de estos dos grupos. Los niveles de diferenciación confirmaron la especificidad de *P. chiapensis*, *P. lambertiana* y *P. ayacahuite*. Con excepción de la población de *P. strobiformis* de Cerro el Potosí, N. L., las poblaciones de *P. strobiformis* formaron un subgrupo dentro del grupo *ayacahuite-strobiformis*. La distancias genéticas entre las poblaciones del subgrupo de *P. strobiformis* y las poblaciones de *P. ayacahuite* son similares a las observadas entre las poblaciones de *P. chiapensis*. El análisis con marcadores RAPDs no permitió definir a *P. strobiformis* como una especie diferente a *P. ayacahuite*. El análisis de marcadores RAPDs en genomas individuales de las cuatro especies de pinos blancos estudiados confirmó la cercanía de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*.

El capítulo IV contiene los resultados del análisis de diversidad del complejo de pinos formado por *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* con marcadores RAPDs. Se analizaron 264 muestras, representativas de 11 poblaciones distribuidas a lo largo de un gradiente latitudinal. Para la amplificación se utilizaron 13 iniciadores seleccionados con base a la calidad del perfil de amplificación. Se estimaron las frecuencias génicas y fenotípicas y los índices de diversidad correspondientes. Se determinó la estructura genética poblacional de *P. ayacahuite*, *P. strobiformis* y del complejo *ayacahuite-strobiformis*. Con los índices de diversidad poblacional se obtuvieron las distancias genéticas de Nei y se generó un dendograma UPGMA. Los niveles de diversidad genética de las poblaciones de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* son similares a los observados en otras especies de pinos. Las poblaciones de *P. strobiformis* de Cananea, Son., Pueblo Nuevo, Dgo. y la población de *P. ayacahuite* de Cuale, Jal., presentaron los niveles de diversidad más altos. Mientras que dos poblaciones del Centro de México; Las Palmas, Mich. y San Rafael, Edo. de México, mostraron los niveles de diversidad más bajos. El mayor porcentaje de la variación genética se explica por la variación intrapoblacional. Así, las poblaciones de *P. strobiformis* se encuentran más diferenciadas que las poblaciones de *P. ayacahuite*. Las poblaciones del Norte presentaron niveles de diversidad más altos en relación a las poblaciones del Centro y del Sur y una mayor diferenciación genética.

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN: GENERALIDADES Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS PINOS BLANCOS MEXICANOS**

### **Generalidades sobre los pinos blancos mexicanos**

La Biología de la Conservación tiene como objetivos mantener y conservar la diversidad biológica en sus tres niveles: diversidad de especies, diversidad genética y diversidad de ecosistemas. La delimitación de especies y la determinación de los niveles de diversidad genética son dos de los aspectos claves y fundamentales para preservar la biodiversidad. En el género *Pinus*, los estudios morfológicos convencionales y la caracterización de compuestos terpenoides frecuentemente conducen a diferentes conclusiones taxonómicas, particularmente la taxonomía y delimitación de especies de pinos de reciente evolución o de complejos de especies aún en evolución, son un importante motivo de debate (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995). En cuanto a los niveles de diversidad genética en pinos, en los últimos años, las especies tropicales específicamente, se han visto afectadas por la agricultura y la explotación exagerada, una gran variedad de especies está experimentando una marcada reducción en el tamaño, número de poblaciones y ocasionalmente la fragmentación poblacional (Furman *et al.*, 1997). Como consecuencia, muchas de estas especies se encuentran amenazadas o en peligro de extinción.

En general los pinos blancos mexicanos representan una fuente importante de madera. Este grupo se encuentra formado por: 1) *Pinus lambertiana* D. Douglas, 2) *P. flexilis* E. James var. *reflexa* Engelmann, 3) *P. strobiformis* Engelmann, 4) *P. ayacahuite* Ehrenberg ex Schlechtendal y 5) *P. chiapensis* (Martínez) Andresen (Critchfield y Little, 1966; Farjon *et al.*, 1997). *Pinus ayacahuite* constituye un complejo morfológico con *P. flexilis* y *P. strobiformis*. Sin embargo, la identidad taxonómica de la última especie se encuentra sujeta a discusión, ya que ha sido considerada como una variedad más de *P. ayacahuite* (Farjon y Styles, 1997). La sobre-explotación ha provocado una disminución de las poblaciones de *P. chiapensis*

(Martínez) Andresen, actualmente solo se encuentran poblaciones relictuales y es considerada una especie amenazada (Newton *et al.*, 2002). Dado que la madera de *P. ayacahuite* y de *P. strobiformis* presenta características similares a la de *P. chiapensis*, la explotación exagerada de ambas especies podría conducir las a la misma condición de *P. chiapensis* en corto tiempo. Con el fin de implementar programas de conservación biológica y planes de recuperación en el caso de especies amenazadas en el corto, mediano y largo plazo, es importante resolver la identidad de aquellos taxa que presenten controversias taxonómicas y definir los niveles y la distribución de la diversidad genética.

#### *El género Pinus en México*

Los pinos (género *Pinus*, familia Pinaceae), ya sea que provengan de bosques naturales o de plantaciones forestales, son una fuente importante de madera y resina. El género *Pinus* presenta una distribución geográfica casi exclusiva en el hemisferio norte desde las zonas boreales hasta las francamente tropicales, con 110 especies reconocidas se le considera el género más grande de la familia Pinaceae. Al igual que otros géneros de esta familia, la diversidad es mayor en América del Norte que en Eurasia. México, con 42 especies y 18 taxa infraespecíficos (Farjon y Styles, 1997), se encuentra entre las regiones de América del Norte con un alto número de especies. Rzedowski (1993) señala al Eje Volcánico Transversal y a la Región Noreste como centros de diversidad y evolución del género. Eguluz (1985) reconoce 6 regiones principales de distribución de pinos en México, estas son: 1) la Sierra Madre Occidental, 2) la Sierra Madre Oriental, 3) el Eje Volcánico Transversal y la Mesa Central, 4) la Sierra de Juárez y la Sierra de San Pedro Martír en Baja California, 5) la Sierra Madre del Sur y Macizo de Oaxaca y



6) los altos de Chiapas. La diversidad de pinos disminuye significativamente en el Sureste de México (Farjon y Styles, 1997).

En pinos, la variación genética puede determinarse a través del análisis de caracteres morfológicos y moleculares (Furnier, 1997). En México, los estudios de diversidad genética en especies de pinos son relativamente escasos y la taxonomía se basa principalmente en estudios morfológicos. Características de la corteza, acículas, conos y semillas se encuentran entre los principales caracteres morfológicos con los cuales se describen las especies de éste género. Sin embargo, el alto grado de variación que presentan estos caracteres puede dificultar la discriminación entre especies. En el caso de taxa cercanamente emparentados, la hibridación y la introducción de genes de una especie a otra son procesos probables. Además, la fragmentación de las poblaciones observada particularmente en especies de pinos de interés comercial, hace aún más compleja la taxonomía, ya que la integridad de una especie puede disminuir debido a que la fragmentación poblacional potencialmente promueve la hibridación interespecífica (Furman *et al.*, 1997).

Los problemas taxonómicos aumentan debido a los patrones de variación clinal registrados en algunas áreas geográficas, algunas especies de pinos presentan una gradación de los caracteres morfológicos en sus poblaciones; ligeras diferencias en éstos caracteres pueden generar confusiones taxonómicas. Además, cuando los factores ambientales son marcadamente discontinuos, se pueden llegar a observar patrones de variación ecotípica (Ledig, 1998). En México, la topografía accidentada conduce a la formación de microhabitats que pueden favorecer una mayor diferenciación de las poblaciones. La gran mayoría de especies, subespecies, variedades y formas de pinos reportadas se encuentran en el Eje Volcánico Transversal, región con grandes y abruptos cambios topográficos (Perry *et al.*, 1998).

*Pinos blancos mexicanos*

Morfología: En su conjunto el grupo de pinos blancos mexicanos generalmente presenta árboles con tronco recto, el tamaño y diámetro de los árboles son variables dependiendo de la especie edad y hábitat. Las acículas se encuentran en fascículos de 5, la vaina es decidua, con diferencias en el tamaño según la especie, fertilidad del suelo y humedad disponible. Los conos pueden desarrollarse solitarios o en verticilios de 2-4, de color café claro u opaco, con marcada variación en el tamaño entre especies cuando están abiertos. Las semillas son de color café, de tamaño variable de acuerdo a la especie y latitud, con ala adnada o ala adnada rudimentaria, el tamaño del ala varía desde la semillas ápteras de *P. flexilis* y *P. strobiformis* hasta las semillas de *P. ayacahuite*, con alas de un tamaño dos a tres veces mayor que el de la semilla (Farjon *et al.*, 1997; Farjon y Styles, 1997).

El análisis del Cuadro 1 permite comparar los principales caracteres morfométricos de los taxa que conforman el grupo de pinos blancos mexicanos. Los caracteres morfológicos permiten una clara definición de *P. chiapensis* y *P. lambertiana*, sin embargo no ocurre lo mismo con el resto de los taxa ya que se observa una gran variación en algunos caracteres entre poblaciones de una misma especie. La variación en el tamaño del ala de la semilla en poblaciones de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* tiende a ser clinal con una orientación norte-sur, las poblaciones del norte presentan semillas ápteras mientras que el tamaño del ala de las poblaciones del sur duplica el de las semillas (Pérez de la Rosa, 1993). La reducción en el tamaño del ala de la semilla de *P. strobiformis* sugiere una desviación de la dispersión de las semillas por viento a dispersión a través de vectores animales, mecanismo que se encuentra aún más perfeccionado en *P. flexilis* (Lanner, 1998). Los conos de *P. strobiformis* son muy

variables en forma y tamaño, aunque generalmente presentan un tamaño más reducido que los de *P. ayacahuite*, es factible encontrar conos de hasta 60 cm de longitud. *Pinus flexilis* y *P. strobiformis* forman también una clina polimórfica en la cordillera de América del Norte, las diferencias morfológicas entre los dos taxa son más acentuadas en las extremidades de la clina (Farjon y Styles, 1997).

Cuadro 1. Principales características morfométricas de los pinos blancos de México (Farjon *et al.*, 1997).

	<i>P. ayacahuite</i>	<i>P. flexilis</i>	<i>P. strobiformis</i>	<i>P. chiapensis</i>	<i>P. lambertiana</i>
<b>Árbol</b>					
Altura (m)	20-43(-50?)	10-15(-20)	25-30	30-35	30-40
Diámetro (cm)	150-200	100-150	80-100	100-150	80-120
<b>Acículas</b>					
Longitud (cm)	(8-)10-15(-18)	(5-)6-9	(5-)7-11(-12)	(5-)6-12(-13)	(3.5-)4-8(-10)
Ancho (mm)	0.7-1.0	0.8-1.2	(0.6-)0.8-1.1(-1.2)	0.6-0.8(-1)	0.8-1.5
<b>Conos</b>					
Longitud (cm)	(10-)15-50	10-15	12-30(-60)	(6-)8-16(-25)	25-45
Ancho (cm)	7-15	4-6	7-11	4-8	8-14
Número de escamas del cono	100-150	80-110	70-120	40-100	110-130
<b>Semillas</b>					
Longitud (mm)	8-15	10-15	12-18	7-9	(10-)12-15(-18)
Ancho (mm)	6-9	8-10	8-11	4-5	6-10
<b>Ala</b>					
Longitud en relación al tamaño de la semilla	2-3.5 X	0 X	0-0.5 X	1.5 X	2 X

**Taxonomía:** Las especies de pinos blancos mexicanos se encuentran ubicadas dentro del subgénero *Strobus*, sección *Strobus*, subsección *Strobi* (Little y Critchfield, 1969). La estrecha cercanía de *P. flexilis* y *P. strobiformis* y de este último con *P. ayacahuite* ha generado controversias taxonómicas interespecíficas. James describió a *P. flexilis* por primera vez en Estados Unidos en 1823 (Farjon y Styles, 1997),

posteriormente varias de las colecciones originalmente identificadas como *P. flexilis* fueron descritas como variedades de *flexilis* (Engelmann, 1879). El análisis detallado de las variedades descritas por Engelmann indican una similitud de los caracteres diferenciales con los de *P. strobiformis* (Farjon y Styles, 1997). Shaw (1914) consideró a *P. flexilis* var. *reflexa* como sinónimo de *P. flexilis*.

Carl August Ehrenberg recolectó el árbol tipo de *Pinus ayacahuite* en 1837 (Farjon y Styles, 1997). Desde entonces, basándose en la variación de caracteres morfológicos, se reconocen dos variedades de esta especie: *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Roezl) Shaw y *P. ayacahuite* var. *brachyptera* (Shaw, 1909). La variedad *veitchii* fue descrita por primera vez en 1857 por Roezl como *P. veitchii*. Engelmann (1848) reconoció a *P. strobiformis* en el Norte de México y años después Shaw (1909) describió a *P. strobiformis* como la variedad *brachyptera* y a *P. vietchii* como la variedad *veitchii* de *P. ayacahuite*. Mirov (1967) y Farjon (1984), siguen la nomenclatura de Shaw, sin embargo Little y Critchfield (1969) reconocen a *P. strobiformis* como especie y señalan que representa un eslabón geográfico y morfológico entre *P. flexilis* de Estados Unidos y *P. ayacahuite* de México y Centro América. Ha sido varias veces señalado que las diferencias entre el espécimen tipo de *P. strobiformis* y *P. ayacahuite* “no parecen ser suficientes para justificar el estatus de especie de *P. strobiformis*” (Shaw, 1909; Carvajal y McVaugh, 1992).

La taxonomía de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* se dificulta aún más debido a la descripción de un número importante de variedades (Carvajal, 1986; Silba, 1990). Sin embargo, Pérez de la Rosa (1993) indica que probablemente estas variedades no son mas que ecotipos, favorecidos por la amplia distribución geográfica que presenta lo que actualmente se considera un complejo morfológico formado por *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* (complejo *ayacahuite-strobiformis*). A pesar de que las acículas y los

conos de *P. strobiformis* presentan un menor tamaño que los de la var. *brachyptera*, algunos autores los consideran como taxa distintos aunque simpátricos (Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997; Farjon *et al.*, 1997).

*Pinus lambertiana* fue descrito por primera vez en Estados Unidos por Douglas (1827), posteriormente Minnich (1987), establece la distribución de esta especie hasta el Norte de Baja California. Las ligeras diferencias morfológicas observadas en la única población de esta especie en Baja California Norte han conducido a que se le describa como una variedad de *P. lambertiana* (Silba, 1990).

Martínez (1940), identificó a *P. chiapensis* como una variedad de *P. strobus*, esta condición fue mantenida por Critchfield y Little (1966) y Little y Critchfield (1969). Andresen (1964) a través de un estudio fenético elevó este taxón a nivel de especie y estudios taxonómicos posteriores han apoyado este estatus (Price *et al.*, 1998). La posición de especie de *P. chiapensis* ha sido confirmada a través del análisis de las secuencias de los espaciadores internos transcritos (ITS) de los genes ribosomales (Liston *et al.*, 1999).

Importancia económica: En general, las especies de pinos blancos mexicanos son una importante fuente de madera. Debido a su gran tamaño, los fustes rectos y la calidad de la madera, *P. strobiformis* en el Norte de México y *P. ayacahuite* y *P. chiapensis* en el Sur, son ampliamente utilizados en trabajos de construcción, manufactura de muebles y como fuente de combustible (Farjon y Styles, 1997; Newton *et al.*, 2002). Debido a la rareza o inaccesibilidad de sus poblaciones y a la forma pobre de sus troncos *Pinus flexilis* var. *refleja* no es explotada con fines comerciales, en el caso de *P. lambertiana*, la restricción de su distribución en México le confiere cierta protección.

Ecología: *Pinus lambertiana* crece en suelos profundos, frecuentemente en los márgenes de los arroyos intermitentes, en un rango de altitud de 2200 a 2800 m. Se le encuentra asociada con *Abies concolor*, *P. contorta* var. *murrayana* y *P. jeffreyi* (Farjon y Styles 1997; Farjon *et al.*, 1997).

*Pinus flexilis* prospera en suelos rocosos, expuestos a fuertes vientos y nevadas, se le encuentra en bosques abiertos de alta montaña y subalpinos. Aunque la altitud de crecimiento no ha sido registrada, seguramente es superior a los 2500 m ya que generalmente se desarrolla por encima de cinturón boscoso formado por *P. strobiformis*. La especie crece formando bosques pequeños o como se reporta en Cerro Potosí asociada con *P. hartwegii* y *P. culminicola*. La dispersión de sus semillas es efectuada por aves (Farjon y Styles 1997; Farjon *et al.*, 1997).

Los árboles del complejo *ayacahuite-strobiformis* tienen preferencia por lugares sombreados y húmedos. Crecen en suelos fértiles, profundos y bien drenados. Eguiluz (1982) señala que estos 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) reporta su presencia en laderas de exposición norte y en el fondo de cañadas, asimismo indica 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. En áreas planas, los árboles se encuentran asociados con especies de los géneros *Abies* y *Quercus*. Ern (1976) reporta 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 para el desarrollo de *P. ayacahuite*.

Aunque *P. flexilis* y *P. strobiformis* se encuentran entre los pinos cuyas semillas son dispersadas por animales (Lanner, 1996), la última 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 *Strobus* 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. En la actualidad la especie se encuentra restringida a poblaciones pequeñas, remanentes, en bosques templados de montaña y subtropicales con abundante precipitación. El intervalo de altitud 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 su pariente cercano *P. strobus* (Farjon y Styles, 1997).

### **Diversidad genética en pinos**

En la actualidad la gran mayoría de los estudios de diversidad genética realizados en pinos, consideran exclusivamente caracteres morfológicos. No obstante, es necesario considerar que generalmente estos caracteres presentan plasticidad fenotípica y se

encuentran fuertemente influenciados por la selección natural. La selección puede homogeneizar o diferenciar poblaciones; la distinción morfológica se produce si las poblaciones se encuentran en ambientes diferentes y la homogenización si están en ambientes muy parecidos (Furnier, 1997). La plasticidad fenotípica promueve la formación de ecotipos. En los pinos una buena parte de las diferencias morfológicas pueden ser expresiones adaptativas. Aunque son relativamente pocos los estudios de jardín realizados en pinos, los resultados del análisis morfológico muestran pronunciados patrones de variación geográfica; dentro de una misma especie pueden presentarse tanto patrones de variación clinal como ecotípica (Ledig, 1998).

Los caracteres moleculares se consideran una mejor medida de variación genética en relación a los morfológicos ya que generalmente no se encuentran sujetos al efecto de la plasticidad fenotípica y al proceso de selección natural (Furnier, 1997). Sin embargo, son escasos los estudios de diversidad genética con marcadores moleculares (ya sea con fines taxonómicos o de conservación), realizados en especies de pinos blancos mexicanos. Hernández (1990) estudió la variación de 14 loci isoenzimáticos en 12 poblaciones de *P. ayacahuite* (desde Centroamérica hasta el Edo. de Durango), sus resultados mostraron una mayor semejanza entre las poblaciones de *P. ayacahuite* tipo y las de la var. *veitchii* en comparación con las de la var. *brachyptera*. En este trabajo sólo se analizaron dos poblaciones de *P. strobiformis*, ambas provenientes de Durango, por lo tanto la distribución geográfica que presenta el complejo *ayacahuite-strobiformis* en México no se encuentra completamente representada. Hernández recomienda que se estudien otras poblaciones, especialmente aquellas que se encuentran en las conexiones de los sistemas montañosos del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre del Sur. Ledig (1986, 1998) reportó los niveles de variación genética de diversas especies de pinos estudiados con isoenzimas, entre las que se incluyen poblaciones de *P. ayacahuite* y *P.*



*strobiformis*. Los resultados revelan altos niveles de variación genética en ambas especies. *Pinus strobiformis* o *P. ayacahuite* var. *brachyptera* presentó menores valores de polimorfismo en relación a la variedad *veitchii* y *P. ayacahuite* tipo valores aún mas bajos. Es importante considerar en este tipo de estudios que la variación isoenzimática representa solamente una pequeña fracción de la variación genética en una población (Conner y Hartl, 2004), además han sido cuestionada la neutralidad de los loci enzimáticos, sugiriendo que tanto la selección balanceadora como diversificante pueden operar en algunas enzimas (Díaz *et al.*, 2001).

En un trabajo reciente, se encontraron niveles de variación genética bajos y una alta diferenciación poblacional en *P. chiapensis*, el análisis se llevó a cabo con RAPDs y marcadores mitocondriales (Newton *et al.*; 2002). Por otro lado, los trabajos con fines filogenéticos realizados en el género *Pinus* no han incluido la totalidad de las especies de pinos blancos mexicanos, Pérez de la Rosa *et al.* (1995) analizaron el genoma mitocondrial de *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. chiapensis*; Liston *et al.* (1999) obtuvieron las secuencias de los espaciadores internos transcritos (ITS) de los genes ribosomales de *P. ayacahuite*, *P. lambertiana* y *P. chiapensis*; Gernandt *et al.* (2005) analizaron las secuencias de genes mitocondriales de 101 especies de pinos pero no incluyeron a *P. strobiformis*. Además, los estudios de secuenciación realizados hasta ahora no han resuelto completamente las relaciones filogenéticas de los pinos blancos mexicanos.

#### *Marcadores moleculares: Polimorfismo de DNA amplificado al azar (RAPD)*

Los marcadores moleculares consisten en un grupo de técnicas que permiten la detección de polimorfismos en el genoma sin necesidad de secuenciación. En los últimos años, los marcadores moleculares se han aplicado en la resolución de una serie

de problemas genéticos. El marcador molecular ideal se hereda en forma mendeliana, es polimórfico, codominante y representativo de todo el genoma de la especie. Además, es importante que su detección y aplicación sea rápida, eficaz y no excesivamente costosa. Desafortunadamente, aún no existe un marcador molecular que cumpla con todos y cada uno de estos condicionantes.

Los RAPDs (de sus siglas en inglés Random Amplified Polymorphic DNA) son marcadores moleculares dominantes, 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 entre individuos se deben a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento y a la inserción o delección de nucleótidos 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 amplifica una cantidad pequeña de DNA 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 complementarios (5'-3'/3'-5'), resultando en la amplificación de segmentos de DNA de longitudes variables (Williams *et al.*, 1990).

Los RAPDs se encuentran junto con los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) entre las técnicas moleculares consideradas como multilocus, ya que permiten el análisis de varios loci a la vez (Harris, 1999). Los marcadores RAPDs han sido ampliamente utilizados en el estudio de la diversidad genética debido a que la metodología es muy sencilla, rápida y poco costosa. La gran ventaja de la técnica RAPD es que permite detectar polimorfismos sin secuenciar o caracterizar el genoma de interés. 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.

### **Planteamiento del problema**

Dentro del grupo de pinos blancos mexicanos, *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* presentan dificultades taxonómicas. El tamaño del ala de la semilla es el caracter morfológico que explica el mayor porcentaje de la variación morfológica observada entre y dentro de ambos taxa, sin embargo, este caracter presenta un patrón de variación clinal (Pérez de la Rosa, 1993). Lo anterior frecuentemente conduce a problemas en la definición taxonómica de las poblaciones que forman lo que actualmente se considera un complejo morfológico. En la actualidad, la gran mayoría de los estudios de diversidad genética con fines taxonómicos realizados en los pinos blancos mexicanos, analizan exclusivamente caracteres morfológicos. No obstante, es frecuente que este tipo de caracteres se encuentren sujetos al proceso de selección natural (Furnier, 1997)

La importancia económica de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* ha conducido al desarrollo de una serie de actividades para su conservación. Entre estas actividades se encuentran además de la conservación *ex situ*, la recolección y el almacenamiento de germoplasma (Wright *et al.*, 2003). El conocimiento de la variabilidad genética es una herramienta de apoyo importante para estos programas. Diferencias en el grado de distribución geográfica, el mecanismo de dispersión de las semillas y el grado de explotación poblacional, son factores que afectan los niveles de variación genética en las especies forestales (Hamrick *et al.*, 1992). La sobreexplotación frecuentemente conduce a una mayor diferenciación poblacional. Hasta ahora, no se han realizado estudios sobre el efecto de estos factores en la diversidad genética de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*.

El análisis genético de los pinos blancos mexicanos con marcadores moleculares neutros como los RAPDs, permitirá avanzar en el entendimiento de sus relaciones genéticas y determinar los niveles y la distribución de la diversidad genética del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*.

### **Objetivo general**

Determinar las relaciones genéticas de las especies de pinos blancos mexicanos y los niveles y distribución de la variación genética del complejo formado por *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* con marcadores RAPDs.

### **Objetivos particulares**

- a) Optimización de la técnica de PCR-RAPD.
- b) Determinar la reproducción y el patrón de segregación de un grupo de marcadores RAPDs.
- d) Definir las relaciones genéticas entre las especies de pinos blancos mexicanos.
- e) Establecer el estatus taxonómico a nivel molecular de *P. strobiformis*.
- f) Obtener los niveles de variación dentro y entre las poblaciones de *P. ayacahuite*, *P. strobiformis* y el total de las poblaciones de ambos taxa.
- g) Determinar la estructura genética de *P. ayacahuite* y de *P. strobiformis*.
- h) Determinar la estructura genética del complejo *P. ayacahuite-strobiformis*.

### Literatura citada

- Andresen, J.W. 1964. The taxonomic status of *Pinus chiapensis*. *Phytologia* 10: 417-421.
- 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, Washington, pp 137-153.
- Carvajal, S., and McVaugh, R. 1992. *Pinus* L. En: Andersen, W.R. (Ed.) Flora Novogaliciana, Ann Arbor 17. University of Michigan Herbarium, Michigan, pp 32-100.
- Carvajal, S. 1986. Notas sobre la flora fanerogámica de Nueva Galicia, III. *Phytologia* 59: 127-147.
- Critchfield, W.B, Little, E.L. 1966. Geographic distribution of the pines of the world, USDA Forest Service Miscellaneous Publications 991.
- Conner, J.K., and Hartl, D.L. 2004. A primer of ecological genetics. Sinauer Associates, Inc., U.S.A., pp 15-16.
- 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.
- Douglas, D. 1827. An account of a new species of *Pinus*, native of California: in a letter to Joseph Sabine. *Trans. Linn. Soc. London* 15: 497-500.
- Eguiluz, P.T. 1985. Origen y evolution del género *Pinus* (con referencia especial a los pinos mexicanos). *Dasonomía Mex.*, 3(6): 5-31.
- Engelmann, G. 1848. Sketch of the botany of Dr. Wislizenus' expedition, Appendix to Wislizenus. En: Wislizenus F.A., (Ed.) Memoir of a tour to northern Mexico. Tappin & Streeper. Washington, D. C., pp 87-115.
- Engelmann, G. 1879. Coniferae. En: Rothrock, J.T. (Ed.) Reports upon the botanical collections made in portions of Nevada, UTA, California, Colorado. New Mexico and Arizona. 1871-1875. Report of the U. S. Geographical Survey of the 100<sup>th</sup> meridian in charge of Lt. Wheeler, Government Printing Office, Washington, D. C. Vol. 6-Botany. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Ern, H. 1976. Descripción de la vegetación montañosa de los Estados Mexicanos de Puebla y Tlaxcala. *Willdenowia* 10: 128.
- Farjon, A. 1984. Pines: drawing and descriptions of the genus *Pinus*. E.J. Brill, Leiden, Netherlands.

- 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. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica *Pinus* (Pinaceae). Monograph 75. 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.
- Furnier, G. R. 1997. Métodos para medir variación genética en las plantas. En: Vargas J.J., Bermejo B., Ledig T., (Eds.) Manejo de recursos genéticos forestales, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo de México, pp 23-36.
- Gernandt, D.S., Geada, G., Ortiz, S., Liston, A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54: 29-42.
- 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: Hollingsworth P.M., Batesman R.M., Gornall R.J. (Eds.) Molecular systematics and plant evolution. Taylor & Francis, London and New York, pp 211-228.
- Hernández, J.J. 1990. Variación genética isoenzimática en *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades de México y Centroamérica. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Lanner, R.M. 1996. Made for each other: A symbiosis of birds and pines. Oxford University Press, New York.
- Lanner, R.M. 1998. Seed dispersal in *Pinus*. En: Richardson D.M. (Ed) Ecology and biogeography of *Pinus*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 281-293.
- Ledig, F.T. 1986. Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants. En : Soule, M. E (Ed.) Conservation biology, the Science of scarcity and diversity. Sunderland, Massachussets, Sinauer Associates, pp 77-104.
- 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.
- Little, E.L., Jr., Critchfield, W.B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus*. U. S. Forest Service Miselaneous Publications 1144, Washington, D. C., 51.
- 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.

- Martínez, M. 1940. Pinaceae mexicanas: descripción de algunas especies y variedades nuevas. *Anales Instituto de Biología de la Universidad Nacional de México* 11: 57-84.
- Minnich, R.A. 1987. The distribution of forest trees in northern Baja California, Mexico. *Madroño* 34: 98-127.
- Mirov, N.T. 1967. The genus *Pinus*. Ronald Press, New York.
- 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.
- Pérez de la Rosa, J.A. 1993. Taxonomía de *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.
- Pérez de la Rosa, J.A., Harris, S.A., Farjon, A. 1995. Noncoding chloroplast DNA variations in Mexican pines. *Theoretical Applied Genetics* 91: 1101-1106.
- Perry, J.P. 1991. The pines of Mexico and Central America. The Timber Press, Inc. Portland.
- Perry, J.P., Graham, A., Richardson, D. M. 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 137-149.
- Price, R.A., Liston, A.L., Strauss, S.H. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. En: Richardson, D.M. (Ed) Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 49-68.
- Rzedowski, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of México. En: Ramamoorth T.P., Bye R., Lot A. & Fa J. (Eds.) Biological diversity of Mexico: origins and distributions. Oxford University Press, New York, pp 129-144.
- Shaw, G.R. 1909. The Pines of Mexico. *Journal of the Arnold Arboretum* 1: 1-30.
- Shaw, G.R. 1914. The genus *Pinus*. *Journal of the Arnold Arboretum* 5: 1-96.
- Silba, J. 1990. A supplement to the international census of the Coniferae, II. *Phytologia* 68: 7-78.
- 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.

Wright, J. A., Marín, V., Dvorak, W. 2003. *Ex situ* gene conservation of *Pinus ayacahuite*. Forest Genetic Resources No. 24.



## **CAPÍTULO II**

**MARCADORES RAPDs: OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA PCR-RAPD,  
REPRODUCCIÓN Y SEGREGACIÓN EN *Pinus ayacahuite*.**

## **Introducción**

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los años 70, ha simplificado y transformado la manera en que se lleva a cabo el análisis genético. En los últimos años, se ha registrado un aumento considerable en el estudio de la diversidad genética utilizando marcadores de DNA que se basan en la técnica de PCR, entre los que se incluyen: el DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD), el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y los microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSR) (Conner y Hartl, 2004).

A pesar de que los organismos comparten en general las mismas características estructurales de la molécula de DNA y por lo tanto, el mismo tipo de marcadores moleculares, las plantas difieren de los animales en la utilidad de marcadores particulares. Ritland y Ritland (2000) señalan que al analizar los resúmenes de trabajos publicados en el área biológica, el marcador RAPD aparece 40 veces más frecuentemente asociado a la palabra planta, en relación a la palabra animal. Esta diferencia es probablemente resultado de las características particulares del genoma vegetal y de las ventajas que ofrece este marcador en relación a otros marcadores de DNA: la sencillez de la metodología, el bajo costo y la posibilidad de analizar varios loci en una sola reacción.

### *Genoma vegetal*

En las plantas coexisten tres genomas diferentes: el del cloroplasto, el de la mitocondria y el nuclear. Cada uno con características peculiares y complicaciones moleculares y genéticas importantes de comprender, ya que estas definen su utilidad en el análisis genético.

Los genomas citoplasmáticos son moléculas de DNA circular que se heredan en forma predominantemente uniparental. Las mitocondrias se heredan por vía materna y los cloroplastos por vía materna en el caso de las angiospermas y paterna en el de las gimnospermas. En una sola célula vegetal existen numerosas copias de DNA mitocondrial (mDNA) y DNA de cloroplastos (cDNA). La recombinación entre los genes de los cromosomas de los organelos es prácticamente ausente. En ausencia de heteroplasma los genomas citoplasmáticos pueden ser efectivamente tratados como genomas haploides (Ennos *et al.*, 1999). El genoma de cloroplasto usualmente presenta dos regiones sin repetir, una larga (LSC) y otra corta (SSC) de aproximadamente unos 134-160 kb respectivamente, además de una parte duplicada invertida (IR), formada por dos fragmentos idénticos de sentidos opuestos, separados por la región SSC. El genoma de mitocondria es más grande que el de cloroplasto; sin embargo, es muy distinto en su comportamiento evolutivo. Los genes en cloroplastos se encuentran muy conservados tanto en número como en estructura. En contraste, el genoma de mitocondrias es muy dinámico e incorpora fácilmente genes del núcleo y del cloroplasto, además la posición relativa de los genes de la mitocondria vegetal puede cambiar y presentar una gran cantidad de DNA sin función aparente. A pesar del dinamismo del genoma de la mitocondria y en contraste con la mitocondria animal las secuencias de mDNA se encuentran muy conservadas (Eguiarte *et al.*, 2003).

El genoma nuclear en plantas comprende al menos un complemento diploide de cromosomas que se heredan en forma biparental. La recombinación entre los cromosomas homólogos es frecuente. Debido a la gran cantidad de duplicaciones y al alto porcentaje de elementos móviles, el genoma nuclear en las plantas presenta un gran tamaño, los genes se encuentran dispersos entre múltiples cromosomas y separados unos de otros por grandes regiones de DNA no codificante (Zhang y Hewitt, 2003).

Una diferencia importante entre los tres genomas vegetales es que cada uno presenta diferentes tasas evolutivas, por lo que su empleo en genética vegetal dependerá del problema a resolver en particular. Generalmente, los genes mitocondriales cambian muy lentamente, los genes de cloroplasto también presentan una baja tasa evolutiva aunque más alta que los genes de mitocondrias, por último los genes nucleares evolucionan sustancialmente más rápido (Zhang y Hewitt, 2003). La alta tasa de evolución del genoma nuclear dificulta la construcción de iniciadores universales para genes que se encuentran en el núcleo. Además debido a que la mayoría de los genes nucleares vegetales pertenecen a familias génicas, es difícil contar con genes de copia única para estudios genéticos (Doyle y Doyle, 1999). Evolutivamente los genes mitocondriales solo pueden ayudar en el análisis de grupos lejanos ya que para otro tipo de estudios, como sería el análisis genético de especies cercanas o poblaciones de una misma especie, no presentan variación suficiente. Los genes de cloroplastos pueden utilizarse para establecer relaciones entre familias y a veces entre géneros, pero es necesario emplear genes nucleares o las partes más variables de los otros genomas para definir relaciones genéticas por abajo del nivel de familia y en estudios poblacionales y ecológicos (Doyle y Doyle, 1999).

#### *Marcadores RAPDs*

Los RAPDs son marcadores moleculares generados por la amplificación de segmentos aleatorios de DNA. La técnica de RAPD se basa en la posibilidad estadística de que se presenten sitios complementarios a un iniciador a lo largo del genoma. Se utiliza una cantidad mínima de material genético que se amplifica por la reacción en cadena de la polimerasa, 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 repetidos invertidos, resultando en la amplificación de segmentos de DNA de longitudes variables. El tamaño corto 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). A través de la aplicación de la técnica PCR-RAPD es posible efectuar un muestreo al azar y eficiente del genoma.

Junto con los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs), los RAPDs se encuentran entre las técnicas moleculares consideradas como multilocus, ya que permiten el análisis de varios loci a la vez (Harris, 1999). En relación a los AFLPs la metodología es más sencilla, por lo tanto más rápida y menos costosa. La gran ventaja de la técnica de RAPD es que permite 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 el DNA.

Los RAPDs presentan el problema de la reproducibilidad, aún dentro de un mismo laboratorio se han observado diferencias en los resultados de la amplificación (Harris, 1999). Dowling *et al.* (1996) señalan que para reducir la variación provocada por los componentes de la reacción, es necesaria una rigurosa estandarización del protocolo de RAPD. Weeden *et al.* (1992) y Skroch y Nienhuis (1995) reportan una marcada mejoría, si se minimizan las diferencias en las condiciones de la reacción entre réplicas y además sugieren seleccionar los iniciadores utilizados en la reacción PCR-RAPDs, en base a la reproducibilidad de los datos generados. Más aún, se reporta 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).

En relación a la herencia de los RAPDs, la dominancia de los marcadores imposibilita la identificación de organismos heterocigotos (Williams *et al.*, 1993). En el análisis electroforético de los fragmentos RAPDs, se observa solamente la presencia o la ausencia del marcador, los individuos heterocigotos (+-) para una determinada mutación se mezclan con los homocigotos dominantes (++), por lo que generalmente no es posible determinar el patrón de herencia (mendeliana o citoplasmática) de estos marcadores. Por lo tanto no se pueden aplicar los modelos de genética de poblaciones que se utilizan para alelos codominantes, ya que no se puede asumir equilibrio Hardy-Weinberg. Lo anterior, dificulta el análisis de los datos generados con RAPDs y reduce el poder estadístico de las estimaciones en relación a los sistemas codominantes (Otero y De la Cruz, 1997).

#### *Taxonomía molecular y diversidad genética en plantas con marcadores RAPDs*

En plantas, es difícil contar con genes nucleares de copia única para estudios genéticos. Esto, más las ventajas técnicas que ofrecen los RAPDs, explican el amplio uso que han tenido estos marcadores en la definición de las relaciones genéticas a niveles por debajo de familia y en la determinación de los niveles y distribución de la variación genética.

El empleo de diversos oligonucleótidos como cebadores para la reacción PCR-RAPDs, permite generar caracteres moleculares útiles en el diagnóstico de diferentes niveles taxonómicos (Hadrys *et al.*, 1992). Los productos de la reacción se clasifican en dos grupos: aquellos que son variables (polimórficos) y los que son constantes (monomórficos), ej. un carácter polimórfico a nivel de especies, identificará a miembros

de una misma especie solamente si se encuentra en todos los individuos de dicha especie (Fig. 1).

En taxonomía molecular es importante considerar la posibilidad de que bandas no homólogas migren en la misma posición. En el caso de los RAPDs, el problema puede reducirse si se realiza la separación electroforética en geles de poliacrilamida y tinción con plata, ya que se genera una mejor resolución del tamaño de los fragmentos. Además, la homología puede comprobarse con hibridación Southern o con la digestión de los fragmentos amplificados con enzimas de digestión. Sin embargo, cualquiera de las alternativas mencionadas encarece la técnica y consume una considerable cantidad de tiempo (Wolfe y Liston, 1998). Debido a que no siempre es posible contar con las técnicas señaladas, se recomienda utilizar los RAPDs exclusivamente para estudios a nivel infraespecífico o entre especies cercanamente relacionadas, ya que se ha demostrado la homología de las bandas co-migrantes cuando se trabaja con especies cercanas (nivel infragenérico) (Catalán *et al.*, 1995; Reisenberg, 1996). Dentro de una misma especie, la proporción de fragmentos homólogos es del 92% en maíz (Beaumont *et al.*, 1996), del 91% en *Heliantus* (Reisenberg, 1996), y del 94% en *P. sylvestris* (Hurme y Savolainen, 1999). Entre especies de un mismo género, las proporciones encontradas no son muy diferentes. Así, por ejemplo, en *Glycine* se registran valores del 90% (Williams *et al.*, 1993), y del 93% en especies de pinos (Wu *et al.*, 1999). Thorman *et al.* (1999) reportan un 80% de homología de los fragmentos de diversas especies de *Brassica* aunque Lanner *et al.* (1996) encuentran hasta un 98.8% de homología.

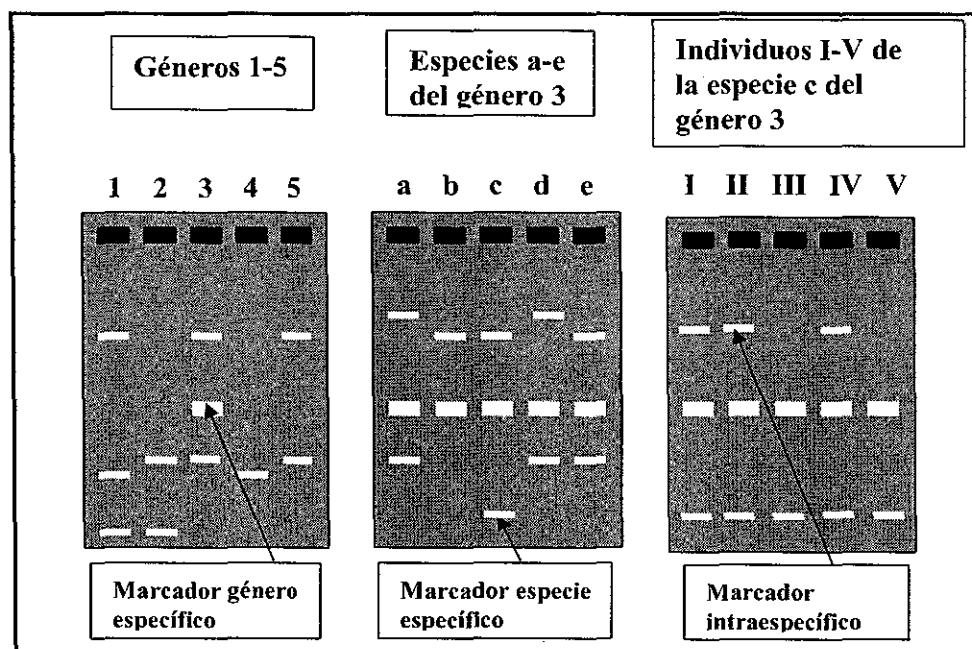


Fig. 1. Representación de la utilidad de fragmentos RAPDs como marcadores diagnóstico en taxonomía (modificado de Hadrys *et al.*, 1992).

Las similitudes y las diferencias reveladas por los marcadores RAPDs se utilizan para la determinación de las relaciones genéticas entre taxa. La distancia genética se obtiene a partir de la proporción de similitudes y diferencias encontradas para los loci RAPDs entre dos genomas (Harris, 1999). Los estimadores de distancia genética más utilizados son los índices de similitud de Jaccard, de Dice y de Nei y Li (Jaccard, 1908; Dice, 1945; Nei y Li, 1979), y los índice de diversidad de Nei y de Lynch y Milligan (Nei, 1973; Lynch y Milligan, 1994). A partir de las distancias genéticas puede realizarse un análisis de agrupamiento, o un análisis de componentes principales que revelen 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 (infragenérico) los resultados del análisis de RAPDs han sido aplicados con éxito en la determinación de las relaciones filogenéticas (Wolfe y Liston, 1998).



La técnica de RAPDs es sin duda una de las más utilizadas para determinar la extensión y distribución de la diversidad genética dentro y entre especies, cultivares o poblaciones naturales (Otero y de la Cruz, 1997). Se considera que los RAPDs son técnicamente más prácticos que la electroforesis de proteínas y es posible que en aquellos casos en que se presenta poca variación genética, sean más informativos por el gran número de loci que se pueden analizar (Mosseler *et al.*, 1992). El análisis de la variación genética a nivel intraespecífico con RAPDs implica la identificación de marcadores informativos (Fig. 1). La gran mayoría de los estudios de diversidad considera a los loci RAPDs como marcadores independientes cuyos productos pueden estar presentes o ausentes (+ o -). Para estimar los niveles de variación genética con este tipo de marcadores puede efectuarse un análisis génico o un análisis fenético. En el análisis génico se consideran las frecuencias alélicas y se presupone que el marcador visible, el alelo dominante, está en equilibrio Hardy-Weinberg con un alelo recesivo. A partir de las frecuencias alélicas, se calculan los estimadores de diversidad genética (polimorfismo, heterocigosidad e índices de diversidad), empleando las técnicas estándares de la genética de poblaciones (Hartl y Clark, 1989). Sin embargo, debido a que generalmente se desconocen las bases genéticas de los marcadores RAPDs es común llevar a cabo un análisis fenético; es decir, un análisis de la diversidad fenotípica, en el que se consideran las frecuencias fenotípicas: presencia o ausencia de las bandas. En este tipo de análisis no se asume el equilibrio Hardy-Weinberg y es común efectuar un análisis de varianza molecular (AMOVA), en el que se generan estadísticas  $\Phi$  (Excoffier *et al.*, 1992) las cuales son análogas a  $F_{ST}$  de Wright (Wright, 1951). Esta última aproximación ha sido ampliamente utilizada en el análisis de datos RAPDs (Gillies *et al.*, 1997; Newton *et al.*, 2002), por lo tanto su uso permite la comparación de los resultados entre diversos estudios. El análisis de diferenciación

genética entre poblaciones con  $G_{ST}$  y con AMOVA indica una alta correlación de los resultados de ambos métodos (Nybom y Bartish, 2000).

*RAPDs en estudios de diversidad genética en el género Pinus*

En el género *Pinus*, los RAPDs se han utilizado principalmente para estudios de diversidad génica en poblaciones naturales de *P. pinaster* (Plomion *et al.*, 1995), de *P. silvestris* (Szmidt *et al.*, 1996), de *P. oocarpa* (Díaz *et al.*, 2001), de *P. banksiana* y de *P. longaeva* (Lee *et al.*, 2002); en poblaciones amenazadas de *P. leucodermis* (Bucci *et al.*, 1997), y de *P. chiapensis* (Newton *et al.*, 2002) y en poblaciones naturales y plantaciones de *P. contorta* (Thomas *et al.*, 1999). También se han utilizado en el estudio de las relaciones filogenéticas entre especies de pinos norteamericanos (Wu *et al.*, 1999) y entre pinos de México y Centroamérica (Furman *et al.*, 1997).

### **Planteamiento del problema**

La desviación de las expectativas de estricta herencia mendeliana observada ocasionalmente, ha sido una de las limitaciones básicas del empleo de los marcadores RAPDs (Wolfe y Liston, 1998). Esta desviación pueden ser provocada por artefactos (variación no genética), localización de los marcadores en organelos e interacciones epigenéticas. Así, en estudios con RAPDs es importante analizar solamente marcadores reproducibles que presenten herencia mendeliana, ya que la confiabilidad de los resultados dependerá de la robustez del marcador. Sin embargo, en la mayoría de los organismos la naturaleza dominante de los RAPDs no permite determinar la herencia mendeliana de estos marcadores.

En el caso de las coníferas es posible definir la herencia de los marcadores moleculares sin necesidad de cruza controladas, las cuales son costosas y frecuentemente imposibles de llevar a cabo. La naturaleza del megagametofito en las coníferas permite analizar la segregación de los marcadores genéticos. Genéticamente, el megagametofito es idéntico al gameto materno que forma el embrión, por lo tanto es equivalente a la progenie haploide de la planta. Cualquier locus en el genoma de la planta que presente herencia mendeliana, segregará 1 a 1 en los megagametofitos (O'Malley *et al*, 1997). El uso de marcadores RAPDs confiables en los estudios de diversidad genética requiere de la optimización de la técnica de PCR, de la selección de iniciadores con base en su perfil de amplificación y de la selección de marcadores reproducibles que se hereden mendelianamente.

**Objetivo general**

Generar marcadores RAPDs fácilmente analizables, confiables y reproducibles en genoma de pinos.

**Objetivos particulares**

- a) Optimizar la técnica PCR-RAPDs.
- b) Seleccionar iniciadores RAPDs para el análisis de diversidad genética del complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis*, con base en el perfil de amplificación.
- c) Analizar la reproducción de la amplificación de un conjunto de RAPDs en acículas, megagametofito y embrión de pinos.
- d) Analizar la reproducción de la amplificación de los marcadores RAPDs en dos replicas de la extracción y dos replicas de la amplificación.
- e) Definir el patrón de segregación de un grupo de marcadores RAPDs.

## **Materiales y métodos**

### *Recolección de las muestras de acículas y semillas*

Se colectaron muestras de acículas de 5 árboles de *P. chiapensis* (Martínez) Andresen, de 27 árboles de la población de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) G. R. Shaw de San Rafael Tlalmanalco, Edo. de México y de 25 árboles de la población de *P. ayacahuite* de Las Palmas Michoacán. Además, se obtuvieron las semillas de conos maduros de al menos seis árboles de cada población.

### *Obtención de megagametofitos y embriones*

Se germinaron de seis a diez semillas de cada cono y se obtuvieron los gametofitos y los embriones de cada semilla (Fig. 2). Las semillas se lavaron tres veces con agua destilada (permanecieron 12 horas en agua durante cada lavado). Se añadieron 250 mL de agua oxigenada comercial y un volumen igual de agua destilada, se mantuvieron en esta solución durante 30 min y se lavaron por cuarta vez con agua destilada. Se eliminó el exceso de agua y las semillas se almacenaron en bolsas de papel a 4 °C. Para obtener el gametofito y el embrión, se diseccionó la semilla germinada con la ayuda de un bisturí, se localizó visualmente el megagametofito (n) y se separó de la cubierta con ayuda de unas pinzas de disección. Se efectuó un corte en forma vertical en el gametofito y se localizó y extrajo el embrión (2n). Con el fin de evitar la contaminación del gametofito es importante eliminar el tejido que lo une con el embrión. Finalmente se colocaron por separado ambas estructuras en tubos de 2 mL y se mantuvieron a -80 °C hasta la extracción de DNA.

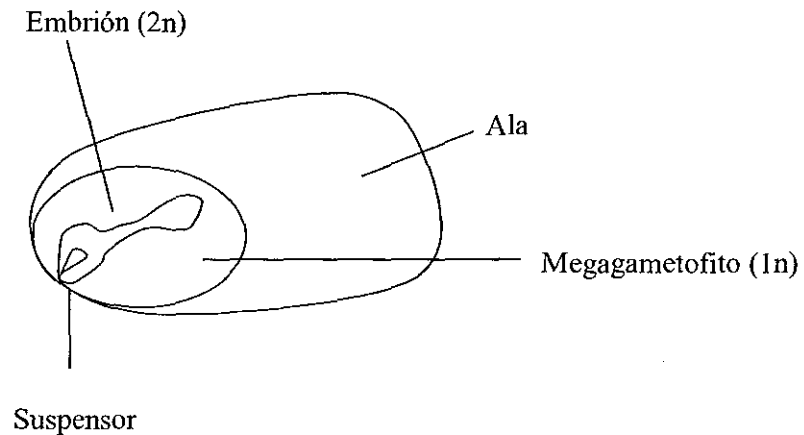


Fig. 2. Esquema de la semilla de pino germinada.

#### *Extracción del DNA*

La extracción de DNA a partir de tejido fresco de acículas, gametofito y embriones se realizó con el método descrito por Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones dependiendo del origen del material biológico (Apéndice 1).

#### *Optimización de la reacción PCR-RAPD*

La reacción PCR-RAPD se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L siguiendo el procedimiento básico de Williams *et al.* (1990), las concentraciones finales de los componentes de la reacción original y las modificaciones realizadas en este trabajo se especifican en el (Cuadro 1). Se utilizaron los iniciadores OPB-01 y OPB-04 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA).

Cuadro 1. Condiciones de la reacción PCR-RAPDs.

Reacción	Método de Williams (cc finales)	Modificaciones
Tris- HCl, pH 8.3	10 mM	-
KCl	50 mM	-
Gelatina	0.001 %	-
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	1.5/ 2.5/ 3.5/ 4.5 mM
DNA molde	25 ng	5/ 10/ 20/ 40 ng/μl
dNTPs	0.1 μM	0.1/ 0.2 μM
Iniciador	0.2 μM	0.2/ 0.3 μM
<i>Taq</i> pol	0.5 U	0.5/ 0.75/ 1 U

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research modelo PTC 100. Se utilizó el programa original de Williams *et al.* (1990) el cual consiste de 45 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C y 2 min a 72°C, y otros dos programas modificados. Los cambios que se efectuaron al programa original se indican en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Programas empleados en la amplificación de fragmentos RAPDs.

Fase de PCR	Pasos	Método de Williams	Modificaciones	
			Programa 1	Programa 2
Desnaturalización	1		3 min 94°C	3 min 94°C
Desnaturalización	2	1 min 94°C	1 min 94°C	1 min 94°C
Alineación	3	1 min 36°C	2 min 36°C	1 min 40°C
Elongación	4	2 min 72°C	2 min 72°C	2 min 72°C
<b>Ciclos</b>		45 pasos 2 a 4	45 pasos 2 a 4	45 pasos 2 a 4
Elongación prolongada	5		7 min 72°C	7 min 72°C

### *Separación, tinción y registro de los productos de la amplificación*

Los productos de la reacción se mezclaron con solución de carga (Sambrook *et al.*, 1989) y se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % (4 V/cm). Se utilizó un marcador de 100 pb (Gibco) para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados. Los geles se tiñeron mediante inmersión en bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL durante 30 min y se destiñeron en agua destilada durante 2-3 hr. Los marcadores se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta.

### *Selección de iniciadores y optimización de las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> por iniciador*

Se generaron los perfiles de amplificación con 69 iniciadores de dos muestras del genoma de acículas de *P. ayacahuite* y de *P. strobiformis*. Los iniciadores OPA1-OPA20, OPB1-OPB-20, OPBB1-OPBB20, OPC1-OPC9 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA). Las reacciones PCR-RAPDs se efectuaron en un volumen final de 25 µL siguiendo el procedimiento básico de Williams *et al.* (1990) con las siguientes modificaciones: se utilizaron 40 ng de DNA en la mezcla de reacción y 1 U de *Taq* pol, se trabajó con una concentración final de MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM. El programa de amplificación consistió de un paso inicial de 3 min a 94 °C seguido de 45 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 72 °C, 2 min a 36 °C, y un paso final de 7 min a 72 C°. Se seleccionaron los iniciadores que produjeron los mejores patrones de amplificación (resolución y mayor número de bandas) y se optimizó la concentración del cofactor por iniciador. Las reacciones PCR-RAPD se realizaron siguiendo el procedimiento antes señalado y solamente se modificó la concentración de MgCl<sub>2</sub>, se obtuvieron los perfiles RAPDs con las siguientes concentraciones del cofactor: 1.5 mM, 2.5 mM, 3.5 mM y 4.5 mM.

### *Amplificación de marcadores RAPDs*



En la determinación de la reproducción y el patrón de segregación de un grupo de marcadores RAPDs, se llevaron a cabo las reacciones de amplificación siguiendo el procedimiento general de Williams *et al.* (1990) con algunas modificaciones, las condiciones de la mezcla de reacción fueron las siguientes: 10 mM de Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.001 % gelatina, 100  $\mu$ M de dNTPs; 0.2  $\mu$ M de cebador; 40 ng de DNA y 1 U de *Taq* DNA polimerasa, la concentración de MgCl<sub>2</sub> varió dependiendo del cebador. Las secuencias de los tres decámeros y las concentraciones de cofactor, empleados en las reacciones PCR-RAPD se muestran en el Cuadro 3. Se siguió el programa de amplificación señalado anteriormente. De la misma manera se separaron y visualizaron los marcadores.

Cuadro 3. Iniciadores y concentraciones óptimas de MgCl<sub>2</sub>.

Iniciador	Secuencia	MgCl <sub>2</sub> cc final
	5'-----3'	
OPA-08	GTGACGTAGG	4.5 mM
OPA-11	CAATCGCCGT	2.5 mM
OPC-06	GAACGGACTC	3.5 mM

*Definición del perfil de amplificación en acículas, megagametofitos y embriones*

Se definieron los perfiles de bandeo de los RAPDs en DNA de acículas, megagametofitos y embriones de 12 árboles de *P. ayacahuite*. Se analizaron un total de 72 megagametofitos y 56 embriones. Se visualizaron los fragmentos amplificados por al menos dos personas y se determinó en particular: el número, el tamaño en pares de bases (pb) de cada fragmento y el nivel de intensidad de las bandas.

### *Reproducción de la amplificación de marcadores RAPDs*

Se analizó la reproducción de los productos de la reacción PCR-RAPDs utilizando las muestras de DNA de acículas de la población del Edo. de México (n=27). La amplificación del templete, con los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06, se efectuó por duplicado en experimentos independientes (réplicas de la amplificación). En uno de los experimentos las reacciones se desarrollaron con *Taq* pol de Perkin Elmer y en el otro con *Taq* pol de Invitrogen. Además, se extrajo DNA de acículas de 12 pinos por duplicado (réplicas de la extracción) y se desarrollaron las reacciones de amplificación con los iniciadores señalados anteriormente. Se formaron bases de datos con los fragmentos visualizados en las replicas de la amplificación y en las de la extracción. Los fragmentos se registraron como presentes (1) o ausentes (0). Se calculó el porcentaje de reproducibilidad de cada fragmento y se obtuvo el promedio de reproducibilidad para cada uno de los iniciadores.

### *Análisis de Segregación*

Se generaron fragmentos RAPDs, con los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06, en seis gametofitos de seis árboles de la población de *P. ayacahuite* de San Rafael y de seis árboles de la población de *P. ayacahuite* de Las Palmas. Se analizaron un total de 12 árboles y 72 megagametofitos.

El análisis de segregación se llevó a cabo formando una base de datos en la que se registró la presencia (1) o ausencia (0) de los fragmentos en el genoma diploide (acículas) y en el genoma haploide (gametofito). Se analizó la base de datos, se identificaron los loci que segregaron y el número de árboles heterocigotos para cada uno de los locus. Se contabilizó el número de megametófitos con presencia o ausencia del marcador (alelos nulos). Se calculó el porcentaje de desviación de las relaciones

esperadas (1:1) en la segregación mendeliana y se identificaron los loci que presentaron una fuerte desviación.

## **Resultados y discusión**

### *Optimización de la reacción PCR-RAPD*

El análisis electroforético de las reacciones PCR-RAPD mostró amplificadas con todas las concentraciones de DNA molde. Sin embargo, se observó una mejor resolución de las bandas de débil amplificación cuando se añadieron 20 y 40 ng de DNA a la mezcla de reacción (Fig.3). Debido a que la pureza y la calidad del material genético dependen del método de extracción de DNA empleado, es necesario determinar la cantidad óptima de DNA para la reacción de amplificación por PCR. La concentración de DNA que produjo los mejores resultados es similar a la utilizada en otros trabajos de RAPDs en pinos (Díaz *et al*, 2001; Mosseler, 1992). Durante el proceso de optimización, se emplearon tanto muestras tratadas y no tratadas con RNasa, los resultados no mostraron diferencias en los patrones de bandeo, por lo tanto, es posible llevar a cabo la reacción PCR-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 la mitad del material genético total extraído en ausencia de RNasa es DNA.

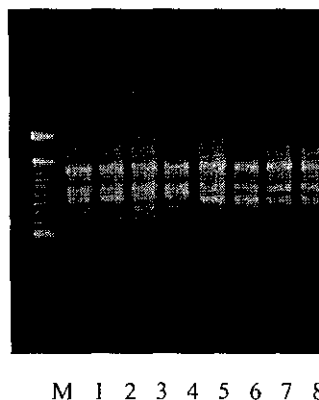


Fig. 3. Amplificación PCR-RAPDs con OPB-01 a diferentes concentraciones de DNA. M representa el marcador, muestras 1, 2, 3, 4 *P. chiapensis* y 5, 6, 7, 8 *P. ayacahuite*. Muestras 1, 5; 2, 6; 3, 7; 4, 8 concentraciones 5, 10, 20 y 40 ng respectivamente.

La cantidad del  $MgCl_2$  en la mezcla de reacción fue determinante tanto para la amplificación como para la resolución de los marcadores RAPDs, Fig. 4. Una concentración final 1.5 mM produjo una amplificación débil. Un aumento en la concentración mejoró considerablemente la amplificación. La mejor resolución de las bandas, con los iniciadores empleados, se observó con una concentración final 2.5 mM. Al analizar la metodología de RAPDs empleada en diversos trabajos se observa una variación en la concentración de  $MgCl_2$  en la mezcla de reacción, en trabajos en pinos las concentraciones empleadas fueron 1.5 y 2.5 mM (Díaz *et al.*, 2001; Furman *et al.*, 1997; Mosseler, *et al.*, 1992). Nuestros resultados revelan que debido a la importancia que tiene la cantidad de cofactor en el resultado de la amplificación es necesario determinar las concentraciones óptimas de cofactor por iniciador (Bowditch *et al.*, 1993; Ellsworth *et al.*, 1993).

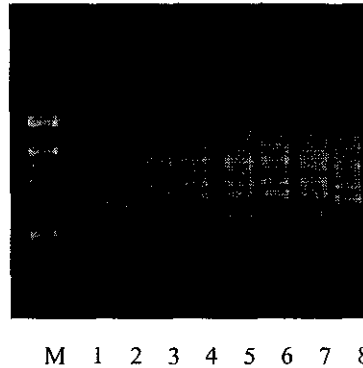
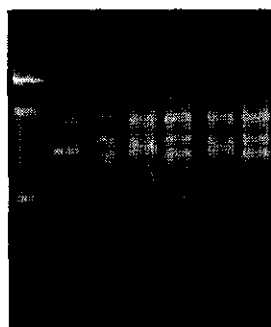


Fig. 4. Amplificación PCR-RAPDs con OPB-01 a diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ . M representa marcador, muestras 1, 3, 5, 7 *P. chiapensis* y 2, 4, 6, 8 *P. ayacahuite*. Muestras 1, 2; 3, 4; 5, 6; 7, 8 concentraciones 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 mM respectivamente.

La adición de 0.75 U de enzima *Taq* pol (Perkin-Elmer) a la mezcla de reacción fue suficiente para obtener una amplificación y una resolución adecuada, 0.5 U de la enzima produjeron una amplificación débil y por lo tanto una menor resolución, Fig. 5. Se ha reportado que cantidades excesivas de *Taq* polimerasa producen barrimiento del DNA amplificado (Bowditch *et al.*, 1993); 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. En nuestro estudio la cantidad mínima que produjo una amplificación adecuada fue de 0.75 U, sin embargo en otros trabajos con RAPDs se han empleado hasta 0.5 U de *Taq* pol (Isabel *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 2002).



M 1 2 3 4 5 6

Fig.5. Amplificación PCR-RAPDs con OPB-01 a diferentes concentraciones de *Taq* pol. M representa marcador, muestras 1, 3, 5 *P. chiapensis* y 2, 4, 6, *P. ayacahuite*. Muestras 1, 2; 3, 4; 5, 6, concentraciones 0.5, 0.75, y 1 U respectivamente.

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 otros trabajos con RAPD. Williams *et al.* (1993), indicaron que las concentraciones óptimas de iniciadores se encuentran entre 0.1 y 2  $\mu$ M y que 100  $\mu$ M de cada una de los cuatro nucleótidos es suficiente para que se lleve a cabo la amplificación.

#### *Optimización del programa de amplificación*

Se observaron los mismos perfiles de amplificación con el programa original de Williams y con el programa 1 (Cuadro 2). Sin embargo, el programa modificado que consistió de un paso de desnaturalización prolongada de 3 min a 94°C; de 40 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94°C; alineación de 1 min a 36°C y elongación de 2 min a 72°C y un paso de elongación prolongada de 10 min a 72°C proporcionó una mejor

resolución de los patrones de bandeo. No se observó amplificación o se observaron cambios en los patrones de amplificación con el programa 2. Bowditch *et al.* (1993) reportaron que cuando se emplean iniciadores con una longitud de 10 bases, temperaturas de alineamiento superiores a 40°C reducen el número de productos amplificados pero aumentan la reproducibilidad de las bandas. En este trabajo una temperatura de 40°C redujo considerablemente tanto el número como la calidad de los fragmentos amplificados. 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 una mejoría en la amplificación. Como otros trabajos con marcadores RAPDs, 35 ciclos fueron suficientes para obtener una cantidad considerable de amplificado (Williams *et al.*, 1993; Furman *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2001; Newton *et al.*, 2002).

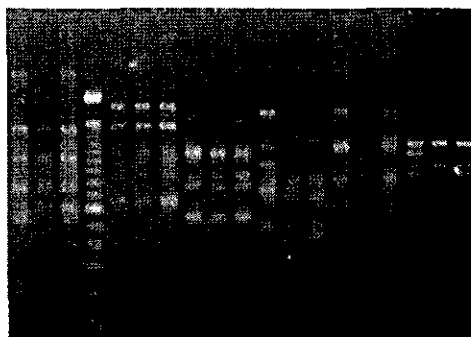
#### *Resultados de la amplificación*

De un total de 69 iniciadores empleados en la amplificación del genoma de *P. ayacahuite* y *P. strobiformis*, los iniciadores OPA-14, OPA-20 y OPB-07 no generaron amplificados. En un número importante de iniciadores se observaron bandas, pero éstas eran débiles o presentaban una gran cantidad de barrimiento en el gel, otros presentaron una buena amplificación pero el número de bandas era reducido o se observaba un ligero barrimiento. Los iniciadores del grupo OPA (02, 04, 07, 08, 09, 10, y 11), del grupo OPB (01, 04, 10, 11, 12 y 18), del grupo OPBB (02, 05, 07, 09, 10 y 12) y del grupo OPC (03, 06) produjeron en menor o mayor grado bandas definidas e intensas. Con excepción de un número reducido de bandas, producto probablemente de variación

a nivel individual, se observó la reproducción de los patrones de bandeo en las dos muestras analizadas de cada taxa.

*Selección de iniciadores y optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub> por iniciador*

Se seleccionaron aquellos iniciadores que generaron los mejores patrones de amplificación en relación al número y la resolución de las bandas y se optimizó la concentración del cofactor por iniciador en la mezcla de reacción. Es importante señalar que el perfil de amplificación no cambió con las diversas concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, amplificó el mismo número de bandas por iniciador, sin embargo se observó una mejoría en la resolución de algunos iniciadores. De un total de 21 iniciadores seleccionados, 7 mostraron una mejor resolución de las bandas con una concentración final de cofactor 2.5 mM, 6 con una concentración 3.5 mM y 8 cuando se elevó la concentración en la mezcla de reacción a 4.5 mM (Fig. 6, Cuadro 4).



1 2 3 M 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Fig. 6. Optimización de la amplificación PCR-RAPD a concentraciones de MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (muestras 1, 4, 7, 10, 13, 16); 3.5 mM (2, 5, 8, 11, 14, 17) y 4.5 mM (3, 6, 9, 12, 15, 18). M representan marcador, muestras 1, 2, 3 iniciador OPA-04; 4, 5, 6 iniciador OPA-07; 7, 8, 9 iniciador OPA-08; 10, 11, 12 iniciador OPA-09; 13, 14, 15 iniciador OPA-10 y finalmente 16, 17, 18 iniciador OPA-11.



Cuadro 4. Optimización por iniciador de la concentración de  $MgCl_2$  en la mezcla de reacción PCR-RAPD.

Iniciadores	Secuencia	$MgCl_2$ mM	No. de bandas
	5'-----3'		
OPA-02	TGCCGAGCTG	3.5	4
OPA-04	AATCGGGCTG	4.5	7
OPA-07	GAAACGGGTG	4.5	6
OPA-08	GTGACGTAGG	4.5	6
OPA-09	GGGTAACGCC	2.5	8
OPA-10	GTGATCGCAG	2.5	5
OPA-11	CAATCGCCGT	2.5	5
OPB-01	GTTTCGCTCC	3.5	3
OPB-04	GGA CTGGAGT	4.5	6
OPB-10	CTGCTGGGAC	4.5	5
OPB-11	GTAGACCCGT	2.5	3
OPB-17	AGGGAACGAG	2.5	4
OPB-18	CCACAGCAGT	4.5	5
OPB-19	ACCCCGAAG	3.5	6
OPBB-02	CCCCGTTAG	4.5	5
OPBB-05	GGGCCGAACA	2.5	4
OPBB-07	GAAGGCTGGG	2.5	5
OPBB-09	AGGCCGGTCA	2.5	5
OPBB-10	ACTTGCCTGG	4.5	3
OPC-03	GGGGGTCTTT	3.5	7
OPC-06	GAACGGACTC	3.5	4

*Amplificación de RAPDs en acículas, megagametofitos y embriones*

Se observaron un total de 20 fragmentos amplificados con los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06 en las muestras de DNA de acículas, megagametofitos y embriones. El DNA de cada uno de los materiales biológicos presentó el mismo perfil de amplificación para cada iniciador. El iniciador OPA-11, con un total de 9 bandas, produjo el mayor número de amplificados, el tamaño de los fragmentos varió de 1900 a 750 pb. Los otros dos iniciadores generaron seis y cinco fragmentos cada uno, el

tamaño de los amplificados fue de 1700 a 550 pb para OPA-08 y de 2200 a 900 pb para OPC-06 (Cuadro 5, Fig. 7).

Cuadro 5. Perfiles de bandeo obtenidos con cada cebador en *P. ayacahuite*. Intensidad de las bandas: F = fuerte, I = intermedia D = débil.

	Fragmentos		
	OPA-11	OPA-08	OPC-06
1900 I	1700 I	2200 F	
1800 I-D	1100 F	1700 I	
1500 I	950 F	1300 F	
1300 I	850 F	1100 F	
1200 I	750 I	900 F	
1050 D	550 I		
900 F			
850 I			
750 I			

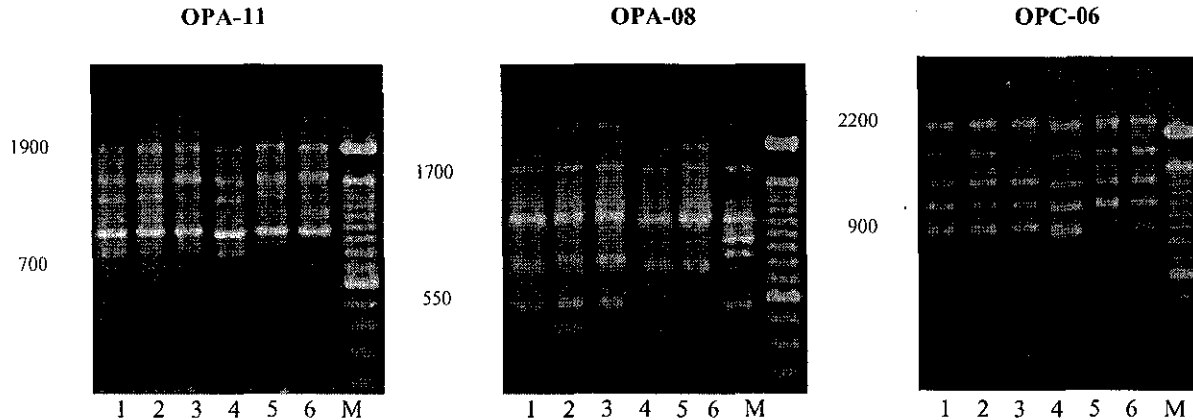


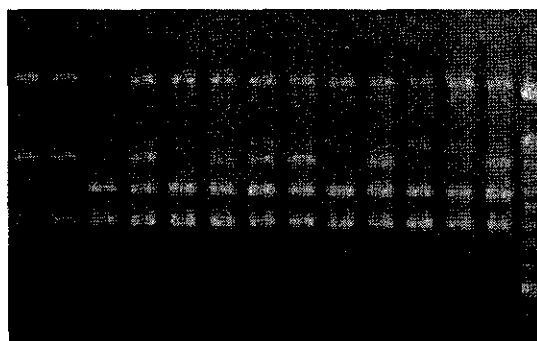
Fig. 7. Patrones de amplificación de los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en acículas (1,4), megagametofito (2,5), embriones (3,6) de *P. ayacahuite*. M, marcador de 100 pb.

Los fragmentos se clasificaron en tres grupos de acuerdo a la intensidad de las bandas: Fuerte (F), intermedia (I) y débil (D) (Cuadro 5). Los fragmentos OPA-11<sub>900</sub>, OPA-08<sub>1100</sub>, OPA-08<sub>950</sub>, OPA-08<sub>850</sub>, OPC-06<sub>2200</sub>, OPC-06<sub>1300</sub>, OPC-06<sub>1100</sub>, OPC-06<sub>900</sub> mostraron una intensidad fuerte. El patrón de intensidad fue similar en el

megagametofito y en el embrión; sin embargo, ocasionalmente se observaron fragmentos que presentaron diferencias en la intensidad entre genomas (Cuadro 6, Fig. 8). Diferencias en la pureza del DNA pueden explicar las diferencias observadas en la intensidad de los fragmentos.

Cuadro 6. Fragmentos que mostraron diferencias en la intensidad de la amplificación, F = fuerte, I = intermedia, D = débil.

Fragmentos	Acículas	Megagametofito	Embrión
OPA-11 <sub>1900</sub>	I	F	F
OPA-11 <sub>1800</sub>	I	D	D
OPA-11 <sub>700</sub>	I	D	D
OPA-08 <sub>550</sub>	I	D	D
OPC-06 <sub>1100</sub>	I	F	F



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

Fig. 8. Diferencias en la intensidad de la amplificación del fragmento OPC-06<sub>1100</sub> en acículas (1, 2), megagametofitos (3, 5, 7, 9, 11,13) y embriones (4, 6, 8, 10, 12) de *P. ayacahuite*. M, marcador de 100 pb.

Aunque en nuestro estudio no se observaron diferencias en los perfiles de amplificación de acículas, gametofitos y embriones, ha sido señalado que el tipo de muestra y su calidad pueden generar artefactos en los patrones de bandeo de marcadores RAPDs (Ellsworth *et al.*, 1993). En estudios en los que el fenotipo o genotipo de los

RAPDs del genoma diploide de un árbol se infiere a partir de la amplificación del genoma haploide del mismo árbol, es importante definir previamente la reproducción de los marcadores en ambos genomas, con el objetivo de eliminar artefactos y validar la inferencia del fenotipo o genotipo.

Es importante señalar que se observaron individuos homocigotos o heterocigotos para el alelo nulo, en los que el fragmento no se encontraba presente en el megagametofito pero si en el embrión correspondiente a la misma semilla. En la Figura 8 se muestran semillas de un individuo heterocigoto para OPC-06<sub>1300</sub> que presentan diferencias en la amplificación del fragmento en megagametofitos y embriones de una misma semilla. La naturaleza dominante de los marcadores RAPDs no permite su utilidad en el análisis de flujo genético; sin embargo, la identificación de individuos homocigotos para alelos nulos en las poblaciones naturales y la determinación de las frecuencias génicas de estos marcadores en los embriones de estos árboles, podría ser de utilidad en el análisis del flujo genético a través del polen en poblaciones naturales de pinos.

#### *Reproducción de la amplificación*

El análisis de reproducción de los fragmentos en las dos réplicas de la amplificación con *Taq* pol de diferentes marcas comerciales, mostró 18 fragmentos que presentaron un porcentaje de reproducción igual o superior al 90% (Cuadro 7). El iniciador que amplificó el menor número de bandas intensas (OPA-11), generó los fragmentos menos reproducibles (OPA-11<sub>1900</sub> y OPA-11<sub>750</sub>), el promedio de reproducción de marcadores RAPDs para este iniciador fue de 91%. Los iniciadores OPA-08 y OPC-06 presentaron promedios superiores al 98%. Las amplificaciones con los iniciadores OPA-11 y OPC-06 se muestran en las Figs. 9 y 10.

Cuadro 7. Porcentaje de reproducción (R) de los fragmentos en réplicas de la amplificación.

<b>OPA-11</b>	<b>R (%)</b>	<b>OPA-08</b>	<b>R (%)</b>	<b>OPC-06</b>	<b>R (%)</b>
1900	81	1700	100	2200	100
1800	90	1100	100	1700	100
1500	100	950	100	1300	100
1300	90	850	100	1100	93
1200	90	750	100	900	100
1050	100	550	92		
900	100				
850	90				
750	81				
<b>Promedio</b>	<b>91.3</b>		<b>98.6</b>		<b>98.6</b>

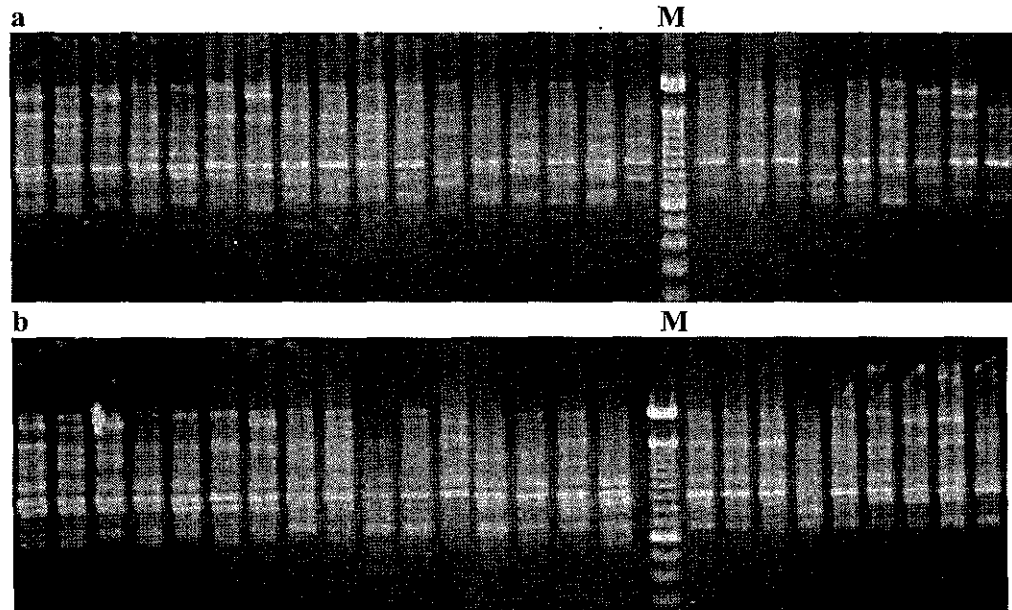


Fig. 9. Réplicas de la amplificación con el iniciador OPA-11. Gel a, *Taq* pol Invitrogen, Gel b, *Taq* pol Perkin Elmer. M marcador de 100 pb.

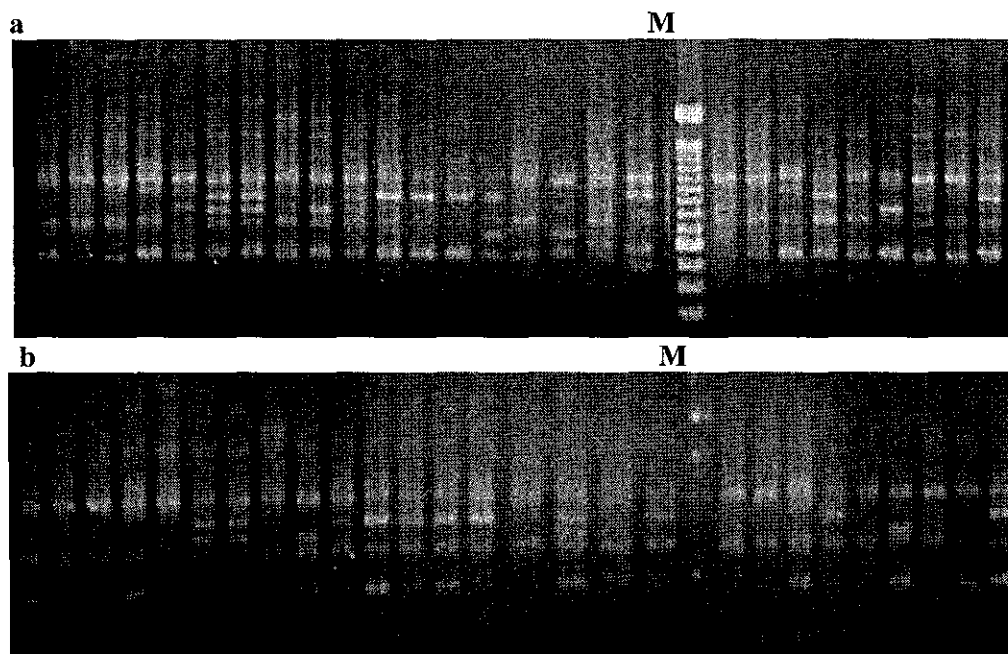


Fig. 10. Réplicas de la amplificación con el iniciador OPA-08. Gel a, *Taq* pol Invitrogen, Gel b, *Taq* pol Perkin Elmer. M marcador de 100 pb.

El análisis de reproducción en las réplicas de la extracción reveló 16 fragmentos con un porcentaje de reproducibilidad superior al 90%. En general, el promedio de reproducibilidad por iniciador fue superior al 90% (Cuadro 8). Los patrones de amplificación generados con los tres iniciadores en las réplicas de la extracción se muestran en la Fig. 11.

Cuadro 8. Porcentaje de reproducción (R) de los fragmentos por iniciador en réplicas de la extracción de DNA de acículas.

<b>OPA-11</b>	<b>R (%)</b>	<b>OPA-08</b>	<b>R (%)</b>	<b>OPC-06</b>	<b>R (%)</b>
1900	91	1700	91	2200	100
1800	90	1100	91	1700	97
1500	95	950	100	1300	100
1300	90	850	90	1100	98
1200	90	750	100	900	100
1050	95	550	100		
900	98				
850	91				
750	100				
<b>Promedio</b>	<b>93 %</b>		<b>95 %</b>		<b>99 %</b>

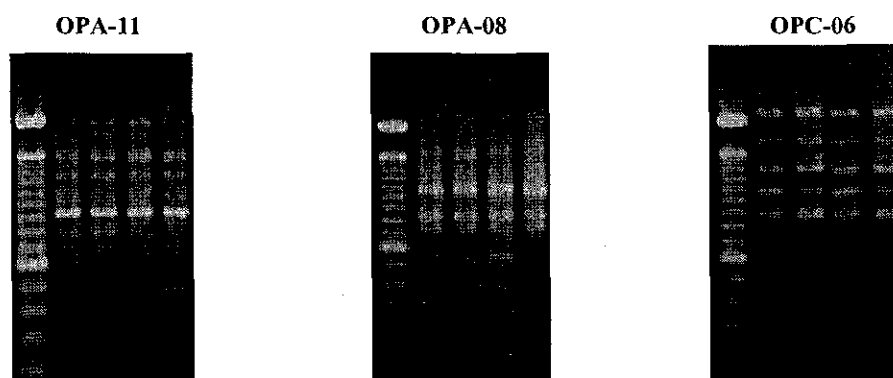


Fig. 11. Amplificación de RAPDs con OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en réplicas de la extracción de DNA de acículas.

Ha sido señalado que los marcadores RAPDs presentan problemas de reproducción entre diferentes laboratorios y aún entre réplicas de un mismo laboratorio (Wolfe y Liston, 1998; Harris, 1999; Ritland y Ritland, 2000). La reproducción de un marcador en particular puede ser afectada por diversos factores. Así, variaciones en la pureza del DNA, en la concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) y en la relación iniciador/DNA molde, pueden provocar modificaciones en los patrones de bandeo. Además, diferencias en las temperaturas de alineación y la utilización de diferentes tipos de polimerasas termoestables, pueden tener efectos sobre los patrones de RAPDs.

Aquellos marcadores RAPDs que amplifican aún con alineaciones incompletas, se espera que sean particularmente sensibles a cambios en el protocolo. Skroch y Nienhuis (1995) reportan un 76% de reproducción de los fragmentos RAPDs al analizar réplicas de la amplificación de genomas de *Phaseolus vulgaris*. La alta reproducibilidad de los marcadores observada en nuestro trabajo puede ser resultado de la optimización de la técnica PCR-RAPD, particularmente la definición de la concentración de  $MgCl_2$  por iniciador y de la selección de los iniciadores utilizados.

#### *Análisis de segregación*

El tamaño de la muestra ( $n=12$ ) en el análisis de segregación estuvo determinado por el número de árboles en los que se disponía de conos maduros. El desconocimiento de la fenología de la mayoría de las poblaciones de *P. ayacahuite* dificulta el muestreo de acículas y conos en buenas condiciones. Sin embargo, el número de gametófitos analizados por árbol en este estudio, es suficiente para la identificación de individuos heterocigotos, ya que la probabilidad de no detectarlos cuando se analizan de seis a ocho megagametofitos, es de 3 a 1% (Isabel *et al.*, 1999).

La amplificación del genoma de los 12 árboles con los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06, mostró 20 fragmentos en total. Se examinó la presencia de cada fragmento en el genoma de las acículas de cada árbol y el genotipo diploide (homocigoto para la presencia del fragmento AA o heterocigoto AB) se infirió a través del genotipo haploide de los gametofitos, la ausencia de un fragmento en las acículas y en los gametofitos identificó a los individuos homocigotos para el alelo nulo (BB). Del total de fragmentos analizados, siete resultaron monomórficos (OPA-08<sub>1700</sub>, OPA-08<sub>1100</sub>, OPA-08<sub>750</sub>, OPA-11<sub>1900</sub>, OPC-06<sub>2200</sub>, OPC-06<sub>1300</sub> y OPC-06<sub>900</sub>) mientras el resto



fue polimórfico de acuerdo al criterio de considerar un locus como polimórfico, cuando el alelo más común presenta una frecuencia menor a 0.95 (Hartl y Clark, 1989).

Uno de los loci polimórficos (OPC-06<sub>1100</sub>) mostró una clara distorsión de la segregación alélica (Cuadro 9). Los loci OPA-11<sub>1900</sub>, OPA-11<sub>1500</sub>, OPA-11<sub>1050</sub>, OPA-11<sub>900</sub> y OPA-08<sub>1700</sub> presentaron un exceso de alelos segregantes, sin embargo el tamaño de la muestra analizada (1 o 2 individuos heterocigotos), no fue suficiente para la definición de estos resultados, sería importante analizar un mayor número de individuos heterocigotos para estos marcadores.

Cuadro 9. Loci que mostraron distorsión de la segregación alélica.

Locus	Heterocigotos	No. de alelos		Exceso %
		positivos	nulos	
OPA-11 <sub>1900</sub>	1	2	3	20
OPA-11 <sub>1500</sub>	1	6	2	33
OPA-11 <sub>1050</sub>	2	13	8	23.8
OPA-11 <sub>900</sub>	1	3	2	20
OPA-08 <sub>1700</sub>	2	4	7	27
<b>OPC-06<sub>1100</sub></b>	5	22	14	22

En pinos es frecuente observar una distorsión de la segregación o desviación de la relación mendeliana esperada (1:1) en genes que codifican para proteínas, esta distorsión puede ser observada en la población o en árboles individuales (Ledig, 1998). Una de las explicaciones para este tipo de observaciones es la existencia de alelos egoístas (distorsionan la segregación), que afectan la meiosis incrementando la frecuencia con la cual se transmiten; el ligamiento de un locus determinado a este tipo de alelos resultará en una desviación de las relaciones mendelianas esperadas. Otra probable explicación, es la selección en contra de uno de los alelos durante los procesos de gametogénesis o embriogénesis (Ledig, 1998). Además, una distorsión en la segregación puede resultar del origen citoplasmático del marcador; en coníferas, las mitocondrias son de origen materno y los cloroplastos se heredan a través del polen

paterno. En el caso del análisis de segregación de los RAPDs es importante considerar la competencia que ocurre entre los sitios a los cuales se unen los iniciadores, un marcador en particular puede amplificar cuando el genoma se encuentra en un ambiente determinado y no en otro, esta competencia puede explicar en parte, la presencia de bandas no parentales en los segregantes (Wolfe y Liston, 1998).

Finalmente, es necesario señalar la importancia de aprovechar en el análisis genético de las gimnospermas, las características que presenta su biología. En estas plantas, podría determinarse el flujo genético a través de la migración del polen utilizando marcadores RAPDs. Esto sería posible comparando el genotipo haploide del megagametofito con el genotipo diploide del embrión; la ausencia del marcador en el genoma de las acículas de un determinado árbol implicaría la ausencia del marcador en los gametofitos del mismo árbol. Si efectivamente, no se observa el marcador en los gametofitos de las semillas de un árbol homocigoto para el alelo nulo, pero se encuentra presente en los embriones, entonces el marcador tendría un origen paterno. En plantas polinizadas por viento con semillas muy grandes, como es el caso del complejo *P. ayacahuite-P. strobiformis*, la dispersión por polen contribuye mucho más al flujo genético que la dispersión por semillas (Kremer *et al.*, 1991). Generalmente, en plantas, el nivel de flujo genético es inferido indirectamente a partir de las frecuencias alélicas, se calcula el valor de  $F_{ST}$  (diferenciación entre poblaciones) y este valor es aplicado para estimar el número de migrantes por población ( $m$ ) (Ouborg, *et al.*, 1999). Sin embargo  $m$  considera el movimiento de los genes debido tanto a la migración de la semilla como a la del polen. La identificación de homocigotos para el alelo nulo de un determinado marcador RAPD y la inferencia de la aportación paterna al embrión permitirían el cálculo de las frecuencias alélicas en los embriones. El análisis de los megagametofitos y embriones de las semillas de un determinado número de árboles homocigotos para el

alelo nulo reflejaría las frecuencias alélicas (p y q) en los embriones. La comparación de estas frecuencias con las frecuencias alélicas en los árboles adultos de la población proporcionaría una medida directa del flujo genético debido al evento de polinización.

### **Conclusiones**

- Las concentraciones de  $MgCl_2$  y *Taq* pol son determinantes en el resultado de la reacción de PCR-RAPDs.
- Se recomienda la optimización de la concentración del cofactor por iniciador en la reacción PCR-RAPDs. Trece de un total de 69 iniciadores produjeron un patrón de amplificación claro en *P. ayacahuite*, las concentraciones del cofactor en las reacciones de amplificación variaron de acuerdo al iniciador.
- Se observaron los mismos patrones de amplificación de marcadores RAPDs con los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en genoma diploide (acículas y embriones) y en genoma haploide (megagametofito) de pinos. Es posible trabajar marcadores RAPDs utilizando cualquiera de las fuentes de DNA mencionadas.
- La reproducibilidad de los marcadores RAPDs fue superior al 90 % tanto en las replicas de la reacción de amplificación, como en las reacciones de amplificación en réplicas de la extracción del DNA molde. Es probable que la optimización de las condiciones de las reacciones PCR-RAPDs y el empleo de iniciadores seleccionados, incrementen la reproducibilidad de los fragmentos amplificados.

- Con excepción de un marcador, el resto de los RAPDs analizados presentaron la segregación esperada para herencia mendeliana. Esto demuestra indirectamente el origen nuclear de los marcadores. Es importante señalar que es necesario aumentar el número de individuos heterocigotos analizados para definir claramente el patrón de segregación de los loci OPA-11<sub>1900</sub>, OPA-11<sub>1500</sub>, OPA-11<sub>1050</sub>, OPA-11<sub>900</sub> y OPA-08<sub>1700</sub>.

### Literatura citada

- Beaumont, V.H., Mantet, J., Rocheford, T.R. 1996. Comparison of RAPD and RFLP markers for mapping  $F_2$  generations in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 93: 606-612.
- Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G. 1993. En: Wu, R. (Ed.) Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods in enzymology*, Academic Press, Inc., New York, pp 295-309.
- Bucci, G., Vendramin, G.G., Lelli, L., Vicario, F. 1997. Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. Endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1138-1146.
- 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.
- Conner J.K., and Hartl D.L. 2004. A primer of ecological genetics. Sinauer Associates, Inc., USA. pp 9-45.
- 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.
- 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, Sunderland, Mass. USA, pp 249- 230.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1999. Nuclear protein-coding genes in phylogeny reconstruction and homology assessment: some examples from Leguminosae. En: Hollingsworth P. M, Bateman R. M., Gornall R. J. (Eds.) *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor & Francis, London and New York.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Eguiarte, L. E., Castrillo, A., Souza, V. 2003. Evolución molecular y genómica en angiospermas. *Interciencia* 28. 141-147.
- Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D., Honeycutt, L.R. 1993. Artifactual variation in Random Amplified Polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 14: 214-217.

- Ennos, R.A., Sinclair, W.T., Hu, X.S., Langdon, A. 1999. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant population. En: Hollingsworth P. M, Bateman R. M., Gornall R. J. (Eds.) *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor & Francis, London and New York, pp 1-19.
- 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.
- 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.
- Harris, S.A. 1999. RAPDs in systematics – a useful methodology? En: P.M. Hollingsworth, R.M. Batesman, R.J. Gornall (Eds.) *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor & Francis, London and New York, pp 211-228.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1989. Population structure of multilocus associations. *Proceedings of National Academy of Science USA* 78: 5913-5916.
- Hurme, P., Savolainen, O. 1999. Comparison of homology and linkage of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers between individual trees of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Molecular Ecology* 8: 15-22.
- 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.
- Isabel, N., Beaulieu, J., Thériault, P., Bousquet, J. 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Molecular Ecology* 8: 477-483.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudense des Sciences Naturelles* 44: 223-270.
- Kremer, A., Petit, R.J., Zanetto, A., Fougere, V., Ducouso, A., Wagner, D. B., Chauvin, C. 1991. Nuclear and organelle gene diversity in *Quercus robur* and *Q. petraea*. En: Müller-Starck G., and Ziehe, M. (Eds.) *Genetic variation in european populations of forest trees*. Sauerländers-Verlag, Frankfurt am Main, Germany, pp 141-166.

- Lanner, C., Bryngelsson, T., Gustafsson, M. 1996. Genetic validity of RAPD markers at the intra-and inter-specific level in wild brassica species with  $n=9$ . *Theoretical and Applied Genetics* 93: 9-14.
- Lee, S.W., Ledig, T.F., Johnson, D.R. 2002. Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus Longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California. *American Journal of Botany* 89: 566-577.
- 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.
- Lynch, M., Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- 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. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70: 3321-3323.
- 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 Systematics* 3/2: 93-114.
- O' Malley, D.M., Whetten, R. 1997. Molecular markers and forest trees. DNA markers En: Caetano-Anollés G., Gresshoff, P. M. (Eds.) Protocols and Overviews. pp 237-257.
- 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.
- Ouborg, N.J., Piquot, Y., Van Groenendael, J.M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87: 551-568.
- Plomion, C., Bahrman, N., Durel, C.E., O'Malley, D.M. 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* 74: 661-668.

- Reisenberg, L.H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* 5: 99-105.
- Ritland, C., Ritland, K. 2000. DNA fragments markers in plants. En: Baker, A.J. (Ed.) *Molecular methods in ecology*. Blackwell Science Ltd, pp 208-234.
- Sambrook, J., Fritsh E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor pp 6.12.
- Skroch, P., Nienhuis, J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1086-1091.
- Szmidtl, 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.
- Thomas, B.R., McDonald, S.E., Hicks, M., Adams, D.L., Hodgetts, R.B. 1999 Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 793-801.
- Thorman, C E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A., Tivang, J.G., Osborn, T.C. 1999. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 973-980.
- 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, Massachusetts USA, pp 43-86.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals Eugenics* 15: 323-354.
- Wu, J., Krutovski, K.V., Strauss, S.H. 1999. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome* 42: 893-908.



Zhang, D.X., Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.

### **CAPÍTULO III**

#### **GENETIC RELATIONSHIPS AMONG MEXICAN WHITE PINES (*Pinus*, Pinaceae) BASED ON RAPD MARKERS.**

## Trabajo enviado a: Biochemical Systematics and Ecology.

**Abstract**

RAPD markers were used to assess genetic relationships among four species of Mexican white pines. Pooled DNA samples from ten populations were included in this study. A total of 247 bands were amplified with 69 arbitrarily chosen primers. The estimated Jaccard differences among populations varied from 0.571 to 0.989. Polymorphisms were sufficient to differentiate and cluster populations within the *Pinus chiapensis* and *P. ayacahuite*-*P. strobiformis* groups. *Pinus lambertiana* appeared clearly different from these two groups. On the other hand, the analysis of RAPDs at DNA individual level revealed a total of 27 bands amplified with 4 selected primers. The AMOVA (analysis of molecular variance) analysis performed on RAPD data showed that most of the phenotypic diversity was explained by species and within-populations differentiation. The resulting UPGMA dendrogram derived from this analysis confirmed the close relationship between *P. ayacahuite* and *P. strobiformis*. The species relationships revealed by RAPD markers were consistent with the relationships based on morphological data and ITS sequencing data. In conclusion, the analysis of RAPDs confirmed the distinctiveness of *P. chiapensis*, *P. lambertiana* and *P. ayacahuite* but did not support *P. strobiformis* as a species distinct from *P. ayacahuite*.

**Key words:** Mexican white pines, RAPDs, genetic relationships, genetic diversity.

## Introduction

Mexico, with 42 species and 18 infraspecific taxa, is an important center of diversity for the genus *Pinus* (Farjon & Style, 1997). Differentiation among populations of conifers is more pronounced in Mexico than in further northern latitudes (Delgado *et al.*, 1999; Aguirre-Planter *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 2002). Since major diversity occurs in regions with great and abrupt changes in topography (Ledig, 1998), high levels of genetic differentiation within Mexican conifers have been attributed to restricted gene flow, genetic drift or selection (Aguirre-Planter *et al.*, 2000). Taxonomic studies on Mexican pine species are mainly based on morphological data; however, subtle morphological differences between species or among populations within a particular species frequently lead to taxonomical controversies. A clear taxonomical definition is a necessary first step to guide efforts to conserve biodiversity, hence the establishment of genetic relationships within the genus *Pinus*, based on molecular and morphological data, may provide a better solution to taxonomic problems.

Mexican white pines (*Pinus*, subgenus *Strobus*, section *Strobus*, subsection *Strobi*) are a valuable natural resource as they play an essential role in ecological processes and are an important source of timber. The group includes *Pinus strobiformis* Engelm., *P. ayacahuite* Ehrenb. ex Schltld., *P. lambertiana* Dougl., *P. chiapensis* (Martínez) Andresen and *P. flexilis* var. *reflexa* Engelm. (Price *et al.*, 1998). Most species grow at altitudes above 2000 m, on fertile soils, on wet sites in tropical and subtropical environments. *Pinus strobiformis* and *P. ayacahuite* exhibit the largest geographic distribution of the group in Mexico and *P. lambertiana* is now a day restricted to one population in San Pedro Martir, Baja California (Farjon & Styles, 1997). *Pinus strobiformis* and *P. ayacahuite* constitute a “species complex”, a north-south clinal variation in cone morphology and in the development of the seed wing occur in these

two taxa. This cline has led to *P. strobiformis* and *P. ayacahuite* being considered as either a pair of closely related species (Perry, 1991; Price *et al.*, 1998; Bruederle *et al.*; 2001) or a single species (Carvajal & McVaugh, 1992; Wright *et al.*, 1996). Within the complex, taxonomists disagree on the identity of populations with intermediate morphological characters. Phylogenetic analysis of *Pinus* based on partial ITS region (Liston *et al.*, 1999) and chloroplast DNA sequences (Gernandt *et al.*, 2005) did not include *P. strobiformis*. Moreover, in those works relationships within subsection *Strobi* were poorly resolved.

The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers for the study of interspecific relationships has been questioned because the possible lack of homology of co-migrating bands might reveal unreliable phylogenies (Harris, 1999). However, recent work showed that RAPDs have been successfully employed in several plant genera included *Pinus*, to reveal genetic relationships at the sectional and subsectional level (Furman *et al.*, 1997; Nebauer *et al.*, 2000; Dvorak *et al.*, 2000; Roman *et al.*, 2003; Mehrnia *et al.*, 2005). Identification and characterization of RAPD fragments among eight pines showed that RAPD analysis is a reliable tool to determine their genetic relationships (Nkongolo *et al.*, 2002). We expect that the analysis of Mexican white pines with RAPD markers will help to clarify their genetic relationships at population and species levels and therefore the taxonomical status of *P. strobiformis*.

In this study, we analyzed RAPD differentiation among ten populations of Mexican white pines, using two approaches: 1) Marker variation among pooled DNA samples, and 2) marker variation among individual DNA samples.

## Materials and methods

### *Plant material*

Needle samples from 176 individual pine trees were collected in Mexico from 2001 to 2004 (Table 1). Three natural populations of each species distributed along a latitudinal gradient were included in the present analysis: *P. chiapensis*, *P. strobiformis* and *P. ayacahuite*, and the unique existing population of *P. lambertiana* in Mexico (Fig. 1). In each case individual trees were separated from each other by at least 50 m. Needle samples were kept in a fresh environment after collection and promptly stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Table 1. Sampled populations of Mexican white pines, number of plants sampled at each site and exact locality.

Sample	Taxon	Locality	No. of individuals	Latitude ( $^{\circ}\text{N}$ )	Longitude ( $^{\circ}\text{O}$ )
1	<i>P. lambertiana</i>	San Pedro Mártir, B. C.	20	23 $^{\circ}$ 00'	115 $^{\circ}$ 33'
2	<i>P. strobiformis</i>	Bocoyna, Chih.	21	20 $^{\circ}$ 43'	107 $^{\circ}$ 40'
3	<i>P. strobiformis</i>	Cerro el Potosí, N. L.	24	24 $^{\circ}$ 53'	100 $^{\circ}$ 13'
4	<i>P. strobiformis</i>	Pueblo Nuevo, Dgo.,	23	23 $^{\circ}$ 43'	105 $^{\circ}$ 33'
5	<i>P. ayacahuite</i>	Las Palmas, Mich.	22	19 $^{\circ}$ 40'	102 $^{\circ}$ 25'
6	<i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	San Rafael, Edo. de México	20	19 $^{\circ}$ 55'	98 $^{\circ}$ 44'
7	<i>P. ayacahuite</i>	Tuxtepec, Oax.	23	17 $^{\circ}$ 24'	96 $^{\circ}$ 30'
8	<i>P. chiapensis</i>	Tlapacoyan, Ver.	5	19 $^{\circ}$ 55'	97 $^{\circ}$ 15'
9	<i>P. chiapensis</i>	El Mohón, Pue.	6	19 $^{\circ}$ 53'	97 $^{\circ}$ 16'
10	<i>P. chiapensis</i>	Bochil, Chis.	18	16 $^{\circ}$ 59'	92 $^{\circ}$ 50'



Fig. 1. Geographic location of the 10 Mexican white pine populations sampled in a latitudinal gradient.

#### *DNA extraction and pooled samples*

The needles were flash-frozen in liquid nitrogen and ground in a mortar to a fine powder. Total genomic DNA was extracted from 176 individual samples following the CTAB method of Doyle & Doyle (1990) with minor modifications. DNA quality and concentration were determined visually on agarose gels and by UV spectrophotometry. DNA samples were then diluted in MilliQ water at a final concentration of 20 ng/ $\mu$ L. Pooled DNA samples from each population were obtained by mixing 500 ng of genomic DNA from each one of 5 to 6 individual DNA samples (Furman *et al.*, 1997). Thus, each pooled sample was composed of 5 to 6 diploid genomes, representing 10 to

12 haploid genotypes. Duplicated pools were obtained for each of the ten studied populations and amplified by PCR in separate experiments.

#### *RAPD amplification*

PCR reactions were performed according to Williams *et al.* (1990) with minor modifications. Each RAPD reaction (25  $\mu$ L final volume) contained 0.75 U of *Taq* polymerase (Applied Biosystems, Inc., Calif., USA), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.2  $\mu$ M of primer (Operon Tech., Calif., USA) and 40 ng of genomic DNA. Amplifications were carried out in a MJ Research PTC-0100 Thermal Cycler programmed as follows: A first step of 3 min at 94 °C, followed by 45 cycles of 1 min at 94 °C, 2 min at 36 °C and 2 min at 72 °C, with a final additional step of 10 min at 72 °C. A total of 69 primers (series OPA, OPB, OPBB and primers OPC-1 to OPC-9) were assayed on pooled samples. Four primers (OPA-8, OPA-11, OPB-1 and OPB-4) that exhibited polymorphisms and showed the best readability were selected for the study of individual DNA samples from each population. Fragments generated by amplification were separated by size on a 1.8 % agarose gel run in 1X TBE buffer at 100 V for 4 h, stained with ethidium bromide, and visualized on an UV Transilluminator. Gels were photographed with a Kodak DC40 digital camera.

#### *RAPD data analysis*

DNA fragments were analyzed visually and with the help of the EDAS Kodak photo documentation system (version 3.02). Weak amplification bands and those fragments that were different between the two sets of pooled DNA samples were not scored. DNA fragment sizes were estimated by comparison with the DNA size marker (Gibco 100



bp). Amplified fragments were scored according to their presence (1) or absence (0) to create binary data matrices.

Two strategies were followed to investigate the genetic relationships among Mexican white pines. First, the pooled samples data matrix was entered into the NTSYS-pc program version 2.11 N and the pair-wise distances matrix was computed based on Jaccard similarity coefficients (Jaccard, 1908). An Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average (UPGMA) dendrogram was constructed. A cophenetic matrix was derived from the similarity matrix and the goodness of fit of the cluster was tested by comparing the original similarity matrix with the cophenetic matrix using the Mantel matrix correspondence (Mantel, 1967). In a second stage, the individual sample data matrix was used to analyze genetic diversity at the population level. Genetic diversity was estimated by computing the mean number of pair-wise differences over each locus among RAPDs binary phenotypes using the algorithm of Arlequin 1.1 software (Excoffier *et al.*, 1992). An Euclidian distance matrix was computed and used to produce an analysis of molecular variance (AMOVA). The genetic distances average per species was obtained using the MEGA ver. 2.1 program and an UPGMA dendrogram was thus generated.

## **Results**

### *RAPD amplification*

Out of the 69 primers employed to detect genetic differences among the pooled samples, 47 (68%) detected at least one RAPD marker, 19 showed amplifications without detection of polymorphism, while three gave a weak or no amplification. A total of 247 bands were generated on the accumulated genomes. The size of the amplified fragments

ranged from 1900 to 400 bp. Only those bands that showed clear amplification on the two sets of pooled samples were scored as markers to ensure the reproducibility of the RAPD markers information. The number of amplified bands per primer varied from 1 to 11, with an average of 3.5. A total of 139 polymorphic RAPD bands were scored. The number of polymorphic bands per primer varied from 0 to 9 with a mean of 1.5. Some of the markers amplified only in one species: 23 bands amplified exclusively in *P. chiapensis*, 23 in both *P. ayacahuite* and *P. strobiformis*, and 10 only in *P. lambertiana*. Populations of *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* showed similar amplification patterns. We did not find any band exclusive of *P. ayacahuite* nor *P. strobiformis* (Fig. 2). A total of 108 monomorphic markers were shared across all the taxa.

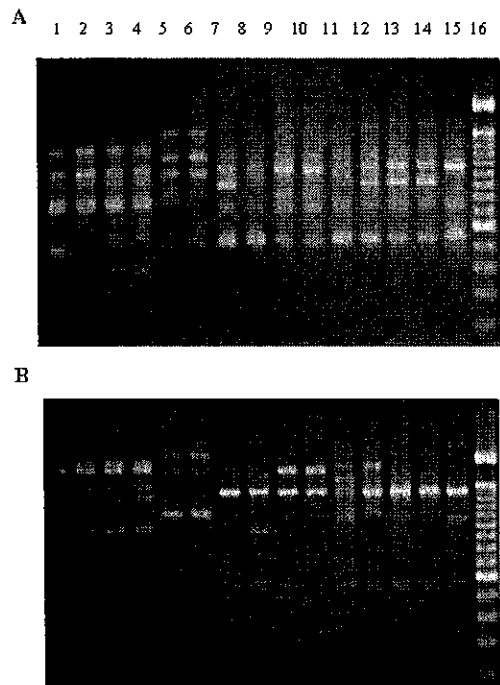


Fig. 2. RAPD amplification patterns with primers A-08 (A) and A-16 (B). Lane 1-4 contain the amplified products from DNA pooled samples of *P. chiapensis*, lane 5-6 from *P. lambertiana*, lane 7-10 from *P. strobiformis*, lane 11-15 from *P. ayacahuite* and lane 16 contains 100 bp DNA ladder.

The four selected primers used to screen the 176 individual genotypes amplified a total of 27 bands, ranging in size from 1450 to 550 bp. The total number of amplified bands per primer varied from 5 (OPB-1) to 9 (OPA-8). Some of the markers amplified exclusively in one species: bands OPB1-600, OPA8-1100 and OPA11-600 (*P. chiapensis*), band OPA11-550 (*P. lambertiana*). *Pinus ayacahuite* and *P. strobiformis* shared amplification patterns for all primers.

### *Genetic relationships*

RAPD markers differences among the pooled DNA samples were analyzed to infer genetic relationships among populations within species. The estimated Jaccard similarity coefficients varied from 0.989 to 0.941 in *Pinus chiapensis*, 0.970 to 0.907 in *P. strobiformis* and 0.970 to 0.959 in *P. ayacahuite*. When compared with *P. ayacahuite* var. *veitchii*, the two populations of typical *P. ayacahuite* were more similar to each other. The similarity coefficients among populations of white pines varied from 0.970 in *P. ayacahuite* from Oaxaca and *P. strobiformis* from Chihuahua to 0.571 in *P. lambertiana* and *P. chiapensis* from Veracruz. Likewise, the similarity coefficients of populations within the *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* complex ranged from 0.907 to 0.970. The original Jaccard similarity coefficient matrix and the cophenetic value matrix derived from the phenetic analysis were compared using the Mantel matrix correspondence test. A cophenetic of  $r = 0.99$  was obtained, which indicates a good fit between the original similarity matrix and the resulting clustering analysis. The UPGMA dendrogram (Fig. 3) separated the populations into two main groups: 1) A cluster formed by populations of *P. chiapensis* and 2) a cluster containing populations of *P. ayacahuite* and *P. strobiformis*. The population of *P. lambertiana* was clearly different from these two groups. Although the populations of *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* were quite close in the cluster, *P. ayacahuite* formed a subgroup and two out of three populations of *P. strobiformis* grouped together. Within this group, the population of *P. strobiformis* from Nuevo León was the most divergent. Within the *P. ayacahuite* subgroup, the two populations of *P. ayacahuite* were more similar.

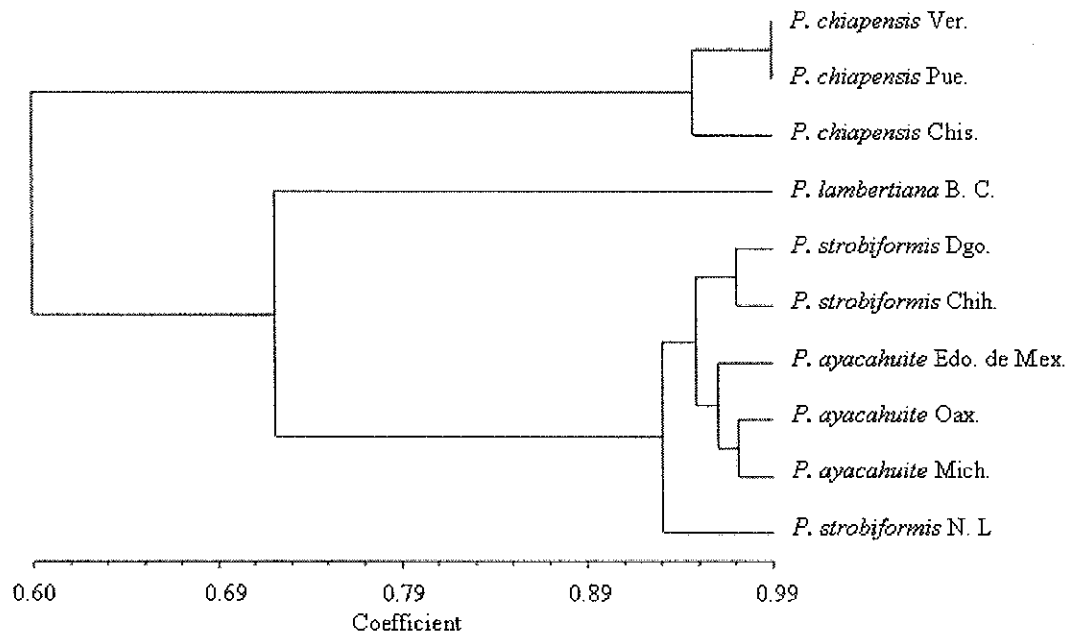


Fig. 3. UPGMA dendrogram based on RAPD data generated from DNA pooled samples of ten Mexican white pine populations.

To further evaluate the relationships among species, individual RAPD haplotypes were used to estimate population differentiation. A genetic distance average by species was obtained and used to infer genetic relationships among Mexican white pines. The AMOVA analysis performed on RAPDs showed that about 49 % of the diversity was explained by within-population variation, 45 % was attributable to differences among species and only 5 % to differences among populations within species (Table 2). The resulting UPGMA dendrogram (Fig. 4) confirmed the

distinctness of *P. chiapensis*, *P. lambertiana* and *P. ayacahuite* and the closeness of *P. strobiformis* and *P. ayacahuite*. A close relationship was revealed between *P. lambertiana* and the *P. ayacahuite*-*P. strobiformis* complex.

Table 2. AMOVA analysis results for differentiation of Mexican white pines.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among species	3	230.290	1.78281	45.08
Among populations within species	8	36.369	0.21342	5.40
Within populations	165	323.165	1.95857	49.52
Total	176	589.824	3.95480	100.00

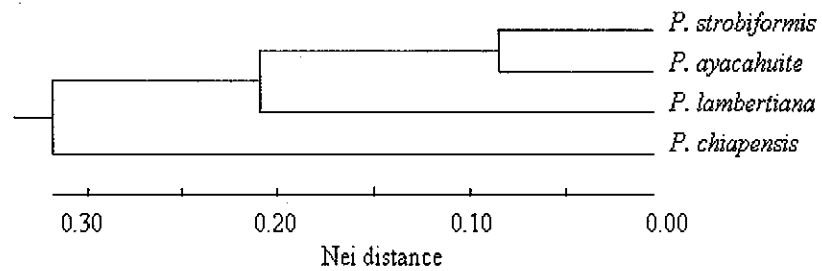


Fig. 4. UPGMA dendrogram based on RAPD data generated from individual samples of four Mexican white pine species.

### Discussion

Although Mexican white pines have been included in phylogenetic studies based on molecular data (Perez de la Rosa *et al.*, 1995; Liston *et al.*, 1999; Gernandt *et al.*, 2005) genetic relationships within the group and the taxonomical identity of *P. strobiformis* have not been completely resolved. Apparently this work constitutes the first

application of RAPD markers for the study of relationships among white pines in Mexico.

Genetic differences among Mexican white pine taxa were successfully identified by the DNA pooling strategy used to find RAPD markers. The pooling strategy discounts low-frequency variation within taxa and only abundant high-frequency bands are detected (Furman *et al.*, 1997). In this study an average of 1.5 polymorphic markers per primer was obtained. The number of markers identified per primer is often higher in plants (5-20). However, our findings are similar to the 1.85 intense and reproducible RAPD markers per primer obtained in the analysis of Mexican hard pine species (Furman *et al.*, 1997). Even though some marker fragments amplified exclusively in one species, their genome specificity needs to be confirmed (Nkongolo *et al.*, 2002). Our results are consistent with the morphological similarities observed between *P. ayacahuite* and *P. strobiformis*, as we did not find any exclusive RAPD marker to differentiate them at molecular level.

RAPD data on pooled DNA samples clearly were able to differentiate and cluster populations within the *P. chiapensis* and *P. ayacahuite-strobiformis* groups. A correlation between geographical site and genetic distance is observed in the group of *P. chiapensis*. This suggests that, following isolation by distance, genetic differentiation in this taxon might be influenced by genetic drift and gene flow. Within the *ayacahuite-strobiformis* group, the clustering analysis reveals a low degree of genetic differentiation among populations of *P. ayacahuite* and populations of *P. strobiformis*. Further studies with a larger number of populations will be performed to confirm this result. Within this group, the population from Cerro el Potosí in Nuevo León, the only population sampled in the Sierra Madre Oriental is clearly more differentiated. It is worth mentioning that there is disagreement on the taxonomic status of specimens



collected in this locality, and they have been named *P. reflexa* (Rushforth, 1987) and *P. strobiformis* var. *potosiensis* (Silva, 1990). We suggest that several species of white pines coexist in Cerro el Potosí and that abiotic factors and introgression explain in part the variation observed in cone size.

Since product competition is a major source of errors in RAPD data scoring and may be enhanced in pooled DNA samples (Harris, 1999), RAPD markers were also analyzed on DNA from single plants. Genetic relationships among species are evident in the dendrograms generated from both kinds of data. *Pinus chiapensis*, *P. lambertiana* and *P. ayacahuite* are clearly shown as distinct species. According to our results, *P. strobiformis* is very similar to *P. ayacahuite*, the similarity indices show higher divergences among the morphologically well-differentiated species included in this study. The estimated average genetic distance between *P. strobiformis* and *P. ayacahuite* with RAPD markers is lower than 0.1; Furman *et al.* (1997), reported genetic distances from 0.111 to 0.077 when comparing populations within species of hard pines, and from 0.173 to 0.740 when species are compared. In our dendrograms *P. lambertiana* appears closer to the *P. strobiformis*-*P. ayacahuite* complex than to *P. chiapensis*. Interestingly, the status of *P. strobiformis* as a species or as a variety of *P. ayacahuite* has been subject to debate. Early observations based on cone and seed wing size variation recognized *P. ayacahuite* var. *veitchii* and *P. ayacahuite* var. *brachyptera*, and *P. strobiformis* was placed into synonymy with the latter (Shaw, 1909). This was accepted by Martínez (1948), who reported the occurrence of *P. ayacahuite* in southern Mexico, *P. ayacahuite* var. *veitchii* in central and *P. ayacahuite* var. *brachyptera* in northern Mexico. Perry (1991) accepted *P. strobiformis* and *P. ayacahuite* as two distinct but sympatric taxa, the former having wingless seeds and shorter leaves. Our

results suggest that *P. strobiformis* should be considered as a subspecies or as a variety of *P. ayacahuite*.

The position of white pines in the cladogram constructed by Farjon and Styles (1997), based on 20 morphological characters is consistent with the dendrogram based on RAPD data obtained here, except for *P. strobiformis*, which morphologically appears clearly differentiated from *P. ayacahuite*. Furthermore, the genetic relationships of white pines in our dendrogram are similar to the relationships revealed on the phylogenetic tree based on nrDNA ITS sequences (Liston *et al.*, 1999). However, *P. strobiformis* was not included in the ITS analysis.

We conclude that RAPD variation is useful in establishing genetic relationships within and between Mexican white pine species, and the obtained results do not allow us to suggest that *P. strobiformis* is a distinct species from *P. ayacahuite*. In the future, the inclusion of *P. flexilis* in the analysis with RAPD markers and the complementing of molecular data with other techniques will improve the resolution of genetic relationships and the boundaries of Mexican white pines.

### **Acknowledgements**

P. C. was supported by a fellowship from CONACYT 33129-B (ID 3160). This work was supported by SEP-CONACYT grant (33129-B), Universidad de Guadalajara (02/SA-CI/DBCM/4.2/083) and PROMEP-CA03 Biología Celular y Molecular (CGA/III/1179/04) to A.R.V.A.

## References

- Aguirre-Planter, E., Furnier, G.R., Eguiarte, L.E., 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from Southern Mexico and Guatemala. *Am. J. Bot.* 87, 362-371.
- Bruederle, L.P., Rogers, D.L., Krutovskii, K.V., Politov, D.V., 2001. Population genetics and evolutionary implications. In: Tomback, D.F., Arno, S.F., Keane, R.E., (Eds.) *Whitebark Pine communities*. Island Press, Washington D.C., pp 137-153.
- Carvajal, S., McVaugh, R., 1992. Gymnosperms and Pteridophytes. In: Anderson, W.R. (Ed.) *Flora Novo-Galiciana*, Ann Arbor 17. University of Michigan Herbarium, Michigan, pp. 32-100.
- Delgado, P., Piñero, D., Chaos, A., Pérez-Nasser, N., Alvarez-Buylla, E.R., 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican Pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* 86, 669-676.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- Dvorak, W.S., Jordon, A.P., Hodge, G.R., Romero, J.L., 2000. Assessing evolutionary relationships of pines in the *Oocarpae* and *Australes* subsections using RAPD markers. *New Forest* 20, 163-192.
- 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., Styles, B.T., 1997. *Pinus* (Pinaceae) Flora Neotropica. Monograph 70. 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. *Mol. Ecol.* 6, 321-331.
- Gernandt, D.S., Geda, G., Ortiz, S., Liston, A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54: 29-42.
- Harris, S.A., 1999. RAPDs in systematics – a useful methodology? In: Hollingsworth, P.M., Batesman, R.M., Gornall, R.J. (Eds.) *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, London, pp. 211-228.
- Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44, 223-270.
- Ledig, F.T., 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson, D.M. (Ed.) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 251-280.

- Liston, A., Williams, A.R., Piñero, D., Alvarez-Buylla, E.R., 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 11, 95-109.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209-220.
- Martínez, M., 1948. *Los Pinos Mexicanos*. Ediciones Botas. México.
- Merhnia, M., Zarre, S., Sokhan-Sanj, A., 2005. Intra- and Inter.-specific relationships within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 149-158.
- Nebauer, S.G., del Castillo-Agudo, L., Segura, J., 2000. An assessment of genetic relationships within the genus *Digitalis* based on PCR-generated RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 1209-1216.
- Newton, A.C., Alnutt, T.R., Dvorak, W.S., 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.
- Nkongolo, K.K., Michael, P., Gratton, W.S., 2002. Identification and characterization of RAPD markers inferring genetic relationships among pine species. *Genome* 45, 51-58.
- Pérez de la Rosa, J., Harris, S.A., Farjon, A., 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theor. Appl. Genet.* 91, 1101-1106.
- Perry, J.P., 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, O.R.
- Price, R.A., Liston, A., Strauss, S.H. 1998. Phylogeny and Systematics of *Pinus*. In: Richardson, D.M. (Ed.) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 49-68.
- Román, B., Alfaro, C., Torres, A.M., Moreno, M.T., Satovic, Z., Pujada, A., Rubiales, D., 2003. Genetic relationships among *Orobanchae* species as revealed by RAPD analysis. *Ann. Bot.* 91, 637-642.
- Rushforth, K.D., 1987. *Conifers*. Christopher Helm. London.
- Shaw, G.R., 1909. *The Pines of Mexico*. Harvard University. Cambridge.
- Silva, J., 1990. A supplement to the International Census of the Coniferae, II. *Phytología* 68, 7-78.
- Williams, J.G.K., 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 Acids Res.* 18, 6531-6535.

Wright JA, Marín A, Dvorak W. 1996. *Ex situ* conservation of *Pinus ayacahuite*. Forest Genetic Resources No. 24. FAO.

## CAPÍTULO IV

### **DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE OF THE *Pinus ayacahuite* AND *P. strobiformis* COMPLEX AS REVEALED BY RAPDs**

**Abstract**

We studied the population structure of *Pinus ayacahuite* and *P. strobiformis* complex by assessing random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation in eleven populations distributed along a latitudinal gradient in Mexico. Of 69 primers screened, 13 that amplified 51 intense and reproducible fragments were chosen for the study. None of the 51 fragments were unique to a population. Genotypic diversity ranged from 0.223 to 0.296 among populations and average 0.255 for *P. ayacahuite*, 0.270 for *P. strobiformis* and 0.261 for all 11 populations. Phenotypic diversity ranged from 0.124 to 0.166 and average 0.149 for all populations.  $G_{ST}$  values and analysis of molecular variance (AMOVA) showed that most variation was within populations but differentiation values in *P. strobiformis* were twice those in *P. ayacahuite*. Cluster analysis indicated closer relationships among most of the populations from a same geographical region but populations from the Northern region were more differentiated than populations from the Central and Southern regions. Management of *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* complex in Mexico should be aimed to maintain morphologically and genetically well differentiated populations with the highest levels of genetic variation.

## Introduction

The main goal of genetic conservation is to preserve the evolutionary potential of species. The long-term survival and evolution of every species depends on the available diversity in its present habitat. The levels and distribution of genetic diversity among populations of woody plant species are correlated with such factors as breeding systems (Lande and Schemske, 1985), geographical range, seed dispersal mechanisms and regional distribution (Hamrick and Godt, 1996). Specifically, conifers with wide geographical range show high genetic diversity within populations and little differentiation (Molina-Freaner *et al.*, 2001). Reproductive characteristics such as outcrossing mode, wind pollination, effective mechanisms of seed dispersal, high fecundity, and flexible mating systems have been cited as determinants of their population genetic structure. Furthermore, disjunct distribution and environmental gradients also influence the genetic structure of conifers (Ledig, 1998; Gibson and Hamrick, 1991).

*Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schtdl. and *P. strobiformis* Engelm. are important components of forest ecosystems in Mexico. Economically these pines are valuable sources of timber as they are the tallest growing and most regular shaped representatives of Mexican white pines (Farjon & Styles, 1997). They grow on well drained soils as discrete populations located in mountain areas at altitudes of 1500-3600 m. Morphologically *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* along with *P. flexilis* form a species complex. *Pinus strobiformis* grows from southwestern Colorado and northern Arizona to northern Mexico; and *P. ayacahuite* ranges from El Salvador and north of Honduras to central Mexico. North-south clinal variations in cone morphology and seed wing development occur in these two taxa. Taxonomically two varieties of *P. ayacahuite* are recognized; the var. *brachyptera* is the Mexican northern representative of *P.*



*ayacahuite* and the var. *veitchii* grows sympatrically with *P. ayacahuite* in central Mexico (Martínez, 1948). The variety *brachyptera* has been treated as synonymous with the wingless seeded *P. strobiformis* (Shaw, 1914; Wright *et al.*, 1996). *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* are so closely related that frequently taxonomists disagree on the identity of populations with intermediate morphological characters.

As a consequence of the overexploitation, Mexican populations of *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* are suffering degradation and studies of genetic variability within the complex have been limited to a few inherited quantitative traits and enzyme loci. We examined geographic variation in morphological characters and found a north-south cline in the development of the seed wing, with *P. strobiformis* approaching *P. ayacahuite* in its more southern populations. Surveys of enzyme polymorphisms revealed that *P. strobiformis* and *P. ayacahuite* are closely related genetically (Ledig, 1998). However, the population structure and genetic affinities within these taxa require clarification.

There is a poor understanding of the effects of ecological factors on the genetic variability of the *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* complex, differences in ecological traits, such as seed dispersal mechanisms and in the isolation, deforestation and forest fragmentation of populations within the complex, might have serious consequences on the genetic diversity. The main purpose of this study is to assess the levels and distribution of genetic variation within *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* as independent taxa and within the complex through the use of random amplified DNA (RAPD) markers, in an attempt to contribute toward the definition of genetically distinctive units for conservation.

## Materials and Methods

### *Plant material*

A total of 264 needle samples were collected from four populations of *P. strobiformis* and seven populations of *P. ayacahuite* of Mexico during a four years period (2001-2004) Table 1. Populations were distributed along a latitudinal gradient and were representatives of the distribution range of the complex *P. ayacahuite-strobiformis* in Mexico (Table 1, Figure 1). The number of trees sampled from each population varied from 23 to 30 and selected trees were separated by a minimum of 50 m within each population. Samples were kept in a fresh environment after collection and promptly stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Table 1. Details of *Pinus strobiformis* and *Pinus ayacahuite* populations sampled for molecular analysis

Taxon	Population	No. of plants	Region	Latitude ( $^{\circ}\text{N}$ )	Longitude ( $^{\circ}\text{E}$ )	Altitude (m)
<i>P. strobiformis</i>	1 Cananea, Son.	24	North	31 $^{\circ}$ 03'	110 $^{\circ}$ 22'	2470
	2 Bocoyna, Chih.	23	North	20 $^{\circ}$ 43'	107 $^{\circ}$ 40'	2470
	3 Cerro el Potosí N.L.	25	North	24 $^{\circ}$ 51'	100 $^{\circ}$ 13'	3116
	4 Pueblo Nuevo, Dgo	23	North	23 $^{\circ}$ 37'	105 $^{\circ}$ 50'	2224
<i>P. ayacahuite</i>	5 Cuale, Jal.	26	North	20 $^{\circ}$ 22'	105 $^{\circ}$ 02'	1810-2530
	6 Las Palmas, Mich.	25	Central	19 $^{\circ}$ 40'	102 $^{\circ}$ 25'	2260
	7 Real del Monte, Hgo.	25	Central	20 $^{\circ}$ 09'	98 $^{\circ}$ 38'	2630
	8 Xico, Ver.	23	Central	19 $^{\circ}$ 31'	97 $^{\circ}$ 05'	2930
	9 Tuxtepec, Oax.	24	South	17 $^{\circ}$ 24'	96 $^{\circ}$ 30'	2770
	10 Palenque, Chis.	23	South	16 $^{\circ}$ 40'	92 $^{\circ}$ 33'	2390
<i>P. ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	11 San Rafael, Edo. de Mex.	30	Central	19 $^{\circ}$ 12'	98 $^{\circ}$ 44'	2721

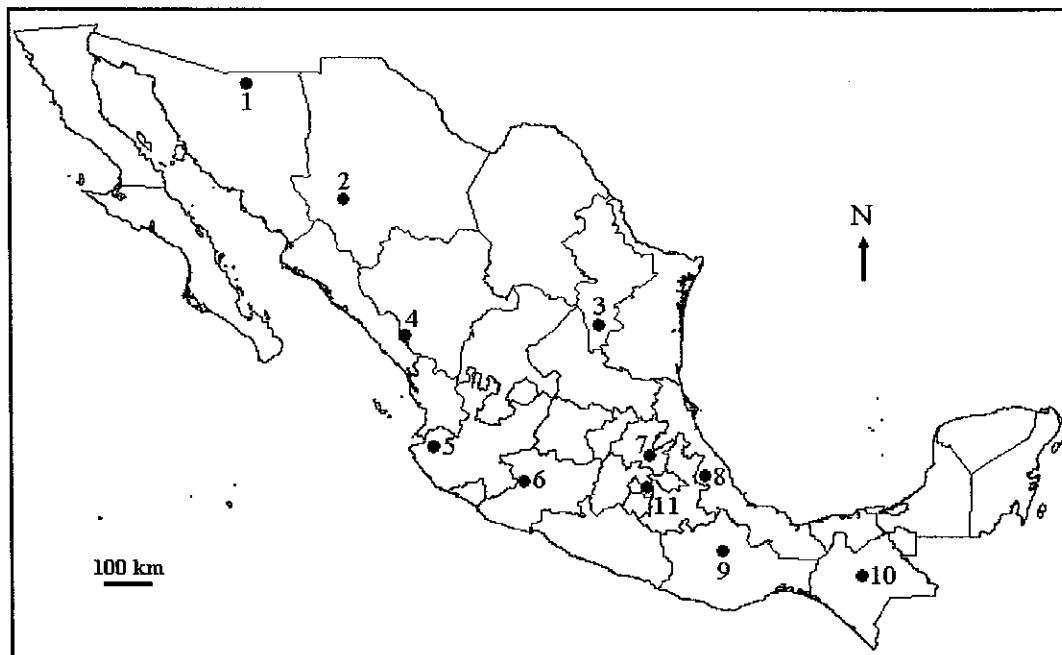


Fig. 1. Map illustrating the positions of *Pinus strobiformis* and *Pinus ayacahuite* populations sampled for assessment of genetic variation. (For details of sample locations, see Table 1).

#### *DNA extraction*

The needles were flash-frozen in liquid nitrogen and ground in a mortar to a fine powder. Total genomic DNA was extracted following the CTAB method of Doyle & Doyle (1990) with minor modifications. DNA quality and concentration were determined visually on agarose gels and by UV spectrophotometry. DNA samples were then diluted in MilliQ water at a final concentration of 20 ng/ $\mu$ L.

#### *PCR-RAPD reactions*

The PCR-RAPD reaction component concentrations and conditions were optimized for representative samples of *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* to give reproducible markers. A total of 69 oligonucleotides primers (series OPA, OPB, OPBB and primers OPC-1 to OPC-9) supplied by Operon Technologies were assayed during this study and

thirteen were selected for producing a clear RAPD profile. Each PCR-RAPD reaction proceeded in a 25  $\mu$ L reaction mix that contained 0.75 U of *Taq* polimerasa (Applied Biosystems, Inc., Calif., USA ), 0.2 mM of each dNTP, 0.2  $\mu$ M of primer (Operon Tech., Calif., USA), 40 ng of genomic DNA and a  $MgCl_2$  concentration optimized for each primer (Table 2). Amplifications were carried out in a MJ Research PTC-0100 Thermal Cycler. Optimal amplifications conditions for *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* templates were a first step of 3 min at 94  $^{\circ}C$ , followed by 45 cycles of 1 min at 94  $^{\circ}C$ , 2 min at 36  $^{\circ}C$  and 2 min at 72  $^{\circ}C$ , with a last additional step of 10 min at 72  $^{\circ}C$ . A negative control, without template DNA was included in each round of reactions. Fragments generated by amplification were separated by size on a 1.8 % agarose gel run in 1X TBE buffer at 100 V for 4 h, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. Gels were photographed with a Kodak DC40 digital camera. The reproducibility of RAPD fragments for each selected primer was tested in the total number of individual samples of two populations of *P. ayacahuite* and only highly reproducible fragments were considered in this study.

Table 2. RAPD primers and optimal concentrations of  $MgCl_2$  used in PCR reactions.

Primer name	Sequence 5' - 3'	$MgCl_2$ mM
OPA-04	AATCGGGCTG	4.5
OPA-08	GTGACGTAGG	4.5
OPA-09	GGGTAACGCC	2.5
OPA-11	CAATCGCCGT	2.5
OPB-01	GTTTCGCTCC	3.5
OPB-04	GGA CTGGAGT	4.5
OPB-10	CTGCTGGGAC	4.5
OPB-11	G TAGACCCGT	2.5
OPB-19	ACCCCCGAAG	3.5
OPBB-02	GGGCCGAACA	4.5
OPBB-07	GAAGGCTGGG	2.5
OPC-03	GGGGGCTTT	3.5
OPC-06	GAACGGACTC	3.5

### *RAPD data analysis*

Analysis was restricted to intense and reproducible RAPD fragments. Amplified fragments were scored in each DNA sample, visually and with the help of the EDAS Kodak photo documentation system (version 3.02). DNA fragment sizes were estimated by comparison with the DNA size marker (Gibco 100 bp). Each fragment was treated as an independent locus with two alleles. Fragments were scored according to their presence (1) or absence (0) to create binary data matrices. The data matrices were entered into the AFLP-SURV version 1.0 program (Vekemans *et al.*, 2002) and diversity values based on gene frequencies were calculated. Allele frequencies by compensating for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were estimated following Lynch and Milligan (1994). A RAPD marker was determined to be polymorphic when its allelic frequencies lied within the 0.05 to 0.95 range. Average Nei diversity was calculated for each population ( $H_j$ ) and for the whole sample ( $H_T$ ). Similarly, total diversity values were estimated independently for *P. ayacahuite* and *P. strobiformis*, taking into account the total number of individual for each taxon. Total genotypic diversities for each taxon and for the whole sample were partitioned into intra and interpopulational components. Intrapopulational diversity was calculated as the weighted average of the  $H_j$  values. The components of diversity within populations  $H_{POP}/H_T$  and the component between populations (GST) were estimated.

Additionally, diversity values based on phenotype frequency were obtained. RAPD data matrices were entered into the ARLEQUÍN 3.01 software (Excoffier *et al.*, 1992). A RAPD marker was determined to be polymorphic when found in less than 95 % of the sampled individuals. Diversity values for each population were estimated using pairwise difference comparison. Phenotypic diversity values were used to conduct an analysis of molecular variance (AMOVA). Variance components for RAPD phenotypes

were estimated for each taxon and for the whole sample, partitioning the variation into intrapopulational and interpopulational values. A matrix containing Euclidean distances between all pairs of phenotypes was used as input distance matrix (Díaz *et al.*, 2001). Variance components were tested statistically by nonparametric permutational procedures using 1000 permutations. Additionally, variance components were used to estimate the genetic divergence in the complex at intraregional e interregional (Northern, Central and Southern) level. All these analyses were performed using ARLEQUÍN 3.01 software.

A dendrogram based on a matrix of pairwise Nei's genetic distances between populations was constructed using the procedure Neighbor from PHYLIP version 3.57c (Felsenstein, 1993). Bootstrap analysis was performed by resampling RAPD markers, with replacement, and computing a new distance matrix and dendrogram for each sampled data set. One hundred trees were processed and tested using procedure Consense from the PHYLIP package.

## Results

### *RAPD profile*

Of the 69 RAPD primers screened, 13 produced clear RAPD patterns and yielded a total of 51 intense and reproducible bands, with an average of 3.92 bands per primer (Table 3). The number of bands scored per primer varied from two (OPB-19) to seven (OPA-04) in the size range of 450 to 2200 bp. None of 51 bands were unique to a particular population. Based on either allelic frequencies or absence and presence of band frequencies, 29 loci were polymorphic in at least one population. Primes OPA-09, OPB-01 and OPB-11 were monomorphic. The percentage of polymorphic loci on those

primers that showed variation ranged from 100% for primers OPA-08 and OPB-19 to 40% for OPB-04.

Table 3. Total number of bands amplified per selected primer, number and percentage of polymorphic bands.

Primer name	Total number of bands	Fragment sizes (bp)	Number of polymorphic loci	% of polymorphic loci
OPA-04	7	450-1500	4	57
OPA-08	5	550-1100	5	100
OPA-09	2	750-1150	0	0
OPA-11	5	650-1150	4	80
OPB-01	3	900-1400	0	0
OPB-04	5	500-1200	2	40
OPB-10	4	700-1500	2	50
OPB-11	3	800-1800	0	0
OPB-19	2	650-1400	2	100
OPBB-02	4	650-900	3	75
OPBB-07	3	650-1000	2	67
OPC-03	3	1000-1500	2	67
OPC-06	5	900-2200	3	60

#### *Genotypic and phenotypic diversity*

Gene frequencies revealed percentages of polymorphic loci of 37% for populations of Las Palmas and San Rafael to 47% for Cuale, Cananea and Pueblo Nuevo. Nei's diversity indexes ( $H_j$ ) were calculated for each polymorphic fragment and were used to evaluate gene diversity within populations (Table 4). Diversity within populations ranged from 0.223 to 0.293 among eleven natural populations. The population of Cuale exhibited the higher level of genetic diversity (0.296) followed by Pueblo Nuevo and Cananea (0.285 and 0.280 respectively) whereas Las Palmas and San Rafael showed the lowest levels (0.223 and 0.225 respectively).

Phenotypic frequencies revealed the lowest percentage of polymorphic loci for Las Palmas and the highest in Cerro el Potosí, Tuxtepec and Palenque (Table 4). Diversity estimates indicated by Nei's indexes ( $H_j$ ) differed between populations, the lowest values were observed in the populations of San Rafael and Las Palmas (0.124 and 0.129 respectively) and values higher than 0.16 were obtained in the populations of Cananea, Bocoyna and Cuale.

Table 4. Estimates of genotypic and phenotypic diversity (% P,  $H_j$ ) within populations of *Pinus ayacahuite* and *Pinus strobiformis* based in RAPD markers.

Taxon	Population	Genotypic Diversity		Phenotypic Diversity	
		% P	$H_j$	% P	$H_j$
<i>P. strobiformis</i>	Cananea, Son.	47	0.280	51	0.166
	Bocoyna, Chih.	45	0.268	46	0.166
	Cerro el Potosí N.L.	41	0.247	57	0.141
	Pueblo Nuevo, Dgo	47	0.285	51	0.153
<i>P. ayacahuite</i>	Cuale, Jal.	47	0.296	55	0.161
	Las Palmas, Mich	37	0.223	39	0.129
	Real del Monte, Hgo.	39	0.253	50	0.142
	Xico, Ver.	45	0.271	56	0.165
	Tuxtepec, Oax.	43	0.262	57	0.138
<i>P. ayacahuite</i> var. <i>vetichii</i>	Palenque, Ch.	43	0.257	57	0.156
	San Rafael, Edo. de Mex.	37	0.225	45	0.124
Mean		43	0.261	51	0.149

#### *Distribution of variation*

Averaged values for intrapopulation genotypic diversity ( $H_{POP}$ ) and genotypic diversity values in the total sample ( $H_T$ ) were used to calculate levels of diversity within and among populations of *P. ayacahuite*, *P. strobiformis* and the complex as a whole (Table 5). The mean gene diversities within *P. ayacahuite* populations and within the whole sample were 0.255 and 0.278 respectively. Most of the diversity (91.8%) was found within populations and only 8.2 % was attributable to differences among populations.



The mean intrapopulation diversity for *P. strobiformis* was 0.270 and diversity value for the total sample was 0.324. Genetic diversity partitioned within and among *P. strobiformis* populations showed a pattern similar to that of *P. ayacahuite*, however, a higher proportion of genetic diversity was explained for differences among populations (16.2 %). The analysis of all populations revealed similar results.

Table 5. Partitioning of genotypic diversity within and among populations of *Pinus ayacahuite*, *Pinus strobiformis* and within and between all populations.

Taxa	n	H <sub>POP</sub>	H <sub>T</sub>	% H <sub>POP/HT</sub>	% G <sub>ST</sub>
<i>P. ayacahuite</i>	7	0.255	0.278	91.8	8.2
<i>P. strobiformis</i>	4	0.270	0.324	83.3	16.7
<i>P. ayacahuite-P. strobiformis</i>	11	0.261	0.297	87.8	12.2

Similarly, partitioning of variation within and between populations using an analysis of molecular variance (AMOVA) showed that most of the total variation existed within populations. Higher population differentiation was detected in *P. strobiformis* (25.61%) compared with *P. ayacahuite* (12.51%). Analysis of the all populations revealed that 81.71% of the total variance is attributable to differences within populations and 18.29% to differences among populations.

Table 6. Analysis of molecular variance (AMOVA) using 51 RAPD markers, conducted within and among populations of *Pinus ayacahuite*, *Pinus strobiformis* and the whole complex ( $P < 0.05$ ).

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance	% total variance
<i>P. ayacahuite</i>				
Among populations	6	97.68	0.53	12.51
Within populations	159	590.14	3.71	89.49
<i>P. strobiformis</i>				
Among populations	3	101.27	1.37	25.61
Within populations	83	330.84	3.98	74.39
<i>P. ayacahuite</i> - <i>P. strobiformis</i>				
Among populations	10	233.73	0.85	18.29
Within populations	242	920.99	3.80	81.71

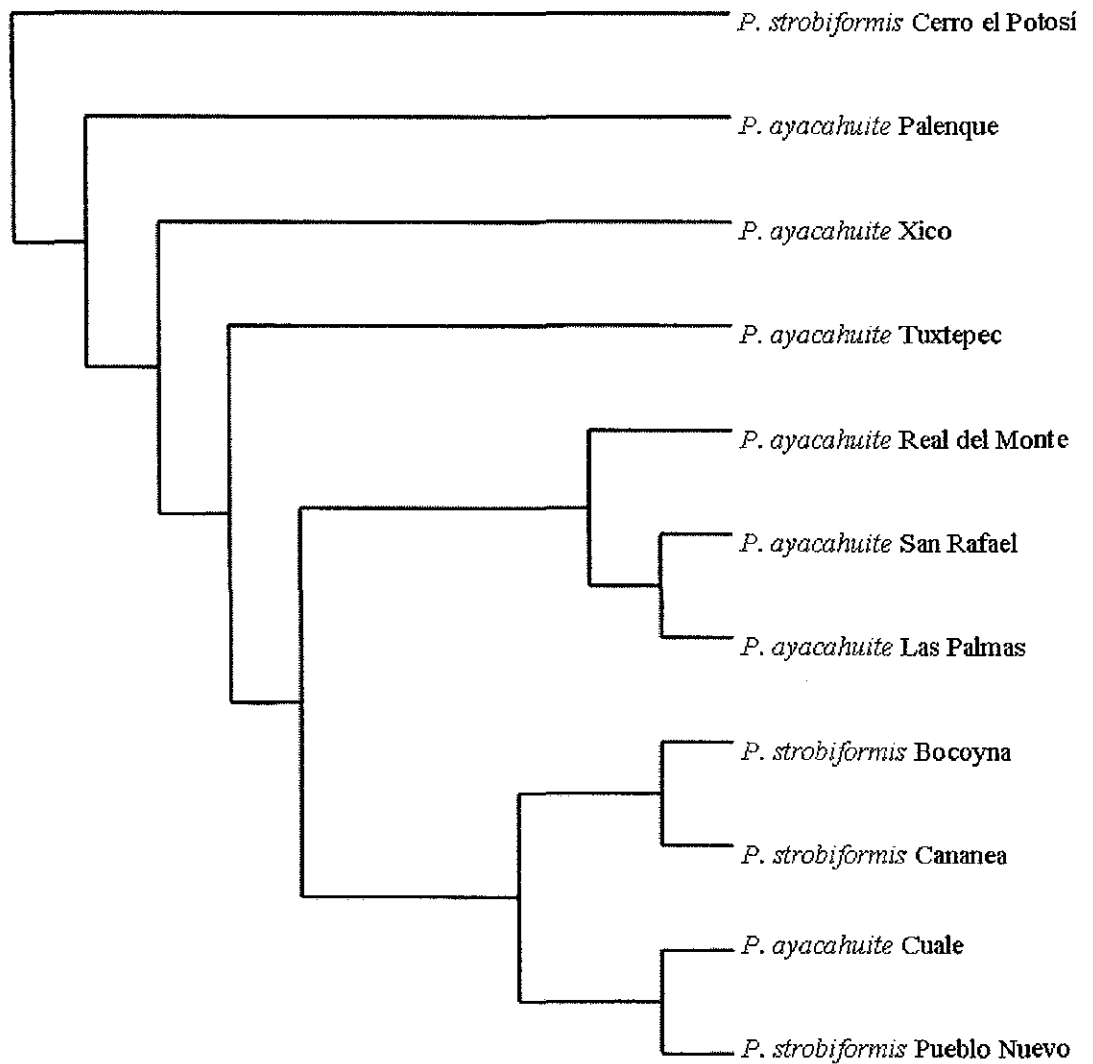
AMOVA estimates within regions and among regions revealed that a small proportion of the total variation detected by RAPDs (1.28%) was attributed to differences among regions (Table 7). When the analysis was restricted to populations within a particular region, it showed that the Northern populations (23.41%) were more differentiated than the Central and Southern ones (8.11 and 16.95 %).

Table 7. Analysis of molecular variance (AMOVA) using 51 RAPD markers, conducted among and within three regions and within all populations, among and within populations of the Northern, Central and Southern regions ( $P < 0.05$ ).

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance	% total variance
Among regions	2	53.72	0.06	1.28
Among populations within regions	8	180.00	0.81	17.34
Within populations	242	920.99	3.80	81.38
Among populations of the Northern region	4	124.92	1.22	23.41
Within populations of the Northern region	106	425.76	4.01	76.59
Among populations of the Central region	3	33.74	0.31	8.11
Within populations of the Central region	94	335.17	3.56	91.89
Among populations of the Southern region	1	20.53	0.76	16.95
Within populations of the Southern region	42	157.28	3.74	83.05

In order to examine relationships between populations, 100 matrices of pairwise Nei genetic distances were used to construct a consensus Neighbour-joining tree (Figure 2). Two main groups were apparent: the first including populations of *P. ayacahuite* from the Central region, the second including populations from the Northern region. The second cluster was formed by three of the four populations of *P. strobiformis* analyzed and the population of *P. ayacahuite* from Cuale. The population of Cerro el Potosí was significantly different from this group. Both populations of *P. ayacahuite* from the Southern region and the populations from Xico were separated in the dendrogram from the two clusters and were different from each other.

Figure 2. Neighbour-joining dendrogram based on RAPD data showing genetic relationships of 11 populations of the complex *Pinus ayacahuite* and *Pinus strobiformis*.



## Discussion

The study of gene diversity in natural populations remains central to the area of conservation genetics. The genetic variation within a population is considered to represent its evolutionary potential (Wright, 1951). RAPD markers have been widely used in population genetic studies of a large number of plant species, including pines

(Szmidt *et al.*, 1996, Thomas *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2001; Newton *et al.*, 2003). The most important problem related with the use of RAPD markers its reproducibility in amplification. Out of 69 primers examined in this study the 13 selected ones exhibited a adequate number of fragments and the clearest RAPD patterns, only intense and highly reproducible fragments were analyzed which reduced the potential number of bands that could have been scored but avoided mis-scoring. Moreover, in order to improve RAPD patterns resolution, magnesium chloride concentration in the PCR-RAPD reaction was optimized for each selected primer.

*Pinus strobiformis* and *P. ayacahuite* comprise a species complex which is characterized by a set of shared characters. However, *P. ayacahuite* is highly variable across its range; *P. ayacahuite* var. *brachyptera* is considered the Northern form and *P. ayacahuite* var. *veitchii* has been described in Central Mexico. A taxonomical controversy occurs with the Northern form, as it was first described by Engelmann (1848) as *P. strobiformis* and later by Shaw (1909) as *P. ayacahuite* var. *brachyptera*. Most recent classification of the genus *Pinus* recognizes only *P. strobiformis* in Northern Mexico (Farjon and Styles, 1997). Morphologically a North-South clinal variation in the development of the seed wing occurs between these taxa with *P. strobiformis* having the largest wingless seed. *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* is considered an intermediate form between *P. ayacahuite* and *P. strobiformis*.

Similar levels of genetic diversity with allozymes are reported in *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* ( $H_e=0.154$ ) (Ledig, 1998), nevertheless only two populations of *P. strobiformis* were included in the analysis. In pines allozymes have been usually the markers used to estimate genetic variability. However, their use can be limited either by the number and kind of detectable loci, or the lack of variable loci (Díaz *et al.*, 2001). RAPD markers have been widely used in the study of the levels and distribution of

genetic variation. Since in most studies based on natural populations the genetic basis of RAPDs markers are not understood, then phenotypic rather than genotypic diversity is frequently calculated. We decided to conduct both kind of analysis for comparative purposes. Broadly, genotypic and phenotypic diversity results based on expected heterocigosity were very similar; however phenotypic diversity showed a better definition of the differences on genetic variation at population level. Higher levels of population genetic diversity were obtained in *P. strobiformis* compared with *P. ayacahuite*. In general, populations of *P. strobiformis* are less disturbed in Mexico than *P. ayacahuite* ones. *Pinus ayacahuite* has been heavily exploited; farmers and wood cutters use it for low grade construction timber, furniture and wood carving. Populations from Las Palmas and San Rafael showed the lowest indices of genetic diversity, forest in these localities are highly perturbed and *P. ayacahuite* populations are now small and fragmented, San Rafael is the only population of *P. ayacahuite* var. *veichii* included in the RAPD analysis.

Although seed dispersal mechanisms for *P. strobiformis* are unknown in Mexico, many pines with large and wingless seeds depart from a purely wind-dispersed condition and their seeds are dispersed by birds and small vertebrates as well as wind (Lanner, 1988; Vander Wall, 1992); *P. strobiformis* in the Southwestern U.S. is primarily dispersed by Clark's nutcracker (Benkman, 1984). In this study most of the genetic diversity was contained within populations, but genetic differentiation for *P. strobiformis* based on  $G_{ST}$  and AMOVA was almost twice that of *P. ayacahuite*. According to Ledig (1998), a high differentiation ( $G_{ST}=0.228$ ) was observed in 14 populations of *P. ayacahuite*, but populations of *P. ayacahuite* var. *brachyptera* were included in the analysis. Previous work reported a correlation among seed dispersal mechanisms and genetic diversity at the population level (Hamrick *et al.* 1992); trees

species whose seeds are ingested by animals maintain significantly more genetic diversity than species with other forms of seed dispersal. Moreover, nine of 41 pine species showed high population differentiation estimates and five of them had large and wingless seeds (Delgado, 2002). The relatively isolation of populations of *P. strobiformis* should be also taken into account to explain the level of differentiation observed, as geographically separated populations have a reduced gene flow ( Delgado et al., 1999).

Diversity values observed in the *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* complex were within the range of those reported in other pines studied using RAPDs. Similar mean levels of diversity (0.261 for gene diversity and 0.149 for phenotypic diversity) were found in *P. radiata* (0.23), *P. muricata* (0.16) and *P. radiata* (0.17) (Wu et al., 1999), higher levels (0.37, 0.37. and 0.46) on *P. sylvestris*, *P. oocarpa* and *P. contorta*, respectively (Szmitdt et al., 1996; Díaz et al., 2001; Thomas et al., 1999). Our value for gene diversity is higher than the expected mean genetic diversity (0.158), estimated using isozymes, across a large number of *Pinus* species (Delgado et al., 2002).

The analysis conducted among and within particular regions showed a lower differentiation among populations of the Central region than among populations of the Northern and Southern regions. This implies that populations of the complex can not be considered a single panmictic unit; differences in gene flow between populations probably are determined by geographical distances and by the mechanism of seed dispersion. Out of the population from Xico, all the populations from the Central region clustered in the dendrogram. Similarly, populations from the Northern region formed a second cluster. Out of the population of Cerro el Potosí (its position in the dendrogram has already been discussed in Chapter III), all populations of *P. strobiformis* were grouped. Interestingly, *P. ayacahuite* from Cuale is in the *P. strobiformis* group, this

population has been described as a new species (Carvajal, 1986), as a variety of *P. ayacahuite* (Carvajal and Mc Vaught, 1992) and as *P. strobiformis* (Farjon and Styles, 1997). Our results revealed a closer relationship of this population to *P. strobiformis* than to *P. ayacahuite*.

Morphological differentiation between *P. ayacahuite*, *P. ayacahuite* var. *veitchii* and *P. strobiformis* might be a result of natural selection, so it is important to conserve populations that represent this differentiation. Conservation decisions should be based on quantitative genetic variation as well as patterns of variation on molecular markers, which are generally assumed to be selectively neutral. RAPD variation did reflect levels of genetic variation and differentiation within and between *P. ayacahuite* and *P. strobiformis*. These data could be used to define appropriate units for conservation; the high degree of differentiation recorded between populations of *P. strobiformis* suggests that population's through-out range of the taxa should be incorporated into conservation plans. Similarly populations of *P. ayacahuite* from the Southern region should be conserved as they appear separated and different from each other in the dendrogram. Management in the Central region should be aimed at preserving germoplasm from those populations of *P. ayacahuite* with the highest levels of genetic variation and to promote a regeneration of the more degraded ones by using either selected local seed or genetic material from a more variable but morphologically close population.



## References

- Benkman, C.W., Balda, R.P., Smith, C.C. 1984. Adaptations for seed dispersal and the compromises due to seed predation in limber pine. *Ecology* 65: 632-642.
- Carvajal, S. 1986. Notas sobre la flora fanerogámica de Nueva Galicia, III. *Phytologia* 59: 127-147.
- Carvajal, S., McVaugh, R., 1992. Gymnosperms and Pteridophytes. In: Anderson, W.R. (Ed.) *Flora Novo-Galiciana*, Ann Arbor 17. University of Michigan Herbarium, Michigan, pp. 32-100.
- Delgado, P., Cuenca, A., Escalante, A.E., Molina-Freaner, F., Piñero, D. 2002. Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista chilena de Historia Natural* 75: 27-37.
- Delgado, P., Piñero, D., Chaos, A., Pérez-Nasser, N., Alvarez-Buylla, E. R. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus Rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86: 669-676.
- 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* 30: 2593-2603.
- Doyle & Doyle (1990) Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- 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., Styles, B.T., 1997. *Pinus* (Pinaceae) Flora Neotropica. Monograph 70. New York Botanical Garden. New York.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Gibson, J.P., Hamrick, J.L., 1991. Genetic diversity and structure in *Pinus pungens* (table mountain pine) populations. *Canadian Journal of Forest Research* 21: 635-642.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles, S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.

- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise J.C., Hamrick J.L (Eds) Conservation genetics. Case history from nature. New York: Chapman and Hall pp 281-304.
- Lande, R., Schemske, D.W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39: 24-40.
- Lanner, R.M., 1988. Dependence of Great Basin bristlecone pine on Clark's Nutcracker for regeneration at high elevations. *Arctic and Alpine Research* 20: 358-362.
- Ledig, F.T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson D. M. (Ed.) Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 251-280.
- Lynch and Milligan (1994) 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. Ediciones Botas. México.
- Molina-Freaner, F., Delgado, P., Piñero, D., Perez-Nasser, N., Alvarez-Buylla, E. 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany* 79: 131-138.
- 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.
- Shaw, G.R. 1914. The genus *Pinus*. Publ. Arnold Arbor. 1. Harvard University, Cambridge.
- Shaw, G.R., 1909. The Pines of Mexico. Harvard University. Cambridge.
- 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.
- Thomas, B. R., McDonald, S. E., Hicks, M., Adams, D. L., Hodgetts, R. B. 1999 Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 793-801.
- Vander Wall, S.B. 1992. The role of animals in dispersing a "wind-dispersed" pine. *Ecology* 73: 614-62.
- Vekemans, X., Beawens, T., Lemaire, M., Roldan-Ruiz, I. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11: 139-151.

- Wright JA, Marín A, Dvorak W. 1996. *Ex situ* conservation of *Pinus ayacahuite*. Forest Genetic Resources No. 24. FAO.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals Eugenics* 15: 323-354.
- Wu, J., Krutovski, K. V., Strauss, S. H. 1999. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome* 42: 893-908.

**APÉNDICE 1**

**HIGH YIELD OF GOOD QUALITY DNA FROM VEGETATIVE AND SEXUAL  
TISSUES OF MEXICAN WHITE PINE (*Pinus ayacahuite*)**

## Trabajo enviado a: Plant Molecular Biology Reporter.

### **Abstract**

Isolation of large quantity of high quality DNA from pine tissue is difficult; polysaccharides and phenolic compounds contained in needles and seeds interfere with DNA extraction and purification. Moreover, from one pine species to the other there is variation in needles phenolic profiles and seed size that affect final DNA yield and quality. Here we show results using modified CTAB and SDS DNA extraction protocols on needles, gametophyte and embryo of *Pinus ayacahuite*, a species with an especially large seed (8-18 mm). Our results revealed that the CTAB method provided higher yield of good quality DNA from vegetative tissue and embryo than the SDS method. The average yield of high molecular weight DNA using the CTAB procedure was  $340 \pm 28$  ng/mg from needles,  $960 \pm 100$  ng/mg from gametophyte and  $4,950 \pm 450$  ng/mg from embryo; DNA samples with  $A_{260}/A_{280}$  ratios in the range of 1.6 to 1.7 were obtained. Embryos (2n) and gametophytes (n) resulted to be a very good source of DNA. The DNA isolated was suitable for PCR-RAPD and SSR molecular markers and enough DNA amount was obtained for RFLP reactions.

**Key words:** CTAB, DNA isolation, *Pinus ayacahuite*, SDS, seed tissue, vegetative tissue.

**Abbreviations:** CTAB, hexadecyltrimethylammonium bromide; SDS, sodium dodecyl sulfate; RAPD, random amplified polymorphic DNA; SSR, simple sequence repeats; RFLP, restriction fragment length polymorphism; PVP, polyvinylpyrrolidone.

## Introduction

In the last years, molecular techniques have become essential tools in phylogeny and population genetics of plants (Conner and Hartl, 2004). Extraction of high quality DNA is an important step of all molecular analysis, especially if DNA is to be manipulated with restriction endonucleases or if large DNA segments are amplified by PCR (Sperisen et al., 2000; Crowley et al., 2003). In conifers, needles and gametophytes are commonly used as DNA source material and single embryos are scarcely utilized because of the small size of the body seed of most conifers (Farjon and Styles, 1997).

Extraction of high-yield and excellent quality DNA from pines is difficult due to the presence of high levels of polysaccharides in needles and gametophytes. Polysaccharides co-precipitate with nucleic acids, interfering with DNA purification and quantification by spectrophotometry, and restriction digestion (Demerek and Adams, 1992). Furthermore, PCR amplifications are particularly susceptible to the presence of acidic polysaccharides (Guillemaut and Maréchal-Drouard, 1992; Crowley et al., 2003). Needles are also rich in phenolic compounds, which bind to DNA after cell lysis, interfering with the isolation of high quality DNA (Kim et al., 1997).

Mexican white pine (*Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltld.) is an important source of timber, pulp and nuts as it is the largest growing representative of soft pines in Mexico, taxonomically it is classified into the subgenus *Strobus*, subsection *Strobi* (Farjon and Styles, 1997). In order to perform a genetic analysis on this species, our group has been working on the isolation of large quantities of high quality DNA, suitable for PCR amplification and other molecular techniques.

Although several procedures of DNA extraction have been used in pines (Bousquet et al., 1990; Kim et al., 1997; Sperisen et al., 2000; Crowley et al., 2003), species from the subgenus *Strobis* show a marked variation in phenolic profiles and gametophyte size which affect both DNA yield and quality (Price et al., 1998). To the best of our knowledge, there are no available publications regarding any DNA extraction method on particular species of this subgenus. Thus, we tested and compared modified CTAB and SDS based DNA extraction protocols (Doyle and Doyle, 1987; Dellaporta et al., 1983) on needles, gametophytes and embryos of *P. ayacahuite*. The CTAB protocol produced higher yield of high molecular weight DNA than the SDS one, suitable for PCR-based molecular markers. We present here our results and describe the optimized CTAB extraction protocol on vegetative and seed tissue from this economically important species.

## **Materials and Methods**

### *Plant material*

Forty needle samples from different trees of *P. ayacahuite*, and twenty seeds from the same species were used for DNA extraction. Needle samples were collected from Mexican natural populations and conserved in the field on ice from the time of the collection until the arrival to the laboratory, and then maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$ . To obtain gametophytes and embryos, seeds were hydrated with distilled water overnight at room temperature and later germinated in 1% hydrogen peroxide during 4 days. Germinated seeds were dissected with a scalpel and the outer brown scale covering the megagametophyte was removed. Gametophytes and embryos were then isolated and maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  in microtubes until DNA extraction.

*Reagents and solutions*

Liquid nitrogen

CTAB extraction buffer: 100 mM Tris•HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2%

CTAB, 1% soluble PVP (MW 10,000, Sigma) (Added just before use)

Washing solutions: Chloroform/isoamyl alcohol (24:1) and Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (24:24:1)

Washing buffer: 70% ethanol, 10 mM ammonium acetate

Resuspension buffer TE: 10 mM Tris•HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Ammonium acetate 7.5 M

Isopropanol

Absolute ethanol

70% ethanol

**Protocols***Isolation of DNA from needles*

Weight 1 g of needles (fresh or frozen).

Transfer the needles to a precooled mortar ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) and grind with liquid nitrogen to a fine powder as quickly as possible.

Transfer the powder to a 50 mL Nalgene tube.

Add 8 mL of CTAB extraction buffer, preheated at  $65^{\circ}\text{C}$ .

Incubate at  $65^{\circ}\text{C}$  for 60 min with gentle shaking from time to time.

Extract once with 7.5 mL of chloroform-isoamyl alcohol, mixing gently but thoroughly.

Centrifuge at 10,000 g for 20 min at room temperature.



Pull out the upper aqueous phase with a wide-bore pipet and transfer it to a clear 50 mL Nalgene tube. Add 2/3 vol of  $-20^{\circ}\text{C}$  isopropanol and mix gently to precipitate nucleic acids.

If possible, spool out nucleic acids with a pipet or centrifuge at low speed for 10 min.

Transfer nucleic acids to 10 mL of washing buffer for approximately 20 min.

Centrifuge at low speed (or spool out) and briefly air dry nucleic acids and dissolve in 1 mL of TE buffer.

Add 2 mL of distilled water and 1.5 mL of ammonium acetate (7.5 M) and mix by inversion. Add 10 mL of cold absolute ethanol, and mix gently to precipitate DNA.

Centrifuge at low speed (or spool out) nucleic acids.

Add 5 mL of 70% cold ethanol and mix gently for 5 min, repeat this step twice.

Air-dry and resuspend in about 500  $\mu\text{L}$  of TE.

#### *Isolation of DNA from gametophyte and embryo*

Weight the whole gametophyte or embryo.

Transfer the tissue to a 2 mL Eppendorf tube containing 200  $\mu\text{L}$  of CTAB extraction buffer.

Grind the tissue with a pestle.

Add 800  $\mu\text{L}$  of extraction buffer preheated at  $65^{\circ}\text{C}$ .

Incubate at  $65^{\circ}\text{C}$  for 60 min with gentle shaking from time to time.

Add 1 mL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol for gametophyte or 1 mL of chloroform-isoamyl alcohol for embryo.

Follow the same steps for vegetative tissue; reducing all the volumes to 1/3.

#### *RAPD and SSR amplifications*

RAPDs reactions were conducted following the procedure of Williams et al. (1990) with minor modifications and SSR reactions were performed according to the procedure of Rajora et al. (2000).

### **Results and Discussion**

Isolation of high quality DNA from conifers is a frequently difficult issue (Kim et al., 1997). Hence, existing extraction procedures have been modified or new methods have been developed to sort out DNA extraction problems (Bousquet et al., 1990; Guillemaut and Maréchal-Drouard, 1992; Kim et al., 1997; Sperisen et al., 2000). Both the CTAB and the SDS based methods tested here, led to the extraction of high molecular weight DNA from *P. ayacahuite* (Fig. 1), nevertheless, the CTAB protocol showed higher yield for needles and embryo than the SDS protocol (Table 1). The average DNA yields with the CTAB procedure was  $340 \pm 28$  ng/mg from needles,  $960 \pm 100$  ng/mg from gametophyte and  $4950 \pm 450$  ng/mg from embryo; DNA samples with  $A_{260}/A_{280}$  ratios in the range of 1.6 to 1.7 were obtained.

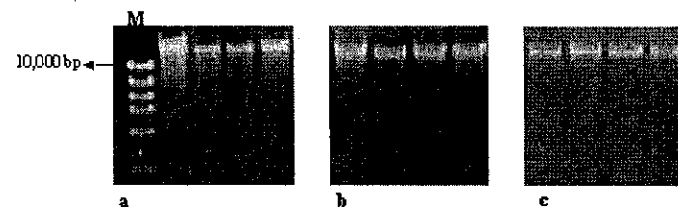


Fig. 1. Total DNA from needles (a), gametophytes (b), and embryos (c) of *Pinus ayacahuite*. M, DNA size marker (High DNA mass ladder, Invitrogen-Life Technologies).

Table 1. Average yields and qualities of DNA extracted from *P. ayacahuite* tissues using the CTAB or SDS protocol.

Protocol	Plant material	n	DNA yield (mean $\pm$ SE) ng/mg	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
CTAB	Needles	40	340 $\pm$ 28	1.70 $\pm$ 0.02
	Gametophyte	20	960 $\pm$ 100	1.72 $\pm$ 0.02
	Embryo	20	4950 $\pm$ 450	1.61 $\pm$ 0.03
SDS	Needles	20	169 $\pm$ 20	1.57 $\pm$ 0.04
	Gametophyte	20	1430 $\pm$ 150	1.65 $\pm$ 0.05
	Embryo	20	2800 $\pm$ 300	1.68 $\pm$ 0.04

Most of the reported DNA extraction procedures for conifers use vegetative tissue and gametophytes as DNA source and alternative sources have been scarcely explored. Bousquet et al. (1990), using a CTAB method without RNase treatment, reported DNA yields between 100 and 500 ng/mg from vegetative and sexual tissues of diverse tree species, among which *P. banksiana* and *P. strobus* were included. We report DNA yields between 95 and 929 ng/mg from vegetative tissue and between 330 and 10,000 ng/mg from sexual tissue of *P. ayacahuite*. Sperisen et al. (2000) described a rapid SDS method for the isolation of DNA from fresh needle tissue of gymnosperms and the average DNA yield obtained from *P. sylvestris* (366 ng/mg) was similar to our results. Because of the small seed size of many conifers, the total amount of DNA isolated from embryos is generally too low for RFLP analysis (Newton et al., 2002). Interestingly

here, large embryos of *P. ayacahuite* resulted to be a good source of DNA; one embryo from *P. ayacahuite* seed yielded about 100 µg of DNA, which is enough for several RFLPs reactions (Dowling et al., 1996). Thus, in conifers with large body seed embryos might be an excellent source of DNA.

Differences in DNA quality and yield may correlate with the relative levels of the secondary products that interfere with extraction. It has been reported that inclusion of PVP to the DNA extraction buffer helps in the elimination of polyphenol compounds in needles (Kim et al., 1997). Therefore, the addition of PVP to the extraction buffer used in our modification of the original CTAB protocol, was critical to reduce DNA degradation, although we did not observe any marked variation on DNA yield between samples treated with PVP and samples without PVP, the effect on DNA quality was noticeable. It is also worth mentioning that the inclusion of phenol to the washing solution used with gametophyte samples was relevant to improve both DNA quality and yield. Frequently, DNA extraction protocols do not consider some side effects of the chemical compounds above mentioned (PVP and phenol). It is important to observe that DNA extraction from embryos using the CTAB protocol does not require either PVP or phenol.

In almost all DNA samples, RNA smears were visualized on agarose gels, however DNAs were suitable for PCR-RAPD and SSR reactions (Fig. 2). No differences were observed in banding profiles between needles, gametophyte and embryo. Even though RNase treatment was not necessary for molecular analysis, it is relevant to keep in mind that addition of 5 µL of RNase A (30 mg/mL) to the DNA solution led to about half the initial DNA concentrations. This DNA yield is similar to the obtained from *P. radiata* using a modified CTAB method that included RNase treatment (Stange et al., 1998).

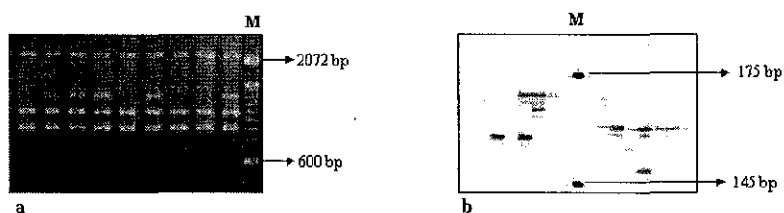


Fig. 2. PCR amplifications of DNA from needles, gametophytes and embryos of *Pinus ayacahuite*, RAPDs (OPA-06) (a), SSR (RPS 50) (b). M, DNA size marker.

In conclusion, the CTAB based method produced high yield of good quality DNA from needles and embryo of *P. ayacahuite*. In addition, seed tissue gave higher DNA yield than leaf tissue and embryo resulted to be the best source of DNA.

#### Acknowledgements

The authors of this paper wish to thank Dr. José Elías García Ortiz (Centro de Investigación Biomédicas de Occidente) and Dr. Gustavo Moya-Raygoza (Universidad de Guadalajara) for improving the English text and their valuable suggestions. This work was supported by SEP-CONACYT grant (33129-B), Universidad de Guadalajara.

### Literature cited

- Bousquet J, Simon L, Lalonde M (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Can J For Res* 20: 254-257.
- Conner JK, Hartl DL (2004) A primer of ecological genetics pp 303. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Crowley TM, Muralitharan MS, Stevenson TW (2003) Isolation conifer DNA: A superior polysaccharide elimination method. *Plant Mol Biol Rep* 21: 97a-97d.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21.
- Demerek T and Adams RP (1992) The effect of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* 12: 332-334.
- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dowling TE, Moritz C, Palmer JD, Rieseberg LH (1996) Nucleic Acids III: Analysis of fragments and restriction sites. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds), *Molecular Systematics*, pp 290 Sinauer, Sunderland, Mass.
- Farjon A and Styles BT (1997) *Pinus* (Pinaceae) flora neotropica monograph 75 pp 199-204. The New York Botanical Garden, New York.
- Guillemaut P and Maréchal-Drouard L (1992) Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive and reliable method. *Plant Mol Bio Rep* 10: 60-65.
- Kim CS, Lee CH, Shin JS, Shung YS, Hyung NI (1997) A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res* 25: 1085-1086.
- Newton AC, Alnutt TR, Dvorak WS, Del Castillo RF, Ennos RA (2002) Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity* 89: 191-198.
- Price RA, Liston A, Strauss SH (1998) Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: Richardson DM (ed). *Ecology and Biogeography of Pinus*, pp 59, Cambridge University Press UK.
- Rajora OP, Rahman MH, Buchert GP, Dancik BP (2000) Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molec Ecol* 9: 339-348.
- Sperisen C, Gugerli F, Bucher U, Mátyás G (2000) Comparison of two rapid DNA extraction protocols for gymnosperm for application in population genetic and phylogenetic studies. *For Genet* 7: 133-136.

Stange C, Prehn D, Arce-Johnson P (1998) Isolation of *Pinus radiata* Genomic DNA Suitable for RAPD Analysis. *Plant Mol Bio Rep* 16: 366

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535.



**APÉNDICE 2**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Pinus ayacahuite* UTILIZANDO MARCADORES  
RAPDs EN GENOMA DIPLOIDE Y HAPLOIDE**

## Trabajo aceptado en: Scientia CUCBA

**Resumen**

En este trabajo se utilizaron marcadores RAPDs para obtener los niveles de diversidad y diferenciación genética en *Pinus ayacahuite* de las poblaciones de Las Palmas, Michoacán y San Rafael, Estado de México. La amplificación por PCR del material diploide de 20 árboles y 36 genomas haploides de 6 árboles de cada una de las poblaciones, generó un total de 20 fragmentos con los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06. Se estimaron las frecuencias alélicas por dos métodos: 1) indirecto, utiliza la frecuencia de los individuos con ausencia del fragmento (genoma diploide) y 2) directo, utiliza las frecuencias genotípicas inferidas de los patrones de segregación de los gametofitos (genoma haploide). Los valores de diversidad genética (porcentaje promedio de *loci* polimórficos y heterocigosis promedio) derivados del método indirecto fueron de P=65 % y H=0.25 para Las Palmas y de P=60 % y H=0.26 para San Rafael, el valor de  $F_{ST}$  fue de 0.1. Se obtuvieron valores de P=62 % en ambas poblaciones por el método directo y los valores de H fueron ligeramente menores a los producidos por el método indirecto. El análisis de marcadores RAPDs en material haploide de *P. ayacahuite* permitió determinar los patrones de segregación y el equilibrio Hardy-Weinberg. Los índices de fijación ( $F_{IS}=0.0024$ ,  $F_{IT}=0.0829$  y  $F_{ST}=0.089$ ) mostraron ausencia de endogamia y una diferenciación poblacional moderada. Los niveles de diversidad genética de *P. ayacahuite* se encuentran dentro de los valores reportados para otras especies de pinos.

### Abstract

In this work RAPD markers were used to obtain levels of genetic diversity and differentiation on *P. ayacahuite* from Las Palmas, Michoacan and San Rafael, Estado de Mexico populations. PCR amplification of diploid material from 20 trees, and 36 haploid genomes from 6 trees of each population, produced a total of 20 fragments with OPA-11, OPA-08 and OPC-06 primers. Two methods were applied to estimate allelic frequencies 1) indirect, which uses the frequency of individuals with absent fragment (diploid genome) and, 2) direct, which uses genotypic frequencies inferred from segregation patterns in gametophytes (haploid genome). Genetic diversity measurements (average percentage of polymorphic *loci* and average heterozygosity) derived from the indirect method were P=65 % and H=0.25 in the population of Las Palmas and P=60 %, H=0.26 in San Rafael,  $F_{ST}$  value was 0.1. Estimated values of P=62 % were obtained in both populations from the direct method and H values were lightly lower than the ones produced from the indirect method. Analysis of RAPD markers in haploid material of *P. ayacahuite* allowed determination of segregation patterns and Hardy-Weinberg equilibrium. Fixation indices ( $F_{IS}=0.0024$ ,  $F_{IT}=0.0829$  y  $F_{ST}=0.089$ ) showed no inbreeding and moderate population differentiation. Genetic diversity levels of *P. ayacahuite* are in the range reported for other pines.

## Introducción

La variabilidad genética, como componente de la diversidad biológica, se ha constituido en un aspecto clave y fundamental de la biología de la conservación, debido a que le confiere eficacia biológica a la especie y le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Hartl y Clark 1989). *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schlttd. es uno de los pinos blancos más utilizados en México como fuente de madera (Farjon y Styles 1997). La especie presenta una amplia distribución geográfica (Martínez 1948, Critchfield y Little 1966, Eguiluz 1982), aunado a esto muestra una variación morfológica significativa entre localidades. Tal es el caso de la población de Las Palmas, municipio de los Reyes, Michoacán, considerada el área donde la especie produce los conos femeninos más largos (Pérez de la Rosa 1993). Por otra parte, la población aislada de San Rafael, municipio de Tlalmanalco, Estado de México considerada como *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Roezl) Shaw, presenta como caracter distintivo sus apófisis largas pero no encorvadas (Farjon et al. 1997). Aunque se han realizado estudios de variabilidad genética con aloenzimas en algunas poblaciones de *P. ayacahuite* (Ledig 1998), es importante considerar que la variación isoenzimática representa solamente una pequeña fracción de la variación genética en una población (Conner y Hartl 2004).

Los marcadores de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD), han sido ampliamente utilizados en el estudio de la diversidad genética de especies vegetales (Ritland y Ritland 2000). Los RAPDs son marcadores moleculares dominantes, generados por la amplificación de segmentos aleatorios de DNA. La técnica de RAPD es una de las técnicas moleculares consideradas como multilocus, ya que permite el análisis de varios *loci* a la vez, se basa en la posibilidad estadística de que se presenten sitios complementarios a un iniciador de 10 b, a lo largo del genoma (Harris 1999). La gran ventaja de esta técnica es que permite el análisis de la variación genética sin

secuenciar o caracterizar el genoma de interés, su uso en forma adecuada permite resolver una gran cantidad de marcadores neutros y detectar polimorfismos.

Cuando se dispone solamente de material diploide para el análisis genético, las frecuencias de los marcadores RAPDs se estiman indirectamente, utilizando las frecuencias de los individuos en los que el fragmento está ausente. En este tipo de análisis se asume que los marcadores segregan mendelianamente y que las poblaciones presentan el equilibrio Hardy-Weinberg. Sin embargo, la desviación de las expectativas de estricta herencia mendeliana ha sido reportada como una de las limitantes básicas del empleo de RAPDs (Wolfe y Liston 1998). Esta puede ser producto de artefactos (variación no genética), de la localización de los marcadores en organelos y de interacciones epigenéticas. De esta forma, en estudios realizados con RAPDs es importante registrar solamente marcadores altamente reproducibles que presenten un patrón de herencia mendeliana, ya que la confiabilidad de los resultados dependerá de la robustez de los marcadores. En el caso de las coníferas es posible determinar la herencia de los marcadores sin necesidad de cruza controladas, las cuales son costosas y frecuentemente imposible de llevar a cabo. Se considera que son el material genético ideal para estudios genéticos, ya que la naturaleza del megagametofito permite analizar el tipo de segregación de los marcadores genéticos. Genéticamente, el gametofito es idéntico al gameto materno que forma el embrión, por lo tanto es equivalente a la progenie haploide de la planta. Cualquier *locus* en el genoma de la planta que presente herencia mendeliana, segregará 1 a 1 en los megagametofitos (O'Malley et al. 1997). El estudio de los RAPDs en los megagametofitos de varias semillas del mismo árbol permite determinar el patrón de segregación de cada marcador, identificar heterocigotos, estimar directamente las frecuencias alélicas y aplicar los modelos clásicos de genética de poblaciones utilizados para alelos codominantes.

Los objetivos de este trabajo consistieron en estimar y comparar los niveles de diversidad genética en dos poblaciones de *P. ayacahuite*, utilizando las frecuencias alélicas de marcadores RAPDs calculadas a través de: 1) el método indirecto, 2) el método directo.

## **Materiales y métodos**

### *Características de las poblaciones*

La población de *P. ayacahuite* de San Rafael, municipio de Tlalmanalco, Estado de México se localiza a 19° 12' 38" de latitud Norte, y 98° 44' 10" de longitud Oeste; a una altitud de 2721 msnm, la temperatura anual es de 15 °C y las precipitaciones pluviales de 744 mm/año. Actualmente, la población se encuentra en un bosque muy perturbado de *P. ayacahuite*, *Pinus* spp. y *Cupressus lusitanica* y se considera como una población aislada. Los árboles presentan un tamaño de 25 a 35 m. La época de dehiscencia de las semillas inicia en octubre. La población de *P. ayacahuite* de Las Palmas, municipio de los Reyes, Michoacán se encuentra a 19° 40' de latitud Norte y 102° 25' de longitud Oeste, a una altitud de 2260 msnm, la temperatura anual es de 15 °C y las precipitación pluvial de 634 mm/año. Actualmente la población esta reducida y aislada.

### *Recolección de las muestras de acículas y semillas*

Se colectaron muestras de acículas de 20 árboles de cada población. Los árboles se encontraban separados uno del otro al menos por 50 m. Se colectaron además conos maduros de seis árboles de cada población. Las acículas se mantuvieron en un ambiente fresco hasta su llegada al laboratorio, donde se congelaron a -20 °C hasta la extracción de DNA. Las semillas colectadas entre julio y agosto de 2003 se almacenaron en bolsas de papel a 4 °C hasta la extracción de DNA.

### *Obtención de megagametofitos*

Se germinaron de seis a diez semillas de cada cono. Para la germinación, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada (permanecieron 12 horas en agua durante cada lavado). Se añadieron 250 mL de agua oxigenada comercial y un volumen igual de agua destilada, se mantuvieron en esta solución por 30 minutos y se lavaron por cuarta vez con agua destilada. Se eliminó el exceso de agua y las semillas se almacenaron en bolsas de papel a 4° C. Para obtener el megagametofito, se diseccionó la semilla germinada con la ayuda de un bisturí, se localizó visualmente el gametofito (n) y se separó de la cubierta con unas pinzas de disección. Se efectuó un corte en forma vertical y se localizó y extrajo el embrión (2n). Se eliminó el suspensor del embrión (Fig. 1). Finalmente se colocaron los megagametofitos en tubos eppendorf de 2 mL y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de DNA.

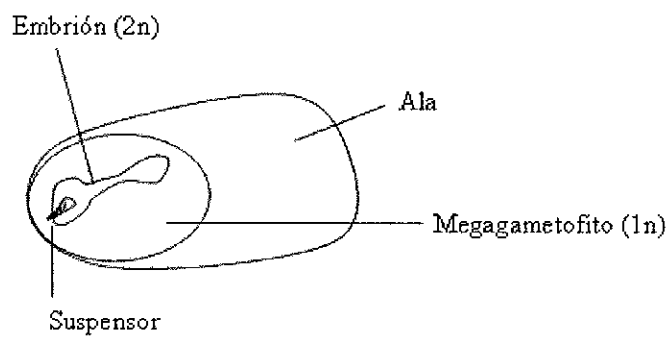


Fig. 1. Semilla germinada de pino.

#### *Extracción de DNA*

La extracción de DNA a partir de acículas (genoma diploide) y megagametofitos (genoma haploide) se llevó a cabo mediante el método descrito por Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones. En el caso de las acículas se adicionó



polivinilpirrolidona 10 al 1% al amortiguador de extracción; mientras que en gametofitos fue necesario el uso de fenol para eliminar la gran cantidad de grasa del tejido (Palomera 2002). Finalmente, se determinó la concentración y la calidad del DNA por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa, respectivamente (Sambrook et al. 1989).

#### *Marcadores RAPDs*

Para la amplificación de los marcadores RAPDs se siguió el procedimiento de Williams et al. (1990) con ligeras modificaciones (Arvizu 2003). Las reacciones de PCR se desarrollaron en un volumen final de 25  $\mu$ L. Las concentraciones finales de los componentes de la reacción fueron: Tris HCl 10 mM, pH 8.3; KCl 50 mM; gelatina 0.001 %; dNTPs 100  $\mu$ M; iniciador 0.2  $\mu$ M; 25 ng de DNA y 0.5 U de *Taq* Pol. Se utilizaron tres cebadores seleccionados con base en la calidad de la amplificación de muestras DNA de *P. ayacahuite*, las características de los iniciadores y las concentraciones óptimas de  $MgCl_2$  por iniciador se muestran en el Cuadro 1. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research modelo PTC 100. El programa de amplificación consistió de un paso inicial de 3 min a 94 °C seguido de 45 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 72 °C, 2 min a 36 °C, y un paso final de 7 min a 72 °C. Los productos de la reacción se mezclaron con solución de carga (Sambrook et al. 1989) y se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % (4 V/cm). Se utilizó un marcador de 100 pb (Gibco) en el gel para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados. Los geles se tiñeron mediante inmersión en bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/mL por 30 min y se destiñeron en agua destilada. Los marcadores se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta usando el sistema de fotodocumentación EDAS (Kodak).

Cuadro 1. Secuencia y concentraciones de cloruro de magnesio de los iniciadores utilizados en la amplificación del genoma de *Pinus ayacahuite*.

Iniciador	Secuencia 5' ----- 3'	MgCl <sub>2</sub> cc final
OPA-08	GTGACGTAGG	4.5 mM
OPA-11	CAATCGCCGT	2.5 mM
OPC-06	GAACGGACTC	3.5 mM

#### *Análisis de datos*

El tamaño de cada fragmento se determinó utilizando un marcador de 100 pb y el sistema de fotodocumentación EDAS. Las bandas se registraron como presentes (1) o ausentes (0). Se definieron los patrones de bandeo para cada iniciador, en particular el tamaño en pares de bases (pb) y el grado de intensidad de las bandas.

En el análisis de datos de marcadores RAPDs se asume que cada fragmento representa un locus y que existen solamente dos alelos para cada locus. Así, se formaron dos matrices de datos, en una se registró la presencia (1) o ausencia (0) de los fragmentos RAPDs en el genoma diploide de las acículas de cada población (matriz 1) y en la otra la presencia o ausencia en los genomas haploides de cada población (matriz 2).

#### *1. Método indirecto*

Los fragmentos registrados en la matriz 1 se analizaron como marcadores dominantes con el programa PopGene ver. 1.31. (Yeh et al. 1997). Las frecuencias génicas se calcularon en forma indirecta a partir de la frecuencia de los individuos con ausencia del marcador. Se obtuvo el porcentaje de *loci* polimórficos (P) y el valor de heterocigosis

promedio ( $H$ ) (Nei 1973) en cada población. Se realizó también un análisis multipoblacional en el que se estimaron los índices de diversidad total y diferenciación genética ( $F_{ST}$ ).

## *2. Método directo*

A través del análisis de la matriz 2 se localizaron los *loci* que segregaron y se identificaron los individuos heterocigotos. Se contabilizó el total de gametofitos con presencia o ausencia del marcador (alelos nulos). Se calculó el porcentaje de desviación de las relaciones esperadas (1:1) en la segregación mendeliana y se identificaron aquellos *loci* que presentaron una fuerte desviación. A partir del análisis de los gametofitos, se formó una nueva matriz poblacional (matriz 3), con los genotipos diploides de los *loci* monomórficos (AA) y los *loci* que segregaron en forma mendeliana: AA, BB o AB. Se alimentó con esta matriz el programa PopGene y se analizaron los RAPDs como marcadores codominantes (análisis genotípico). Se comparó la distribución genotípica observada en las poblaciones con la distribución genotípica esperada bajo el equilibrio Hardy-Weinberg. Finalmente, se calcularon los índices de diversidad y se analizaron las poblaciones con estadísticas  $F$  (Wright 1951).

## **Resultados y discusión**

### *Perfil de marcadores RAPDs*

Los iniciadores OPA-08, OPA-11 y OPC-06 produjeron un total de 20 fragmentos. El perfil de amplificación (número, tamaño e intensidad de las bandas) por iniciador se muestra en el Cuadro 2. El iniciador OPA-11, con un total de nueve bandas produjo el mayor número de fragmentos, cuyo tamaño varió de 1900 a 750 pb. Los otros dos iniciadores generaron seis y cinco fragmentos de un tamaño de 1700 a 550 pb para

OPA-08 y de 2200 a 900 pb para OPC-06 (Cuadro 2) (Fig. 2). El DNA de las acículas y de los gametofitos presentó el mismo perfil de amplificación para cada iniciador.

Cuadro 2. Perfil de bandas obtenidos con cada cebador en material haploide y diploide de *Pinus ayacahuite*. Intensidad de las bandas: F = fuerte, I = intermedia y D = débil.

Iniciador	Bandas								
OPA-08	1700 I	1100 F	950 F	850 F	750 I	550 I			
OPA-11	1900 I	1800 I-D	1500 I	1300 I	1200 I	1050 D	900 F	850 I	750 I
OPC-06	2200 F	1700 I	1300 F	1100 F	900 F				

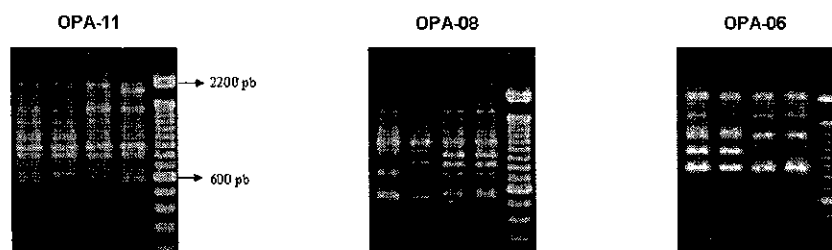


Fig. 2. Perfil de amplificación de marcadores RAPDs obtenidos con los iniciadores OPA-11, OPA-08 y OPC-06 en *Pinus ayacahuite*.

#### *Diversidad genética*

En un estudio de reproducción de fragmentos RAPDs en *P. ayacahuite* se observó que los fragmentos OPA-11<sub>900</sub> y OPA-11<sub>750</sub> no fueron reproducibles (Ramos 2006). Debido

a esto, se eliminaron estos dos *loci* y los análisis de diversidad genética se realizaron solamente con 18 fragmentos (Fig. 2 y 3). Es probable que los fragmentos OPA-11<sub>1900</sub> y OPA-11<sub>750</sub> sean artefactos producidos durante la amplificación. La confiabilidad del análisis de variación genética de poblaciones naturales con RAPDs depende en gran parte de que se eliminen aquellos marcadores que presenten variación artificial.

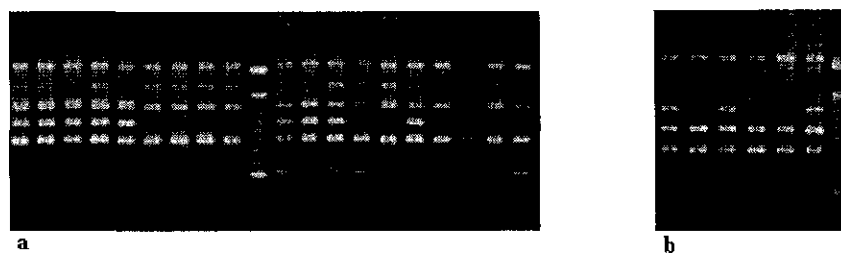


Fig. 3. Marcadores RAPDs (OPC-06) en genoma diploide (a) y haploide (b) de *Pinus ayacahuite*.

### 1. Método indirecto

El análisis del material diploide mostró un porcentaje ligeramente más alto de polimorfismo promedio en la población de Las Palmas en relación a la de San Rafael (Cuadro 3). Sin embargo, los niveles de heterocigosis (H) fueron similares en ambas poblaciones. El análisis multipoblacional mostró un 75 % de *loci* polimórficos, un valor de H de 0.29 y de  $F_{ST}$  de 0.1. El valor de  $F_{ST}$  indica el grado de diferenciación poblacional, para la mayoría de los organismos los valores de  $F_{ST}$  son iguales o menores a 0.15, valores entre 0.05-0.15 indican una diferenciación moderada, entre 0.15-0.25 una gran diferenciación y mayores a 0.25 una diferenciación aún más grande (Ouborg et al. 1999). Así, el valor de  $F_{ST}$  observado en las dos poblaciones de *P. ayacahuite* indica una diferenciación moderada. La distancia genética de Nei en las poblaciones analizadas fue de 0.08.

Cuadro 3. Diversidad genética con marcadores RAPDs en material diploide de *Pinus ayacahuite*.

Población	n	No. de <i>loci</i> polimórficos	% P	H	$F_{ST}$	Distancia genética
Las Palmas	20	13	65	0.25		
San Rafael	20	12	60	0.26		
Ambas	40	15	75	0.29	0.1	0.08

## 2. Método directo

El tamaño de la muestra (n=6 en cada población) en el análisis de material haploide, fue determinado por el número de árboles en los que se disponía de conos maduros. El desconocimiento de la fenología de la mayoría de las poblaciones de *P. ayacahuite* dificulta el muestreo de acículas y conos en buenas condiciones. Sin embargo, el número de gametófitos analizados por árbol en este estudio, fue suficiente para la

identificación de individuos heterocigotos, ya que la probabilidad de no detectarlos cuando se analizan de seis a ocho megagametofitos, es de 3 a 1% (Isabel et al. 1999).

Del total de fragmentos analizados, siete resultaron monomórficos (OPA-08<sub>1700</sub>, OPA-08<sub>1100</sub>, OPA-08<sub>750</sub>, OPA-11<sub>1900</sub>, OPC-06<sub>2200</sub>, OPC-06<sub>1300</sub> y OPC-06<sub>900</sub>) mientras que el resto fue polimórfico de acuerdo al criterio de definir un *locus* como polimórfico cuando el alelo más común presenta una frecuencia menor a 0.95 (Hartl y Clark 1989). El *locus* OPC-06<sub>1100</sub> mostró una clara distorsión en la segregación alélica, el análisis de cinco individuos heterocigotos reveló un 28.8 % de exceso de alelos positivos en relación a alelos nulos. Los *loci* OPA-11<sub>1900</sub>, OPA-11<sub>1500</sub>, OPA-11<sub>1050</sub>, OPA-11<sub>900</sub> y OPA-08<sub>1700</sub> presentaron un exceso de alelos segregantes, sin embargo el tamaño de la muestra (uno o dos individuos heterocigotos), no fue suficiente para la definición de estos resultados, por lo que es necesario analizar un mayor número de individuos heterocigotos para estos marcadores.

En pinos es frecuente observar una distorsión de la segregación alélica o desviación de la relación esperada (1:1) en genes que codifican para proteínas, esta distorsión puede ser observada en la población o en árboles individuales. Una probable explicación para este tipo de observaciones es la existencia de alelos egoístas que afectan la meiosis incrementando la frecuencia con la cual se transmiten; el ligamiento de un *locus* determinado a este tipo de alelos resultará en una desviación de las relaciones mendelianas esperadas. La selección en contra de uno de los alelos durante los procesos de gametogénesis o embriogénesis o el origen citoplasmático del marcador producirían también una distorsión en la segregación (Ledig 1998). En el caso del análisis de segregación de los RAPDs es importante considerar la competencia que ocurre entre los sitios a los cuales se unen los iniciadores, un marcador en particular puede amplificar cuando el genoma se encuentra en un ambiente determinado y no en otro, esta

competencia puede explicar en parte, la presencia de bandas no parentales en los segregantes (Wolfe y Liston 1998).

Con excepción del *locus* OPA-11<sub>1200</sub> en la población de San Rafael ( $\chi^2 = 0.4$ ,  $p > 0.05$ ), las poblaciones mostraron el equilibrio Hardy-Weinberg para el resto de los RAPDs. El análisis de los 16 *loci* válidos (monomórficos y polimórficos), reveló el mismo valor de P en las dos poblaciones y los niveles de H fueron muy similares. En conjunto el análisis genotípico mostró valores de 68.75% y 0.23 para P y H respectivamente (Cuadro 4). El índice de fijación intrapoblacional ( $F_{IS}$ ) fue de 0.0024, este estimado mide la reducción proporcional en heterocigotos dentro de una población debido al efecto de la endogamia, por lo tanto el valor observado indica la ausencia de endogamia. El promedio del índice de fijación total ( $F_{IT}$ ) fue de 0.0851 y el promedio estimado de  $F_{ST}$  de 0.0829. De manera similar a lo observado en el análisis de marcadores RAPDs por el método indirecto, el valor de  $F_{ST}$  indica un grado de diferenciación moderada en las poblaciones de *P. ayacahuite*. La distancia genética de Nei fue de 0.09.

Cuadro 4. Diversidad genética utilizando RAPDs en material haploide de *Pinus ayacahuite*.

Población	n	No. de <i>loci</i> polimórficos	%P	H	$F_{ST}$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	Distancia genética
Las Palmas	6	10	62	0.21				
San Rafael	6	10	62	0.21				
Ambas	12	11	69	0.23	0.082	0.0024	0.085	0.09

Los valores de diversidad poblacional obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de los descritos en otros pinos con marcadores RAPDs. Niveles de diversidad similares a los nuestros fueron reportados por Wu et al. (1999) en *P. radiata* (0.23), los



mismos autores encuentran valores más bajos para *P. muricata* y *P. attenuata* (0.16 y 0.17). Niveles más altos han sido descritos en *P. oocarpa* (Díaz et al. 2001), *P. sylvestris* (Szmidt et al.1996) y *P. contorna* (Thomas et al. 1999). En las especies de pinos que han sido estudiados hasta ahora utilizando aloenzimas, el promedio de heterocigosis esperada es de 0.198 y de diferenciación genética de 0.129 (Delgado et al. 2002). El promedio de heterocigosis obtenido en *P. ayacahuite* (H entre 0.23 y 0.29) utilizando marcadores RAPDs es mayor al observado en el análisis de la diversidad genética de pinos con aloenzimas, probablemente esta diferencia sea resultado del nivel más alto de polimorfismo detectado con marcadores RAPDs en relación a las aloenzimas (Díaz et al. 2001). El valor de  $F_{ST}$  es menor al reportado con aloenzimas, esta diferencia puede ser explicada por la cercanía geográfica de las dos poblaciones analizadas.

En el método indirecto las frecuencias alélicas se estiman a partir de las frecuencias de los individuos en los que el marcador esta ausente. Sin embargo, la ausencia de un marcador RAPD puede ser producto de más de un evento, de tal forma que el cálculo de las frecuencias alélicas por este método puede ser impreciso. Aunque han surgido propuestas para la resolución de este problema (Lynch y Milligan 1994), los mismos autores señalan que sus estimadores no representan la solución completa. El análisis genotípico de marcadores RAPDs en los gametofitos de *P. ayacahuite* permitió además del cálculo directo de las frecuencias alélicas, determinar los patrones de herencia, el equilibrio genético y realizar el análisis poblacional con el estadístico F. A diferencia de lo reportado por Szmidt et al. (1996) en *P. sylvestris*, nosotros no observamos grandes diferencias entre los resultados de la aplicación del método indirecto y el método directo para el cálculo de frecuencias alélicas. Sin embargo, si obtuvimos un valor ligeramente más alto de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) con el

primer método en relación al segundo. Lo anterior es similar a lo reportado por Isabel et al. (1999) en *P. strobilus*.

## Conclusiones

- Los niveles de diversidad genética de *Pinus ayacahuite* con marcadores RAPDs utilizando el método indirecto y directo para el cálculo de las frecuencias alélicas fueron similares.
- Los índices de diversidad genética de *P. ayacahuite* se encuentran dentro de los valores reportados para otras especies de pinos.
- Las poblaciones de *P. ayacahuite* de Las Palmas, Mich. y San Rafael, Edo. de Méx. presentan una diferenciación moderada. El análisis de diferenciación poblacional utilizando el método indirecto mostró un índice de diferenciación ligeramente mayor.
- Con excepción de los *loci* OPC-06<sub>1100</sub> y OPA-11<sub>1200</sub> el resto de los *loci* RAPDs analizados en este trabajo presentaron segregación mendeliana y equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones estudiadas.
- El equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones de *Pinus ayacahuite* y el análisis con estadísticas F mostraron ausencia de endogamia.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Verónica Palomera Ávalos y a Carmen Ramos Navarro por la asistencia técnica prestada para la elaboración de este trabajo. Esta investigación fue financiada por SEP-CONACYT Proyecto 33129-B, Universidad de Guadalajara P3E-2005 Proyecto 32980 y PROMEP-CA03 Biología Celular y Molecular (CGA/III/1179/04) apoyos otorgados para A.R.V.A.

### Literatura citada

- Arvizu, L. 2003. Caracterización de marcadores RAPDs en *Pinus chiapensis* y en el complejo *Pinus ayacahuite-P. strobiformis*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México, pp 53.
- Delgado, P., Cuenca, A., Escalante, A., Molina-Freaner, F., Piñero, D. 2002. Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 27-37.
- 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.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Conner, J.K., Hartl, D.L. 2004. A Primer of Ecological Genetics. Sinauer Associates, Inc., U.S.A., pp 15-16.
- Critchfield, W.B, Little, E.L. 1966. Geographic distribution of the pines of the world, USDA Forest Service Miscellaneous Publications 991.
- Eguiluz, P.T. 1985. Origen y evolución del género *Pinus* (con referencia especial a los pinos mexicanos). *Dasonomía Mex.*, 3(6): 5-31.
- Farjon, A., Styles, B. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica *Pinus* (Pinaceae). Monograph 75. The New York Botanical Garden. New York.
- 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.
- Harris, S.A. 1999. RAPDs in systematics – a useful methodology? En: P.M. Hollingsworth, R.M. Batesman, R.J. Gornall (eds.), *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor y Francis. London and New York, pp 211-228.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1989. Population structure of multilocus associations. *Proceedings of National Academy of Science USA* 78: 5913-5916.
- Isabel, N., Beaulieu, J., Thériault, P., Bousquet, J. 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Molecular Ecology* 8: 477-483.
- 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.
- 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. Ediciones Botas. México.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 70 3321-3323.
- O' Malley, D.M., Whetten, R. 1997. Molecular markers and forest trees. DNA markers En: Caetano-Anollés G., Gresshoff, P. M. (eds), *Protocols and Overviews*, pp 237-257.
- Ouborg, N.J., Piquot, Y., Van Groenendael, J.M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87: 551-568.
- Palomera, V. 2002. Comparación de métodos de extracción de ADN en diferentes tejidos de tres especies de pinos blancos (*Pinus* spp.). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México, pp 42
- Pérez de la Rosa, J.A. 1993. Taxonomía de *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Méx., México.
- Ramos, C.L. 2006. 1993. Diversidad genética de *Pinus ayacahuite* Ehrenberg ex Schelechtendal: Reproducibilidad y segregación de marcadores RAPDs. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México, pp 48
- Ritland, C., Ritland, K. 2000. DNA Fragments Markers in Plants. En: Baker, A.J. (ed.), *Molecular Methods in Ecology*, Blackwell Science Ltd, pp 208-234.
- Sambrook, J., Fritsh E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor. pp 6.12.
- Szmidtl, 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.
- Thomas, B. R., McDonald, S. E., Hicks, M., Adams, D. L., Hodgetts, R. B. 1999. Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical Applied Genetics*. 98: 793-801.
- 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.
- 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, Massachusetts USA, pp 43-86.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals Eugenics* 15: 323-354.

Wu, J., Krutovski, K. V., Strauss, S. H. 1999. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome* 42: 893-908.

Yeh, F.C, Boyle, T., Rongcai, Y., Zhihong, Y., Xiyan, J.M. 1997. PopGene ver. 1.32. Freeware software for population genetics analysis. Dept. of renewable resources. [www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh](http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh).



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN

CINV.566/06

## A QUIEN CORRESPONDA:

Me permito hacer **CONSTAR** que el artículo '**Diversidad genética de *Pinus ayacahuite* utilizando marcadores RAPD's en genoma diploide y haploide**', de los autores **PATRICIA CASTRO FÉLIX, JORGE ALBERTO PÉREZ DE LA ROSA, GEORGINA VARGAS AMADO Y ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA**, fue recibido por un servidor y enviado a revisores, corregido y aceptado para su publicación en el volumen 8 (1) correspondiente a 2006.

Se extiende la presente a petición de la interesada para los fines que juzgue convenientes.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Nextipac; Zapopan, Jal; 25 de abril de 2006



**COORDINACION DE  
INVESTIGACION  
CUCBA**

**DR. SERVANDO CARVAJAL**  
Editor Jefe de la revista  
*Scienia-CUCBA*

Km. 15.5 Carretera Guadalajara - Nogales  
Predio "Las Agujas", Nextipac • AP 1-139  
Tel. 37 77 11 55 y Fax 37 77 11 59  
Zapopan, 45101, Jalisco, México