

ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE *Pinus hartwegii* Lindley DEL COFRE DE PEROTE, MEXICO

Yamilet Tivo Fernández

yamilet84@hotmail.com

Lourdes G. Iglesias Andreu

lgeorg01@hotmail.com

INSTITUTO DE GENÉTICA FORESTAL. UNIVERSIDAD VERACRUZANA (MÉXICO)

INTRODUCCIÓN

Pinus hartwegii Lindley constituye una de las especies de pinos que se presenta en el estado de Veracruz como pequeñas poblaciones disjuntas (Styles, 1993). Esta especie tiene un gran valor desde el punto de vista ecológico así como socioeconómico. Al respecto Solís (1994) ha indicado que como las poblaciones de esta especie se desarrollan a mayores elevaciones sobre el nivel del mar, cumplen funciones de protección a otros recursos y amortigua los efectos de contaminación ambiental, además que contribuye, como regulador del ciclo hidrológico producto del deshielo de los volcanes, alimenta de agua a los mantos freáticos.

Aunque no hay evidencias que lo confirmen, se ha observado que *Pinus hartwegii* resiste, satisfac-

toriamente, el efecto de incendios severos con efectos catastróficos (Solís, 1994). Sumado a ello se ha podido constatar la presencia en varias poblaciones de esta especie en el estado de Veracruz de un bajo porcentaje de germinación, menor de un 50%, así como de un elevado porcentaje de semillas vacías, que sobrepasa el 50% (Solís, 2002), cifras que, probablemente, son manifestaciones del fenómeno de depresión consanguínea, bastante común en especies de coníferas (Williams y Savolainen, 1996; Remington y O'Malley, 2000) y que está ocasionando una sensible disminución en la producción y calidad de la semilla de estas poblaciones (Solís *op. cit.*).

Dentro de estas poblaciones afectadas se encuentra la existente en el Parque Nacional “Cofre de Perote” que aunque no ha sido incluida en la

Norma Oficial de especies amenazadas (Norma Oficial Mexicana, 2001) presenta serio deterioro en cuanto a producción y calidad de sus semillas.

Es por ello que adquiere una especial relevancia el desarrollo de estudios citogenéticos en esta especie, que permitan lograr una mejor comprensión de la baja viabilidad de las semillas de esta población a fin de complementar los esfuerzos que actualmente se realizan para la conservación de estos valiosos recursos genéticos forestales.

A pesar de que se han desarrollado diversos estudios citogenéticos en gimnospermas (Khoshoo, 1961; Faulkner, 1979; Eguiluz, 1988; Muratova, 1995; Nurul, 1995; Ledig, 1998; Ahuja, 2001; Gustafsson y Francois, 2002) no se cuenta en *Pinus hartwegii* con una metodología aprobada que permita realizar análisis cromosómicos para conocer si la baja viabilidad detectada se encuentra asociada con algún tipo de aberración cromosómica.

Teniendo en cuenta todo lo antes expuesto se propuso el desarrollo del presente con vistas a evaluar la efectividad de diferentes ensayos citogenéticos para establecer la metodología más adecuada para efectuar análisis cromosómico en la población de *Pinus hartwegii* del Cofre de Perote.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto de Genética Forestal de la Universidad Veracruzana, ubicado en el Parque Ecológico “El Haya”, en el kilómetro 1.5 carretera vieja Xalapa-Coatepec, Veracruz, en asociación con la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de Peñuela en la Congregación de Peñuela, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz.

Con el propósito de establecer la técnica citogenética apropiada para efectuar estudios cromosómicos en ápices radicales de *Pinus hartwegii*, se procedió a evaluar (Tabla 1) el efecto de 49 ensayos. Estos ensayos consistieron en la evaluación de: tres tiempos de toma de las muestras: 8 am, 11 am y 3 pm, cuatro métodos diferentes de pretratamientos: 8-hidroxiquinoleína 0.02 M, durante 2.5 - 12 h a 18°C; colchicina 5 mgL⁻¹ durante 3.5 - 12 h a 18°C; 1,4-*p*-diclorobenceno saturado durante 20-24 h a 4°C y agua helada durante 24 h a 1°C.

Dos tratamientos con fijadores: Carnoy y Farmer por 12 h; diferentes tratamientos de hidrólisis ácida durante 5 min con HCl 1N a 60°C con y sin etanol durante 5 y 10 min, así como un tratamiento con pectinasa al 2% a 37°C por 50 min. Se evaluó, asimismo, el efecto de dos tipos de tinciones: acetocarmín al 0.5% y aceto-orceína al 0.1%. Se incluyeron tres ensayos adecuados para la tinción con el reactivo de Schiff. Finalmente se realizó un “squash”, a fin de proceder a la observación microscópica de las preparaciones (Curtis, 1981).

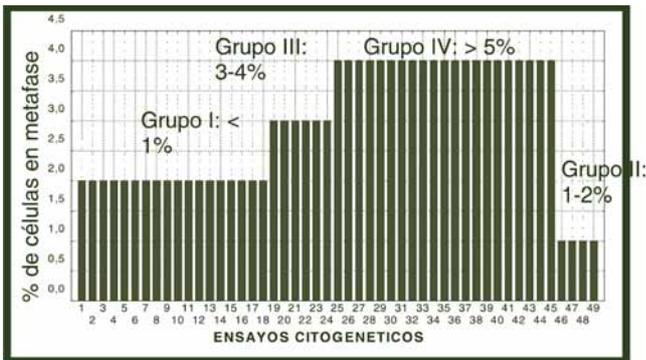
Por cada ensayo se evaluó el número de células en metafase de acuerdo a una escala previamente establecida de cuatro grados (1: > 5%; 2: 3 - 4%; 3: 1 - 2%; 4: (1%); así mismo se determinó la calidad de las preparaciones de acuerdo con una escala de tres grados (3: Bueno: preparaciones con citoplasma y cromosomas bien definidos; 2: Regular: preparaciones con cromosomas poco visibles; 1: Malo: preparaciones con citoplasma plasmolizado). Los resultados obtenidos se graficaron de acuerdo con el programa Statistica (2000). Con los datos obtenidos se realizó asimismo un análisis de conglomerado empleando como índice de disimilitud la distancia de Manhattan y como algoritmo de ligamiento, el método WPGC (Weighted Pair - Group Centroid), a fin de clasificar los diversos ensayos citogenéticos empleados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

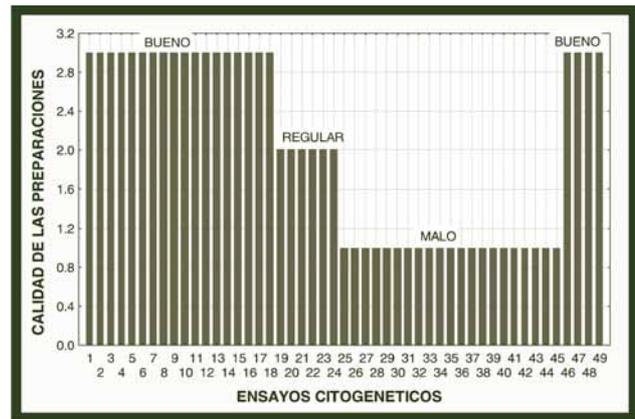
Al evaluar de manera integral los resultados obtenidos de los diferentes ensayos citogenéticos evaluados, se observó que los mismos permitieron constatar valores relativamente bajos de células en metafase (56.1%). Un análisis más detallado de estos resultados reveló que solamente el 29.1% de los ensayos, permitieron detectar células en metafase para efectuar los estudios citogenéticos. De estos ensayos 1, 2, 5, 6, 46 y 48 (conformados en el grupo I y IV), fueron los que mostraron los mejores resultados en cuanto a la presencia de un número relativamente más elevado de células en metafase (Gráfica 1).

Tabla 1
Ensayos empleados para el establecimiento de la técnica citogenética para el estudio cromosómico en *Pinus hartwegii* Lindley.

No.	ENSAYOS
1	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-orceína a las 8 am
2	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-carmín a las 8 am
3	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 8 am
4	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 8 am
5	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-carmín a las 8 am
6	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-orceína a las 8 am
7	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 8 am
8	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 8 am
9	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-carmín a las 11 am
10	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-orceína a las 11 am
11	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-carmín a las 11 am
12	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-orceína a las 11 am
13	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 11 am
14	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 8 am
15	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 11 am
16	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 11 am
17	8-hidroxiquinoleína 12 h + Farmer 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-orceína a las 3 pm
18	8-hidroxiquinoleína 12 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 5 min + aceto-carmín a las 3 pm
19	colchicina 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 8 am
20	colchicina 4 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 8 am
21	colchicina 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 11 am
22	colchicina 4 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 11 am
23	colchicina 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 3 pm
24	colchicina 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 3 pm
25	1,4 paradiclorobenzeno 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 8 am
26	1,4 paradiclorobenzeno 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 8 am
27	1,4 paradiclorobenzeno 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 11 am
28	1,4 paradiclorobenzeno 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 11 am
29	1,4 paradiclorobenzeno 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 3 pm
30	1,4 paradiclorobenzeno 4 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 3 pm
31	agua helada 24 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 8 am
32	agua helada 24 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 8 am
33	agua helada 24 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 11 am
34	agua helada 24 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 11 am
35	agua helada 24 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 3 pm
36	agua helada 24 h + Farmer 12 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 3 pm
37	colchicina 9 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 5 min + reactivo de Schiff + aceto-carmín a las 8 am
38	colchicina 9 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 5 min + reactivo de Schiff + aceto-carmín a las 11 am
39	colchicina 9 h + Carnoy 12 h + hidrólisis 5 min + reactivo de Schiff + aceto-carmín a las 3 pm
40	8-hidroxiquinoleína + 1,4 paradiclorobenzeno 3 h + Carnoy 5 min + pectinasa 50 min a las 8 am
41	8-hidroxiquinoleína + 1,4 paradiclorobenzeno 3 h + Carnoy 5 min + aceto-orceína a las 8 am
42	8-hidroxiquinoleína + 1,4 paradiclorobenzeno 4 h + Carnoy 5 min + aceto-carmín a las 8 am
43	8-hidroxiquinoleína + 1,4 paradiclorobenzeno 4 h + Carnoy 5 min + hidrólisis + etanol al 95 % 3 min a las 8 am
44	8-hidroxiquinoleína 4 h + Carnoy 1 h + pectinasa 50 min + aceto-orceína a las 8 am
45	8-hidroxiquinoleína 4 h + Carnoy 1 h + pectinasa 50 min + aceto-orceína a las 11 am
46	Farmer 1 h + hidrólisis 5 min + aceto-orceína a las 8 am
47	Farmer 1 h + hidrólisis 5 min + aceto-carmín a las 11 am
48	Farmer 1 h + hidrólisis 10 min + aceto-orceína a las 8 am
49	Farmer 1 h + hidrólisis 10 min + aceto-carmín a las 11 am



Gráfica 1. Variación en el porcentaje de células en metafase (según escala de cuatro grados) detectadas con los diferentes ensayos citogenéticos examinados. Statistica (2000).



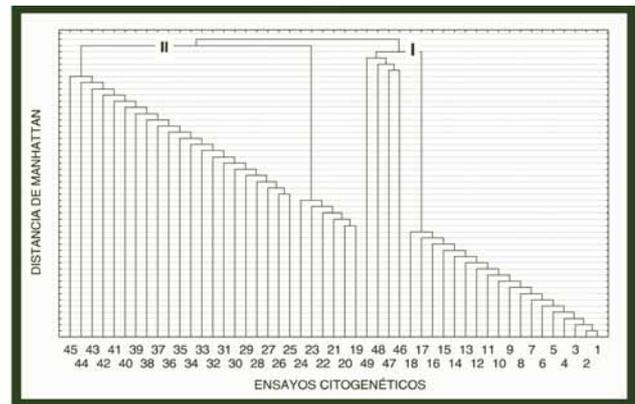
Gráfica 2. Variación en la observación de las preparaciones obtenidas (según escala de tres grados) detectadas con los diferentes ensayos citogenéticos examinados.

Cabe mencionar que no se lograron mejorías en la observación de las preparaciones cromosómicas al emplear la colchicina como pretratamiento y tinción con el reactivo de Schiff, ya que estos ensayos (ensayos 37, 38 y 39) no produjeron valores muy elevados de células en metafase (Gráfica 1). Por ello no se procedió a evaluar otros ensayos que emplean estos reactivos.

Por otra parte, los resultados obtenidos del análisis de la calidad de los diversos ensayos examinados mostraron (Gráfica 2) que solamente el 45% de los mismos permitieron observar preparaciones con cromosomas definidos (ensayos 1, 2, 5, 6, 46 y 48), mientras que en el resto de las preparaciones presentaban un citoplasma plasmolizado.

Un análisis de conjunto permitió clasificar a los diferentes ensayos citogenéticos en dos grandes grupos (Gráfica 3). El grupo I conformado por 22 ensayos (1-18, 46-49) que mostraron los resultados más apropiados para efectuar estudios citogenéticos en esta especie. El grupo II estuvo representado por 27 ensayos empleados: (19-45) que mostraron un mal comportamiento.

Cabe resaltar que coincidentemente con lo antes planteado, los ensayos 1, 2, 5, 6, 46 y 48 estuvieron representados en el grupo I (donde se empleó 8-hidroxiquinoleína en todos los casos), en comparación con los ensayos restantes clasificados en el grupo II en los que no se logró una adecuada calidad en las preparaciones y en donde se utilizaron otros pretratamientos (colchicina, 1,4-*p*-diclorobenceno o agua helada).



Gráfica 3. Clasificación de los ensayos citogenéticos empleados por análisis de conglomerado utilizando la distancia de Manhattan como índice de similitud y el algoritmo de ligamento WPGC (Weighted Pair - Group Centroid).

Estos resultados ponen de manifiesto el efecto beneficioso que reviste el empleo de la solución de 8-hidroxiquinoleína como pretratamiento para lograr una mejor calidad en las preparaciones cromosómicas en esta especie. No se apreció sin embargo diferencias sustanciales con el empleo de aceto-orceína y aceto-carmín en la tinción de los cromosomas de esta especie.

Un análisis integral de los resultados obtenidos permiten concluir que los ensayos 1 y 2 (Figura 1) se obtuvieron los mejores resultados pueden constituir puntos metodológicos para proseguir optimizando la técnica más adecuada para efectuar análisis cromosómico en esta población.

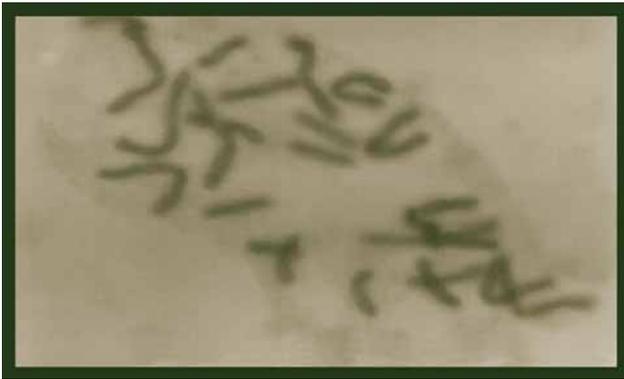


Figura 1. Cromosomas del *Pinus hartwegii* Lindley, observado con el ensayo 2 empleando un aumento de 1000 X. FOTO. Tivo (2001).

Así mismo se pudo comprobar en base a las preparaciones obtenidas con estos ensayos la presencia de 24 cromosomas tal como se esperaba, de acuerdo con lo señalado por diversos autores (Khoshoo, 1961; Faulkner, 1979; Eguiluz, 1988; Muratova, 1995; Nurul, 1995; Ledig, 1998; Ahuja, 2001; Gustafsson y Francois, 2002) para el género *Pinus*.

REFERENCIAS

- AHUJA, M.R. 2001. Recent Advances in Molecular Genetics of Forest Trees. Institute of Forest Genetics, 3 p.
- CURTIS, P.J. 1981. Manual para la Elaboración de Preparaciones Cromosómicas en Plantas. Universidad Autónoma de Chapingo. Editorial Patera, A. C. México, D.F., pp.: 29-33.
- EGUILUZ, P.T. 1988. Distribución Natural de los Pinos en México. Centro de Genética Forestal A. C. Nota Técnica. Chapingo, México, D.F., 2(1): 6.
- FAULKNER, R. 1979. Evolution of Crop Plants. Timber Trees. Forestry Commission Northern Research Station Edinburgh Scotland. (Ed). Simmonds N.W., 87: 299.
- GUSTAFSSON, A. y FRANCOIS, M. 2002. Algunos Principios sobre Genética y Citología Arbórea. Reunión FAO/IUFRO sobre Genética Forestal, 73-74(1): 1-30.
- KHOSHOO, T.N. 1961. Chromosome Numbers in Gymnosperms *Silvae Genet.*, 10: 1-9.
- LEDIG, F.Th. 1998. Genetic Variation in *Pinus*. En: Richardson, D.M. Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge, pp.: 251-280.
- MURATOVA, E. 1995. Karyological diversity in representative species from *Pinaceae*. *Cytogenetics*, 2: 1.
- NORMA OFICIAL MEXICANA. (NOM-059-ECOL-2001). 2001. Protección Ambiental – Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres – Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, exclusión o Cambio – Lista de especies en Riesgo. Segunda Sección. Secretaría de medio Ambiente y Recursos Naturales. Anexo Informativo II. [En Línea]. (Consultado: Enero 27, 2003). http://www.ine.gob.mx/ueajei/plantas11_13.html
- NURUL, M. Islam - Faridi. 1995. A Karyotype of Loblolly Pine. *Plant Genome*. Texas University. USA, 1 p.
- REMINGTON, D.L. y O'MALLEY, D.M. 2000. Whole genome characterization of embryonic state. Inbreeding depression in a selfed loblolly Pine family. *Genetics*, 155 (1): 337-348.
- SOLIS, M.A. 1994. Monografía de *Pinus hartwegii* Lindl. Tesis Profesional para obtener el título de Ingeniero Forestal. Universidad Autónoma de Chapingo. División Ciencias Forestales. México, 130 pp.
- SOLÍS, R.L. 2002. Contribución al conocimiento de la población de *Pinus hartwegii* Lindley en el Pico de Orizaba, Veracruz, México. Tesis de Maestría, 130 pp.
- STATISTICA 2000. STAT SOFT, Inc. Statistica for Window. (Computer Program Manual). Statistica: User Guide. 2325 East 13th Street, Tulsa ok. 74104. USA.
- STYLES, B.T. 1993. Genus *Pinus*: a Mexican purview. En: Biological Diversity of México. Origins and Distribution. Ramamorthy, T. P. Bye, R. Lot A. y Fa, J. (eds.). Univ. Press Oxford, pp. 595-680.
- WILLIAMS, C.G. y SAVOLAIENEN, O. 1996. Inbreeding depression in conifers: Implications for breeding strategy. *For. Sci.* 42: 102-117.