

AVANCES EN LA EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE ESPECIES FORESTALES MEDIANTE EL USO DE MARCADORES ISOENZIMÁTICOS

L. Iglesias¹ y J.L. Casas²

1 INSTITUTO DE GENÉTICA FORESTAL. UNIVERSIDAD VERACRUZANA (MÉXICO)
LGEORG01@HOTMAIL.COM

2 UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. CIBIO.
JL.CASAS@UA.ES

La aplicación de las técnicas electroforéticas en el campo forestal datan de la década de los años sesenta. A partir de entonces se han desarrollado numerosos estudios encaminados a evaluar el polimorfismo proteico en diversas especies forestales, que en el caso de las coníferas asciende a alrededor de 300 especies (Hamrick y Godt, 1996). Gran parte del progreso alcanzado dentro del campo de la genética poblacional experimental en las especies forestales ha sido posible mediante el empleo de los análisis isoenzimáticos multilocus (Gillet, 1999).

La amplia utilización de los marcadores isoenzimáticos en la estimación de la variación genética de las poblaciones forestales se debe en gran medida a las ventajas que las mismas ofrecen comparada con otras clases de marcadores genéticos. Los análisis isoenzimáticos permiten revelar un gran número de *loci* de una forma rápida, sencilla y poco costosa (Bermejo-Velázquez, 1993; Gillet, 1999). Las variantes isoenzimáticas poseen además la ventaja de que pueden ser resueltas usando las mismas téc-

nicas básicas para la mayoría de las especies con independencia de su hábitat, tamaño o longevidad (Hamrick, 1990) de forma que permite evaluar numerosos individuos para diversos sistemas enzimáticos en un período relativamente corto de tiempo (Bermejo-Velázquez, 1993).

Una de las mayores ventajas de estos marcadores radica en que generalmente los *loci* enzimáticos de las especies forestales se expresan de forma *codominante*. Esta situación permite la identificación clara de los genotipos heterocigotos en organismos diploides facilitando con ello la obtención de estimados de frecuencias alélicas en estudios de genética poblacional (Bermejo-Velázquez, 1993). Se ha constatado además que los *loci* enzimáticos se segregan en una proporción mendeliana, aunque en algunos casos también se ha detectado la presencia de alelos nulos y zonas sobrelapadas de actividad codificada por diferentes *loci* como resultado de efectos de dominancia así como casos poco frecuentes de distorsión en la segregación (Rudin y

Ekberg, 1978; Adams y Joli, 1980; Bermejo-Velázquez, 1993; Prus-Gowacki y Stephan, 1998). También se ha reportado (Bahrman y Damerval, 1989) un efecto de pleiotropía en la cantidad de proteínas de *Pinus pinaster* Ait.

Las variantes isoenzimáticas poseen además la ventaja de que pueden detectarse en una amplia variedad de tejidos. En particular cabe destacar que se han detectado polimorfismo isoenzimático en una gran variedad de tejidos de coníferas, que incluyen entre otras hojas adultas y juveniles, yemas, polen, embriones y megagametofitos (Bingham *et al.*, 1964; Rudin, 1977; Mitton *et al.*, 1979; Adams, 1983; Müller-Starck *et al.*, 1996). Al respecto, cabe indicar los resultados obtenidos por Iglesias *et al.*, (2002) al realizar un análisis de la variación en la composición de isoformas esterasas y fosfatasas ácidas en diversos tejidos (hoja cotiledonal (Hc), megagametofito (M) y embrión (E)) de *Pinus hartwegii* Lindl., que constataron la existen-

cia de un marcado polimorfismo tisular dada la presencia de perfiles de bandas distintivos mostrados por los diversos tejidos examinados (Figura 1).

Sin embargo, la mayor parte de los estudios aloenzimáticos realizados en coníferas han sido efectuados en semillas, dado que estas contienen un megagametofito haploide (Adams, 1983; Bermejo-Velázquez, 1993). De esta manera, el análisis de los patrones de segregación de los megagametofitos de árboles parentales individuales permite determinar el control genético y las relaciones de ligamiento sin necesidad de efectuar cruces y estudiar las progenies en fase de plántula (Rudin y Ekberg, 1978; Neale y Adams, 1981; El Kassaby *et al.*, 1987). De igual forma la segregación de aloenzimas en megagametofitos de árboles individuales puede ser utilizada para la determinación del genotipo de los árboles parentales (Conkle y Adams, 1977).

Por otro lado, el análisis tanto del megagametofito como del embrión en semillas de especies de

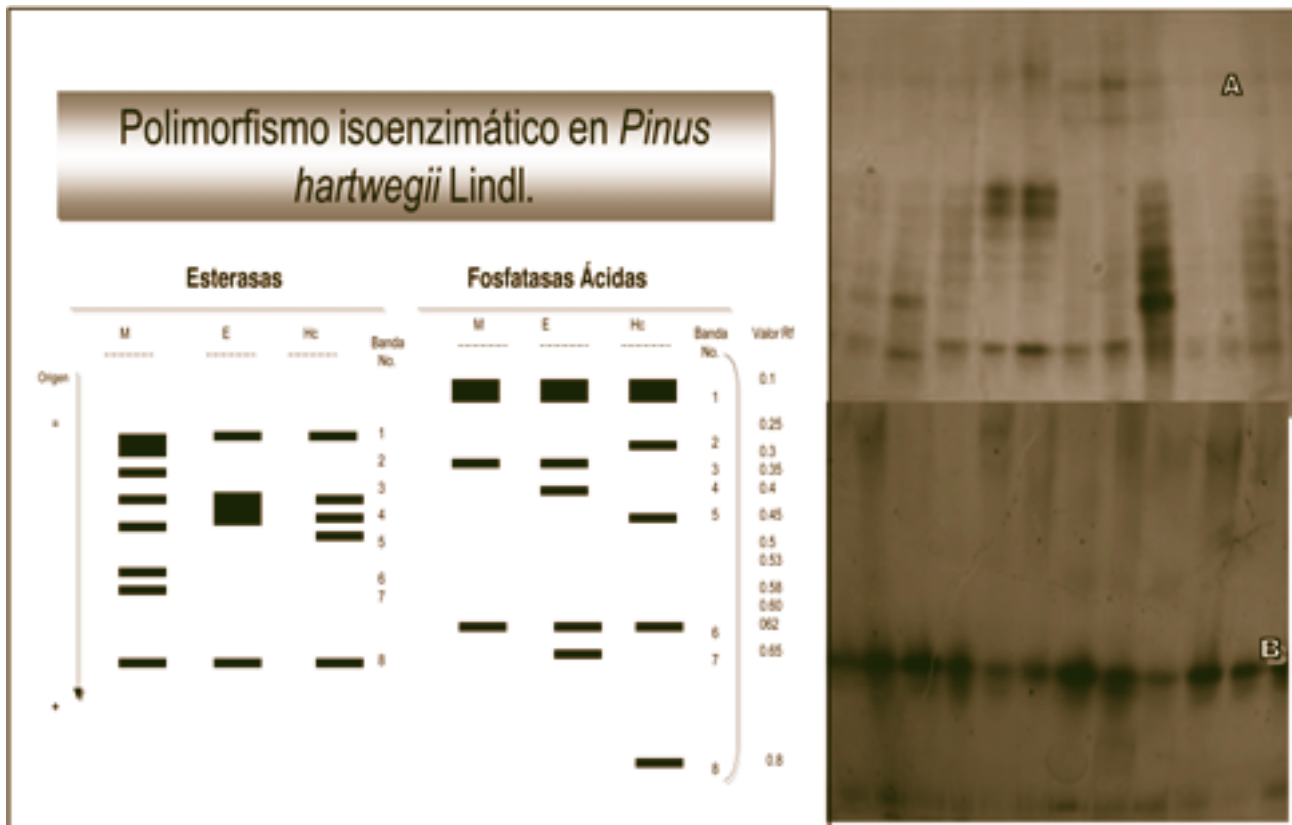


Figura 1. Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. de Cofre de Perote, Veracruz (México). A: Isoformas de esterasas; B: Isoformas de fosfatasas ácidas.

coníferas permite inferir la composición genética de los gametos masculinos y femeninos que contribuyen directamente a la formación de cada embrión lo cual resulta muy útil para abordar estudios relacionados con la biología reproductiva de las poblaciones (Bermejo-Velázquez, 1993).

Por todas estas ventajas es por lo que a pesar de las limitaciones que éstas poseen y dado que sólo revela una porción limitada de la variación genética existente (Iglesias y Rojas, 1992), los marcadores aloenzimáticos se siguen empleando hoy en día sobre todo en el ámbito forestal (Cruzan, 1998; Gillet, 1999). Dentro de este contexto la mayor parte de los estudios que se han desarrollado en el campo forestal han puesto de manifiesto el valor que estos revisten sobre todo para el estudio de la diversidad genética, que como se sabe resulta fundamental para el desarrollo de programas apropiados de conservación genética (Szmidt, 1995). Así se cuenta hoy en día con una voluminosa información sobre el empleo de estos marcadores para, entre otros, conocer los niveles y patrones de distribución de la variación genética dentro y entre diversas poblaciones así como evaluar y comparar la estructura poblacional de diversas especies forestales.

Caben citar entre los estudios aloenzimáticos que se han efectuado con este fin en forestales los realizados en: *Abies alba* (Hussendörfer, 1999), *Abies balsamea* (Shea y Furnier, 2002), *Cupressus sempervirens* (Schiller y Korol, 1997), *Dryobalanops aromatica* (Lee *et al.*, 2000), *Picea abies* (Geburek, 1999), *Picea glauca* (Feret, 1971), *Picea sitchensis* (Yeh y El Kassaby, 1980), *Pinus albicaulis* (Rogers *et al.*, 1999), *Pinus brutia* (Conkle *et al.*, 1988; Kara *et al.*, 1997), *Pinus contorta* (Danick y Yeh, 1983; Wheeler y Guries, 1982), *Pinus engelmannii* (Bermejo-Velázquez, 1993), *Pinus leucodermis* (Bucci *et al.*, 1997), *Pinus greggii* (Ramírez *et al.*, 1997), *Pinus palustris* (Schmidting y Hipkins, 1998), *Pinus pinaster* (Salvador, 1997; Salvador *et al.*, 2000), *Pinus pungens* (Feret, 1973), *Pinus sylvestris* (Ramuson y Rudin, 1971; Forrest *et al.*, 2000), *Pseudotsuga menziessi* (Hoffmann y Geburek, 1995), *Tectona grandis* (Kjær y Siegismund, 1996), *Thuja dolabrata* (Sakai *et al.*, 1971), *Toona ciliata* (McDonald, 2002).

De estos estudios se ha podido conocer que las especies forestales exhiben los niveles más elevados de variación aloenzimática en comparación con otros grupos de organismos (Hamrick *et al.*, 1979; Hamrick *et al.*, 1981). El nivel de polimorfismo detectado en las plantas leñosas resulta ser incluso superior a lo detectado en especies herbáceas debido entre otros a que las especies forestales se caracterizan por poseer una amplia dispersión, alta longevidad además de que se reproducen por polinización cruzada y presentan una alta fecundidad (Hamrick y Godt, 1989; Ledig, 1998). Este alto nivel de variación genética es necesario para garantizar la adaptabilidad actual y futura de las especies y su evolución continuada así como para satisfacer las cambiantes necesidades de uso final y adaptarse a las condiciones ambientales que evolucionan dinámicamente (Ramanatha Rao y Hodgkin, 2002).

Los niveles de diversidad genética detectados mediante el empleo de marcadores bioquímicos varían grandemente entre especies forestales. Al respecto se han detectado rangos de variación que oscilan entre cero, como el caso descrito por Ledig y Conkle, (1983) en *Pinus torrellana*, a un 30-36% como lo observado entre otros por Hiebert y Hamrick (1983) en *Pinus engelmannii* y por Ramírez *et al.*, (1997), en *Pinus greggii*.

Hoy en día se conoce que la variación genética en las poblaciones forestales se encuentra estructurada en espacio y tiempo (Loveless y Hamrick, 1984). Es por ello que muchos estudios aloenzimáticos han estado dirigido a conocer la distribución espacial de la diversidad, ya que los patrones de variabilidad aloenzimática, tanto entre como dentro de poblaciones, resultan de gran utilidad para formular estrategias más eficientes de conservación (Ramanatha Rao y Hodgkin, 2002). Al respecto, diversos autores (Brown y Moran, 1981; Adams, 1981; Davidson y El Kassaby, 1997; Chamberlain, 1998) han brindado buenos ejemplos de como los datos aloenzimáticos pueden ser utilizados en la selección del número y distribución de las reservas *in situ* o colecciones de semillas.

De todo ello se desprende la importancia de lograr una adecuada comprensión de la diversidad genética en sus tres niveles: a nivel de especie, de



género y de ecosistemas, así como las diversas causas que afectan la diversidad alélica y las diferencias en las frecuencias alélicas dentro y entre poblaciones. Hasta la fecha los estudios realizados para conocer la estructura genética de diversas poblaciones forestales han puesto de manifiesto el hecho de que por lo regular las especies arbóreas se caracterizan por poseer elevados niveles de variación genética dentro de poblaciones y bajo entre poblaciones (Ledig *et al.*, 2000). Al respecto numerosos trabajos desarrollados en el campo forestal han confirmado la existencia de relativamente bajos niveles de variabilidad genética entre poblaciones (Hamrick *et al.*, 1981; Wheeler y Guries, 1982; Guries, 1984; Fournier y Adams, 1986; Merkle y Adams, 1987; Bermejo-Velázquez, 1993; Barreneche *et al.*, 1996; Bucci *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000). De esta manera una gran parte de los estudios efectuados indican que las especies forestales parecen ser genéticamente poco diferenciadas, ya que en muchos casos las poblaciones de una especie comparten los mismos alelos, con frecuencias más o menos similares (Bermejo-Velázquez, 1993).

Un aspecto que también se ha puesto en evidencia de los diversos estudios que al respecto se han realizado es que el rango geográfico o la amplitud ecológica de una especie puede no ser siempre un indicador preciso de su variación genética. De esta manera, algunos estudios indican que aquellas especies que presentan distribuciones naturales grandes y continuas tales como *Q. petraea* o *Q. rubra* exhiben niveles elevados de diversidad genética (Kremer y Petit, 1993). Sin embargo, los estudios realizados por Merkle y Adams (1987) para conocer la variación genética en *Pseudotsuga menziesii* de Oregón, Estados Unidos, mostraron que menos del 1% de la variación isoenzimática se debía a diferencias entre poblaciones y que esta poca diferenciación no estaba correlacionada con variables ambientales ni con la distancia entre poblaciones. Similares resultados han sido entre otros obtenidos por Bermejo-Velázquez (1993) quien también encontró bajos valores (13%) de diferenciación entre las poblaciones de *Pinus engelmannii* de México, por lo que concluyó que las poblaciones de esta especie no están fuertemente diferenciadas geográficamente en términos de variación aloen-

mática. Sobre el particular Maki (2003) indicó que no siempre aquellas poblaciones grandes o ampliamente distribuidas cuentan con una gran diversidad genética. Al respecto González-Astorga y Núñez-Farfán (1999) apuntaban que aquellas especies con rango geográfico restringido como *B. vazquezii*, no necesariamente se caracterizaban por poseer una baja diversidad genética. De acuerdo con Ramanatha Rao y Hodgkin (2002), la variación geográfica es casi imposible separarla de la variación determinada por factores ecológicos, por lo que a menudo se engloba su efecto dentro de los factores ecogeográficos que actúan sobre las poblaciones ubicadas en diferentes regiones geográficas.

Otros estudios han detectado, por otra parte, niveles sustanciales de diferenciación entre poblaciones de diversas especies forestales. Al respecto caben mencionar los resultados obtenidos por Jørgensen *et al.* (2002) quienes detectaron una elevada diversidad genética entre las poblaciones de *Pinus flexilis* estudiadas. De igual forma Fady *et al.* (1999) constataron la existencia de una variación sustancial en las poblaciones de *Abies alba* de la zona mediterránea de Francia; no obstante apuntaban que desde el punto de vista genético éstas no parecían ser diferentes, lo que sugería un origen genético común.

En coníferas algunos autores (Delgado *et al.*, 1999; Ledig *et al.*, 2000; Aguirre-Planter *et al.*, 2000) han puesto de manifiesto que las poblaciones en México y América Central muestran niveles más elevados de diferenciación en relación con lo encontrado para poblaciones de latitudes más al norte. Según Ledig *et al.* (2000) esto puede deberse a que estas poblaciones se encuentran más fragmentadas lo que pudo haber ocasionado una reducción de los niveles de flujo genético y por ende haberse favorecido ya sea la deriva genética en las poblaciones aisladas de menor tamaño o la diferenciación por selección. No obstante al parecer la deriva genética constituye la explicación más probable ya que se ha detectado (Ledig, 2000) en las poblaciones californianas de *Pinus coulteri* D. Don, poco distanciadas geográficamente, un valor similar de diferenciación (F_{st}) a lo observado en las poblaciones de pinos de México y América Central.

Por otra parte numerosos autores han resaltado la existencia de una marcada estructura espacial del polimorfismo aloenzimático dentro de poblaciones de especies forestales (Furnier y Adams, 1986; Hamrick y Godt, 1989; Ramírez *et al.*, 1997; Stoehr y El-Kassaby, 1997; Parker *et al.*, 1997; Epperson y Gi Chung, 2001). Se ha sugerido al respecto que la alta variabilidad intrapoblacional en los árboles forestales puede constituir una respuesta adaptativa a la heterogeneidad espacial y temporal encontrada en las poblaciones (Adams, 1981). Como se sabe la mayoría de la variación en los caracteres adaptativos de especies forestales es clinal y esta relacionado a menudo con gradientes ambientales (temperatura o humedad); esto enfatiza el papel de los factores ecológicos en la determinación de la extensión y distribución de la diversidad genética. No obstante esto no se cumple en su totalidad pues se han encontrado casos donde la plasticidad ha resultado ser lo suficientemente grande para permitir que poblaciones genéticamente similares ocurran en una amplia gama de ambientes (McNeilly, 1997).

La cantidad y distribución de la diversidad genética dentro de las especies forestales resulta influida por factores tales como el tamaño del árbol, longevidad, fecundidad, sistema de apareamiento y distribución geográfica (Hamrick y Godt, 1989). Dentro de estos factores se le ha prestado un énfasis particular en el estudio de la diversidad genética en poblaciones forestales al papel que juega el sistema de reproducción sobre el modo en que se encuentra distribuida la variación genética dentro y entre poblaciones (Ramanatha Rao y Hodgkin, 2002). Dentro de este contexto se ha indicado que es muy común encontrar en especies de coníferas manifestaciones del fenómeno de la depresión consanguínea (Williams y Savolainen, 1996). De acuerdo con Remington y O'Malley (2000) y Husband y Schemske (1996) la depresión consanguínea, que por lo regular se manifiesta en etapas tempranas en coníferas, se debe más bien a mutaciones letales que a mutaciones deletéreas. La letalidad embrionaria generalmente produce semillas vacías y las coníferas portan en promedio de 8-10 letales embrionarios (Griffin y Lindgren, 1985). Al respecto Keller y Waller (2002) apuntaba la presencia de efectos de

consanguinidad importantes sobre la producción de semilla, germinación, supervivencia y resistencia a estrés en poblaciones fragmentadas con una reducida diversidad genética.

De este modo se ha constatado la presencia de este fenómeno en diversas poblaciones de especies de pinos, como la especie *Pinus hartwegii* (Iglesias *et al.*, 1999; Solís, 2002) que como consecuencia de la fragmentación que éstas han sufrido son más susceptibles por su tamaño a los disturbios ambientales o antropogénicos y por ello corren el riesgo de sufrir fenómenos genéticos (deriva génica, cuellos de botella, etc.) que las lleven a la pérdida de variabilidad genética y por estocasticidad ambiental, a la extinción. Es por ello que desde hace algunos años el Instituto de Genética Forestal de la Universidad Veracruzana en México ha estado desarrollando diversos estudios encaminados a evaluar los niveles y patrones de distribución de la diversidad genética en las dos poblaciones de esta especie (Figura 2) con que cuenta el estado de Veracruz, empleando diversos marcadores (cuantitativos y aloenzimáticos). Los resultados obtenidos hasta la fecha han indicado la existencia de una fuerte diferenciación en las dos poblaciones examinadas (Iglesias *et al.*, 2001) así como una variación intrapoblacional sustancial tanto desde el punto de vista morfométrico como isoenzimático (Solís, 2002; Iglesias, datos no publicados).

El empleo de diferentes tipos de caracteres para evaluar la diversidad genética en las poblaciones obedece a lo apuntado entre otros por Kjær y Graudal (2000) quien señalara que no todas las características que se emplean para evaluar la diversidad genética exhiben patrones de diferenciación genética similares. Esto se ha observado en *Pinus contorta* (Yang *et al.*, 1996) y en *Pinus sylvestris* (Karhu *et al.*, 1996). Según Karhu *et al.* (1996) esto obedece en gran medida a la interacción entre las fuerzas evolutivas: deriva genética, migración y en particular de la acción de la selección natural. Como se sabe la variación genética cuantitativa de una especie vegetal está íntimamente ligada a las condiciones medioambientales que prevalecen en el ciclo de vida de la misma, de modo que la estrecha relación planta-medio ambiente marca la importante propiedad para la especie vegetal de poseer la suficiente flexibi-

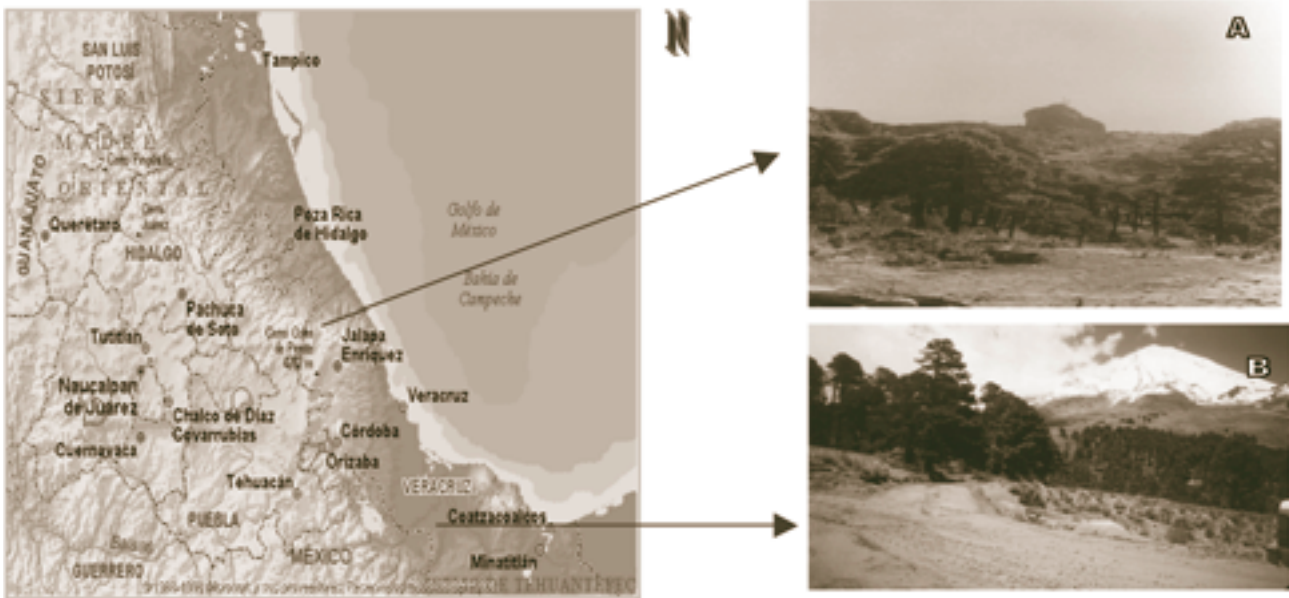


Figura 2. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. en el estado de Veracruz, México. A. Población del Cofre de Perote. B. Población del Pico de Orizaba.

lidad de desarrollo o normas de reacción amplias para existir en las condiciones donde se ubican (Stebbins, 1950, citado por Pérez, 1984). Por otro lado, la variación genética evaluada a través de marcadores isoenzimáticos al ser menos influidos por el ambiente, proporcionan información precisa de patrones reproductivos tales como niveles de consanguinidad y reducción de la variabilidad debida a diversos factores (Bermejo-Velázquez, 1993).

No obstante la utilidad que por todo lo antes referido poseen los marcadores isoenzimáticos no debe descartarse la utilidad que brindan los marcadores moleculares dentro de este contexto. Al respecto se ha resaltado en los últimos años la utilidad del empleo de marcadores moleculares, como los microsatélites, para revelar diferencias en los estimados de diversidad genética en poblaciones fores-

tales como *Pinus radiata* (Karhu, 2001). Es por ello que se encuentra en desarrollo algunos trabajos en *Pinus hartwegii* para la detección de marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) (Iglesias *et al.*, 2003) que permitan conocer de un modo integral los niveles y distribución de la diversidad genética existente en este valioso recurso forestal.

NOTA DE LA REDACCIÓN

Por limitaciones de espacio no se ha podido incluir la lista completa de referencias bibliográficas que acompaña a este artículo. Los interesados en obtenerla en formato electrónico pueden solicitarla directamente a la dirección de correo electrónico de Cuadernos de Biodiversidad.