



# VARIACIÓN EN LA COMPOSICIÓN ISOENZIMÁTICA EN LA POBLACIÓN DE *PINUS HARTWEGII* LINDL. DEL PICO DE ORIZABA, VERACRUZ

**Laura Y. Solís Ramos<sup>1</sup> y Lourdes G. Iglesias Andreu<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> TESISISTA MAESTRÍA ECOLOGÍA FORESTAL, <sup>2</sup> INSTITUTO DE GENÉTICA FORESTAL, UNIVERSIDAD VERACRUZANA (MÉXICO)

EMAIL: [CATLEYASP@HOTMAIL.COM](mailto:CATLEYASP@HOTMAIL.COM); [LGEOR@HOTMAIL.COM](mailto:LGEOR@HOTMAIL.COM)

## INTRODUCCIÓN

La caracterización e identificación de poblaciones forestales generalmente se basa en la descripción de características morfológicas de las plantas; pero su uso es limitado debido a que por lo regular estas características se ven afectadas por el ambiente en donde se desarrolla el organismo (Stegeman, 1984; Iglesias y Aparicio, 2001).

Como alternativa, en las últimas dos décadas se han desarrollado y aplicado con éxito los marcadores isoenzimáticos para estudio de la variación en poblaciones forestales (Parker *et al.*, 1997; Schmidting *et al.*, 1999).

Una gran ventaja de la caracterización isoenzimática comparada con los datos de características morfológicas, es que las isoenzimas por ser productos primarios de los genes, son menos afectadas por el ambiente; además, como la expresión de las enzimas es generalmente codominante, es posible identificar tanto genotipos homocigotos como heterocigotos. El uso de las isoenzimas como marcadores se debe a que están libres de asociaciones deletéreas o efectos epistáticos/pleiotrópicos los cuales ca-

racterizan a los marcadores morfológicos (Asiedu, 1992; Iglesias y Rojas, 1992).

Es por ello que se han desarrollado en coníferas y particularmente en el género *Pinus* numerosos estudios isoenzimáticos que han demostrado la existencia de una amplia variabilidad intrapoblacional (Hamrick *et al.*, 1981). Sin embargo pese a su importancia la mayoría de los estudios que se han realizado en la especie de *P. hartwegii* han sido efectuadas mediante el empleo de marcadores de tipo morfológicos (Pérez, 1984 y Bonilla, 1993, Iglesias, Solís y Hernández, 2001, datos no publicados).

Estudios previos efectuados en las poblaciones de *Pinus hartwegii* ubicadas en el Cofre de Perote y Pico de Orizaba, Ver., han mostrado que las mismas se encuentran seriamente afectadas, dado el bajo porcentaje de germinación (menor de un 10%) así como el elevado número de semillas vacías que sobrepasa la cifra del 50% en dichas poblaciones constituyen, al parecer, manifestaciones del fenómeno de depresión consanguínea bastante común en especies de coníferas (Williams y Savolainen, 1996) que están ocasionando una sensible disminución en la producción y calidad de la semilla de estas

poblaciones que están provocando una seria reducción de las tasas reproductivas en dichas poblaciones (Iglesias *et al.*, 1999; Solís e Iglesias, datos no publicados). Esta problemática es preocupante dada la restringida distribución de la especie en el país, así como por su reducida población en el estado de Veracruz.

Teniendo en cuenta todo lo anterior se desarrolló el presente trabajo con el fin de conocer y describir la variación en la composición esterasas en megagametofitos de árboles provenientes de la población de *Pinus hartwegii* del Pico de Orizaba, Ver.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se efectuó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Instituto de Genética Forestal de la Universidad Veracruzana en Xalapa, Ver. Se colectaron semillas de 20 árboles de *Pinus hartwegii* Lindl. de la población del Pico de Orizaba, Veracruz, México, localizada entre los 19° 01' de latitud Norte y 97° 15' de longitud Oeste. El sitio presenta suelos profundos, arenosos y con buen drenaje, precipitación media anual de 2091.1 mm, temperatura media anual de 18.8 ° C, y la población bajo estudio se encuentra entre los 3500 y 3800 msnm (SMN, 1984).

Las semillas debidamente tratadas e identificadas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su uso. Posteriormente se colocaron en cajas Petri con agrolita para su germinación, hasta que la radícula alcanzó una longitud de 3 a 5 mm. Para extraer las proteínas de las semillas y hacer el corrimiento electroforético de las muestras, se removió la testa y el embrión se separó del tejido del megagametofito. Posteriormente se homogenizaron en frío, los extractos de megagametofito en tampón fosfato 0.2M pH 7.5. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se sometió el sobrenadante a electroforésis.

La electroforésis se realizó en un sistema discontinuo de geles de poliacrilamida en lámina vertical (PAGE) siguiendo el proce-

dimiento descrito por Iglesias *et al.* (1974).

La tinción de las isoenzimas esterasas (Est: EC 3.1.1.2) se realizó siguiendo el procedimiento de Iglesias (1986). El revelado se inició al agregar el sustrato de la enzima de interés a la lámina del gel colocado en una charola de plástico de tinción de 17 x 11cm. Se almacenó hasta que las bandas fueron evidentes y nítidas en el gel, se retiró de la solución y se lavó con agua corriente.

Los patrones de bandas se dibujaron sobre papel milimétrico, designando como cero el punto de unión del gel de compactación y separación y como 100 la posición de la banda 1, de más rápida migración anódica.

Para el establecimiento de los patrones de bandas de cada genotipo en estudio se registró el polimorfismo detectado sobre la base de número, posición relativa e intensidad de tinción de cada banda detectada. Para esta última se siguió la escala de tres grados: 1 = tenuemente teñida, 2 = medianamente teñida y 3 = muy teñida. Se determinaron los genotipos individuales y sobre esta base se calcularon los parámetros poblacionales: porcentaje de polimorfismo (PP), de acuerdo con Hendrick (1985), el índice de heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) de acuerdo con la fórmula de Nei (1978) corregida para muestras pequeñas y el número promedio de alelos por locus (NPAL) de acuerdo con lo propuesto por Ayala y Kiger (1984).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos revelaron la existencia de un total de ocho bandas con actividad esterasa bien definidas, las que se agruparon en cuatro zonas electroforéticas (Figura 1) según la movilidad electroforética en: Est1, Est2, Est3 y Est4. En la zona Est1 de más lenta movilidad aniónica se detectaron dos bandas (bandas 1 y 2) con valores de Rf de 0.38 y 0.43 cm, la primera medianamente teñida (escala 2) y la segunda altamente teñida (escala 3); En las zonas Est2 y Est3 se detectaron cuatro bandas (bandas 3,4,5 y 6) con valores de movilidades electroforéticas de: 0.51, 0.60 y 0.65, 0.70 cm

respectivamente. La banda 3 resultó tenuemente teñida (escala 1), mientras que el resto de las bandas mostraron una elevada intensidad de tinción (escala 3). Dentro de estas últimas las bandas 4 y 5 mostraron una coloración roja que denota la presencia de actividad colinesterasa. Por último en la zona Est4 se detectaron dos bandas (bandas 7 y 8) la primera con mayor intensidad de tinción (escala 3) a diferencia de la banda 8 que resultó medianamente teñida (escala 2). Estas bandas mostraron movilidades electroforéticas de 0.77 a 0.81 cm.

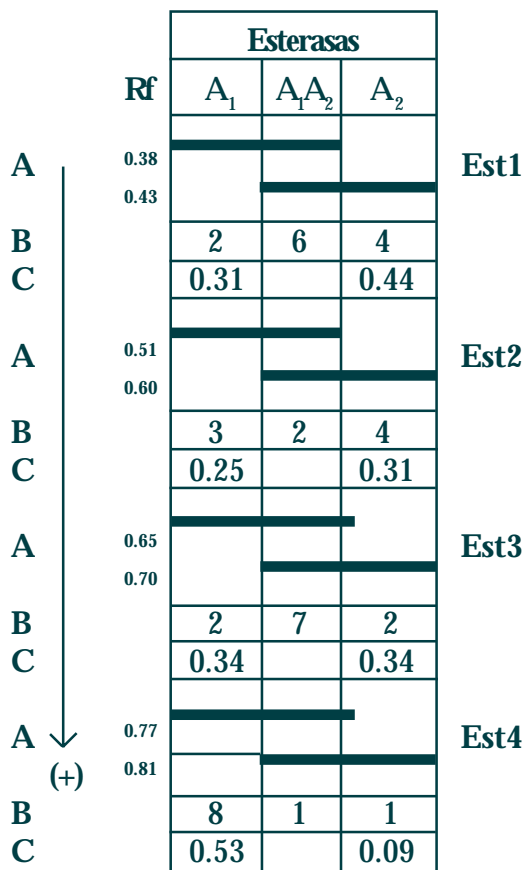


Figura 1. Zimograma del sistema enzimático analizado en *Pinus hartwegii* Lindl. A = Loci; B = Alelos; C = Frecuencia alélica.

Un análisis integral del nivel de polimorfismo en los sitios con actividad esterasa detectadas revelaron la presencia de un 100%

de polimorfismo isoenzimático en los individuos examinados, lo que denota la presencia de una elevada variación en la composición esterazas en megagametofitos de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. examinada.

Cabe significar no obstante que estos resultados concuerdan con lo reportado para la mayoría de las especies de *Pinus*, y en particular coincide con lo encontrado en *Pinus taeda* por Hamrick *et al.* (1981). De igual forma concuerdan con lo obtenido en un trabajo anterior (Iglesias y Cruz, 2001, datos no publicados) donde se detectó en la población del Cofre de Perote, Ver. la presencia de un elevado polimorfismo en la composición esterazas de los megagametofitos examinados en dicha población.

La presencia de un elevado polimorfismo en esta población concuerda además con lo planteado por Ledig (1998) en relación a que los pinos constituyen uno de los grupos de organismos más genéticamente variables del reino vegetal.

Por otra parte el análisis de la base genética de las variantes polimórficas detectadas denotaron la presencia de cuatro loci cada uno con dos alelos (A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>A<sub>2</sub> y A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>). La frecuencia genética se encontró dentro del rango de 0.06 a 0.50. De igual forma se detectó un valor relativamente elevado de número de alelos por locus (NPAL= 2.8) en esta población. Esto coincide con el número promedio de alelos por locus observados para la mayoría de las especies de *Pinus* que se han estudiado, que fluctúa en torno al valor de 2.3 (Hamrick *et al.*, 1981).

Finalmente y como era de esperar en base al nivel de polimorfismo detectado se observó un elevado valor de heterocigocidad esperada (He = 0.45) valor muy superior al registrado en otras especies del género *Pinus* (Ledig, 1986; Bermejo, 1993). Cabe significar que el parámetro poblacional de heterocigocidad esperada constituye una medida más precisa de la variabilidad genética que el nivel de polimorfismo (Ayala y Valentine, 1983).

La presencia de un exceso de heterocigotos en poblaciones de especies de coníferas no ha sido ampliamente reportado en la literatura (Gauthier *et al.*, 1992; Beaulieu y Simon, 1995;

Lamy *et al.*, 1999). De acuerdo con Gauthier *et al.* (1992) lo anterior puede deberse a la eliminación de árboles debido a un efecto de depresión consanguínea que pudiese estar actuando tanto a nivel de semillas, plántulas o de árboles jóvenes. Cabe mencionar al respecto que es posible que la presencia de una elevada heterocigocidad observada en esta población sea debida a un efecto marcado de depresión consanguínea que este operando a nivel de semillas. Esto explicaría los bajos valores de viabilidad de la semilla detectados en estudios previos realizados en esta población (Solís e Iglesias, datos no publicados). Cabe mencionar que se han reportado similares resultados en otras especies de pinos (Linhart *et al.*, 1981; Tigerstedt, 1983). No obstante, como sugirieron Mitton y Grant (1984) los estreses ambientales pueden también favorecer la presencia de una elevada heterocigocidad en las poblaciones.

Es posible que estudios futuros que se realicen en esta dirección empleando un mayor número de sistemas isoenzimáticos y marcadores moleculares permitan obtener una mayor información para el establecimiento de estrategias apropiadas para el manejo y conservación de esta población.

## CONCLUSIONES

✓ Se detectó un elevado polimorfismo en la composición esterasas en muestras de megagametofito provenientes de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. ubicada en el Pico de Orizaba, Ver., las que estuvieron codificadas por 4 loci con 2 alelos.

✓ Los altos valores detectados en cuanto al número de alelos y heterocigocidad esperada sugieren la existencia de un elevado número de individuos heterocigotos en dicha población que pudiera estar dado por un efecto de depresión consanguínea operando a nivel de semillas lo cual estaría en estrecha concordancia con la baja viabilidad de las semillas observada en la misma.

## 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.