

# Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México

L.G. Iglesias Andreu<sup>1</sup>, M. Luna Rodríguez<sup>2</sup>

(1) Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada (LABIOTECA), Universidad Veracruzana, Lomas del Estadio s/n, Xalapa, Veracruz. CP 91000

(2) Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa (LATEX), Universidad Veracruzana, Médicos N°. 5, Xalapa, Veracruz. CP 91010

➤ Recibido el 18 de abril de 2007, revisado el 5 de octubre, aceptado el 2 de noviembre de 2007.

**Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México.** Se utilizó la técnica electroforética en gel de poliacrilamida (PAGE) para evaluar la variación en la composición de cuatro sistemas isoenzimáticos (esterasas, fosfatasas ácidas, aspartato aminotransferasas y polifenoloxidasas) en la población de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional Cofre de Perote en Veracruz, México, con el fin de contribuir a establecer futuros programas de conservación de este valioso recurso forestal. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de 29 isoformas. Estas se presentaron en mayor número de bandas en los sistemas: esterases, aspartato aminotransferasa y polifenoloxidasa, detectándose una variación intrapoblacional sustancial (86,2%).

Palabras clave: Coníferas, marcadores bioquímicos, megagametofito, isoformas.

**Isoenzyme polymorphism in *Pinus hartwegii* Lindl. population from Cofre de Perote, Ver., México.** We used the electrophoretic technique on polyacrylamide gel (PAGE) to evaluate variation in the composition of four isoenzymatic systems (esterases, acid phosphatase, aspartate aminotransferase and polyphenoloxidase) in the *Pinus hartwegii* population from Cofre de Perote NP in Veracruz, México to help establishing future conservation programs for this valuable forest resource. Results showed the presence of 29 isoforms. The highest band numbers were observed in esterase, acid phosphatase and polyphenoloxidase systems. Intrapopulation variation was high (86.2%).

Key words: Conifers, biochemical markers, megagametophyte, isophorms.

## Introducción

A pesar de la gran importancia de los ecosistemas forestales mexicanos que representan el 10% de la diversidad biológica del mundo (Segura, 1997), muchas de sus poblaciones forestales, particularmente dentro del género *Pinus*, se encuentran seriamente amenazadas. Al respecto se ha indicado que alrededor de 10 especies de pinos mexicanos están en peligro de extinción (Romeu, 2002). *Pinus hartwegii* es una de las especies que en los últimos años ha sido severamente afectada, especialmente por incendio y talas clandestinas (Narave y Taylor, 1997). Sin embargo y pese al deterioro de sus poblaciones, aun no se encuentra incluida en la Norma Oficial de especies en riesgo (Norma Oficial Mexicana, 2001).

En el estado de Veracruz las poblaciones de esta especie se desarrollan en el límite de la vegetación arbórea, en las localidades del Cofre de Perote y Pico de Orizaba. En 1998 fueron dañadas 121 hectáreas ubicadas en el volcán del Cofre de Perote (SEMARNAT, 2001), ocasionado una disminución en el tamaño efectivo de la misma que participa en el mecanismo de la polinización (Iglesias y Tivo, 2005) y una sensible disminución en la producción y calidad de la semilla en dichas poblaciones (Solís, 2002; Iglesias *et al.*, 2006). Es muy probable que esta problemática se encuentre asociada con una pérdida de diversidad genética debido a la manifestación del fenómeno de consanguinidad presente comúnmente en coníferas (Williams y Savolainen, 1996).

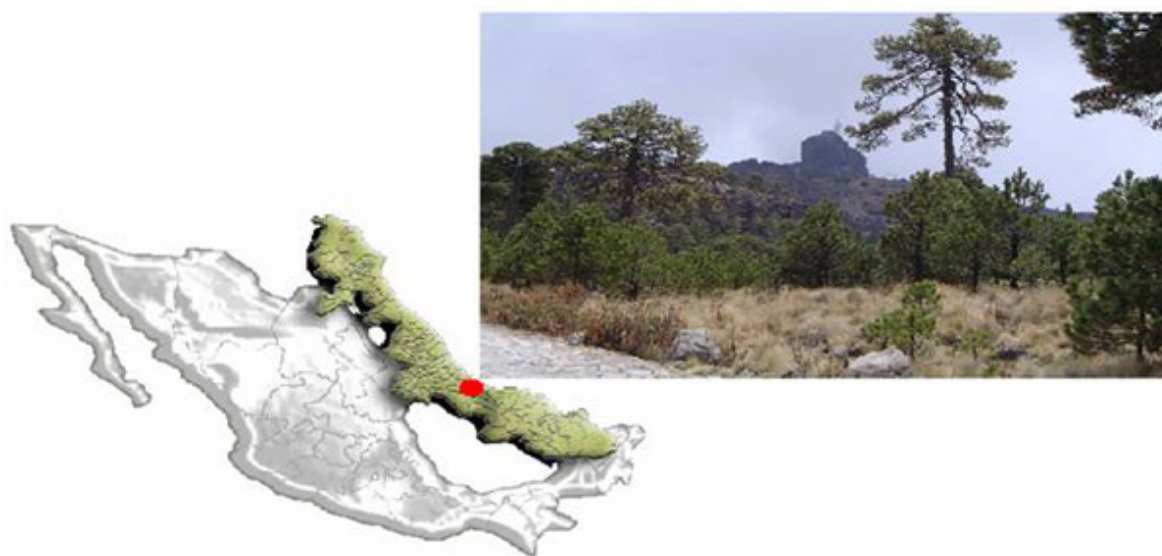
A pesar de la seria problemática que presenta esta especie en la población del Cofre de Perote, y a su gran valor ecológico y socioeconómico (Hernández y Honorio, 1985; Bonilla, 1993), no se cuenta actualmente con información suficiente sobre los

niveles y organización de la variación genética que pueda resultar de utilidad para establecer una estrategia efectiva de conservación.

Por tal motivo se emprendió el presente trabajo con el fin de describir la variación isoenzimática presente en la población de *Pinus hartwegii* Lindl del Cofre de Perote, Ver., como parte del estudio que se está llevando a cabo para el manejo y conservación de este valioso recurso genético.

## Materiales y métodos

Para el desarrollo del presente estudio, se colectaron conos de la parte media de 6 árboles (A1, A17, A19, A20, A28, A-30) de la población de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz, ubicado a 19°15' de latitud Norte y 97° longitud Oeste en la zona Central-Occidente del estado de Veracruz, México (**Fig. 1**). El sitio se caracteriza por presentar suelos con una profundidad media, pedregosos y con poca materia orgánica; precipitación media anual de 519 mm; y 12°C de temperatura promedio anual (Servicio Meteorológico Nacional, 1984).



**Figura 1.** Población de *Pinus hartwegii* en el Cofre de Perote, Ver. Fotografía: Tivo (2003).

Las semillas fueron obtenidas a partir de conos de individuos adultos y germinadas en cajas de Petri con sustrato de agrolita a temperatura ambiente hasta que la radícula alcanzó un tamaño de 3-5 mm. Después se extrajo el megagametofito (M) (haploide). El tejido del megagametofito tiene la misma constitución genética que el óvulo que origina el embrión de las semillas; por tanto, representa la contribución materna.

Los extractos se obtuvieron por homogenización de cada megagametofito en 200  $\mu$ L de tampón fosfato 0,2 M, pH 7,5 (Hodgkiss, 1998) y posteriormente centrifugados a 15.000xg durante 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y almacenado a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de someterlo a electroforesis. La separación electroforética se realizó en un sistema de tampones discontinuos y geles de poliacrilamida (Ornstein, 1964; Davis, 1964) adaptado a la técnica de lámina vertical (Chappel *et al.*, 1974). Se emplearon geles de 1 mm de grosor, 12,5% para la zona de separación y 5% para la de compactación. En los electrodos se empleó tampón Tris Glicina pH 8,3 (Iglesias, 1986). El corrimiento se efectuó a 250 mA, durante 5 h con una fuente de poder marca Consort (modelo E863). Los geles fueron teñidos durante 24 h para los sistemas enzimáticos: esterases (Est; E.C. 3.1.1.2), aspartato aminotransferasas (Aat; E.C. 2.6.1.1) y fosfatasas ácidas (AcP; E.C. 3.1.3.2), de acuerdo con el protocolo reportado por Iglesias (1986) y por Vallejos (1983). Una vez completada las tinciones se lavaron los geles varias veces con agua corriente. Para detener la reacción enzimática y fijar las bandas, los geles fueron sumergidos en solución de ácido acético al 7%.

Los diferentes loci genéticos que codifican para la misma aloenzima fueron designados de acuerdo con la movilidad relativa de la enzima, siguiendo la secuencia numérica desde la región de actividad más cercana al ánodo (Crawford y Smith, 1982). La verificación y homologación de las movilidades enzimáticas intrapoblacional se determinó a través de comparaciones de los diferentes electromorfos en el mismo gel.

El número de isoformas (monomórficas y polimórficas) por cada sistema enzimático fueron graficadas en forma de barras. Mediante el programa Excel se calculó el porcentaje de polimorfismo en esta población.

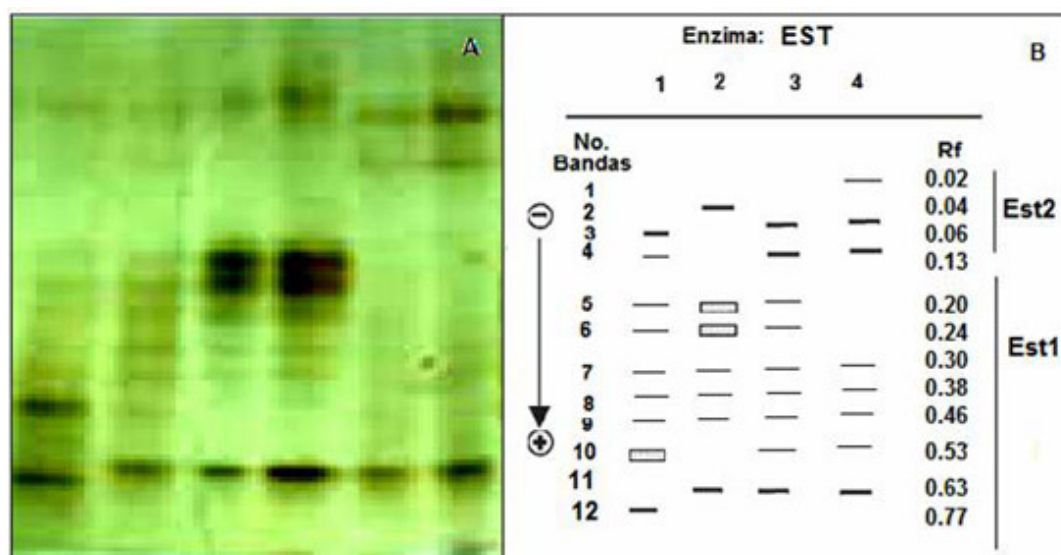
## Resultados y discusión

### Variación en la composición isoenzimática.

Los resultados obtenidos de los sistemas enzimáticos analizados permitieron detectar la presencia de bandas claras y reproducibles en los sistemas: esterases, fosfatasas ácidas, aspartato, aminotransferasas y polifenoloxidasas. Otros tres sistemas enzimáticos (peroxidasas, alcohol deshidrogenasa y amilasa) no fueron incluidos en el análisis debido a su pobre resolución, dificultades en su interpretación o baja repetibilidad.

### Esterasas (Est).

El análisis de los perfiles de bandas esterases permitió constatar la existencia de doce bandas que mostraron mayor resolución y repetibilidad (**Fig. 2**).



**Figura 2.** A: Fotografía del gel de poliacrilamida revelado para isoenzimas esterases (Est), B: Zimograma Est, donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

La región de mayor movilidad aniónica Est1 estuvo conformada por ocho bandas cuyos valores de Rf oscilaron entre 0,20 a 0,77 cm. De ellas, solo tres (Bandas: 7, 8 y 9) resultaron monomórficas. Otras cuatro isoformas polimórficas se ubicaron en la región Est2, de menor movilidad aniónica (valor Rf entre 0,02 y 0,13). En base a estas bandas polimórficas se establecieron cuatro haplotipos distintivos en el material evaluado (**Fig. 2 B**).

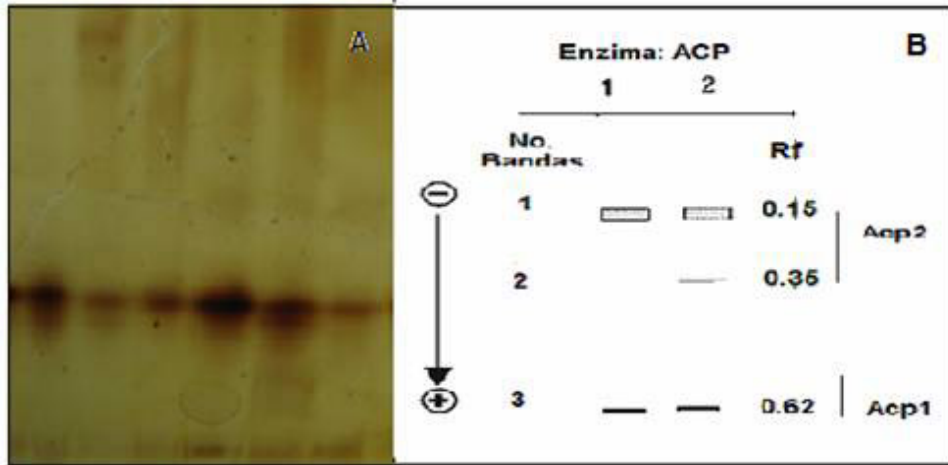
La presencia de un mayor número de loci polimórficos de isoenzimas esterases observados en este trabajo, comparado con lo reportado por Lewandowskii y Mejnartowicz (1990) y Larionova (1995) en coníferas, puede deberse, entre otros factores, al empleo de geles de poliacrilamida, los cuales ofrecen un mayor poder de resolución.

Resultó interesante constatar la presencia de un gran número de isoformas polimórficas, lo que concuerda con lo esperado, ya que el sistema esterases constituye un grupo complejo y heterogéneo de enzimas capaces de hidrolizar ésteres en sus componentes ácidos y alcoholes (Scandalios, 1969), por lo que se ha reportado entre los sistemas más polimórficos de especies vegetales.

### Fosfatasas ácidas (Acp).

Los resultados del análisis de la variación en la composición fosfatasas ácidas reveló una actividad sustancial en las muestras de megagametofitos examinadas, correspondiendo con lo esperado dado el significado biológico de esta enzima hidrolítica que actúa sobre los ésteres del ácido fosfórico en un medio ácido (Scandalios, 1974).

No obstante que se observaron un total de ocho bandas, solamente tres mostraron mayor resolución y repetibilidad (**Fig. 3**), por lo que únicamente éstas fueron consideradas en el análisis posterior. Tales bandas se distribuyeron en dos zonas electroforéticas: la zona Acp1 de más rápida migración anódica se caracterizó por la presencia de una banda polimórfica con valor Rf de 0,62 cm; en la zona Acp2 se observaron dos isoformas; una monomórfica con valor Rf de 0,15 cm y otra polimórfica con valor Rf de 0.35 cm. Las dos bandas polimórficas (Bandas 2 y 3) revelaron la presencia de dos haplotipos en el material evaluado para esta sistema enzimático (**Fig. 3**).



**Figura 3.** A: Fotografía del gel de poliacrilamida revelado para isoenzimas fosfatasas ácidas (Acp), B: Zimograma Acp donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

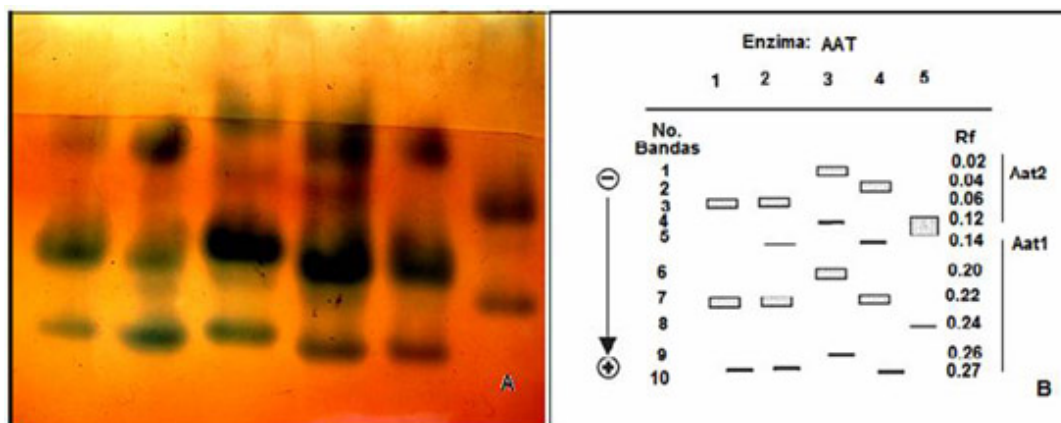
Estos resultados concuerdan con lo obtenido entre otros por Adams y Joly (1980), Wang *et al.* (1991) y Ramírez *et al.* (1997) quienes reportaron la presencia de diversos loci con actividad fosfatasa ácida en *Pinus*.

#### Aspartato aminotransferasa (Aat).

Diez isoformas aspartato aminotransferasa polimórficas (**Fig. 4**) con valores de movilidad electroforéticas entre 0,02 y 0,27 cm se detectaron en las muestras de megagametofitos de los árboles examinados. Su número varió de dos a cinco en el material evaluado.

La zona de mayor migración anódica Aat1 detectó la presencia de un mayor número de isoformas (6) mientras que en la zona Aat2 se constataron cuatro variantes electroforéticas en el material evaluado.

De gran interés resultó el elevado polimorfismo presente en este sistema enzimático. Sobre esta base se establecieron cinco haplotipos característicos en los seis árboles examinados (**Fig. 4**).

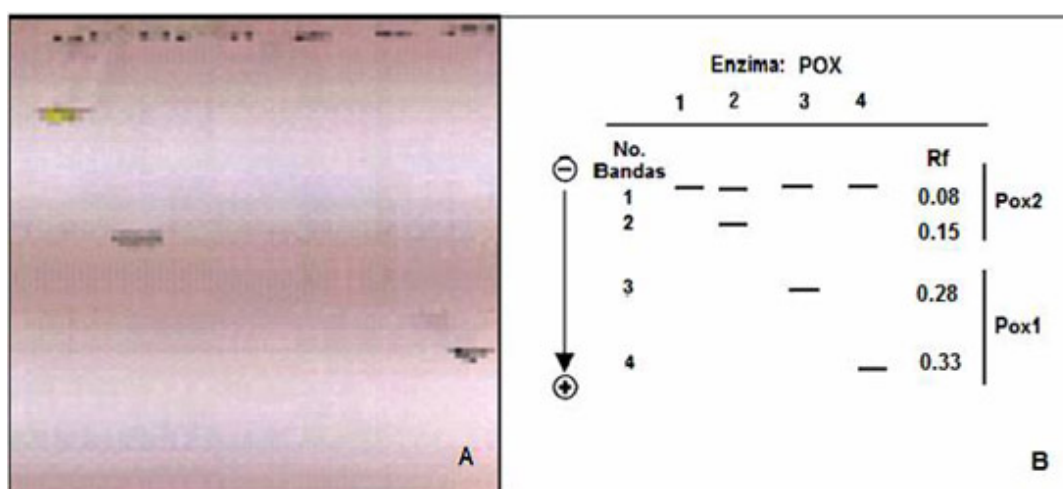


**Figura 4. A:** Fotografía del gel de poliacarilamida revelado para isoenzimas Aspartato aminotransferasas (Aat), **B:** Zimograma Aat donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

Al igual que lo detectado en este trabajo, Cheliak y Pitel (1984) al llevar a cabo estudios de herencia de este sistema enzimático en *Picea glauca* encontraron polimorfismo en la región de mayor movilidad aniónica (Aat1). La interpretación que estos autores dieron a tal hecho, fue que ésta, estaba controlada por un simple gen al que denominaron Aat-I; de tal forma que este gen codifica para una proteína dimérica funcional.

#### Polifenoloxidasas (Pox).

Se detectaron cuatro sitios con actividad polifenoloxidasa en las muestras de megagametofitos examinadas. Estas presentaron valores de movilidad aniónica entre 0,08 y 0,33 cm (**Fig. 5**).



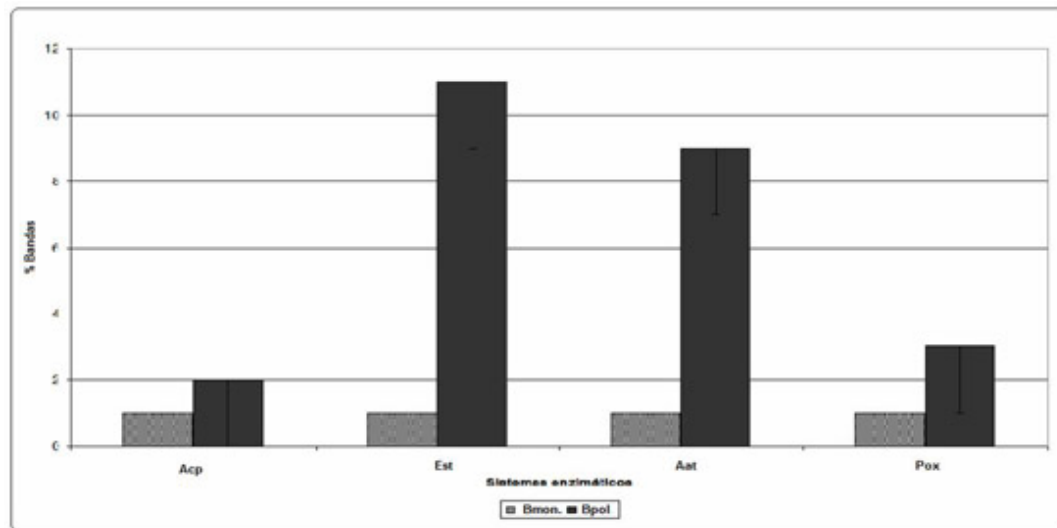
**Figura 5. A:** Fotografía del gel de poliacarilamida revelado para isoenzimas Polifenoloxidasas (Pox), **B:** Zimograma Pox donde se representa la migración diferencial de cada uno de los alelos obtenidos.

Este sistema al igual que el de fosfatasas ácidas se caracterizó por presentar en general un bajo número de isoformas (1-2) por cada árbol examinado; no obstante, tres de las cuatro variantes detectadas resultaron polimórficas. Por esta razón, fue que para este sistema isoenzimático se observó la presencia de un mayor número de haplotipos (**Fig. 5**).

#### Análisis integral de la variación isoenzimática.

La metodología empleada y el empleo de tejido haploide, que no contiene grandes cantidades de metabolitos secundarios, facilitaron el proceso de extracción y permitieron obtener perfiles de bandas con una adecuada resolución y repetibilidad, permitiendo la detección de un número relativamente elevado de variantes electroforéticas (29 isoformas), presentándose en mayor número en los sistemas: esterasas, aspartato aminotransferasas y polifenoloxidasas.

Por otro lado, se detectó menor polimorfismo en la composición de isoenzimas fosfatasas ácidas (**Fig. 6**), por lo que con la excepción de este sistema, los tres anteriormente mencionados, resultan de gran interés para obtener estimados de la variación genética existente en esta población.



**Figura 6.** Número de variantes electroforéticas. Isoenzimas: Esterasas (Est), Fosfatasas acidas (Acp), Aspartato aminotransferasa (Aat) y Polifenoloxidasas (Pox). Bmon: Bandas monomórficas; Bpol: Bandas polimórficas.

Los resultados isoenzimáticos obtenidos mostraron la presencia de un 86,2% de polimorfismo bioquímico en esta población. Esto, concuerda con lo señalado entre otros por Hamrick et al. (1979) y Hamrick et al. (1981) que han indicado que las especies forestales exhiben los niveles más elevados de variación aloenzimática en comparación con otros grupos de organismos.

En general, el nivel de polimorfismo detectado en plantas leñosas resulta ser superior al de especies herbáceas debido entre otros a que estas se caracterizan por poseer una amplia dispersión y alta longevidad, además de que se reproducen por polinización cruzada y presentan una alta fecundidad (Hamrick y Godt, 1989; Ledig, 1998). *Pinus hartwegii* no es una excepción y a pesar de su seria problemática reproductiva, con estos resultados se deduce la existencia de una variación intrapoblacional sustancial en la población estudiada.

De particular interés resultó observar la presencia de un número elevado, relativamente, de bandas en los tejidos de megagametofitos, considerando que como apuntara entre otros Adams (1983), este posee una estructura genética más simple que la planta madre, ya que la meiosis ha suprimido la posibilidad de numerosas interacciones génicas. Este tejido resulta ideal para el estudio del control genético de estas formas electroforéticas, ya que los dímeros, trímeros y tetrámeros que constituyen la enzima activa no pueden estar formados más que de monómeros idénticos, con lo que la modificación de la posición de una banda sobre el zimograma, caracterizando directamente el funcionamiento de un gen.

De este modo, las variantes isoenzimáticas detectadas en las muestras de megagametofitos examinados revelan directamente la contribución alélica de los gametos femeninos de cada genotipo, lo que haría posible, por esta vía, analizar la herencia, ligamiento y segregación de estos marcadores sin la necesidad de efectuar cruzamientos (Cheliak y Pitel, 1984).

Los marcadores isoenzimáticos detectados podrán ser de gran utilidad a fin de preservar la riqueza alélica tanto de los recursos representativos, como los únicos y singulares presentes en esta población y en otras poblaciones sujetas a problemas de fragmentación y aislamiento. Así mismo, estos resultados aportan información que permitirá establecer estrategias efectivas en las prácticas de manejo racional de este valioso recurso. Conjuntamente con futuros análisis que incluyan otros tipos de marcadores brindaran las bases para el desarrollo de trabajos de restauración en la misma.

## Referencias

Adams, W.t. 1983. Application of isozymes in tree breeding. en *isozymes in plant genetics and breeding. Part A*, (eds. Tanksley, S.D. y Orton, T.J.), pp. 382-400, Elsevier Science Publishers.

Adams, W.t. y Joly, J. 1980. Genetics of allozyme variants in loblolly pine. *J. Hered.* 71: 33 -40.

Bonilla, A.V.O. 1993. *Variación natural en Pinus hartwegii Lindl.: longitud de traqueidas de la madera a lo largo del eje*

- neovolcánico*. Tesis de Ingeniería Forestal. Universidad Autónoma de Chapingo. División de Ciencias Forestales. México. 75 p.
- Chappel, T., Iglesias, L., Barreto, A., Baisre, F. y Simon, J.p. 1974. A simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrylamide gel. *Laboratory Practice*. 23: 311-312.
- Cheliak, W.M. y Pitel, J.A. 1984. Genetic control of allozyme variants in mature tissues of white spruce trees. *J. Hered.* 75: 34-40.
- Crawford, D. y Smith, E. 1982. Allozyme variation in *Coreopsis nuceoides* and *C. nuceensis* (Compositae), a progenitor-derivative species pair. *Evolution*. 36:379-386.
- Davis, B. 1964. Disc Electrophoresis. li. Methods and application to human serum proteins. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 121: 31-349.
- Hamrick, J.L. y Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In Plant population genetics, breeding and genetic resources. Edited by A.D.H. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. pp. 43-63.
- Hamrick, J.L., Linhart, Y.B. y Mitton, J.B. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173-200.
- Hamrick, J.L., Mitton, J.B. y Linhart, Y.B. 1981. *Level of genetic variation in trees: the influence of life history characteristics*. Proc. Symp. on isozymes of N. Amer. Forest trees and forest insects. Pacific S.W. For. and range Expt. Stat. Tech. Report Psw-48: 35-41.
- Hernández, H. y Honorio, M. 1985. *Variación natural de pinus hartwegii lindl., dimensiones transversales de las traqueidas en un transecto altitudinal de zoquiapan*. tesis de licenciatura. universidad autónoma de chapingo. División de Ciencias Forestales. Chapingo, México, 59 p.
- Hodgskiss, P. 1998. *Isozymes, allozymes: assays of genetic variation*. Institute of Forest Genetics, Usda Forest Service, 16 p.
- Iglesias, L. 1986. *Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (Glycine max L. Merrill)*. Tesis para optar por el Grado de Dr. Ciencias Agrícolas, Ministerio de Educación Superior, La Habana, Cuba, 232 p.
- Iglesias, L. y Tivo, Y. 2005. Contribución al manejo de la población de pinus hartwegii lindl. del cofre de perote. *Agroentorno* 61 (8): 16-17.
- Iglesias, L., Mora, I. y Casas, J.L. 2006. Morfometría, viabilidad y variabilidad de las semillas de la población de *Pinus hartwegii* del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Cuadernos de Biodiversidad* 19: 14-22.
- Larionova, A.Y. 1995. Inheritance of allozyme variants in siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb.). *Russian Journal of Genetics* 31(9): 1261-1267.
- Ledig, F.T. 1998. Genetic variation in Pinus. En *Ecology and biogeography of Pinus* (ed. Richardson, D. M.), pp. 251-280, Cambridge University Press, Cambridge.
- Lewandowskii, A. y Mejnartowicz, L. 1990. Inheritance of allozymes in *Larix decidua* Mill. *Silvae Genet.* 39(5): 184-186.
- Narave, H. y Taylor, K. 1997. *Pinacea. Flora de Veracruz*. Instituto de Ecología A.C. Fascículo. 98. Xalapa, Ver., México, 50 p.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL-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. Disponible en: [www.ine.gob.mx/ueajei/plantas11\\_13.html](http://www.ine.gob.mx/ueajei/plantas11_13.html).
- Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis I. background and theory. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 121: 321-349.

- Ramírez-Herrera, C., Vargas-Hernández, J.J., Jasso-Mata, J., Carrillo-Castañeda, G. y Guillén-Andrade, H. 1997. Variación isoenzimática en diez poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Agrociencia* 31:2 23-230.
- Romeu, E. 2002. Los pinos mexicanos, record mundial de biodiversidad. Disponible en: [www.conabio.gob.mx/institucion/conabio\\_espanol/doctos/pino.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/pino.html).
- Scandalios, J. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochemical Genetics* 4: 34-39.
- Scandalios, J. 1974. Isoenzymes in development and differentiation. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 225-258.
- Segura, G. 1997. The state of Mexico's forest resources. Management and conservation. Centro de Ecología. Unam. México.
- Servicio Meteorológico Nacional. 1984. *Normas climatológicas*. Dirección general de Geografía y Meteorología. México. 799 p.
- Semarnat. 2001. Incendios forestales y deforestación en México: una perspectiva analítica. Disponible en: [www.cce.org.mx/cespedes/publicaciones/otras/deforestacion/introduc.htm](http://www.cce.org.mx/cespedes/publicaciones/otras/deforestacion/introduc.htm).
- Solís, R.L. 2002. *Contribución al conocimiento de la población de Pinus hartwegii Lindley del Pico de Orizaba, Veracruz, México*. Tesis de maestría, Instituto de Genética Forestal, Xalapa, Ver., México, 130 p
- Vallejos, C.E. 1983. Enzyme activity staining. En: *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. (eds. Tanksley, S.D. y Orton, T.J.), pp. 469-516, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Wang, Xiao-Ru, Shen, Xi-Huan y Szmidt, A. 1991. The choice of allozyme markers for studies in conifer seed orchards: the case of *Pinus tabulaeformis* Carr. En: *Biochemical Markers in the population genetics of forest trees*, (eds. Fineschi, S., Malvolti, M.E., Cannata, F. y Hattemer, H.H.), pp. 173-181, Academic Publishing Bv, The Hague,.
- Williams, C.G. y Savolainen, O. 1996. Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. *For. Sci.* 42:102-117.