

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DIVISION DE CIENCIAS FORESTALES

PROGRAMA DE POSTGRADO

**VARIACION GENETICA ISOENZIMATICA EN Pinus ayacahuite
Y SUS DOS VARIETADES DE MEXICO Y CENTROAMERICA**

TESIS

**Presentada como Requisito parcial para
Obtener el Grado de Maestro
en Ciencias Forestales
por**

JUAN JOSE HERNANDEZ GONZALEZ

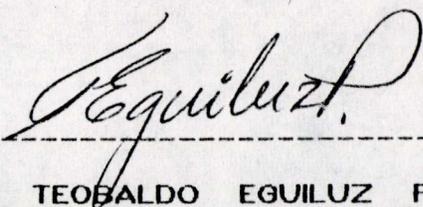
CHAPINGO, MEXICO

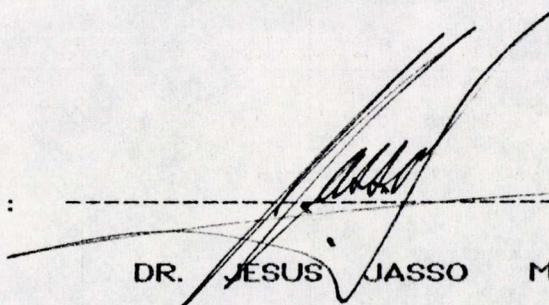
1990

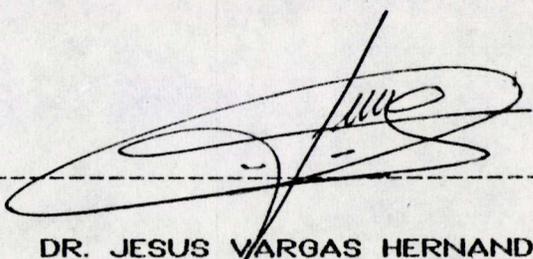


Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Comité Asesor
abajo mencionado; ha sido revisada y aprobada por el mismo y
aceptada como requisito parcial para obtener el grado de :

MAESTRO EN CIENCIAS FORESTALES

PRESIDENTE : 
DR. TEOBALDO EGUILUZ PIEDRA

ASESOR : 
DR. JESUS JASSO MATA

ASESOR : 
DR. JESUS VARGAS HERNANDEZ

A. 23901

DEDICATORIA

A mi esposa Rosario por su amor y comprensión.

A mis padres Ma. Concepción González y Juan Hernández por haberme dado la vida, amor y apoyo en todo momento.

A mis hermanos y hermanas: Armando, Alfredo, José Luis, Sofía, Jesús, Carmen y Emilio.

A mis compañeros de la Universidad Autónoma Chapingo, para motivarlos a enoblecen los colores de nuestra Escuela.

A los investigadores que contribuyen día con día a aumentar los conocimientos para ayudar al bienestar humano.

A los maestros de la Universidad Autónoma Chapingo como agradecimiento a su dedicación en enseñar.

AGRADECIMIENTOS:

Deseo manifestar mi agradecimiento al Dr. Teobaldo Eguiluz por haberme confiado la responsabilidad de desarrollar la presente investigación sobre Genética Moderna. Además por su ayuda en la revisión del escrito final.

Al Dr. Tom Ledig por ayudarme para que fuera posible trabajar en el laboratorio de Isoenzimas del Institute of Forest Genetics (IFG) en Placerville, California.

Al investigador, maestro y amigo Paul Hodgskiss por haberme enseñado a detalle la técnica del laboratorio de isoenzimas.

Al Dr. M. Thompson Conkle por su ayuda y dirección en el trabajo de laboratorio y cómputo de la información así como en la discusión general de la información.

A la investigadora Dra. Anita Koehn por haberme asesorado y ayudado en el laboratorio de isoenzimas.

Al Centro de Genética Forestal y al Central America and México Coniferous Resources Coperative (Raleigh, N.C.), por haber proporcionado las muestras de semilla que se utilizaron en los análisis de laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme ayudado con financiamiento para la realización de mis estudios de maestría y por dar soporte económico para el desarrollo parcial de esta investigación.

A la Secretaria Chris Nelson por toda la ayuda y la buena disposición que me otorgó durante mi estancia en el IFG.

Agradezco al Dr. Jesús Vargas Hernández, al Dr. Jesús Jasso Mata y a la Dr. Johanna Clausen por sus valiosas sugerencias y modificaciones propuestas para mejorar el presente escrito.

INDICE GENERAL

	Pág.
INDICE DE CUADROS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS DEL APENDICE	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Taxonomía de <i>Pinus ayacahuite</i>	3
2.1.1. Grupo AYACAHUITE.....	3
2.1.2. <i>Pinus ayacahuite</i> y sus dos variedades	4
2.2. Descripción y comparación morfológica de los taxa en estudio	6
2.3. Caracterización geográfica y ecológica de los taxa en estudio	9
2.3.1. Caracterización geográfica	9
2.3.2. Caracterización ecológica	13
2.4. Importancia de las proteínas y enzimas	15
2.4.1. Forma molecular de proteínas y enzimas	15
2.4.2. Propiedades de las proteínas	18
2.4.3. Caracterización Genética de las proteínas y enzimas	21
2.5. Teoría de la técnica electroforética	25
2.5.1. Electroforesis	25
2.5.2. Solución buffer y geles	27
2.5.3. Teñido de geles	29

	Pág.
2.6. Aplicación de la electroforesis en la investigación forestal	35
2.7. Electroforesis en coníferas	41
3. MATERIALES Y METODOS	44
3.1. Procedencias muestreadas	44
3.2. Trabajo de laboratorio	44
3.2.1. Preparación de las semillas	47
3.2.2. Preparación de los geles	48
3.2.3. Montaje de muestras y electroforesis	50
3.2.4. Rebanado y tinción de los geles	55
3.2.5. Registro de información de geles	56
3.3. Evaluación de la información	59
4. RESULTADOS Y DISCUSION	66
4.1. Frecuencias alélicas	66
4.2. Diversidad genética	71
4.3. Distancias genéticas	78
4.4. Relaciones filogenéticas	84
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	91
6. LITERATURA CITADA	94
7. APENDICE	99

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Características dasométricas y morfológicas de los tres taxa estudiados	7
Cuadro 2. Caracterización geográfica y ecológica de los tres taxa estudiados	10
Cuadro 3. Localización geográfica de las procedencias muestreadas	45
Cuadro 4. Sistemas enzimáticos ensayados, sus abreviaciones y los sistemas buffer del gel usado usado para los corrimientos electroforéticos ...	57
Cuadro 5. Frecuencias alélicas de las poblaciones estudiadas	69
Cuadro 6. Medidas de variabilidad genética de las poblaciones de los tres taxa estudiados	72
Cuadro 7. Distancias arco de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), calculadas para todas las combinaciones entre poblaciones de <i>Pinus ayacahuite</i> típico y sus variedades <i>brachyptera</i> y <i>veitchii</i>	79

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa mostrando la distribución geográfica natural de los tres taxa estudiados	12
Figura 2. Diagrama mostrando los sistemas de teñimiento por transferencia de electrones; a) deshidrogenasas y b) oxidasas y peroxidasas	33
Figura 3. Mapa mostrando las procedencias muestreadas ...	46
Figura 4. Esquema mostrando un molde de los geles ...	49
Figura 5. Esquema que muestra las dimensiones y la forma de las estructuras para corrimientos electroforéticos	52
Figura 6. Esquema que muestra una vista en sección lateral de las estructuras para corrimientos electroforéticos con los geles portando las muestras de semilla, esponjas y el plástico envolvente en su lugar debido	54
Figura 7. Fenograma de las poblaciones de <i>Pinus ayacahuite</i> , desarrollado usando las técnicas de ligamiento promedio (UPGMA) con las distancias arco de Cavalli-Sforza y Edwards (1967)	80

Figura 8. Arbol filogenético de las poblaciones de *Pinus ayacahite* desarrollado usando la distancia del procedimiento Wagner (Farris, 1972) con la distancia arco de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) 86

:

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS DEL APENDICE

	Pág.
Cuadro 1A. Fórmulas de los buffers para los geles y para las charolas de los electrodos	100
Cuadro 2A. Preparación de los buffers para hacer los geles.....	101
Figura 1A. Diagrama de los zimogramas de las enzimas mostrando el patrón de bandeo para cada uno de los alelos (1,2,...,7) en cada uno de los loci (1 , 2 , 3) analizados	102

RESUMEN :

Se realizó un estudio de la variación genética isoenzimática sobre 12 procedencias del área de distribución natural de los taxa *Pinus ayacahuite* Ehr., *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw y *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* en México y Centroamérica.

Se usó la técnica de electroforesis con geles de almidón para estimar las frecuencias alélicas de 14 loci isoenzimáticos.

Las frecuencias alélicas de los 14 loci isoenzimáticos diferenciaron los taxa de este estudio como independientes, habiendo mayor semejanza de las poblaciones de *Pinus ayacahuite* típico y las de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* en comparación con las de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*.

Las mediciones de diversidad genética indicaron que los tres taxa estudiados tuvieron niveles de variación de media a alta y siendo las poblaciones de *P. ayacahuite* var. *veitchii* las más variables.

Los agrupamientos genéticos formaron tres grupos bien marcados. El primer grupo incluyó las dos poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* y las poblaciones de Ixtlán y Nundaco, Oaxaca, México de *Pinus ayacahuite* típico. El segundo grupo incluyó las seis poblaciones de *P. ayacahuite* típico de Chiapas, Guatemala y Honduras. Por último, el tercer grupo más distante genéticamente lo formaron las dos poblaciones de *P. ayacahuite* var. *brachyptera* de Durango, México.

El análisis cladístico mostró que filogenéticamente el *P. ayacahuite* var. *veitchii* está en un linaje relacionado con

P. ayacahuite típico, a su vez, claramente distante del *P. ayacahuite* var. *brachyptera* que tiene otro linaje de diversificación. Además que el *P. ayacahuite* típico se irradió o se diversificó de norte a sur con una ruta de diversificación desde Oaxaca, continuando con Chiapas, Guatemala y Honduras.

1. INTRODUCCION

México posee el mayor número de especies de importancia maderable dentro del género *Pinus* en comparación con otra área de igual tamaño en el mundo. Además es un buen lugar para la observación e interpretación de la variación y evolución de este género (Little, 1962).

Existen en la actualidad 79 taxa reconocidos, representados por 50 especies, 20 variedades y 9 formas, conformando más del 40% de especies de este género reconocidas a la fecha en todo el mundo (Eguiluz, 1984; 1989). Actualmente la presión demográfica de la población y la necesidad de producir más alimento son la causa de la destrucción rápida de los bosques de coníferas (Dvorak y Eguiluz, 1985), tal es el caso del *Pinus ayacahuite* cuyas poblaciones naturales se han reducido por cortas para combustible, construcción y por la conversión de áreas forestales a uso agrícola, además que su madera se busca por su suavidad, trabajabilidad y buena calidad.

Es preocupación de los genetistas forestales que los mejores genotipos están siendo cortados, además de que poblaciones enteras continuen desapareciendo en el futuro, privando así, la opción de explotar el germoplasma para plantaciones comerciales y regeneración de bosques naturales sanos. Esta especie es potencialmente recomendable para plantarse tanto en lugares templados como en las partes altas de clima tropical y subtropical de México.

La especie de *Pinus ayacahuite* es de amplia distribución, por lo cual tiene genotipos adaptados a diferentes condiciones

ambientales, pero en la actualidad no se conoce la variación genética de las diferentes poblaciones naturales, lo cual es importante para establecer plantaciones en los sitios más recomendables para obtener buena productividad, así como para desarrollar programas de mejoramiento genético. Esta información también se puede utilizar para establecer áreas de conservación en los sitios más variables .

Comúnmente la variación genética se ha medido con base en observaciones morfológicas y fisiológicas. Actualmente es posible medir la variación genética con más precisión a través de técnicas modernas como es la electroforesis, que permite la identificación de la variación isoenzimática.

En este trabajo se utilizó la técnica de electroforesis para conocer la variabilidad genética de las poblaciones naturales de *Pinus ayacahuite* incluyendo la especie típica y sus dos variedades con los siguientes objetivos:

- a) Determinar si la variación genética entre las poblaciones naturales de *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades es significativamente diferente.
- b) Determinar la estructura y distancia genética de las poblaciones naturales de *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades en México y Centroamérica, tomando como base las procedencias muestreadas y sus distancias genéticas.
- c) Analizar las relaciones evolutivas entre los taxa.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Taxonomía de *Pinus ayacahuite*

Martínez (1948) ubicó al *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades dentro del género *Pinus*, sección Ayacahuite. Después Loock (1977) clasificó estos tres taxa dentro del género *Pinus*, sección Haplóxilon o pinos blandos, grupo AYACAHUITE o pinos blancos (con umbo terminal). Aunque, también pueden clasificarse siguiendo la modificación de Eguiluz (1985a) a la clasificación de Little y Critchfield dentro del género *Pinus* L., subgénero *Strobis* Lemm, sección *strobis* Lemm, Subsección *Strobi* Loudon.

2.1.1. Grupo AYACAHUITE

Dentro del grupo AYACAHUITE se incluyen en México los siguientes taxa: *Pinus flexilis* James, *Pinus reflexa* Engelm, *Pinus ayacahuite* Ehr., *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw, *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw, *Pinus lambertiana* Dougl., *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen (Martínez, 1948; Andresen, 1964)

El *Pinus reflexa* y el *Pinus flexilis* son similares, por lo cual según Martínez (1948) algunos autores consideran al primero como variedad del segundo. Asimismo el *Pinus reflexa* tiene notable parecido con *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*, estando ligado a él por formas intermedias (Martínez, 1948). Aunque según Eguiluz (1990) los nombres de *Pinus flexilis* James y *Pinus reflexa* Engelm. han sido usados erróneamente en México, particularmente en las poblaciones del noreste, recomendando usar el nombre de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* hasta que se

desarrolle más investigación sobre el complejo *P. reflexa*, *P. flexilis*, *P. strobiformis*, *P. ayacahuite* var. *brachyptera*.

El *Pinus chiapensis* se distribuye en pequeños manchones en Chiapas, Guerrero, Veracruz, Puebla y Oaxaca, y el *Pinus lambertiana* tiene una distribución restringida en la Sierra de San Pedro Martir, Baja California. (Martínez, 1948; Andresen, 1964; Eguiluz, 1990).

2.1.2. El *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades

Según Eguiluz (1978), Ehrenberg describió por primera vez la especie típica como originaria del sureste de México.

Shaw (1909) consideró dos variedades: *brachyptera* del norte del país y la *veitchii* del centro.

El *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw fue clasificado por G. Engelmann en 1848 como *Pinus strobiformis* en el norte de México (Eguiluz, 1978), pero fue reducido a variedad del *Pinus ayacahuite* en 1909 por G. R. Shaw (Shaw, 1909). Tiene mucho parentesco con *Pinus reflexa* y con el conocido *Pinus strobiformis* de las montañas Rocallosas en los Estados Unidos, a tal grado que se encuentran muchos ejemplares identificados en México, pero que son de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*. Eguiluz (1978) propuso que es necesario estudiar más esta especie para poderla clasificar mejor.

El *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* fue descrito por Roezl como *Pinus veitchii* en 1857 y como *Pinus bonapartea* en 1858 y posteriormente como *Pinus loudoniana* por Gordon en 1858, todos basados en muestras colectadas en la zona centro del país (Martínez, 1948; Eguiluz, 1978, 1990).

Según Martínez (1948) la clasificación de Shaw (1909) estuvo acertada al considerar la especie *Pinus ayacahuite* como típica y sus dos variedades *veitchii* y *brachyptera*, como taxa dependientes de la misma especie. Esta opinión se basa en que estos pinos coinciden en la forma, tamaño y estructura de las hojas, lo mismo que en características de la vaina y el ala de la semilla. Su diferencia se presenta en la longitud relativa del ala, la forma y la consistencia de las escamas, así como su color y otros detalles de menor importancia (Martínez, 1948).

La variedad *veitchii* parece poseer características intermedias entre el *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw y *Pinus ayacahuite* Ehrenb (Martínez, 1948).

Carvajal (1986) basado en muestras procedentes de la Sierra del Cuale, Jalisco y de El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, sitios en donde parecen encontrarse los ejemplares más típicos de la variedad *brachyptera*, hizo un estudio biométrico de 20 variables, encontrando diferencias marcadas en los ejemplares de Jalisco en comparación con los de Durango, por lo cual recomiendo elevar a nivel de especie el taxa de Jalisco como *Pinus novo-galiciana* CARVAJAL. Sin embargo, los datos de las variables medidas no han sido reportados.

Según Carvajal (1986) el *Pinus novo-galiciana* CARVAJAL, parece representar un eslabón que une geográficamente al *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* del centro de la República y el *Pinus strobiformis* o *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* de los estados del norte.

2.2. Descripción y comparación morfológica de los taxa en estudio

La descripción morfológica y las comparaciones de los tres taxa se resumen en el Cuadro 1, cuya elaboración se hizo con base en los datos reportados por Martínez (1948); Loock (1977) y Eguiluz (1978; 1985a).

El *Pinus ayacahuite* típico se distingue morfológicamente de sus dos variedades por: a) En general las acículas son más largas; b) las escamas de los conos son más cortas (5 a 6 cm) y más angostas (2.5 a 3.5 cm); c) las semillas son más pequeñas con longitud de 8 mm; d) el ala de la semilla es más larga (de 32 a 38 cm) y más angosta (8 mm).

El *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* se distingue morfológicamente del *Pinus ayacahuite* típico y su variedad *veitchii* por: a) la longitud de las acículas es en general más corta; b) en general la longitud de los conos femeninos es más corta; c) la apófisis es larga, muy reflejada o enroscada; d) sus semillas son grandes (12 a 15 mm de largo) con ala corta (máximo 10 mm) o casi siempre nula.

El *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* se distingue morfológicamente del *Pinus ayacahuite* típico y su variedad *brachyptera* por: a) los conos femeninos son en general más grandes (22 a 35.5 cm); b) las escamas de los conos son en general más largas (5 a 8 cm) y más anchas (2.8 a 5 cm); c) con semillas grandes (longitud de 12 a 13 mm) pero con ala desarrollada; d) el ala de la semilla es más ancha (6 a 12 mm) con longitud mediana (de 15 a 20 mm).

Cuadro 1. Características dasométricas y morfológicas de los tres taxa estudiados (Esta información fue recabada de las referencias siguientes: Martínez (1948), Loock (1977), Equiluz (1978; 1985a).

Características	<u>P. ayacahuite</u> <u>típico</u>	<u>P. ayacahuite</u> <u>var. brachyptera</u>	<u>P. ayacahuite</u> <u>var. veitchii</u>
<u>Dasométricas</u>			
Altura del árbol	20 a 43 m	30 m	20 a 30 m
Diámetro a altura de pecho	90 a 150 cm	60 a 120 cm	60 a 70 cm
Corteza en arboles maduros	gris cenicienta	gris cenicienta	grisacea o café rojiza
<u>Acículas</u>			
Número de acículas por fascículo	cinco	cinco	cinco
Longitud de acícula	7.5 a 20 cm	9 a 13 cm	10 a 15 cm
Color de acícula	verde brillante	verde intenso, azulado	verde oscuro
Estomas de las acículas	En las caras internas	En las caras internas	En las caras internas
Canales resiníferos	externos	externos	externos
Número de canales resiníferos	2 a 4 rara vez 5 o 6	de 2 a 5	de 2 a 5 rara vez hasta 10
Haz fibrovascular vainas	simple caedizas	simple caedizas	simple caedizas
<u>Estructuras sexuales</u>			
a) masculinas	en grupos de 2 a 4	en grupos de 2 a 3	en grupos de 2 a 3

Cuadro 1. (Continuación)

Características	<u>P. ayacahuite</u> <u>típico</u>	<u>P. ayacahuite</u> <u>var. brachyptera</u>	<u>P. ayacahuite</u> <u>var. veitchii</u>
<u>b) Femeninas</u>			
Forma de los conos	subcilíndricos	subcilíndricos	subcilíndricos
Longitud de los conos	20 a 30 cm (\bar{x} = 30 cm)	15 a 25 cm (\bar{x} = 23 cm)	22 a 35 cm (\bar{x} =28 cm)
Color de los conos	café amarillento	amarillo con tinte anaranjado u ocre	verde amarillento a ocre
Pedúnculo del cono	15 mm	20 a 25 mm	25 mm
Longitud de las escamas de los conos	5 a 6 cm	5 a 7 cm	5 a 8 cm
Ancho de las escamas de los conos	2 a 2.5 cm	2.5 a 3.5 cm	2.8 a 5 cm
<u>Semillas</u>			
Color de semilla	Obscuras con manchas amarillas	café obscuro	Café obscuro
Longitud de las semillas	8 mm	12 a 15 mm	12 a 13 mm
Longitud del ala	32 a 38 mm	máximo 10 mm	15 a 20 mm
Ancho del ala	8 mm	-	6 a 12 mm
<u>madera</u>			
Color de la madera	amarillenta	amarillento rojiza	amarillenta

2.3. Caracterización geográfica y ecológica de los taxa en estudio

La caracterización geográfica y ecológica se resume en el Cuadro 2, el cual fue elaborado con base en Critchfield y Little (1966), Loock (1977), Eguiluz (1977; 1978; 1990), Styles y Hughes (1983).

2.3.1. Caracterización geográfica

Los tres taxa incluidos en este estudio se localizan en las partes montañosas tal y como lo indican las altitudes reportadas mayores de 1800 msnm (Cuadro 2 y Figura 1).

El *P. ayacahuite* var. *brachyptera* se encuentra en la parte norte de México, siendo la especie que se encuentra a latitudes mayores, de 22° 15'N a 31° 20'N en México.

El *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* se encuentra distribuido en el eje neovolcánico (Cordillera transversal del centro de México, donde se encuentran los volcánes más altos del país tal como el Pico de Orizaba (5,700 m) y el Popocatepetl (5,450 m)) dentro de las latitudes 18° 30'N a 21° 20'N. El *P. ayacahuite* típico se localiza en la parte centro y sur de México, continuandose hacia Centroamérica dentro de las latitudes de 14° 15'N a 20° 55'N (Cuadro 2).

El *P. ayacahuite* var. *brachyptera* se encuentra más al oeste con valores de longitud de 101° 00' a 110° 00'. El *P. ayacahuite* típico se encuentra a una longitud de 87° 55' a 100° 50', en tanto que el rango de longitud del *P. ayacahuite* var. *veitchii* se encuentra incluido dentro de la longitud de la especie típica con valores de 97° 15' a 103° 50' (Cuadro 2).

Cuadro 2. Caracterización geográfica y ecológica de los tres taxa estudiados (Esta información fue recabada de las referencias siguientes: Critchfield y Little (1966), Loock (1977), Eguiluz (1977, 1978, 1990), Styles y Hughes (1983).

Característica	<u>Pinus ayacahuite</u> típico	<u>Pinus ayacahuite</u> var. <u>brachyptera</u>	<u>Pinus ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u>
<u>Geográficas</u>			
Rango altitudinal (msnm)	1,800-3,400	2,000-3,200	2,000-3,700
Latitud norte	14° 15' - 20° 55'	22° 15' - 31° 20'	18° 30' - 21° 20'
Longitud oeste	87° 55' - 100° 50'	101° 00' - 110° 00'	97° 15' - 103° 50'
Localización	En el centro y sur de México, en los estados de Col., Gue., Oax., Chis., Méx., Hgo., Pue., Tlax., Ver. extendiéndose dentro de Guatemala, El Salvador y en Honduras.	En la parte norte de México en los estados de Chih., Son., Dgo., Zac., Jal., S.L.P., Sin., Nuevo León, Coah., Tamps.	En la parte central de México en el D.F., estado de Méx., Hgo., Pue., Ver., Mich., y Gro., Tlax., Jal.
<u>Ecológicas</u>			
Asociaciones	Forma masas puras en áreas pequeñas, pero son más frecuentes asociaciones donde pocas veces es dominante.	Forma masas puras más o menos extensas y en algunos se asocia con especies de pino principalmente.	Se asocia con varias especies arbóreas.
Especies de asociación	<u>Pinus montezumae</u> , <u>Pinus teocote</u> , <u>Pinus oaxacana</u> var. <u>ochoteranae</u> , <u>Pinus rudis</u> , <u>Pinus pseudostrabus</u> , <u>Abies religiosa</u> , <u>Abies guatemalensis</u> , <u>Alnus</u> sp., <u>Quercus brachyptera</u> .	<u>Pinus teocote</u> , <u>Pinus cooperi</u> , <u>Pinus duranguensis</u> , <u>Pinus rudis</u> , <u>Pinus lumholtzii</u> , <u>Pinus herrerae</u> , <u>Pinus engelmannii</u> , <u>Pinus arizonica</u> , <u>Abies</u> sp., <u>Pseudotsuga</u> sp., <u>Juniperus depeana</u> .	<u>Pinus montezumae</u> , <u>Pinus teocote</u> , <u>Abies religiosa</u> , <u>Alnus firmifolia</u> , <u>Arbutus glandulosa</u> , <u>Quercus lauriana</u> .

Cuadro 2. Continuación

Características	<u>Pinus ayacahuite</u> típico	<u>Pinus ayacahuite</u> var. <u>brachyptera</u>	<u>Pinus ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u>
<u>Ecológicas</u>			
Tipo de suelo	Prospera mejor en suelos fértiles, profundos, bien drenados ricos en materia orgánica.	Supuestamente prospera mejor en suelos profundos a lo largo de cañadas, pero se ha encontrado asociado con pinos de suelos más pobres como <i>Pinus lumholtzii</i> o <i>Juniperus</i> sp.	Prefiere los suelos bien drenados y protegidos.
Tipo de climas	Templado caliente	Templado frío	Templado caliente
Periodo de lluvias	Frievaera y verano de abril a octubre, con inviernos secos y fríos.	A finales de la primavera y principios de verano con inviernos con nieve o escarcha.	En primavera y verano, desde abril a octubre con inviernos secos y fríos
Mes más caliente	marzo y abril	abril y mayo	marzo y abril
Temperaturas mínimas extremas	-5 °C	-23 °C	-14 °C
Temperaturas máximas extremas	35 °C	40 °C	40 °C
Temperatura promedio	15 °C	13 °C	14 °C

Nota: Coah.= Coahuila; Col.= Colima; Chih.= Chihuahua; Chis.= Chiapas; D.F.= Distrito Federal; Dgo.= Durango; Gro.= Guerrero; Hgo.= Hidalgo; Jal.= Jalisco; Méx.= México; Mich.= Michoacán; Oax.= Oaxaca; Pue.= Puebla; S.L.P.= San Luis Potosí; Son.= Sonora; Tamps.= Tamaulipas; Tlax.= Tlaxcala; Ver.= Veracruz; Zac.= Zacatecas



Figura 1. Mapa mostrando la distribución geográfica natural de los tres taxa estudiados.

El *P. ayacahuite* var. *brachyptera* se localiza en los estados de Chihuahua, Sonora, Durango, Coahuila, Sinaloa, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, Jalisco. En Zacatecas y Jalisco parece intermedio entre la variedad *veitchii* y la variedad *brachyptera*, pero es más semejante a la variedad *brachyptera*. Aunque como se dijo en el apartado de taxonomía, Carvajal (1986) propuso que las poblaciones de Jalisco son de *Pinus novo-galiciiana* CARVAJAL, por encontrar diferencias marcadas entre los individuos muestreados en Jalisco y Durango (Cuadro 2).

El *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* se localiza en la parte central de México en el Distrito Federal y los estados de México, Morelos, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Jalisco, Veracruz, Michoacán y Guerrero. En tanto que el *Pinus ayacahuite* típico que se localiza en el centro y sur de México en los estados de Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Veracruz extendiéndose a Guatemala, El Salvador y Honduras (Cuadro 2).

Las distribuciones de los taxa *Pinus ayacahuite* típico y *P. ayacahuite* var. *veitchii* se traslapan en los estados de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Guerrero. En cambio, la distribución de la variedad *brachyptera* no se traslapa con la especie típica ni con la variedad *veitchii* (Cuadro 2 y Figura 1).

2.3.2. Caracterización ecológica

Las tres especies de este estudio presentan asociaciones con diferentes especies, pero la especie típica puede formar masas puras en áreas pequeñas, en tanto que la var. *brachyptera* no

forma masas puras extensas, y crece espaciado en las cañadas de la Sierra.

Las asociaciones arbóreas que presenta *P. ayacahuite* var. *brachyptera* son diferentes a las asociaciones arbóreas que presentan la especie típica y la var. *veitchii*, habiendo mayor semejanza entre las asociaciones de estos últimos taxa ya que se distribuyen simpátricamente (Cuadro 2).

En cuanto al tipo de suelo, las tres especies prosperan mejor en los suelos fértiles, profundos, bien drenados y ricos en materia orgánica, aunque la var. *brachyptera* prospera también en suelos pobres, donde se asocia con *Pinus lumholtzii* o con *Juniperus* sp. (Cuadro 2).

El clima donde desarrolla el *P. ayacahuite* var. *brachyptera* es templado frío, con temperaturas medias anuales de 13 °C en tanto que el *P. ayacahuite* típico y el *P. ayacahuite* var. *veitchii* son de clima templado caliente con temperaturas medias anuales de 13 y 15 °C respectivamente (Loock, 1977; Eguiluz, 1988).

Las precipitaciones en los lugares donde se encuentran las tres especies de este estudio son del orden de 700 a 1500 mm anuales, aunque la especie típica suele presentar cantidades de precipitación de hasta 1,200 mm anuales por encontrarse en lugares subtropicales, en tanto que el *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* tiene hasta 1,500 mm de precipitación por efecto de la lluvia estacional y la nieve de invierno (Eguiluz, 1988).

Los períodos de lluvias de las tres especies se presentan desde fines de primavera y en verano, con inviernos secos y

fríos aunque para el *P. ayacahuite* var. *brachyptera* el invierno es más frío y con nieve o escarcha.

El mes de más alta temperatura se presenta en los meses de marzo y abril para la especie típica y la var. *veitchii*, en tanto que para la var. *brachyptera* el mes más caliente se presenta de abril a mayo (Cuadro 2).

Las temperaturas mínimas extremas de los lugares de distribución de la especie típica (-5°C) y la var. *veitchii* (-14°C) son menos severas que la temperatura mínima extrema que resiste la especie *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* (-23°C) (Eguiluz, 1988).

2.4. Importancia de las proteínas y enzimas

Las proteínas se definen como sustancias de alto peso molecular, compuestas de subunidades moleculares llamadas polipéptidos. Las enzimas son proteínas de origen natural que catalizan reacciones biológicas con un cierto grado de especificidad. En su ausencia, la mayoría de las reacciones químicas en las células biológicamente activas tardarían mucho tiempo o simplemente no se efectuarían (Badui, 1984).

2.4.1. Forma molecular de proteínas y enzimas

Los polipéptidos que componen las proteínas están formados por unidades más pequeñas llamadas aminoácidos, unidos por el grupo carboxilo de un ácido y el grupo amino de otro. Cualquier proteína dada está compuesta de una o más cadenas polipeptídicas. La composición de una proteína determinada es uniforme; cada molécula está compuesta del mismo número y tipo de cadenas polipeptídicas y cada una de estas cadenas polipeptídicas están compuestas del mismo número y tipo de aminoácidos con una misma

secuencia específica de la mayoría de todos los 20 aminoácidos. sí, los posibles tipos de proteínas que pueden existir dependen de los tipos de aminoácidos que contengan las proteínas, su orden respectivo, su relación y su frecuencia (Srb, Owen y Edgar, 1965; Feret y Bergmann, 1976; Strickberger, 1986).

Según Ferret y Bergmann (1976), La estructura de las proteínas y su configuración molecular están en función de:

- a) Los tipos y frecuencias de interacciones moleculares afectando la configuración y asociación polipeptídica, y
- b) El tamaño y el número de asociaciones polipeptídicas con una proteína.

Los distintos aminoácidos confieren a las proteínas cualidades únicas, la secuencia de aminoácidos que constituyen la estructura de los polipéptidos que integran una proteína se denomina su estructura primaria. Un segundo aspecto de la estructura de las proteínas consiste en la configuración que le viene impuesta por los enlaces peptídicos, llamada estructura secundaria que tiene la forma de una hélice alfa. Si no se hallasen implicadas otras fuerzas, esta estructura haría que la proteína tuviese el aspecto de un largo filamento enrollado. En realidad sin embargo, la mayoría de las proteínas son más bien esféricas que filamentosas, lo que indica que la hélice alfa ha sido doblada y plegada en diversos puntos, dando lugar a una configuración nueva denominada la estructura terciaria. Muchas proteínas presentan una estructura cuaternaria en el sentido de que constituyen asociaciones de dos o más cadenas polipeptídicas unidas por enlaces no covalentes y ocasionalmente por enlaces covalentes (Strickberger, 1987).

En general las proteínas pueden clasificarse como:

1. Fibrosas (P. ejm. colágenos, queratinas, etc.), 2. globulares (P. ejm. albúminas, globulinas, histonas, etc.) y 3. enzimas (cualquier proteína activa catalíticamente) (Ferret y Bergmann, 1976).

Las proteínas fibrosas y globulares no son objeto de estudio en esta investigación, por lo cual sólo se comentan. En tanto que las enzimas se abordarán más ampliamente.

Las enzimas son producidas por células vivas y tienen como principal función la de efectuar las diferentes reacciones biológicas propias de cada especie. Actualmente se conoce la existencia de más de 2,000 enzimas, de las cuales más de 150 han sido aisladas, purificadas y algunas cristalizadas. La estructura química de cada enzima es de carácter protéico globular y puede o no requerir otra molécula llamada cofactor para desarrollar su actividad biológica; la parte protéica de la enzima se llama apoenzima, que al unirse con el cofactor forma la holoenzima que actúa propiamente como catalizador (Badui, 1984).

Proteína (apoenzima)	+	No proteína (cofactor) vitaminas minerales compuestos orgánicos	---> Holoenzima
-------------------------	---	---	-----------------

Debido a su naturaleza protéica, a las enzimas les afectan los mismos factores que a las proteínas: temperatura, disolventes, sales, pH, etc. que modifican su estructura química con la consecuente pérdida de su actividad catalítica. Normalmente la fracción no protéica es parte integral del centro activo de las enzimas: es una molécula de bajo peso, muy estable al calor, y se encuentra libre o unida a la apoenzima. Entre los minerales más importantes que actúan como cofactores se

encuentran los siguientes: Cobre, Molibdeno, Zinc, Magnesio, Hierro, Manganeseo y Calcio; la Tiamina, la Nicotinamida, el Piridoxal, el ácido pantoténico y la rivo flavina son algunas de las vitaminas más comunes (Badui, 1984).

Para los investigadores Feret y Bergmann (1976) y Badui (1984), las enzimas pueden ser clasificadas en varios grupos basados en las reacciones químicas que catalizan. La clasificación más general de las enzimas son:

- a. OXIDOREDUCTASAS. Contiene oxidasas y deshidrogenasas, las cuales catalizan reacciones de oxido-reducción.
- b. TRANSFERASAS. Incluye transaminasas y otras enzimas transferasas que catalizan reacciones de transferencia de grupos.
- c. HIDROLASAS. Incluyen esterases, fosfatasas, glicosidasas y peptidasas, catalizan reacciones hidrolíticas.
- d. LIASAS. Incluyen descarboxilasas, hidratasas y liasas. Rompen un enlace sin participación de agua; se efectúa por un rearrreglo interno de las valencias disponibles.
- e. ISOMERASAS. Incluye varias racemasas, efimerasas, oxidoreductasas y transferasas intramoleculares catalizan reacciones que suponen isomerización.
- f. LIGASAS O SINTETASAS. Incluyen carboxilasas, catalizan reacciones que consisten en la unión de dos moléculas, acopladas con la intervención de un enlace pirofosfato de ATP o de un trifosfato similar.

2.4.2. Propiedades de las proteínas

Como las proteínas están compuestas de aminoácidos, muchas propiedades químicas de las proteínas son similares a las de los aminoácidos. Los aminoácidos pueden existir como iones dipolares. Si se colocan en un ambiente ácido, los aminoácidos

cambian a cargas positivas, y en un ambiente básico los aminoácidos cambiarán a cargas negativas. El grado de la carga asociado con un polipéptido a valores específicos de pH depende del número de grupos funcionales $-NH^{(+)}$ y $-COOH^{(-)}$ sobre la superficie peptídica (Feret y Bergmann, 1976).

Si las proteínas se colocan en un campo polarizado, la mayoría de las proteínas migrarán hacia el ánodo en soluciones de pH básico y hacia el cátodo en soluciones de pH ácido. Las tasas relativas de migración en solución serán proporcionales a la carga de la proteína (Feret y Bergmann, 1976).

La especificidad de las enzimas es una propiedad que la hace muy diferentes a muchos catalizadores no biológicos. La gran mayoría de las enzimas tiene la capacidad de catalizar reacciones específicas; es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de sustrato que debe reunir ciertas características para que pueda ser utilizado como tal (Badui, 1984).

La enzima tiene la capacidad de efectuar la reacción química a través de una ruta que requiere de una menor energía de activación que la necesaria cuando se efectúa sin catalizador. Además a mayor concentración de la enzima la reacción química es más rápida (Badui, 1984).

Las enzimas se ven afectadas por el pH, dependiendo mucho de la concentración de iones hidrógeno; esta dependencia puede deberse a cambios en los grados de ionización de los aminoácidos del sitio activo de la enzima, del sustrato o bien del complejo enzima sustrato, lo que afecta la afinidad que tiene la enzima por el sustrato. El pH tiene un efecto muy marcado en la estructura conformacional de los polipéptidos y esto puede ser

otra razón de la alteración de la actividad de las enzimas. Todas las enzimas presentan una actividad catalítica máxima a un cierto valor óptimo de pH. La mayoría tiene una actividad máxima a un intervalo de 5 a 8 (Badui, 1984).

La velocidad de reacción enzimática aumenta con la temperatura dentro del intervalo en el que la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica; a medida que aumenta la temperatura aumenta también la velocidad de reacción y la inactivación de la enzima por un proceso de desnaturalización al que son sensibles la mayor parte de ellas. La mayoría de las enzimas tiene su óptimo en el intervalo de 30 a 40 °C, inactivándose a más de 50°C (Badui, 1984).

El mismo autor señala que la estructura protéica de la enzima es afectada por la fuerza iónica, lo que trae consigo modificaciones del centro activo de éstos catalizadores biológicos.

Asimismo menciona que la mayoría de las enzimas requieren agua para desarrollar una conformación estable con propiedades biológicamente activas; sin embargo, algunas enzimas pueden actuar en sistemas con un mínimo de agua, como los aceites que están sujetos a reacciones enzimáticas por las lipasas.

También señala que los principales agentes inhibidores de las enzimas son los metales pesados como Mercurio, Plata y Plomo; por otra parte, los iones de Calcio, Magnesio, Sodio, Potasio, Manganeso, Zinc y Hierro actúan como agentes activadores de muchas otras. El efecto activador de los iones se debe probablemente a que forman parte del sitio activo de la enzima, se requieren para la formación del complejo enzima-sustrato o bien ayudan a mantener su conformación tridimensional.

2.4.3. Caracterización genética de las proteínas y enzimas.

Una proteína puede ser conformada de dos, tres o más polipéptidos originados de dos o más genes. En resumen, cualquier proteína dada puede representar en su forma simple la información de un gene singular, o en su forma más compleja, información originándose de varios genes (Ferret y Bergmann, 1976).

Según Ayala y Kiger (1984), se ha descubierto que la información genética codificada en la secuencia de nucleótidos del ADN de un gene estructural, se traduce en una secuencia de aminoácidos que forman un polipéptido. Podemos seleccionar para su estudio una serie de proteínas sin saber previamente si son variables en la población; una serie de proteínas que con respecto a la variación, representan una muestra no sesgada de todos los genes estructurales del organismo. Si se encuentra una proteína que no varía entre los individuos, se deduce que el gene que codifica la proteína también es invariable; si la proteína es variable, sabemos que el gen lo es también y podemos medir su variabilidad.

El ADN tiene el arreglo específico para reproducir los pares de bases que codifican la información genética. El ARN transmite el código a los sitios donde las enzimas son producidas. Las enzimas son proteínas con secuencias especiales de aminoácidos prescritas por el ADN. La secuencia de aminoácidos determina la estructura de las enzimas, impartiendo así una función específica. Cada enzima cataliza un sustrato específico para la reacción producto. Tales reacciones son procesos fisiológicos. Estos procesos producen tejidos, diferentes órganos y ultimamente promueve el fenotipo (Conkle, 1974a).

La naturaleza de las enzimas que pueden formarse en un organismo está determinada por la presencia de genes en sus cromosomas. Los genes no son entidades invariantes permanentemente, sino que experimentan cambios repentinos (mutaciones) persistentes. Las mutaciones pueden ser reconocidas por cambios en las características externas de los organismos, su "fenotipo". Diferentes formas del mismo gen ocupan la misma posición (locus) en un cromosoma, se refiere a los "alelos". La presencia de varios alelos (alelos múltiples) se reconocen como cambios de forma, apariencia o función de los organismos o parte de éstos (Dixon y Webb, 1964).

En las células diploides típicas hay dos series de cromosomas, una derivada del padre y la otra de la madre. Hay así dos genes correspondiendo a cada locus. De acuerdo con la teoría de la genética Mendeliana, tres combinaciones son posibles para cada par de alelos. Si se denotan las dos formas alélicas de los genes en cuestión, por las letras A y a, estas formas pueden escribirse AA, aa y Aa. Se puede esperar que estas tres combinaciones produzcan tres diferentes fenotipos, pero esto no siempre es así. En muchos casos AA y Aa producen los mismos fenotipos; en estos casos se dice que A es dominante y a recesivo. Muy a menudo el carácter recesivo, el cual aparece en la forma de aa es meramente la ausencia de alguna cualidad, la cual esta presente en las otras dos formas. Esto permitió a Bateson y Punnet sugerir la "teoría de la presencia - ausencia" donde el carácter dominante es debido a la presencia del gene, mientras el carácter recesivo resulta de su ausencia. Sin embargo, a la luz del más reciente conocimiento, particularmente en relación a las mutaciones, los hechos son más

fácilmente explicados por suponer que el carácter recesivo es debido no a la ausencia del gene, sino a su inactividad, en otras palabras, que el alelo A produce algo (Por ejemplo una enzima activa) mientras que el alelo a no la produce (Dixon y Webb, 1964).

Las mutaciones del pasado en el material cromosómico dieron la variación heredable que han permitido la diferenciación de los taxa a través de los procesos de evolución, según Conkle (1974a, con base en varios autores).

Varios estudios sobre una variedad de organismos muestran que las frecuencias génicas alélicas cambian a través de los gradientes geográficos; así que asume que la diferenciación se realiza por la presión de la selección ejercida por el gradiente ambiental, lo cual se cumple también en árboles forestales de tal manera que ciertos polimorfismos enzimáticos están influenciados por la selección natural; además que en los sistemas enzimáticos ciertos loci de genes son más polimórficos que otros y por lo tanto son más útiles para monitorear la herencia de la variación enzimática (Conkle, 1974a).

Las isoenzimas son convencionalmente definidas como formas moleculares múltiples de una enzima dada ocurriendo tanto en individuos o miembros diferentes de la misma especie. Las proteínas que constituyen una serie de isoenzimas tienen propiedades similares pero no necesariamente idénticas; pueden catalizar las mismas reacciones pero difieren en su velocidad de reacción. Pueden ocurrir juntos en la misma célula, pero pueden tener isoenzimas de diferentes patrones entre células de diferente tejido o en diferentes etapas de desarrollo (Harris y Hopkinson, 1977).

Las isoenzimas en donde se ha probado que segregan en proporciones Mendelianas y que se encuentra que son expresiones fenotípicas de alelos de un locus genético simple se llaman aloenzimas (Conkle *et al.*, 1982).

Según Harris y Hopkinson (1977) las causas de la existencia de isoenzimas se pueden agrupar en :

a) Loci múltiples que determinan las isoenzimas. Se ha encontrado que dos y algunas veces tres o cuatro loci génicos participan en la determinación de la estructura primaria de varias enzimas. Tales loci múltiples codifican para cadenas polipeptídicas similares, pero estructuralmente distintas, lo cual se atribuye a la ocurrencia de la duplicación de genes los cuales se presentan en el curso de la evolución por efecto de las mutaciones.

b) La ocurrencia de alelos múltiples en un locus particular. En cualquier locus dado pueden ocurrir un número de diferentes alelos en una población de individuos, en donde cada alelo codifica una versión estructural distinta de una cadena polipeptídica. Consecuentemente la estructura primaria de las isoenzimas implicadas será diferente de un individuo a otro de acuerdo a los alelos que lleven en el locus en cuestión. Los individuos heterocigóticos transportan dos alelos diferentes por lo cual en general muestran un patrón más complejo de isoenzimas que los individuos homocigóticos. Si las isoenzimas son monoméricas (solamente con una cadena de polipéptidos simple), entonces las isoenzimas observadas en el heterocigótico representara una mezcla simple de la observada separadamente en los dos correspondientes homocigotos. Sin embargo, si las isoenzimas son multímeros (conteniendo dos o más cadenas de

polipéptidos) aparecerán isoenzimas adicionales "híbridas" no presentes en los tipos de homocigotos correspondientes.

c) La ocurrencia de la llamada formación de isoenzimas "secundarias" debido a las modificaciones de post-translocación de la estructura de la enzima. La modificación de la estructura de las proteínas ocurre después de la síntesis primaria de la cadena polipeptídica en los templates del ARNm del ribosoma (y sus asociaciones en el caso de enzimas multiméricas).

2.5. Teoría de la técnica electroforética

El uso de la técnica electroforética para separar formas moleculares múltiples de enzimas, con la subsecuente tinción de isoenzimas ha sido explorado virtualmente en las ciencias biológicas a partir de la década de los 60s. Esta técnica tiene amplia aplicabilidad en varias características hereditarias y tiene la capacidad de visualizar directamente las enzimas, permitiendo la detección de productos génicos que catalizan la misma reacción. Así también permite la detección de la variación genética muy útil en este tipo de investigación (Brewer y Sing, 1970).

2.5.1. Electroforesis

El término electroforesis es usado para describir la migración de una partícula cargada eléctricamente bajo la influencia de un campo eléctrico (Andrews, 1986).

Para Cheliak y Pitel (1984) electroforesis es un proceso por medio del cual las proteínas introducidas dentro de un medio de filtración molecular, son forzadas a migrar a través de estos filtros bajo la influencia de una corriente eléctrica. La distancia total que una proteína recorre depende del pH, del

sistema "buffer", la carga eléctrica neta de la proteína y su estructura tridimensional.

Por otra parte, Conkle *et al.* (1982) define la electroforesis como el movimiento de enzimas en un gel, bajo la influencia de una corriente eléctrica. Las diferentes enzimas y las formas alternas de enzimas similares migran a diferentes velocidades cuando se aplica corriente directa a muestras de semilla macerada en un gel de almidón bufferizado. La migración enzimática en los geles y la separación de las enzimas con diferente carga resulta de la interacción de la corriente eléctrica y el pH en la charola del electrodo (sistema del gel). La dirección -anodal o catodal- y la velocidad de migración de la enzima depende del tipo de carga eléctrica -positiva o negativa- y de la intensidad de la carga.

Para examinar la estructura genética de las poblaciones, las proteínas son absorbidas en pequeñas tiras de papel de una preparación homogénea cruda del tejido selecto, usualmente la preparación del homogeneizado crudo comprende la maceración del tejido selecto en una apropiada extracción buffer. Después las tiras de papel se insertan en los geles y se realiza la electroforesis (Cheliak y Pitel, 1984).

Se necesitan varios sistemas de gel para analizar un número máximo de enzimas. Después que los geles han sido mantenidos por un tiempo suficiente en el campo eléctrico, se rebanan los geles y rebanadas delgadas del gel son teñidas para las diferentes enzimas. Las soluciones para teñir contienen substratos específicos y las enzimas de las muestras de semilla actúan sobre estas substancias para producir reacciones producto de tal forma que las reacciones producto son teñidas o

son las bases de los procesos de tinción. La localización de bandas visibles sobre los geles marca la distancia de migración de enzimas específicas (Conkle et al, 1982).

2.5.2. Soluciones buffer y geles

Los componentes más importantes del procedimiento electroforético son los sistemas buffer y los geles. Basandose en la estructura molecular de los polipéptidos, el componente de las moléculas de proteína durante la separación electroforética del gel depende primeramente del pH, la fuerza iónica y los tipos de buffers empleados (Feret y Bergmann, 1976).

Un gran número de diferentes buffers han sido usados para electroforesis en enzimas (Harris y Hopkinson, 1977).

En general el uso de buffers para sistemas isoenzimáticos específicos han sido construidos empíricamente por prueba y error. Los buffers de baja fuerza iónica permiten una migración rápida y produce relativamente bajo desarrollo de calor, mientras buffers de fuerza iónica más alta dan, en general zonas de separación más agudas (Brewer y Sing, 1970).

El pH óptimo para los buffers varía de acuerdo a las características de las cargas de las proteínas a ser estudiadas. La carga de una molécula de proteína depende de la proporción de sus grupos carboxilo y amino. Los grupos carboxilo desarrollan una carga negativa y los grupos amino una carga positiva. Si el pH disminuye, los grupos amino son ionizados progresivamente y la proteína asume una carga positiva. A medida que el pH aumenta, los grupos carboxilo son progresivamente ionizados dando a la proteína una carga más negativa. La carga eléctrica neta de una proteína a un pH dado dependerá del número de grupos amino y carboxilo expuestos que se encuentran ionizados. Así que

entre más carga eléctrica tenga una proteína, más rápido se moverá en un campo eléctrico en la dirección del electrodo con la carga opuesta (Brewer y Sing, 1970).

La principal función del buffer es neutralizar los cambios de pH, los cuales ocurren durante la electroforesis en los electrodos, dado que el ácido se produce en el ánodo y la alcalinidad se genera en el cátodo. El grado en que este cambio de pH ocurre está directamente relacionado a la duración de la electroforesis, el voltaje usado y la corriente generada en el circuito (Harris y Hopkinson, 1977).

Según Feret Y Bergmann (1976) en general un sistema buffer consiste de dos partes:

- a) El buffer del electrodo o puente (bridge) el cual se coloca en las cámaras o charolas del electrodo.
- b) El buffer del gel usado para la preparación del gel de almidón. Usualmente el buffer del gel tiene 1/10 de la molaridad del buffer del electrodo.

Para la mayoría de las enzimas los sistemas buffer son "continuos", con los mismos iones buffer en la matriz de soporte (gel) y el comportamiento del electrodo (Harris y Hopkinson, 1977).

La separación de las proteínas puede ser afectada también por el tamiz molecular del medio electroforético. Esto es debido a que ciertos medios electroforéticos, tal como almidón y acrilamida, tienen un tamaño de poro aproximado al de las moléculas de proteína. Así que el tamaño y forma de las moléculas de proteína afectan la velocidad de migración (Brewer y Sing, 1970).

En el gel, el paso de cualquier partícula es impedido por la estructura de la matriz, el alcance depende del tamaño relativo de las partículas y los poros en el gel. Por lo tanto, el tamaño molecular y la carga juegan un papel en el proceso de separación. En geles de agar el tamaño de los poros es grande, así la influencia del tamaño molecular es menos aparente para la mayoría de las partículas que en los geles de almidón y poliacrilamida (Andrews, 1986).

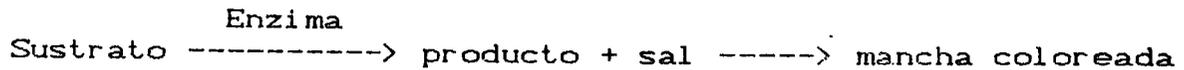
Se cree que el gel de almidón es el mejor medio general para estudios isoenzimáticos. Se ha encontrado que tiene el poder más grande para las isoenzimas que otros medios, incluyendo acrilamida, y además sirve efectivamente como tamiz para trabajar a gran escala. Si se desea un teñimiento multienzimático en un corrimiento electroforético simple con varias comparaciones lado a lado, el gel de almidón es recomendable (Brewer y Sing, 1970). En el caso de estudios génicos de árboles forestales, la técnica de gel es más práctica (Conkle, 1972).

El gel de almidón tiene algunas desventajas, tales como: 1) A no ser que el gel sea procesado en forma especial no es claro, comparado con medios transparentes. 2) El gel de almidón es algo friable y difícil de manipular. 3) En general, la electroforesis con gel de almidón requiere un corrimiento electroforético mayor que algunos otros métodos. No obstante, las limitaciones de los otros métodos (acrilamida, papel), son más desventajosas para electroforesis de isoenzimas (Brewer y Sing, 1970).

2.5.3. Teñido de geles

Después de sacar el gel del campo eléctrico, se trata con una solución química que contiene un sustrato que es específico para la enzima que va a ser ensayada y una sal que reacciona con

el producto de la reacción catalizada por la enzima. En el punto del gel a donde ha migrado la enzima específica tiene lugar una reacción que puede ser como sigue, según Ayala y Kiger, (1984):



Un gran número de mezclas de tinción se describen en la literatura desde una tinción general hasta las altamente específicas para la identificación de una enzima particular simple (Andrews, 1986).

Los reactivos en el fluido o mezcla de tinción varían de acuerdo a la enzima estudiada. Esta solución es bufferizada con un buffer prescrito a un pH específico. El pH debe ser óptimo para las isoenzimas o dar una buena actividad. Además del buffer, la solución de tinción contiene sustratos de la enzima, algunas veces coenzimas y todos los cofactores esenciales para la máxima actividad enzimática (Brewer y Sing, 1970; Feret y Bergmann, 1976).

Según Harris y Hopkinson (1977) los métodos de tinción pueden agruparse en seis tipos, los cuales son:

a) Método de teñimiento cromogénico. Estos métodos consisten en que el sustrato de menor color se convierte en un producto coloreado por acción de la enzima y así se revelan las isoenzimas.

Un ejemplo es el uso de fosfato fenolftaleína como un sustrato para la fosfatasa ácida (ACP1), lo cual permite la formación de zonas rosas brillantes debido a la formación de fenolftaleína en los sitios de la actividad de la fosfatasa.

b) Método de teñimiento fluorogénico . Estos métodos dependen de la generación de productos altamente fluorescentes por la acción de la enzima sobre el sustrato no fluorescente (llamado teñimiento fluorescente "positivo"); o de la generación de un producto no fluorescente (llamado teñimiento fluorescente "negativo". El teñimiento fluorescente positivo el cual emplea derivados del 4-metilumbeliferona (4-methylumbelliferone) como sustratos se ha encontrado que es extremadamente sensible y de especial valor para el estudio de las hidrolasas.

Los teñidores fluorescentes "negativos" son en general menos sensibles y menos convenientes que los teñidores "positivos" porque las concentraciones de reactivos deben ajustarse cuidadosamente para detectar el producto no fluorescente. Sin embargo, estos teñidores son importantes para la detección de deshidrogenasas.

c) Métodos de teñimiento radioactivo. Estos métodos dependen de la detección de un producto radioactivo por radiografía convencional con rayos x. El método radioactivo puede ser aplicado al análisis de una variedad de enzimas pero las posibilidades no se han investigado ampliamente. La susceptibilidad y la resolución de estos métodos puede ser altamente buena.

d) Métodos de teñimiento de detección química. Estos métodos de teñimiento emplean reactivos químicos que producen compuestos coloreados en los sitios de actividad enzimática. El teñidor puede ser "positivo" en el sentido que el color se forma por una reacción con el producto de la actividad enzimática o "negativo" si el color se forma por una reacción con el sustrato. Los teñidores "negativos" son siempre usados en un procedimiento

de dos etapas: primero, el gel se incuba con el sustrato por un período dado de tiempo a 37°C y entonces el reactivo químico coloreado se aplica para producir una coloración total con huecos pálidos en los sitios de actividad enzimática. Los teñidores "positivos" son también usados en dos etapas de reacción con coloración final.

Los teñidores "positivos", los cuales utilizan derivados de naftol α y β con sales estables de diazolum han sido usados extensamente en la examinación de hidrolasas.

e) Métodos de teñimiento por transferencia de electrones. Estos métodos son los reactivos de tinción más ampliamente usados para la detección de isoenzimas. Hay dos colorantes en uso general; tetrazolio tiazolil de metilo (methyl thiazolyl tetrazolium), usualmente conocido como MTT, el cual es receptor de electrones en reacciones con deshidrogenasas (Figura 1a) y carbazole 3-amino 9-etil el cual es un receptor en reacciones con oxidasas y peroxidasas (Figura 1b).

En las sales de tetrazolio, el MTT se reduce por donadores de electrones para formar formazan insoluble de color azul púrpura obscuro. La reacción procede rápidamente en la presencia de metasulfato de fenazina (PMS phenazine methosulphate), el cual actúa como un catalizador intermedio.

Otras sales de tetrazolio tales como Nitrato azul de tetrazolio (NBT) (nitro blue tetrazolio) pueden también ser usados en lugar de MTT pero son en general menos sensibles.

La mezcla de teñimiento tetrazolio-PMS son ligeramente sensibles y por lo tanto la incubación debe llevarse a cabo en la obscuridad.

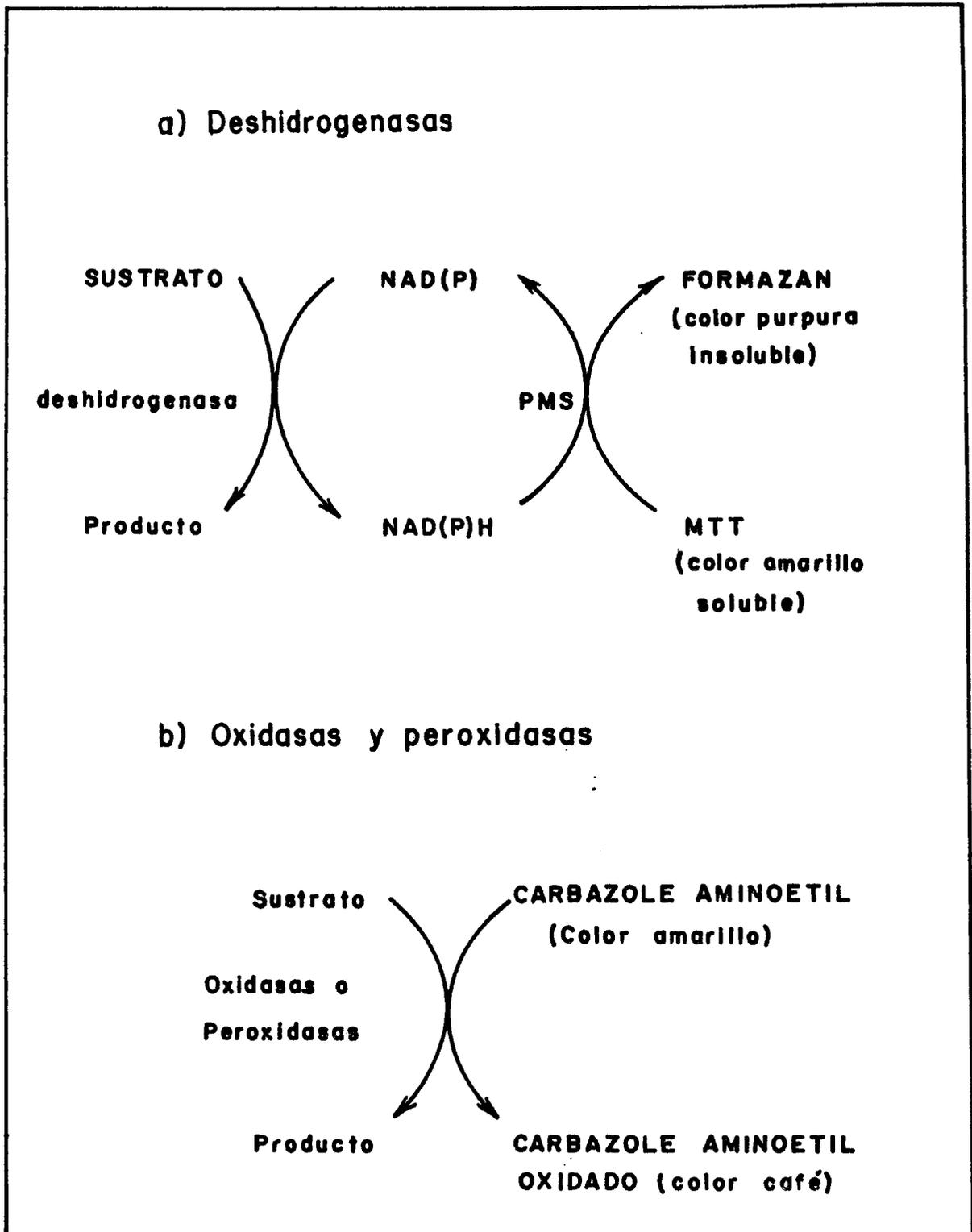


Figura 2. Diagrama mostrando los sistemas de teñimiento por transferencia de electrones; a) deshidrogenasas y b) oxidasas y peroxidasas. PMS= Metasulfato de fenazina; NAD y NADP=coenzimas.

En relación al colorante 3 amino 9 etilo carbazole, es de color amarillo, el cual puede ser oxidado en un compuesto insoluble café oscuro. Es un reactivo útil de propósito general para la detección de oxidasas y peroxidasas.

f) Métodos de teñimiento por ligamiento - enzima. Este grupo de métodos de teñimiento dependen del uso de enzimas exógenas en la mezcla de teñimiento para atrapar y cambiar el producto de la reacción enzimática bajo prueba en una sustancia la cual puede ser detectada por su color o por sus propiedades fluorescentes.

El procedimiento más común consiste en emplear como una enzima de ligamiento una deshidrogenasa exógena junto con su apropiada coenzima, para generar un precipitado de formazan en los sitios de las isoenzimas, los cuales catalizan la primera reacción. Por ejemplo. para los teñidores hexokinasa, fosfoglucomutasa y glucosa fosfato isomerasa se usa glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) como la enzima de ligamiento y la especificidad de cada teñidor se determina por el sustrato o sustratos utilizados. Así se usa glucosa y ATP para la hexokinasa; glucosa y 1-fosfato para fosfoglucomutasa; fructuosa 6-fosfato para glucosa fosfato isomerasa.

Así la isoenzima de la mayoría de cualquier enzima puede en principio ser detectada por el uso de la apropiada enzima de ligamiento. La única limitación es la disponibilidad de enzimas puras con alta actividad específica y sustratos apropiados para las enzimas a ser utilizadas.

2.6. Aplicación de la electroforesis en la investigación forestal

Los estudios isoenzimáticos son útiles en la descripción de diferencias genéticas dentro y entre taxa y para verificar la herencia, por lo cual la información de estos estudios tanto en poblaciones naturales como en huertos semilleros ayuda a aumentar la eficiencia de programas de mejoramiento genético de árboles (Conkle, 1974a y Adams, 1981).

La aplicación de los estudios isoenzimáticos han servido en la investigación forestal para los siguientes estudios:

a) Estudios ontogénicos. La electroforesis se utiliza para hacer estudios ontogénicos, habiéndose demostrado en varias especies de plantas que los perfiles isoenzimáticos de un individuo singular puede variar por órgano, tejido y por tiempo (etapa de desarrollo). La variabilidad en expresión isoenzimática en el tiempo y tejido puede ser debida a factores genéticos. Tal variabilidad puede usarse para controlar los procesos en el desarrollo de un individuo (Feret y Bergmann, 1976).

Como ejemplo de lo anterior expuesto, se han analizado diferencias en isoenzimas en diferentes etapas de la germinación de semillas y crecimiento de embriones de *Pinus attenuata* (Conkle, 1974b).

b) Análisis de variabilidad genética. La variabilidad isoenzimática puede directamente igualarse con la variabilidad alélica, lo cual hace posible definir polimorfismos genéticos por análisis de polimorfismos isoenzimáticos (Feret y Bergmann, 1976).

Los análisis de polimorfismos de proteínas proveen bases de datos para cuantificar el nivel de variación geográfica en caracteres genéticos y hacer estimaciones cuantitativas de la

cantidad de variación genética dentro de una especie. La electroforesis es usada comúnmente para estimar la proporción de loci polimórficos y el nivel promedio de heterocigocidad en todos los loci. Además, estos estudios ayudan a estimar la cantidad relativa de variación en diferentes partes del área de distribución natural de una especie o para comparar diferentes especies (Mitton, 1983).

El estudio de la variación genética dentro y entre poblaciones utilizando un número elevado de loci isoenzimáticos es una manera de generar considerable información genética, en un tiempo limitado y con recursos limitados, por lo que la información derivada de estos estudios puede ser de bastante valor para tomar decisiones de cuales especies se deben comenzar a desarrollar en un programa de mejoramiento genético en una área determinada. El diseño de las estrategias eficientes de conservación génica también requiere información sobre la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones (Adams, 1983).

Brown y Moran (1981) dan un ejemplo de como los datos isoenzimáticos pueden usarse para la selección del número y distribución de reservas *in situ* o colecciones de semilla.

c) Estudio de movimiento de genes. Los estudios de variación en las frecuencias génicas a través de sistemas isoenzimáticos de control genético en árboles forestales de regiones fisiográficas diferentes, procedencias y poblaciones, amplía grandemente el conocimiento de la relación genética entre ellas. La dirección, velocidad y distancia de migración de genes en poblaciones continuas, discontinuas y aisladas

pueden ser estimadas mediante el análisis de frecuencias génicas isoenzimáticas (Ferret y Bergmann, 1976).

Una manera de poder medir el flujo génico es identificar un individuo con un gene único para un rodal de árboles y muestrear la semilla de árboles adyacentes y más distantes para mapear el éxito del viaje de polen que transporta el único alelo. Otra forma de medir el flujo de genes es estimando la frecuencia de polinizaciones que presentan genes que deben haberse originado en una parte determinada del rodal o bosque (en el caso de huertos semilleros, polen proveniente de fuera del huerto) (Mitton, 1983).

d) Estudios de estructura genética de la población. Las coníferas son uno de los grupos de especies más variables genéticamente, pero son caracterizados por niveles relativamente bajos de variación isoenzimática geográfica. Una generalización para las coníferas es que la mayoría de la variación genética de una especie, se encuentra dentro de la población. Esto es, si una población se muestrea aleatoriamente en el rango de distribución de una especie, con una muestra de 50 a 100 árboles de esa población, revelara la mayoría de los alelos a ser encontrados a través del área completa de distribución de la especie (Mitton, 1983).

El nivel relativamente bajo de diferenciación isoenzimática de las poblaciones de especies forestales ha sido atribuido en parte al sistema de apareamiento de las coníferas, que son polinizadas por el viento, con polinización cruzada y las semillas son dispersadas por el viento (Mitton, 1983).

A pesar de que la diferenciación isoenzimática de las poblaciones forestales es relativamente baja, hay patrones de

variación de proteínas asociado con la variación ambiental y la distancia geográfica. Así, el análisis de la distribución de frecuencias de varios marcadores genéticos (isoenzimas) a lo largo del área de distribución de una especie confirmará o refutará la información actual sobre los patrones geográficos de variabilidad genética (Mitton, 1983; Feret y Bergmann, 1976).

Un amplio entendimiento de la estructura genética de las poblaciones de árboles forestales ayudará en la planeación de estrategias óptimas para el mejoramiento genético de árboles y su domesticación (Feret y Bergmann, 1976).

e) Identificación de individuos y poblaciones. Cada individuo de una población posee un genotipo único, así también éste tendrá una única serie de isoenzimas (Feret y Bergmann, 1976).

El análisis isoenzimático se usa para certificar la fuente de semilla, con base en la composición genética (alélica) de la población. Así cualquier análisis de semilla de origen no conocido puede hacerse rápidamente y no requiere gran demanda de años de plantación para su evaluación (Feret y Bergmann, 1976).

Por medio de los perfiles isoenzimáticos también se pueden identificar clones cuando se desconoce su identidad (Feret y Bergmann, 1976).

f) Mejoramiento genético de árboles. La investigación isoenzimática se utiliza para certificar la identidad de árboles parentales en programas de mejoramiento de árboles y para la certificación comercial de clones usados en reforestación. Tal uso es posible porque un gran número de diferentes genotipos

isoenzimáticos pueden ser generados con solamente pocos loci segregantes (Adams, 1983).

En el caso de la certificación de lotes de semilla. Los clones individuales o árboles parentales pueden ser únicamente identificados con base en sus genotipos multilocus. Así, las isoenzimas tienen gran valor para identificar errores en el movimiento de semillas o progenie en plántulas, o para certificación comercial de lotes de semillas de árboles parentales individuales o de un número limitado de padres. Las isoenzimas son útiles también para identificar híbridos (Adams, 1983).

Para determinar el éxito en cruzas controladas, se puede hacer una estimación comparando los genotipos isoenzimáticos en semillas producidas por la crusa, con los esperados en base a los genotipos de los supuestos padres (Adams, 1983).

El estudio de la eficiencia genética de huertos semilleros se puede hacer por medio de los marcadores genéticos de isoenzimas, con los cuales se puede conocer el grado con el cual influyen los diferentes factores que disminuyen la eficiencia genética. Considerando que los factores que disminuyen la eficiencia genética son: a) altos niveles de autofecundación; b) contaminación de polen por fuentes de fuera del huerto semillero; c) apareamiento no aleatorio entre clones, resultando en menos fertilización cruzada y por lo tanto, menos variabilidad genética en la cosecha de semilla (Adams, 1983).

Para determinar la efectividad de la polinización masal suplementaria (que aumenta la fertilización cruzada, reduce la endogamia y la contaminación de polen no deseado) se aplica polen suplementario que contiene marcadores isoenzimáticos

únicos. Posteriormente, las semillas resultantes se analizan electroforéticamente para determinar la frecuencia de marcadores isoenzimáticos en la mezcla de polen (Adams, 1983).

Otra aplicación de las isoenzimas en la genotecnia es como ayuda en la selección de características de importancia económica ya que estudios en árboles forestales han demostrado recientemente correlaciones entre mediciones de la velocidad de crecimiento y los niveles de heterocigocidad en los loci isoenzimáticos. Sin embargo la relación no ha sido consistente en las especies investigadas (Adams, 1983).

Quizás un uso potencial prometedor de las isoenzimas como una ayuda en la selección es como marcador de bloques ligados que transportan genes o grupos de genes que controlan características cuantitativas de importancia económica (Adams, 1983).

g) Inferencias filogenéticas. Las coníferas se han dispersado con ligera diversificación. La tasa de evolución cromosómica en pináceas es alrededor de 1% de la velocidad en mamíferos de placenta (Prager, Fowler y Wilson, 1976). Dadas estas bajas tasas de evolución se produce una serie relativamente pequeña de características útiles en estudios de sistemática. En contraste a los bajos porcentajes de evolución morfológica y cariotípica, las proteínas de coníferas han evolucionado a tasas comparables a las de las angiospermas y animales. Así, las diferencias de proteínas entre especies de coníferas son substancialmente mas grandes que las diferencias cariotípicas y morfológicas, y ellas pueden por lo tanto tener un valor importante en los estudios de relaciones filogenéticas (Mitton, 1983).

2.7. Electroforesis en coníferas

Los estudios empleando polimorfismo de proteínas mediante la electroforesis han contribuido substancialmente al conocimiento de muchos grupos de plantas y animales, particularmente en el estudio de las coníferas (Mitton, 1983).

Con la electroforesis se investigaron proteínas en polen de pinos a inicios de 1964. Después las proteínas solubles de gametofitos femeninos y embriones fueron analizadas en dos especies de pino y una de picea. En 1966, los genetistas de poblaciones usaron el potencial de la técnica de separación de enzimas y demostraron su aplicabilidad al análisis de poblaciones naturales (Conkle, 1972). Pero en sí, el análisis genético de las enzimas de las coníferas no fueron reportados hasta los inicios de los 70's (Conkle, 1974a).

Las técnicas isoenzimáticas pueden actualmente dar resolución de un gran número de loci isoenzimáticos en muchas especies de árboles y muchas de ellas pueden ser ensayadas simultáneamente. Además, la mayoría de los árboles forestales han mostrado altos niveles de variación en los loci isoenzimáticos (Adams, 1983).

Antes de la aplicación de la electroforesis, los análisis genéticos de árboles forestales de coníferas se utilizaban las mediciones de características poligénicas, tales como la altura y diámetro, después de unos pocos años o décadas de crecimiento. Pero como las características poligénicas tiene influencia ambiental, es necesario hacer estudios de procedencias para observar todo el gradiente ambiental, los cuales son caros y consumen tiempo y esfuerzo. Una vez que la variación de proteínas muestran tener patrones simples de herencia, los estudios

genéticos se pueden realizar con colecciones de campo de material de plantas, con lo cual se elimina el problema de la larga duración de las generaciones de las especies arbóreas y se expanden las colecciones de datos (Mitton, 1983).

Las isoenzimas pueden ser identificadas en una variedad de tejidos, incluyendo hojas juveniles y adultas, yemas de invierno, polen y semillas. Generalmente la resolución es mejor en tejidos de semillas (Adams, 1983). Aunque los diferentes tejidos de las plantas difieren en los patrones de bandeo de cada sistema enzimático (Conkle, 1974a).

Las acículas maduras de especies de coníferas son probablemente los tejidos mas difíciles de analizar por electroforesis porque en general, los tejidos vegetativos maduros de especies perennes son ricos en taninos, quinonas, fenoles, flavonoides, etc. Estos compuestos se unen a los sitios activos de la mayoría de las enzimas e impiden hacer investigación con varios tipos de sistemas enzimáticos (Cheliak y Pitel, 1984).

Las semillas de las coníferas son de utilidad especial para el análisis isoenzimático porque contienen el megagametofito (tejido nutritivo) haploide (n) rico en diversidad de enzimas, con una actividad relativamente alta. Además, un megagametofito puede ser considerado como una muestra aleatoria del producto gamético de un individuo, y las aloenzimas (isoenzimas alélicas) de árboles madre heterocigóticos se espera que se segregen en la relación 1:1. Analizando los patrones de segregación de megagametofitos de árboles parentales individuales, se puede determinar el control genético de las isoenzimas y sus relaciones de ligamiento sin la

necesidad de hacer cruizas y estudios de plántulas de la progenie (Adams, 1983; Mitton, 1983).

La segregación de las isoenzimas en megagametofitos de árboles individuales también pueden usarse para determinar los genotipos de las fuentes parentales. La ventaja de este método es que con una muestra de seis semillas, la probabilidad de identificar correctamente un genotipo de un árbol en cualquier locus es muy alta ($p > 0.95$; Adams, 1983).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Procedencias muestreadas

Se muestrearon 12 procedencias a lo largo del área de distribución de los tres taxa de estudio, desde Centroamérica hasta el estado de Durango en México.

Los árboles colectados fueron 314 en total, con un promedio de 26 árboles por procedencia. Las procedencias de San Juan Tetla, Puebla, México y de San Rafael, Méx., fueron ejemplares de la variedad *veitchii*. Las procedencias de Laguna del Progreso y la Victoria, Durango, México, fueron ejemplares de la variedad *brachyptera*. Las ocho procedencias restantes desde Nundaco, Oaxaca, México hasta Las Trancas, Honduras fueron colectas de *Pinus ayacahuite* típico. Para mayor información sobre la localización y número de árboles colectados por procedencia ver el Cuadro 3 y la Figura 3.

Las colectas de las procedencias de las variedades *veitchii* y *brachyptera* fueron hechas por el Centro de Genética Forestal, A.C. de agosto 1986 a septiembre de 1987. Las procedencias restantes fueron colectadas por la Cooperativa de Recursos de Coníferas de México y Centroamérica (CAMCORE) de agosto 1982 a septiembre de 1985.

La semilla se colectó por árbol individual y la identidad de cada árbol se mantuvo a través del estudio.

3.2. Trabajo de laboratorio

El trabajo de laboratorio se realizó en dos periodos. En el primer período de mayo a junio de 1987, se analizaron las semillas correspondientes a las poblaciones de *Pinus ayacahuite*

Cuadro 3. Localización geográfica de las procedencias muestreadas.

NP	PROCEDENCIA	ALTITUD (msnm)	LATITUD NORTE	LONGITUD OESTE	NA
1	San Juan Tetla, Puebla, México.....	2,900-3,400	19° 10'	98° 35'	25
2	San Rafael, México, México.....	2,500-2,600	19° 13'	99° 46'	25
3	Nundaco, Oaxaca, México.	2,840-2,940	17° 09'	97° 38'	9
4	Ixtlan, Oaxaca, México..	2,330-2,920	17° 24'	96° 29'	26
5	San Cristobal de las Casas, Chiapas, Méx.	2,250-2,375	16° 37'	92° 22'	26
6	El Porvenir, Chiapas, México.....	2,645-2,760	15° 25'	92° 20'	30
7	Palestina, Quetzaltenan- go, Guatemala.....	2,580-2,730	14° 56'	91° 43'	14
8	Chuipachec, Totonicapan, Guatemala.....	2,500-2,730	14° 56'	91° 21'	40
9	Ocotepeque, Ocotepeque, Honduras.....	2,730	14° 25'	89° 08'	39
10	Las Trancas, La Paz, Honduras.....	2,120-2,400	14° 07'	87° 49'	30
11	El progreso, Durango, México.....	1,800-2,000	24° 38'	104° 08'	21
12	La Victoria, Durango, México.....	1,600-1,700	25° 31'	105° 03'	29

NOTA : NP=Número de procedencia, NA= Número de árboles colectados.
msnm=metros sobre el nivel del mar

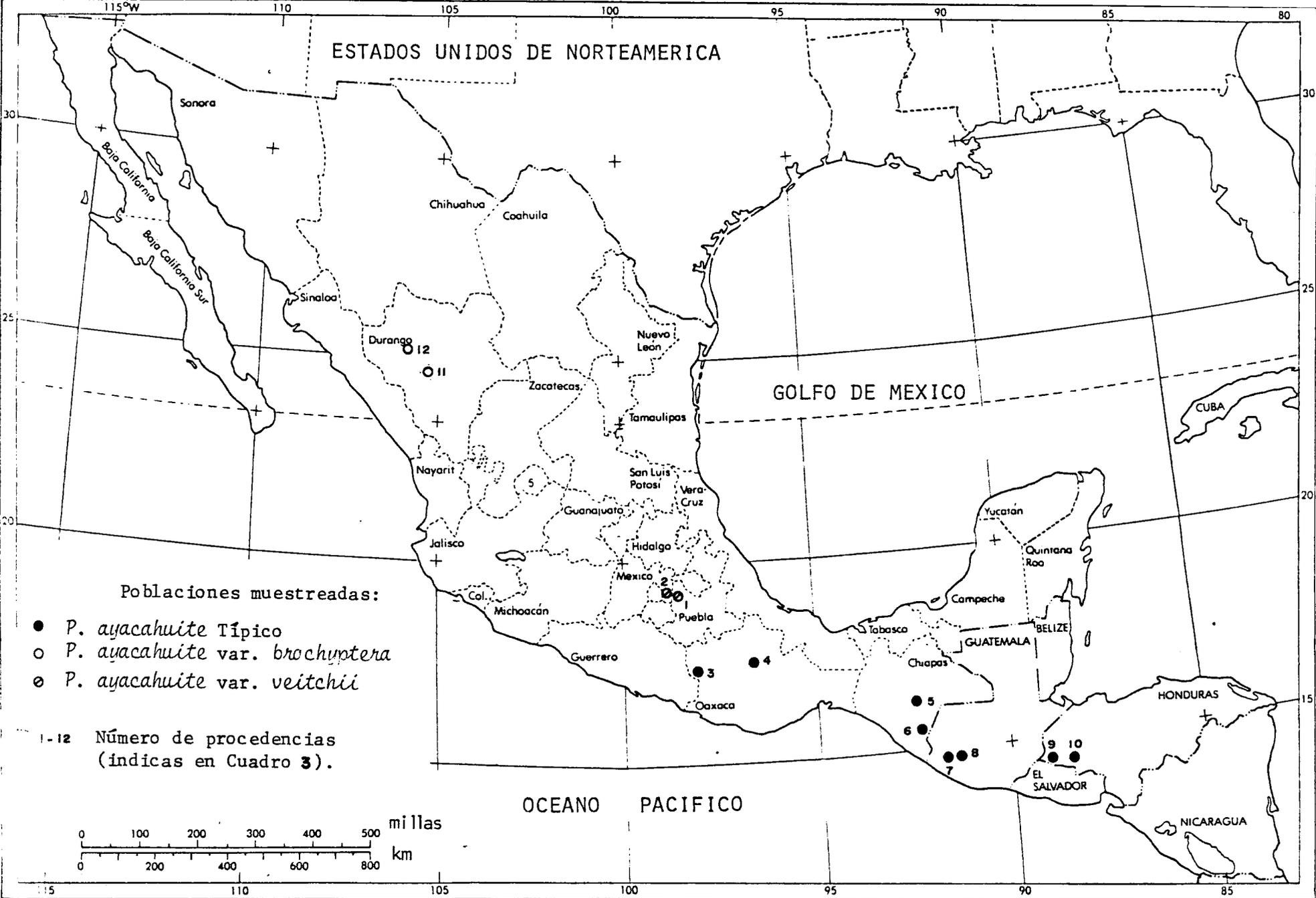


Fig. 3. Mapa que indica la localización geográfica de las procedencias muestreadas

típico y *P. ayacahuite* var. *veitchii*. En el segundo período de mayo a junio de 1989, se analizaron las semillas de *P. ayacahuite* var. *brachyptera*.

3.2.1. Preparación de las semillas

Se analizaron seis semillas por cada árbol individual de todas las procedencias muestreadas. En si, se ensayó el tejido de los megagametofitos haploides de seis semillas por cada árbol. La probabilidad de perder un heterocigoto parental con este tamaño de muestra es de aproximadamente 3% (Fins y Seeb, 1986) Además la ventaja de usar el tejido haploide del megagametofito es que permite el análisis directo de la diferente movilidad enzimática determinada genéticamente (Yeh y O'Malley, 1980).

Los análisis se hicieron en las semillas secas, sin haberlas hidratado o puesto a germinar, ya que según la literatura, en este estado las enzimas se encuentran presentes en el gametofito (Conkle et al, 1982).

Para preparar la semilla, se removió la testa, se extirpó el embrión y se colocó parte del megagametofito en una microcelda de una placa de acrílico. Las placas con microceldas se colocaron sobre hielo para mantener las muestras en frío, para impedir que las enzimas se degeneraran. Al mismo tiempo de colocar las muestras en las microcelda se anotó en una hoja de registro la identidad del material.

Posteriormente se agregó a cada microcelda dos gotas de extracción buffer, la cual fue especial para activar las enzimas. Su formulación se encuentra en Conkle et al. (1982).

Una vez aplicadas las gotas de extracción buffer, se procedió a macerar cada una de las muestras contenidas en las

microceldas con una varilla cilíndrica de vidrio, teniendo cuidado de limpiarla al finalizar de macerar cada muestra.

A continuación de la maceración, a cada microcelda conteniendo el homogeneizado se introdujeron tiras de papel (Whatman chromatography No. 3) de dimensiones 12 x 3.5 mm para que absorbieran las enzimas. Por último, se metieron al refrigerador las placas con microceldas con las muestras debidamente preparadas.

3.2.2. Preparación de los geles

Para hacer los geles, se utilizaron en este trabajo cuatro sistemas buffer (A,B,D, Y E), con diferente pH y formulación química, de forma similar como se indica en Conkle *et al.* (1982), (ver Cuadro 1A y Cuadro 2A del Apéndice).

Previo a la preparación de los geles, se ensamblaron los moldes, los cuales consistieron en una base de vidrio (de dimensión 20.2 cm x 23 cm) y barras de acrílico que unidas entre si y sujetas sobre el vidrio con ligas conformaron un molde con dimensión interior de 18.22 cm x 15.6 cm y un grosor de 1.2. cm (Figura 4).

Para preparar los geles primeramente se pesó la cantidad apropiada de almidón y se midió con una probeta la cantidad respectiva de solución buffer. Aproximadamente 1/5 parte de la solución buffer se depositó en un vaso de precipitado de 250 ml (PYREX), el cual se le agregó el almidón seco para hacer una solución en suspensión, libre de grumos, en tanto que la solución buffer sobrante, se vertió en un matríz de cuello largo y se calentó con un mechero de Bunsen hasta el punto de ebullición.

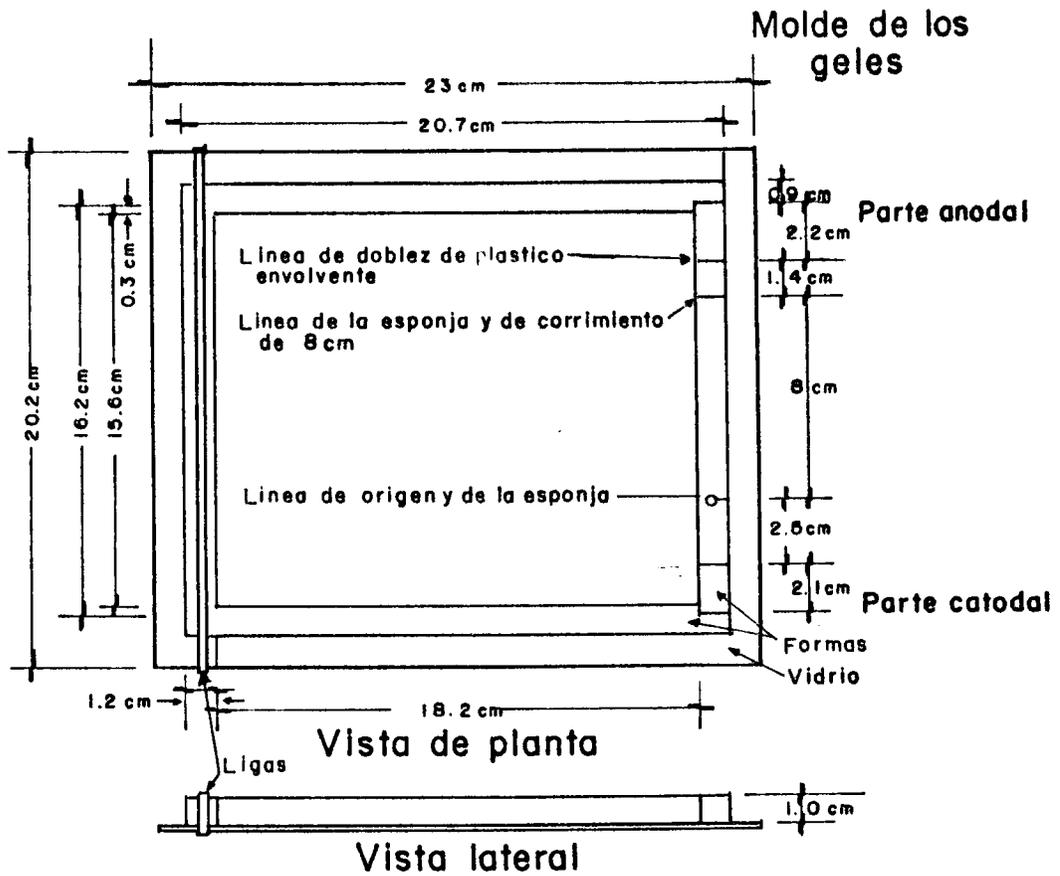


Figura 4. Esquema mostrando un molde de los geles (Conkle et al., 1982).

La suspensión con almidón se vació en un matríz kitazato de 2,000 ml , manteniendolo bajo agitación con sólo el giro de la muñeca de la mano, no permitiendo que se precipitara el almidón.

Por otra parte, el buffer que se puso a calentar en un matríz de cuello largo al momento en que estaba hirviendo, se vertió dentro del matríz kitazato que contenía la suspensión con almidón y se agitó fuertemente. A continuación este matríz kitazato se metió al horno de microondas por un minuto y quince segundos, para hacer un postcoccimiento a toda la mezcla y que tuvieran un aspecto semitransparente.

Una vez cocida la mezcla, se le aplicó un vacío o eliminación de gases con una aspiradora para extraerle las burbujas grandes hasta que sólo quedaron burbujas pequeñas. Después se vertió la mezcla en el molde previamente preparado. La cantidad de mezcla preparada alcanzó para llenar dos moldes.

Al cabo de 20 minutos la mezcla adquirió su consistencia de gel, fue entonces cuando se cubrió con plástico envolvente para prevenir su deshidratación, se etiquetó y se metió al refrigerador para enfriarlo aproximadamente a 4 °C.

3.2.3. Montaje de muestras y electroforesis

Una vez que los geles se enfriaron se procedió a hacer el montaje de muestras.

Primeramente se sacaron los geles del refrigerador y se les hizo un corte sobre lo ancho, este corte denominado origen, se realizó a 4.5 cm a partir del extremo del gel.

Se removieron las ligas que sujetaban las barras del molde y se desplazó la porción más pequeña cortada del gel hacia el final del vidrio, dejando una abertura de aproximadamente un centímetro. En seguida se procedió a colocar las tiras de papel

para electroforesis empapadas con el macerado de las muestras (explicado en el apartado 3.2.1.) en la cara de corte del origen, con una separación entre unas y otras de aproximadamente 2 mm. Se hace notar que dentro de las muestras se hizo el diseño de tal forma que dos muestras testigo fueran de *Pinus resinosa*, el cual por tener poca heterogeneidad genética (Fowler y Morris, 1977), presentó el mismo patrón de desplazamiento de las enzimas, lo cual fue útil para el registro de la información. Cada gel contenía 36 tiras con muestras de macerado de megagametofitos de semillas diferentes.

Al terminar de colocar las muestras sobre el gel, se volvió a colocar en su lugar la porción de gel más pequeña, de tal forma que las tiras con las muestras de macerado quedaron presionadas en el origen. A continuación se colocaron en su lugar las barras del molde y se sujetaron nuevamente con las ligas.

Una vez hecho el montaje de las muestras se colocaron los geles con las muestras sobre las estructuras especiales para corrimientos electroforéticos que consisten en una base de acrílico con una charola en ambos extremos conteniendo electrodos (Figura 5).

La charolas conteniendo los electrodos se llenaron con la solución buffer correspondiente a cada sistema gel.

Al colocar el gel con las muestras sobre la estructura para corrimientos electroforéticos, se desprendió un poco el plástico envolvente que cubría el gel para descubrir una porción de éste y con esponjas especiales para electroforesis se cerró el circuito, uniendo la solución buffer de la charola conteniendo el electrodo con el gel portando las muestras, haciendo lo mismo en ambos extremos del gel. Se hace notar que los geles siempre se

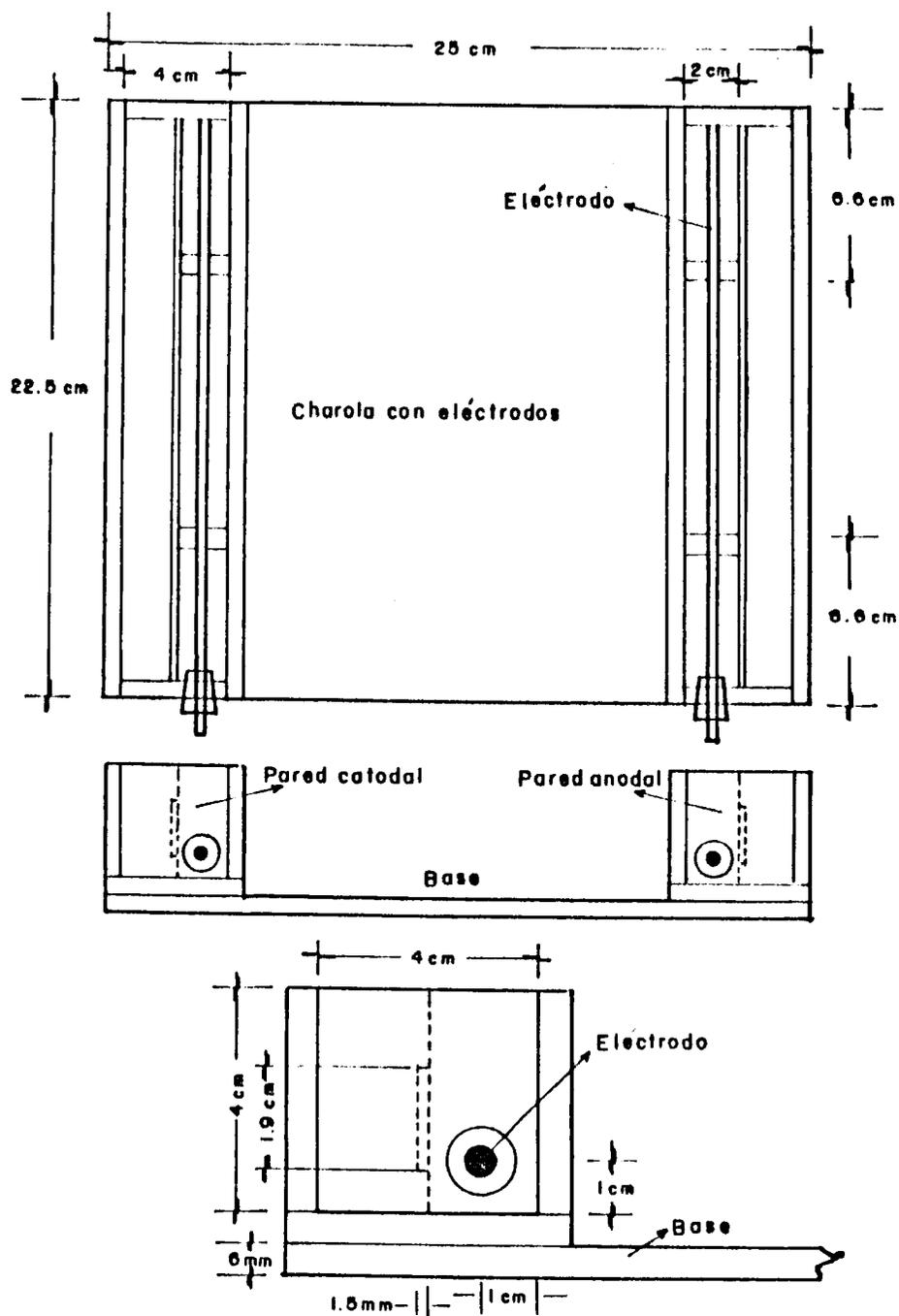


Figura 5. Esquema que muestra las dimensiones y la forma de las estructuras para corrimientos electroforéticos (Conkle *et al.*, 1982).

colocaron de tal manera que el origen que contenía las muestras quedara en el lado catodal, para que las isoenzimas se desplazaran hacia el ánodo.

Cuando las estructuras para corrimientos electroforéticos que soportaban los geles portadores de las muestras estuvieron debidamente preparados (Figura 6), se metieron al refrigerador especial para corrimientos electroforéticos, en donde se realizaron las debidas conecciones eléctricas, se colocó una bolsa con agua fría sobre la parte superior de los geles y se procedió a encender las fuentes de poder con diferente corriente eléctrica en miliamperes para los diferentes sistemas buffer. La corriente eléctrica utilizada fue:

Sistema buffer	miliamperes
A	75
B	70
D	60
E	60

Después de 15 minutos de funcionamiento de las fuentes de poder, se sacaron del refrigerador las estructuras para corrimientos electroforéticos y se removieron las tiras de papel de los geles. A continuación se volvieron a colocar las esponjas en su lugar, se metieron las estructuras para corrimientos electroforéticos al refrigerador, se hicieron las conecciones eléctricas respectivas y se hicieron funcionar nuevamente las fuentes de poder.

El tiempo de corrimiento fue variable para los diferentes sistemas buffer. En el caso de los sistemas A y B, se dió un tiempo de corrimiento hasta que el frente de avance alcanzó 8 cm a partir del corte de origen. En el caso de los sistemas D y E el tiempo de corrimiento fue de 4.5 horas.

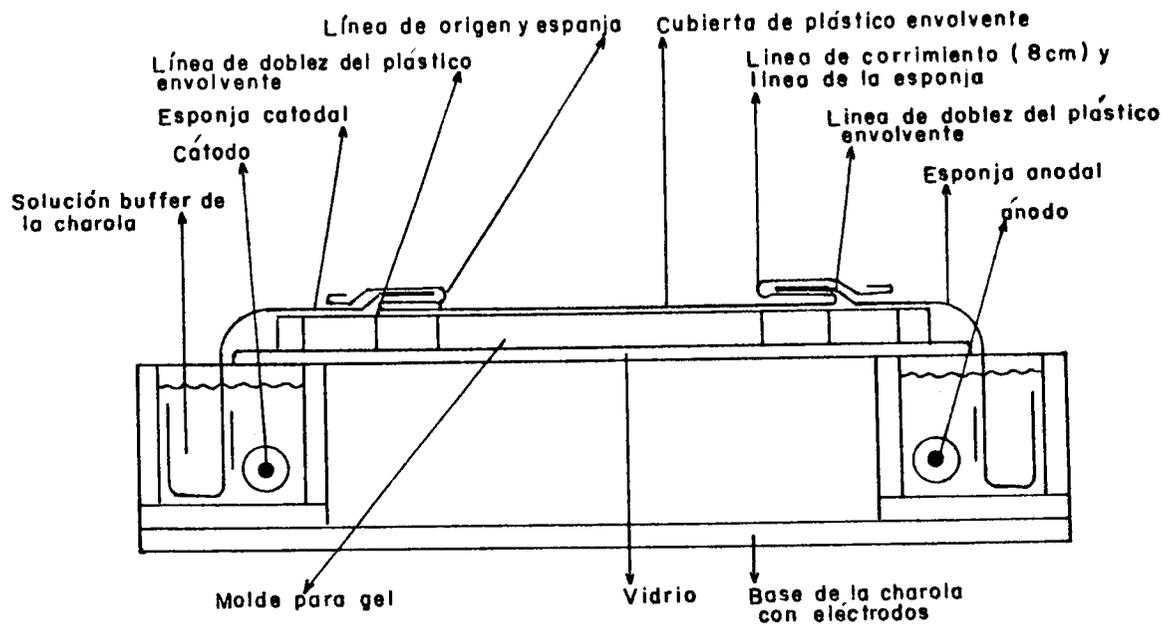


Figura 6. Esquema que muestra una vista en sección lateral de las estructuras para corrimientos electroforéticos con los geles portando las muestras de semillas, esponjas y el plástico envolvente en su lugar debido (Conkle et al., 1982).

3.2.4. Rebanado y tinción de geles

Al finalizar la electroforesis, las fuentes de poder se apagaron, las estructuras para electroforesis que estaban soportando el gel se desconectaron y se retiraron del refrigerador uno por uno.

Se removió el plástico envolvente del gel y se cortó la parte del gel más lejana al lado anodal que no contenía enzimas.

El rebanado se hizo usando guías de plástico (de 200 x 25 x 1.0 mm), hilo transparente y dos broches mariposa grandes. Para efectuar el rebanado primeramente se colocaron las reglas guía en ambos lados del gel y se sujetaron con los broches grandes al vidrio, y utilizando los dedos índices de cada mano se tensó el hilo y se hizo pasar a través del gel, al nivel de las reglas guía.

Una vez realizado el primer corte, se colocó en ambos lados del gel otra regla guía sobre las reglas guía puestas anteriormente, para hacer otro corte en la misma forma indicada anteriormente. Esta secuencia de cortes se repitió hasta rebanar todo el gel.

Al finalizar el rebanado de todo el gel se metió al refrigerador para evitar la degeneración de las enzimas.

Después de rebanado el gel se procedió al tefimiento. El cual consistió en colocar cada rebanada del gel en una charola para tefimiento que contenía una solución de tefimiento diferente para cada enzima ensayada.

La solución de tenimiento consistió en general de tres partes: una solución buffer, una parte química seca y otros reactivos adicionales (entre ellos enzimas y cofactores), de hecho los reactivos en el fluido de tefimiento variaron de

acuerdo a la enzima estudiada como lo indicó Brewer y Sing (1970). Las fórmulas de las diferentes soluciones de teñimiento para las enzimas analizadas en este estudio pueden consultarse en Conkle *et al.* (1982).

Una vez transferidas las rebanadas del gel a la charola para teñimiento, se cubrieron las charolas con plástico envolvente y en caso de que la solución de teñimiento lo requiriera se metieron a la incubadora (a temperatura de 37°C).

Cuando se dió la coloración de las bandas y su resolución fue clara, se retiró la solución de tinción de la charola y se lavaron los geles con agua destilada.

Se ensayaron un total de 7 sistemas enzimáticos que dieron resolución a 14 loci isoenzimáticos (Cuadro 4)

3.2.5 Registro de información de geles

Una vez coloreadas las bandas de las isoenzimas en los geles para las diferentes enzimas estudiadas, se procedió a registrar la información.

Para cada enzima, se realizó un esbozo de las diferentes bandas formadas, en una tarjeta de cartulina (dimensiones 20 x 12 centímetros), en la cual se marcó la distancia al origen en centímetros, para cada una de las bandas.

Se dió el número uno a la banda más frecuente del gel del primer corrimiento electroforético y las bandas nuevas que fueron apareciendo en los siguientes corrimientos electroforéticos se les asignó un número progresivo en orden ascendente.

Con los siete sistemas enzimáticos utilizados, se obtuvo información para catorce loci isoenzimáticos, los cuales se registraron en los zimogramas respectivos para cada enzima (Figura 1A del Apéndice, Cuadro 4).

Cuadro 4. Sistemas enzimáticos ensayados, sus abreviaciones y los sistemas buffer del gel usado para los corrimientos electroforéticos

Sistema enzimático	Abreviación	No de loci	Sistema Gel/ Buffer
Aconitasa	ACO	1	E
Fosfoglucomutasa	PGM	1	A
6- Fosfogluconato deshidrogenasa	6PGD	1	E
Glutamato oxalacetato transaminasa	GOT	3	B
Leucina aminopeptidasa	LAP	3	A
Menadiona reductasa	MNR	3	A
Shikimato deshidrogenasa	SKDH	2	D

No de loci = Número de loci por sistema enzimático; A,B,D,E = Son las diferentes formulaciones de sistemas buffer dados por Conkle *et al.* (1982).

Entre las muestras puestas en el gel del corrimiento electroforético, se pusieron dos muestras de macerado de semillas de *Pinus resinosa*, el cual fue un estándar, que siempre en todos los corrimientos electroforéticos presentó la misma distancia de migración por tener poca variabilidad (Fowler y Morris, 1977).

El estándar fue útil para tener mayor exactitud al momento de presentarse problemas para asignarle un número a una variante isoenzimática, utilizando para ésto la distancia de migración relativa (Rm) (Cheliak y Pitel, 1984).

$$R_m = \frac{\text{distancia de migración de la variante (mm)}}{\text{distancia de migración del estándar (mm)}}$$

El cálculo se realizó tanto en el esbozo de la cartulina como directamente en el gel. De tal manera que se discriminó entre un número y otro (alelos diferentes) con el valor de la distancia de migración relativa que más se aproximaba entre el medido en el esbozo de la cartulina y el medido directamente en el gel.

Para almacenar los geles, se quitó el agua a la charola para tefimiento y se reemplazó con una solución fijadora, consistiendo en una mezcla de metanol, agua y ácido acético glacial en la relación 5:5:1 respectivamente, dejándola toda la noche. Al siguiente día se colocaron sobre servilletas de papel para eliminar el exceso de la mezcla fijadora, se envolvieron con plástico ultradelgado y se metieron al refrigerador.

3.3 Evaluación de la información

La evaluación de la información se realizó por medio del programa escrito en lenguaje FORTRAN para datos electroforéticos llamado BIOSIS-1 (Swofford y Selander, 1981a; 1981b).

El programa permitió obtener la siguiente información:

a) Cálculo de frecuencias alélicas. Para los 14 loci génicos se calcularon las frecuencias alélicas que son las frecuencias de individuos homocigóticos para un alelo, más la mitad de las frecuencias de los heterocigóticos para el alelo (Ayala y Kiger, 1984). El programa trabajó los datos para cada individuo, dando el genotipo para cada locus para el cual fue registrado, especificando todos los genotipos observados y sus correspondientes frecuencias. Estas frecuencias alélicas se utilizaron para las subsiguientes etapas del programa.

b) Medición de la variabilidad genética. El programa calculó para cada población muestreada las siguientes mediciones de variabilidad genética: número promedio de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos (en donde cada locus fue considerado polimórfico cuando se detectó más de un alelo) y la heterocigocidad promedio observada y esperada de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg, se calculó utilizando la estimación insesgada de Nei (1978), en donde la estimación insesgada de la heterocigocidad poblacional en un locus está dada por:

$$h = 2n (1 - \sum_i x_i^2) / (2n - 1);$$

mientras que la heterocigocidad promedio estimada insesgada es $\hat{H} = \sum_{k=1}^r h_k / r$; donde h_k = valor de h para el k ésimo locus; la n = número de individuos por locus; x_i es la correspondiente frecuencia alélica en una muestra.

c) Cálculo de las distancias genéticas. La distancia genética se calculó por el método de Cavalli-Sforza y Edwards

(1967). Este método utiliza las frecuencias alélicas transformadas por medio de la raíz cuadrada, para que estas variables transformadas se comporten con una distribución aproximadamente Normal. Una población con frecuencias alélicas P_1, P_2, \dots, P_A se representa por el vector $(\sqrt{P_1}, \sqrt{P_2}, \dots, \sqrt{P_A})$ donde A es el número de alelos en el i ésimo locus. Un vector siempre será de longitud unitaria, y todas las poblaciones posibles estarán incluidas en la porción de la hiperesfera unitaria de A dimensiones para las cuales todas las coordenadas son positivas. La distancia angular entre dos poblaciones con frecuencias P_1, P_2, \dots, P_A y P_1', P_2', \dots, P_A' está dado por:

$$\cos \theta = \sum \sqrt{P_i P_i'}$$

La circunferencia de una hiperesfera unitaria es 2π , la $1/4$ parte de esta circunferencia corresponde a una sustitución alélica completa con un arco de $\pi/2$. Es conveniente trabajar en términos de $2\theta/\pi$, donde θ está en radianes, para la distancia unitaria es entonces la sustitución de un alelo (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967; Rogers, 1972)

Cavalli-Sforza y Edwards (1967) usaron como la distancia entre dos poblaciones un arco $2\theta/\pi$ y aparte, la longitud de la cuerda que los junta, el cual es $2\sqrt{2/\pi} \sqrt{1-\cos \theta}$. Así para calcular las distancias arco y cuerda entre dos poblaciones se utilizó la hiperesfera, la cual esta contenida dentro de un espacio Euclidiano. Estos espacios Euclidianos para los loci separados (asumiendo no semejanza) pueden entonces ser unidos y las distancias son dadas por el teorema de Pitágoras en varias dimensiones, así que el cuadrado de la distancia entre dos poblaciones esta dado por la suma de las distancias al cuadrado

para cada locus. De esta manera los datos son representados en un espacio Euclidiano, con escala igual a la unidad, por substitución de un gene (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967).

En este trabajo se calculó la distancia genética (arco $2\theta/\pi$), entre las poblaciones muestreadas. Esta distancia toma valores de 0 a 1, siendo de 0 cuando no hay alelos diferentes entre las dos poblaciones comparadas o sea que las dos poblaciones son iguales genéticamente y 1 cuando todos los alelos son diferentes entre las dos poblaciones comparadas.

En esta representación una población puede considerarse como siguiendo un movimiento aleatorio en un espacio curvo.

De las principales fuerzas evolutivas de mutación, migración, selección y deriva genética, el modelo de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) no incorpora las dos primeras fuerzas evolutivas. Se asume que la presión de mutación es usualmente pequeña en relación con otras presiones y que la tasa de migración es usualmente pequeña. No se toma en cuenta la migración y se justifica por una parte porque las tasas de migración pequeñas actuarán esencialmente como disturbios casi aleatorios particularmente amortiguando la variación debido a la deriva aleatoria; por otra parte grandes tasas de migración aparecen solamente como accidentes raros. La deriva genética aleatoria que es el nombre dado a la variación en frecuencias génicas las cuales inevitablemente acompañan la formación de la siguiente generación; la tasa de cambio aleatorio dependerá del tamaño de la población en cuestión (tamaño de cruzamiento efectivo) y la estructura de apareamiento. Si la población es más pequeña la variación aleatoria es más grande y así el movimiento aleatorio es más rápido. La selección puede ser

constante o puede variar tanto en el espacio como en el tiempo. Si la selección es constante en el espacio, origina un cambio en las frecuencias génicas de todas las poblaciones estudiadas tendiendo hacia la selección direccional. La selección es probablemente el factor principal que causa la divergencia. Si la selección es de tipo estabilizante tal como la ventaja heterocigótica causará una reducción en la varianza de frecuencias génicas y sus efectos serán más o menos confundidos con la deriva genética aleatoria.

d) Análisis de agrupamientos. El análisis de agrupamientos comprende técnicas que siguiendo reglas más o menos arbitrarias, forman grupos de Unidades taxonómicas operacionales (UTO), que se asocian por el grado de similitud (Crisci y Lopez, 1983). En este estudio las poblaciones muestreadas son consideradas como UTO's.

El análisis de agrupamiento se desarrollo usando la matriz de distancias genéticas (distancia arco $2\theta/\pi$) de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) previamente calculada, utilizando el método de pares de grupos no ponderados con recálculo de los coeficientes por promedios aritméticos (UPGMA) (Swofford y Selander, 1981a).

La estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamientos se representó gráficamente por medio de un dendrograma, en donde según Crisci y López (1983) las UTO's se colocan en el extremo derecho y dan origen cada una a un eje horizontal, que se unirán mediante ejes verticales que expresan, en relación con la escala, el valor existente entre las UTO o conjunto de UTO. Podría decirse que un grupo cualquiera se constituye por las paralelas a la escala que

nacen de un mismo eje vertical y las ramificaciones que contienen.

e) Distancia del procedimiento Wagner. Se utilizó el método de Farris (1972) para construir la red de Wagner, estimando el árbol filogenético a partir de la matriz de distancias genéticas (distancia arco $2\theta/\pi$) de Cavalli-Sforza y Edwards (1967). Se usó el criterio de adición múltiple para determinar la secuencia de adición de las ramas al árbol total. La raíz del árbol se colocó en el punto medio de la distancia patrística más grande que separó un par de poblaciones. En donde la distancia patrística es la suma de las longitudes de las ramas que conectan dos nodos (Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) o Unidades Taxonómicas Hipotéticas (UTH)) sobre el árbol (Swofford y Selander, 1981a).

La técnica del árbol Wagner utiliza como principal supuesto el postulado de simplicidad (parsimonia según Duncan y Stuessy, 1984) que sostiene que los cambios evolutivos se realizan de la forma más económica posible, desde el punto de vista de los sucesos genéticos requeridos. La evolución orgánica se efectúa con la máxima eficiencia y en todos los cambios de un estado de un carácter a otro recorre el camino más directo entre ellos. En otras palabras se asume que la evolución sigue siempre el camino más corto (Crisci y López, 1983).

Farris (1972) utiliza para estimar el árbol filogenético una modificación de la técnica de construcción del árbol Wagner de Kluge y Farris, cuyo procedimiento opera con una matriz UTO x UTO. La ventaja de este procedimiento es que no tiene la suposición de homogeneidad de tasas evolutivas sobre las líneas filéticas.

Según Farris (1970, citado por Sneath y Sokal, 1973) las unidades taxonómicas operacionales son puntos en el hiperespacio que se tratan de conectar en alguna manera óptima definida. Las líneas conectando estos puntos son hipotéticas como también lo son la mayoría de los puntos de los ramales (UTH). Así que las Unidades Taxonómicas Hipotéticas (UTH) son nodos en el árbol Wagner que no son Unidades Taxonómicas Operacionales (UTO). Se llaman así porque están en lugar de un ancestro hipotético de un grupo de Unidades Taxonómicas operacionales dentro del árbol evolutivo estimado (Farris, 1972), Además que con la finalidad de acortar la longitud del árbol estimado, la técnica de Wagner construye estos taxones intermedios hipotéticos entre las UTO, siendo taxones artificiales que son representados por puntos en la ramificación del árbol evolutivo (Crisci y López, 1983).

Este procedimiento une primeramente las UTOs (Por ejemplo A y B cuyas distancias en la matriz UTO x UTO es la más pequeña. Después se selecciona la siguiente UTO (Por ejemplo C), que será adicionada al árbol, siendo esta la más próxima a las dos UTOs que se unieron primeramente, para lo cual se crea una UTH (Por ejemplo x). La longitud de la rama de C,X se calcula con la siguiente fórmula:

$$L(C,X) = 1/2 \left[L(C,A) + L(C,B) - L(A,B) \right] \quad (1)$$

Una vez que la $L(C,X)$ es conocida se calcula la $L(A,X)$, $D(B,X)$ como sigue:

$$L(A,X) = L(A,C) - L(C,X) \quad (2)$$

$$L(B,X) = L(B,C) - L(C,X) \quad (3)$$

Después se calcula la distancia entre X y las UTOs aún no conectadas al árbol.

Para seleccionar la siguiente UTO a ser adicionada al árbol, se deben primero establecer las diferencias entre cada una de las UTO y cada rama del árbol, a través de la ecuación (1). La distancia que sea menor indica a cual rama se debe unir la siguiente UTO, por medio de otra UTH. Para mayor detalle en los cálculos se recomienda ver Farris (1972).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas se calcularon para los 14 loci génicos por población muestreada, condensandose esta información en el Cuadro 5.

Los loci que mostraron una frecuencia alélica monomórfica o tendientes al monomorfismo en la mayoría de las poblaciones muestreadas son: GOT2, LAP1, LAP2, MNR2, PGM1, SKDH1 y SKDH2. En los otros 7 loci se observó un mayor polimorfismo entre y dentro de poblaciones. En el locus GOT2 todas las poblaciones muestreadas presentaron altas frecuencias (mayores a 0.92), en el alelo GOT2-1. Este locus presentó cuatro alelos, pero 3 de ellos con frecuencias menores al 5%, lo cual es insignificante. En el locus LAP1 se observaron 5 poblaciones monomórficas para el alelo 1, en tanto que en el locus LAP2 el alelo 1 presentó altas frecuencias alélicas mayores de 0.94 en todas las poblaciones muestreadas, excepto en la población 1. El locus MNR2 presentó una fijación del alelo MNR2-1. El locus PGM1 mostró altas frecuencias alélicas en el alelo PGM1-1, siendo este monomórfico en 5 de las poblaciones muestreadas. El locus SKDH1 tuvo alta frecuencia en el alelo SKDH1-1, con 9 poblaciones monomórficas para este alelo. El locus SKDH2, presentó alta frecuencia en el alelo SKDH2-1 (mayor de 0.94) en todas las poblaciones, siendo monomórfico en 10 de ellas.

En el locus ACO, con cuatro alelos, las poblaciones de Durango mostraron altas frecuencias en los alelos ACO-1, mientras que en las poblaciones del centro de México y de Oaxaca las altas frecuencias se presentaron en el alelo ACO-2 y ACO-3. En lo que respecta a las poblaciones del sur de México y Centroamérica las altas frecuencias se presentaron en el alelo ACO-3. Las dos poblaciones de *P. ayacahuite* var. *veitchii* tuvieron cuatro alelos, dos de ellos con mayores frecuencias, pero el alelo ACO4 fue único para estas dos poblaciones.

En el locus GOT1, las poblaciones de Durango presentaron altas frecuencias en el alelo GOT1-2, en tanto que todas las poblaciones restantes presentaron su mayor frecuencia en el alelo GOT1-1.

En el locus GOT3, las poblaciones de Durango muestran altas frecuencias en el alelo GOT3-2, a diferencia de las demás poblaciones que presentaron sus mayores frecuencias en el alelo GOT3-1, con excepción de la población 2 que presentó alta frecuencia en el alelo GOT3-2, al igual que las poblaciones de Durango.

El locus LAP3, presentó en las poblaciones de Durango altas frecuencias en el alelo LAP3-3, mientras que las demás poblaciones presentaron altas frecuencias en los alelos LAP3-1 y LAP3-2.

En el locus MNR1, las poblaciones de Durango tuvieron más altas frecuencias en el alelo MNR1-2, en comparación con las demás poblaciones muestreadas, en donde solamente las

poblaciones 1,2,3,4, y 8 tuvieron la presencia de éste alelo, pero en muy baja frecuencia.

En el locus MNR3, las poblaciones desde la 1 hasta la 10 presentaron altas frecuencias en el alelo MNR3-1, mientras que en las poblaciones de Durango se presentó el alelo monomórfico MNR3-3 que fue diferente al de las demás poblaciones muestreadas. Las poblaciones 1 y 2 del centro de la República Mexicana, del Eje Neovolcánico presentaron el alelo único MNR3-2.

En el locus 6PGI, las mayores frecuencias alélicas en las poblaciones de Durango, se presentaron en el alelo 6PGI-3, en tanto que en las demás poblaciones las mayores frecuencias alélicas se presentaron en el alelo 6PGI-1 y 6PGI-2.

Las poblaciones 1 y 2 presentaron alelos únicos en los locus ACO-4, MNR3-2 y presentaron alelos con alta frecuencia, tal como GOT3-2, PGM1-2.

De las poblaciones 5 a la 10 mostraron mayor número de alelos próximos a su fijación, además de presentar locus monomórficos en: GOT1-1, GOT2-1, GOT3-1, LAP1-1, LAP2-1, MNR1-1, MNR3-1, PGM1-1, SKDH1-1, SKDH2-1. Lo cual es indicador de que las poblaciones de Chiapas, Guatemala y Honduras tienen problemas para mantener alta diversidad genética. Esto puede deberse a que han sido cortados varios individuos de la especie típica, tal y como lo reporta CAMCORE en las descripciones de los sitios colectados. Así, al disminuir las poblaciones hay mayor efecto de fijación de alelos debido a la deriva genética. Por otra parte pueden haber problemas con la polinización cruzada al encontrarse pocos individuos en los sitios colectados ya que es muy posible que estén tan distantes que no sea posible que el

Cuadro 5. (Continuaci3n)

Locus	Alelo	POBLACIONES											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MNR1	(n)	25	25	9	26	26	30	14	40	39	30	21	29
	1	.88	.90	.94	.98	1.0	.98	1.0	.95	1.0	1.0	.76	.71
	2	.08	.10	.06	.02	.00	.00	.00	.05	.00	.00	.24	.28
	3	.04	.00	.00	.00	.00	.02	.00	.00	.00	.00	.00	.01
MNR2	(n)	25	25	9	26	25	30	14	40	39	30	21	29
	1	1.0	1.0	1.0	.86	.98	.93	.89	.75	1.0	1.0	1.0	1.0
	2	.00	.00	.00	.11	.00	.05	.11	.21	.00	.00	.00	.00
	3	.00	.00	.00	.03	.02	.02	.00	.04	.00	.00	.00	.00
MNR3	(n)	24	23	9	26	13	15	14	24	39	30	21	29
	1	.98	.93	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	.00	.00
	2	.02	.06	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
	3	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	1.0	1.0
PGM1	(n)	25	25	9	26	26	30	14	40	38	15	21	29
	1	.90	.60	1.0	.90	1.0	1.0	.96	.99	.97	1.0	1.0	.95
	2	.10	.40	.00	.10	.00	.00	.04	.00	.03	.00	.00	.03
	3	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.01	.00	.00	.00	.02
6PG1	(n)	25	25	9	26	26	30	14	40	39	30	21	29
	1	.32	.20	.61	.21	.06	.07	.07	.06	.00	.02	.14	.41
	2	.44	.46	.28	.63	.86	.87	.89	.91	.94	.80	.00	.07
	3	.24	.34	.11	.13	.08	.06	.04	.03	.06	.18	.86	.52
	4	.00	.00	.00	.02	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
SKDH1	(n)	25	16	7	24	18	7	14	35	39	30	21	29
	1	1.0	1.0	1.0	.96	1.0	1.0	.96	1.0	1.0	1.0	1.0	.90
	2	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.04	.00	.00	.00	.00	.10
	3	.00	.00	.00	.04	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
SKDH2	(n)	25	16	3	10	18	7	14	3	39	30	21	29
	1	.94	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	.98	1.0	1.0
	2	.06	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.02	.00	.00

NOTA: Poblaci3n 1 (Pob. 1) = San Juan Tetla, Puebla, M3x.; Pob. 2 = San Rafael, M3xico, M3x.; Pob. 3 = Nundaco, Oaxaca, M3x.; Pob. 4 = Ixtl3n, Oaxaca, M3x.; Pob. 5 = San Crist3bal de las Casas, Chiapas, M3x.; Pob. 6 = ElPorvenir, Chiapas, M3x.; Pob. 7 = Palestina, Guatemala; Pob. 8 = Chuipachec, Guatemala; Pob. 9 = Ocotepeque, Honduras; Pob. 10 = Las Trancas, Honduras; Pob. 11 = El progreso, Durango, M3x.; Pob. 12 = La Victoria, Durango, M3xico; n = tama1o de muestra.

polen pueda viajar de unos árboles a otros favoreciéndose la endogamia, además de que puede ser que se presente variabilidad en la fenología de la floración tanto masculina como femenina. Otro factor a considerar es la migración, la cual ha disminuido debido a que es difícil que se establezca la regeneración (según reporte de CAMCORE).

Las poblaciones 11 y 12 presentaron mayor semejanza la una con la otra en relación con las demás poblaciones, presentando alelos con alta frecuencia tal como ACO-1, GOT1-2, GOT2-4, GOT3-2, LAP3-3, y 6PGI-3. Además estas dos poblaciones presentaron el alelo MNR3-3 monomórfico. Así también presentaron el alelo LAP3-3 con alta frecuencia (mayor de .88).

La información sobre frecuencias alélicas para los 14 loci isoenzimáticos permitió diferenciar a las poblaciones como pertenecientes a taxa independientes, habiendo mayor semejanza de las poblaciones de *Pinus ayacahuite* típico y las de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* en comparación con las poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*.

4.2. Diversidad genética

El número de alelos promedio por locus de todas las poblaciones muestreadas varió de 1.3 a 2.5 correspondiendo estos valores extremos a las poblaciones de Ocotepaque, Honduras e Ixtlán, Oaxaca, México, respectivamente. El número de alelos promedio para todas las poblaciones muestreadas fue de 1.87. El promedio por taxa fue de 2.05 para las dos poblaciones de *P. ayacahuite* var. *veitchii*, 1.84 para las ocho

Cuadro 6. Medidas de variabilidad genética de las poblaciones de los tres taxa estudiados.

POBLACIONES	TMPPL	NPAL	PLP *	HETERO	PROM
				OBS	HDYWBG
taxa: <i>Pinus ayacahuite</i> típico					
Nundaco, Oax. Méx.(3)	8.4	1.8	64.3	.151	.190
Ixtlán, Oax., Méx.(4)	24.7	2.5	57.4	.193	.232
San Cristobal, de las Casas, Chis., Méx.(5)	23.7	1.6	28.6	.089	.115
El Porvenir, Chis., Méx.(6)	24.8	2.1	42.9	.110	.144
Palestina, Guat.(7)	14.0	1.6	28.6	.087	.105
Chui pachec, Guat.(8)	35.9	2.2	50.0	.109	.123
Ocotepeque, Hon.(9)	38.9	1.3	7.1	.022	.021
Las Trancas, Honduras(10)	28.9	1.6	21.4	.057	.055
Promedio		1.8	37.5	.102	.12
taxa: <i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>brachyptera</i>					
El Progreso Dgo., Méx.(11)	21.0	1.6	57.1	.119	.172
La Victoria, Dgo., Méx.(12)	28.9	2.0	57.1	.094	.167
Promedio		1.8	57.1	.106	.17
taxa: <i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>					
San Juan Tetla, Pue., Méx.(1)	24.9	2.2	64.3	.213	.255
San Rafael, Méx.(2)	23.6	1.9	64.3	.349	.261
Promedio		2.0	64.3	.281	.26

Nota: * Los loci fueron considerados polimórficos si la frecuencia del alelo más común no excedía 0.95; TMPPL = Tamaño de muestra promedio por locus; NPAL = Número promedio de alelos por locus; PLP= Porcentaje de loci polimórficos; HETERO PROM = Heterocigosidad promedio; OBS = observada; HDYWBG = Estimación insesgada de la heterocigosidad (Nei, 1978), de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg; (1)-(12) = Número de procedencia (ver Cuadro 1).

poblaciones de *P. ayacahuite* típico y de 1.8 para las dos poblaciones de *P. ayacahuite* var. *brachyptera*.

Los valores encontrados en este estudio estuvieron ligeramente abajo de 2.7 que es el valor promedio reportado por Hamrick et al. (1981) para Gimnospermas. Pero entran dentro del rango encontrado por el mismo autor de 1.0 a 3.87, que corresponde respectivamente a *Pinus resinosa* y *Pinus taeda*.

El polimorfismo en las 12 poblaciones muestradas varió de 7.1% (Ocotepeque, Honduras) a 64.3% (San Juan Tetla, Pue., San Rafael, Méx. y Nundaco, Oaxaca).

En el caso de *Pinus ayacahuite* típico, las poblaciones de Nundaco e Ixtlán, Oaxaca, México; Chuipachec, Guatemala y El Porvenir, Chis., Méx. presentaron los valores más altos de polimorfismo con valores de 64.3%, 57.4%, 50.0% y 42.9%.

Las poblaciones que presentaron los porcentajes más bajos de polimorfismo fueron las poblaciones de Ocotepeque, Honduras (7.1%) y Las Trancas, Honduras (21.4%). Esto indica que estas poblaciones tienen bajos niveles de diversidad genética, lo cual puede deberse a que se han cortado varios genotipos aumentando la endogamia y los efectos de fijación de alelos via deriva genética, como se discutió anteriormente en relación con las frecuencias alélicas. También es posible que estas poblaciones, por estar en el extremo marginal de la especie típica, presenten aislamiento y restricciones del flujo genético. Además las poblaciones marginales como lo indica Ledig (1986) sufren los efectos de pocos individuos fundadores. Aunque es posible que las tres causas esten actuando para dar como resultado baja diversidad genética.

Considerando el porcentaje de polimorfismo promedio, las poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* tuvieron mayores porcentajes de polimorfismo (64.3%), continuando en orden descendente las poblaciones de *P. ayacahuite* var. *brachyptera* (57.1%) y finalmente el *P. ayacahuite* típico (37.5%). En el caso de las dos variedades debe considerarse que solamente se muestrearon dos poblaciones, las cuales pueden haber sido las más variables, lo cual está alterando la información. En el caso de *P. ayacahuite* típico se muestrearon varias poblaciones, pero puede ser que debido a que las poblaciones naturales han sido degradadas, esto está causando que sus valores de diversidad genética sean menores.

Ledig (1986) reportó una tabla de trabajos isoenzimáticos en pinos, en donde el porcentaje de polimorfismo promedio (con el criterio de 95%) fue de 53%, con valores extremos de 0% para el *Pinus resinosa* y 90% para el *Pinus taeda*. En este estudio, los valores promedio de polimorfismo tanto para la variedad *veitchii* (64.3%) como para la variedad *brachyptera* (57.1%) están por arriba del valor promedio reportado por Ledig (1986) de 53%, lo cual indica que tienen alta variabilidad. Esta alta diversidad genética puede deberse a que estas poblaciones no han sido fuertemente impactadas por el hombre presentando polinización cruzada y flujo genético entre sus poblaciones naturales.

El hecho de que la variedad *brachyptera* presentó menores valores de polimorfismo en relación con la variedad *veitchii* puede deberse a que el ambiente donde crece naturalmente la variedad *brachyptera* tiene climas más fríos, con más variación en

las temperaturas (-23 °C a 40 °C) por lo cual el efecto de la selección natural es más marcado.

En el caso del porcentaje de polimorfismo promedio del *Pinus ayacahuite* típico (37.5%) está por debajo del porcentaje de polimorfismo promedio reportado por Ledig (1986) de 53%. Esto indica que la especie típica tiene bajos niveles de variabilidad genética. No obstante, considerando las poblaciones de Nundaco e Ixtlán, Oaxaca, Méx., presentaron valores altos de polimorfismo arriba del promedio reportado por Ledig (1986). Esto puede deberse a que las poblaciones de Oaxaca han sido menos impactadas por el hombre y es más abundante el número de individuos de la especie típica (como lo reporta CAMCORE en su registro de características del sitio). Otras dos poblaciones con altos valores de polimorfismo son las de El Porvenir, Chis., Méx. (42.9%) y Chuipachec, Guatemala (50.0%), las cuales aunque han sido perturbadas por el hombre por medio de cortas, continúan manteniendo su diversidad genética via polinización cruzada, flujo genético, además que el efecto de la deriva genética de fijación de alelos no ha sido muy pronunciado.

En lo que respecta a la heterocigosidad (H), o sea, la frecuencia promedio de individuos heterocigóticos por locus (Ayala y Kiger, 1984), se encontró una variación de 0.022 a 0.26, valores que corresponden a las poblaciones Ocotepeque, Honduras y San Rafael, México, respectivamente, con un valor promedio para todas las poblaciones muestreadas de 0.13. Las dos poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* tuvieron un valor *Pinus ayacahuite* típico presentaron un valor de heterocigosidad promedio de 0.12, así también las dos poblaciones de

Pinus ayacahuite var. *brachyptera* presentaron un valor de heterocigosidad esperada promedio de 0.17. En si, los valores de Heterocigosidad esperada promedio tuvieron un comportamiento similar a los valores de polimorfismo, en donde la variedad *veitchii* presentó el valor más alto, continuando en orden descendente la variedad *brachyptera* y finalmente la especie típica. Es importante considerar que las poblaciones muestreadas de las variedades *veitchii* y *brachyptera* fueron solamente dos, por lo cual estos resultados deben considerarse con sus respectivas precauciones, dado que, tal vez las poblaciones consideradas en este estudio pudieron ser las más variables.

Dentro de la especie típica las poblaciones de Ixtlán, Oax., Nundaco, Oax., El Porvenir, Chis. y Chiupachec, Guat. presentaron los niveles más altos de variabilidad con una Heterocigosidad promedio esperada de 0.23, 0.19, 0.14 y 0.12 respectivamente. En tanto que las poblaciones de Ocotepeque y Las Trancas, Honduras fueron las que presentaron los valores más bajos de Heterocigosidad esperada promedio, con valores de 0.021 y 0.045, lo cual indica que hay problemas de baja diversidad genética de igual forma como lo indicó el porcentaje de polimorfismo. Esta baja diversidad genética se debe posiblemente a: a) la destrucción o degradación de las poblaciones; b) lo restringido del flujo genético o c) al reducido número de individuos fundadores debido a que son poblaciones situadas en el extremo de la distribución natural.

La heterocigosidad promedio registrada por Mitton (1983) para las coníferas fue 0.270 valor que es parecido al máximo encontrado en este estudio (0.26). En el escrito de Ledig (1986)

en base a 37 investigaciones de isoenzimas en pinos, se obtuvo una heterocigosidad esperada promedio de 0.173, con un rango de 0 a 0.362 que corresponden a *Pinus torreyana* y *Pinus taeda*. Así considerando el escrito de Ledig (1986), los valores encontrados en este estudio se ubican dentro del rango definido para el género *Pinus* y el valor promedio es muy cercano al valor promedio reportado por el último autor.

Los valores de heterocigosidad esperada promedio para *Pinus ayacahuite* típico tendieron a disminuir del Centro de la República Mexicana hacia Centroamérica. De tal forma, que los mayores valores se encontraron en las poblaciones de Ixtlán (0.232) y Nundaco (0.19), Oaxaca, México y los menores valores se encontraron en Ocoatepeque (0.021) y Las trancas (0.055), Honduras. Estos valores de baja heterocigosidad (ver Cuadro 5), se encuentran en el extremo de la distribución de la especie y como indica Ledig (1986), la baja heterocigosidad se debe al aislamiento y a lo restringido del flujo genético en las poblaciones marginales que deben su origen a eventos de colonización y sufren los efectos de pocos individuos fundadores. Esta misma tendencia de decremento de la variabilidad genética en los márgenes de la distribución se presentó en *Pinus contorta* spp *latifolia* (Yeh y Layton, 1979). Además, otras causas de la baja Heterocigosidad puede ser que las poblaciones fueron fuertemente degradadas por cortas, lo que ha acentuado el efecto negativo de la deriva genética y la endogamia.

Además, se encontraron poblaciones que a latitudes semejantes a otras, tuvieron mayores valores de heterocigosidad, tal es el caso de las poblaciones de El Porvenir, Chis.,

México (0.144), Chuipachec, Guatemala (0.123), lo cual indica lugares regionales de mayor variabilidad genética.

La prueba de χ^2 mostró que los valores observados en todas las poblaciones son similares (no estadísticamente diferentes) a los valores esperados por la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg por lo tanto las poblaciones se encuentran en equilibrio genético con frecuencias genotípicas esperadas con polinización aleatoria y sobrevivencia aleatoria dentro de cada población. Sin embargo, en la mayoría de los casos los valores observados de Heterocigosidad fueron numericamente menores a los valores esperados, lo cual indica que hay una tendencia hacia la reducción de la variabilidad genética y un aumento de la endogamia en la mayoría de las poblaciones muestreadas.

4.3 Distancias genéticas

Con la matriz de distancias genéticas (arco 2 θ/π de Cavalli-Sforza y Edwards (1967)), (Cuadro 7) para todas las combinaciones de las poblaciones, se construyó un fenograma de agrupamiento (Figura 7).

Primeramente las poblaciones con las distancias genéticas más pequeñas o sea las poblaciones más parecidas se colocaron en la misma rama, así la población 1 con la 2, la población 3 con la 4, la población 5 con la 6, la población 9 con la 10, la población 7 con la 8 y la población 11 con la 12. Las frecuencias de cada par de poblaciones fueron promediadas y se generó una nueva matriz con valores de distancias genéticas. Las poblaciones con las menores distancias fueron agregadas a la rama apropiada. Este proceso con promedio de pares de grupos no

Cuadro 7. Distancias arco de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) calculadas para todas las combinaciones entre poblaciones de *Pinus ayacahuite* típico y sus variedades *brachyptera* y *veitchii*. Las distancias pareadas están bajo la diagonal y las medias por grupo de comparación están arriba.

ESPECIES/POBLACIONES	POBLACIONES MUESTREADAS												
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	
<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>													
San Juan Tetla, Pue., Méx. (1)	—											.453	
San Rafael, Méx., Méx. (2)	.13	—											
<i>Pinus ayacahuite</i> típico													
Nundaco, Oax., Méx. (3)	.18	.24	—										.530
Ixtlán, Oax., Méx. (4)	.19	.20	.18	—									
San Cristobal de las Casas, Chis., Méx. (5)	.22	.26	.20	.17	—								
El Porvenir, Chis., Méx. (6)	.22	.27	.19	.19	.13	—							
Palestina, Quetzal, Guat. (7)	.24	.27	.23	.20	.17	.19	—						
Chuipachec, Totoni., Guat. (8)	.22	.27	.21	.21	.16	.16	.15	—					
Ocotepec, Ocot., Hond. (9)	.29	.33	.26	.28	.16	.17	.20	.17	—				
Las Trancas, La Paz, Hond. (10)	.25	.31	.22	.25	.14	.15	.17	.16	.08	—			
<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>brachyptera</i>													
El Progreso, Dgo., Méx. (11)	.46	.45	.49	.49	.52	.54	.56	.54	.60	.57	—		
La Victoria, Dgo., Méx. (12)	.45	.45	.47	.49	.52	.53	.52	.50	.57	.56	.21 —		

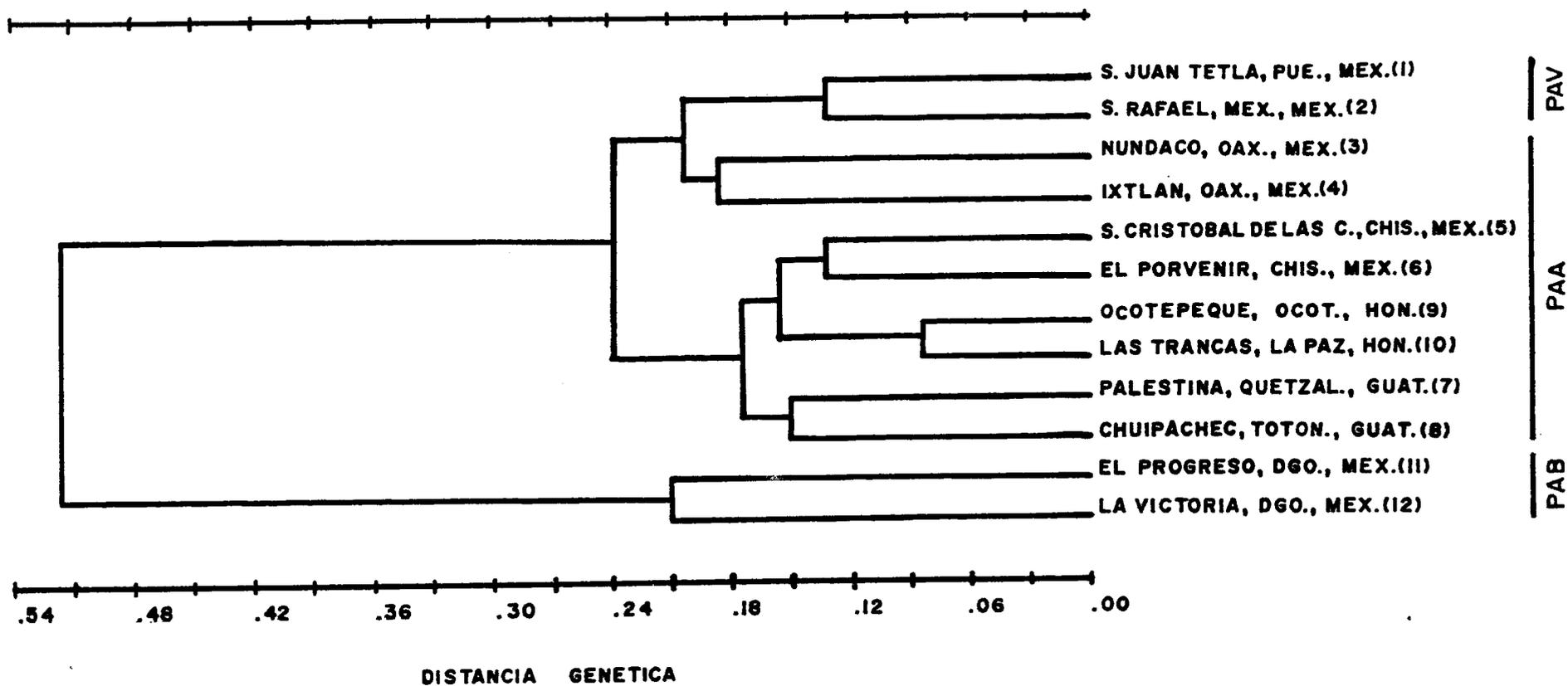


Figura 7. Fenograma de las poblaciones de *Pinus ayacahuite*, desarrollado usando la técnica de ligamiento promedio (UPGMA) con las distancias arco de Cavalli-Sforza y Edwards (1967). PAV=*Pinus ayacahuite* var. *veitchii*; PAA=*Pinus ayacahuite* típico y PAB=*Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*.

ponderados o técnica de ligamiento promedio, se continuó hasta que todas las ramas se unieron.

La población 1 y 2 (de *P. ayacahuite* var. *veitchii*) y las poblaciones 3 y 4 (de *Pinus ayacahuite* típico) formaron un primer grupo con un nivel de agrupamiento de 0.204. Es importante hacer notar, que la población 1 y 2 fueron muy parecidas, formando un grupo con un nivel de agrupamiento de 0.129 y las poblaciones 3 y 4 formaron un grupo con nivel de agrupamiento de 0.184, por lo tanto, son más semejantes genéticamente las poblaciones de *P. ayacahuite* var. *veitchii*. Este primer grupo indica que las poblaciones 3 y 4 tienen características genéticas intermedias entre la especie típica y la variedad *veitchii*, representando tal vez la transición entre ambos taxa. Esto se puede ver en las frecuencias alélicas semejantes que presentan estas poblaciones en los alelos ACO-2, GOT3-1, GOT3-2, LAP2-2, MNR1-2, 6PGI-1, 6PGI-2 y 6PGI-3. Además de tener los valores más altos de heterocigosidad observada como esperada de todas las poblaciones muestreadas en este estudio.

Un segundo grupo con las poblaciones 5,6,7,8,9 y 10 fueron genéticamente semejantes asociándose con la localización geográfica, puesto que todas estas poblaciones se encuentran en Chiapas, Guatemala y Honduras. Este grupo formó tres subagrupamientos que se unieron geográficamente, así se unieron las poblaciones 5 y 6 de Chiapas, México (nivel de agrupamiento 0.133), las poblaciones 9 y 10 de Honduras (nivel de agrupamiento 0.085) y las poblaciones 7 y 8 de Guatemala (nivel de agrupamiento 0.148). Los bajos valores de las distancias genéticas entre estas poblaciones muestreadas se apoyan en las

frecuencias alélicas de estas poblaciones, que se caracterizaron por presentar varios locus monomórficos o tendientes a ser monomórficos como es el caso de: GOT1, GOT2, LAP1, MNR1, MNR3, PGMI, SKDH1, y SKDH2. Además, la semejanza genética que presentaron las poblaciones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 puede deberse a que estas poblaciones están adaptadas a crecer en las partes altas o zonas montañosas de lugares con clima tropical y subtropical. Además estas poblaciones se encuentran en las Sierras del sureste de México que se continúan con las Sierras de Centroamérica por lo que puede o pudo haber en el pasado un flujo genético entre estas poblaciones.

Una hipótesis para explicar la similaridad genética de las poblaciones de *P. ayacahuite* de Chiapas y Centroamérica es que en el pasado durante el pleistoceno, época en que el género *Pinus* dominaba en muchos segmentos del perfil de vegetación de México, o sea que existía una gran abundancia de plantas pertenecientes a este género (Rzedowski et al., 1977), las poblaciones de *P. ayacahuite* estuvieron más ampliamente distribuidas por lo que podían considerarse como un continuo en el cual había un flujo genético. Esta hipótesis también se respalda por Daubenmire (1978) quien sostiene que en la época del Pleistoceno durante las glaciaciones, al darse un enfriamiento global que llegó a las montañas de México y la región tropical, las coníferas se desplazaron hacia el sur hasta el Golfo de México. Fue entonces cuando los pinos se expandieron hacia Centroamérica (Mirov, 1967; Mirov y Hasbrouck, 1976). Al elevarse la temperatura en la Época del Holoceno, las poblaciones que se encontraban en lugares

tropicales fueron subiendo hacia altitudes mayores (Daubenmire, 1978), razón por la cual en la actualidad solamente se encuentran poblaciones de *P. ayacahuite* en las partes altas de las montañas, en donde han quedado aisladas formando poblaciones con diferentes líneas de divergencias tanto en Chiapas, Guatemala y Honduras (Figura 7). Así, una explicación de porque las poblaciones de Chiapas y Honduras tuvieron menor distancia genética en relación a la distancia genética con las poblaciones de Guatemala puede ser que en el Holoceno las poblaciones de Guatemala se aislaron primero de las poblaciones de Chiapas y Honduras que formaban una gran población en la cual se presentó un mayor flujo genético entre sus poblaciones. Aunque la mayor semejanza de las poblaciones de Chiapas y Honduras puede deberse solamente a que los ambientes de Chiapas y Honduras son más parecidos.

Un tercer grupo lo constituyeron las poblaciones 11 y 12 de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* del norte de la República Mexicana que se unieron con un nivel de agrupamiento de 0.213. Este grupo presentó las distancias genéticas más grandes con las demás poblaciones muestreadas (ver Cuadro 7 y Figura 7). Estas dos poblaciones presentaron frecuencias alélicas más altas en diferentes alelos en relación con las demás poblaciones muestreadas. Los locus en que se observó lo anterior fueron: ACO, GOT1, GOT3, LAP3, y 6PGI1; además, presentaron el alelo único MNR3-3.

Es importante hacer notar que las poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* fueron mas semejantes genéticamente a las poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* (ver Cuadro 7),

lo cual apoya la idea de Martínez (1948) que la variedad *veitchii* parecía intermedia entre el *P. ayacahuite* var. *brachyptera* y el *P. ayacahuite* típico.

En general las asociaciones genéticas aproximadamente correspondieron a las asociaciones geográficas. Las poblaciones 1 y 2 del centro de la República Mexicana formaron un grupo con dos poblaciones de Oaxaca, las cuales fueron más cercanas geográficamente que las demás poblaciones muestreadas. Las poblaciones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de Chiapas, Guatemala y Honduras formaron otro grupo y cada subgrupo también se asoció geográficamente dado que se unieron las poblaciones 5 y 6 de Chiapas, México, la 9 y la 10 de Honduras y la 7 y 8 de Guatemala. Las poblaciones 11 y 12 de Durango, México formaron un grupo semejante genéticamente, ubicado geográficamente en la parte norte de la República Mexicana.

4.4. Relaciones filogenéticas

Las distancias arco de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) fueron usadas en conjunción con la distancia del procedimiento Wagner (Farris, 1972) para estimar las relaciones filogenéticas. El árbol filogenético resultante se construyó usando análisis multivariado para proyectar un ancestro hipotético con características genéticas que pudieran explicar la variación entre los taxa de este estudio. El punto medio de la distancia algebraica más larga entre los taxa fue usado como la raíz del árbol filogenético; la raíz se puede considerar como un taxón hipotético teniendo las características genéticas de un progenitor. Las unidades taxonómicas operacionales con

distancias genéticas que estuvieron cercanas a la raíz, fueron unidas al primer árbol y aquellas más distantes se agregaron después (Niebling y Conkle, 1987).

La primera subdivisión del árbol filogenético (Figura 8), formó dos ramas. La rama más baja representó a la especie *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* y la rama de arriba incluyó, tanto a la especie *Pinus ayacahuite* típico como al *Pinus ayacahuite* var. *veitchii*.

La rama que incluyó al *P. ayacahuite* var. *brachyptera* presentó una ruta genética larga, lo cual presume que las poblaciones de La Victoria y Laguna del Progreso, Dgo., México, tuvieron una evolución substancial a partir de la raíz y dió la tendencia de divergencia de norte a sur, en base a las dos poblaciones muestreadas de esta especie. Pero faltó incluir en el muestreo, poblaciones de otras áreas de distribución natural para tener más claridad en lo que respecta a la irradiación o diversificación de este complejo taxonómico.

Una subdivisión de la rama superior colocó en diferentes subramas tanto a la especie *P. ayacahuite* var. *veitchii* como a la especie *P. ayacahuite* típico. Estas dos subramas tienen rutas genéticas cortas a partir de la raíz, lo cual supone que estas especies tienen alto parecido al progenitor común de ellas. Estos resultados no concuerdan con la hipótesis de que el *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* es el más parecido al ancestro común de los tres taxa, puesto que se cree que los pinos entraron a México procedentes de Norteamérica a través de la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre Oriental a inicios y mediados del periodo terciario (Mirov, 1967; Mirov y Hasbrouck, 1976).

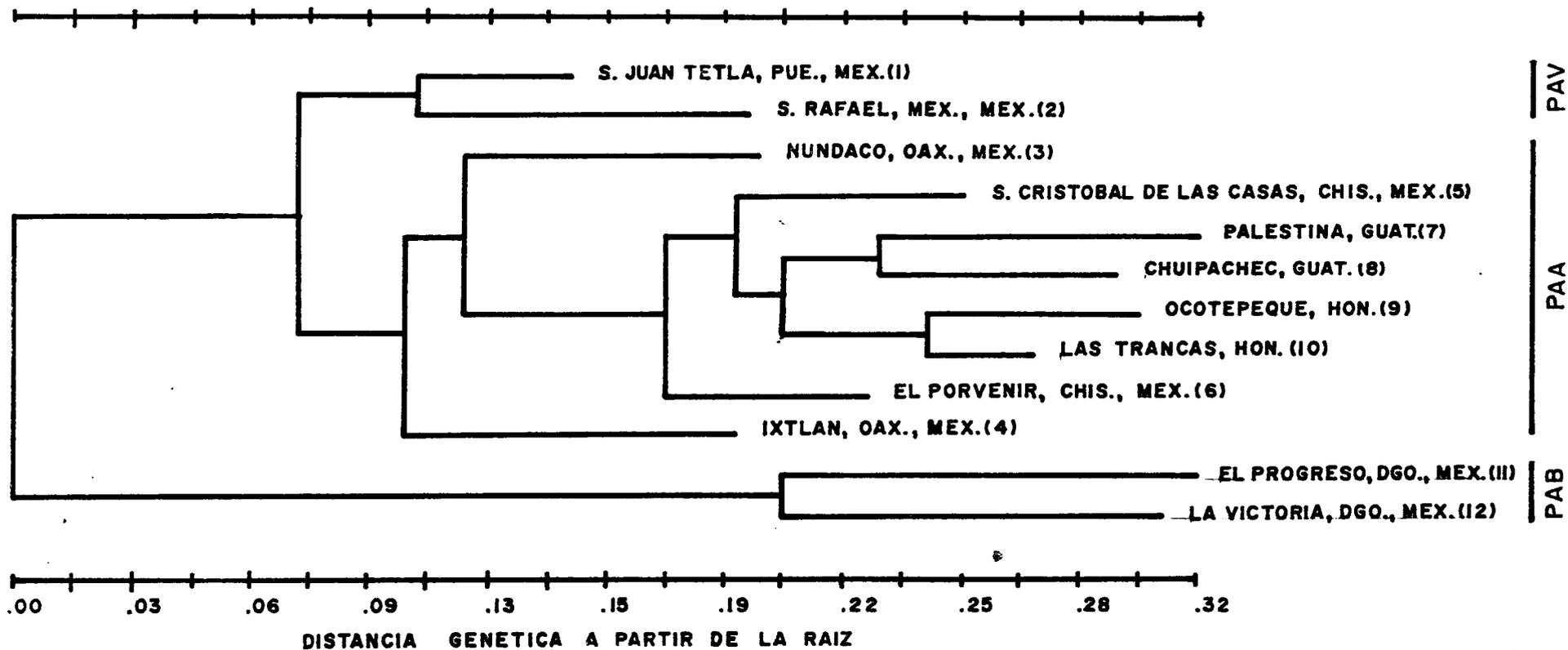


Figura 8. Arbol filogenético de las poblaciones de Pinus ayacahuite desarrollado usando la distancia promedio de Wagner (Farris, 1972) con la distancia arco de Cavalli-Sforza y Edwards (1967). PAA=Pinus ayacahuite típico; PAV=Pinus ayacahuite var. veitchii; PAB=Pinus ayacahuite var brachyptera.

Además, a nivel de la semilla, se considera que semillas sin ala es una característica menos evolucionada en relación a la semilla con ala bien desarrollada (Eguiluz, 1985b). Por lo tanto el *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* se considera más primitivo que la variedad *veitchii* y la especie típica, la cual debería ser menos parecida al ancestro común de los tres taxa, debido a que su semilla es la que tiene el ala más desarrollada.

Por otra parte, se considera que el ancestro del *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* es el *Pinus strobiformis* de las Montañas Rocallosas de los Estados Unidos de Norteamérica (Eguiluz, comunicación personal), de tal forma que es recomendable incluir en este tipo de estudios muestras de la especie *Pinus strobiformis* para analizar con mayor profundidad las relaciones filogenéticas de todos estos taxa.

Dentro de la subrama de *P. ayacahuite* típico, la siguiente subdivisión de divergencia se dió hacia la población de Ixtlán, Oaxaca, México. La subsecuente línea de divergencia fue hacia la población de Nundaco, Oax., Méx., cuyo progenitor hipotético dió también origen al progenitor hipotético de las poblaciones de El Porvenir, Chis., Méx. por una parte y por otra parte a otro ancestro hipotético de las población de San Cristobal de las Casas, Chis., México. Por último, el ancestro de la población de San Cristobal de las Casas, Chis., Méx., dió origen a otro progenitor hipotético que se diversificó hacia Centroamérica, Primero hacia la población de Chuipachec, Guatemala, terminando en la población de Palestina, Guatemala y después por otra parte hacia las poblaciones de las trancas, Honduras, terminando en la

población de Ocotepeque, Honduras. Lo anterior ,mostró que el *Pinus ayacahuite* típico se irradió o se diversificó en forma clinal de norte a sur, siguiendo la ruta de Oaxaca, Chiapas, Guatemala y Honduras. No obstante, las distancias genéticas fueron menores entre las poblaciones de Chiapas y Honduras. Esta ruta de diversificación de la especie típica concuerda con la apreciación de Little (1962) en la cual discutió que la actual distribución del género *Pinus* en México indica la migración hacia el sur, desde las zonas templadas hacia los trópicos.

Se encontró a partir de los datos isoenzimáticos de este estudio, que el *Pinus ayacahuite* var. *veitchii*, está en un linaje relacionado a *Pinus ayacahuite* típico y está claramente distante del *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*. Este resultado se funda en que la var. *brachyptera* tiene diferentes frecuencias alélicas en comparación con la especie típica y la var. *veitchii*, tal como lo indicó el análisis de frecuencias alélicas. Además que las distancias genéticas que separan al *Pinus ayacahuite* típico del *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* fue aproximadamente dos veces la distancia que separa a *P. ayacahuite* típico de *P. ayacahuite* var. *veitchii* (Cuadro 7).

Los datos isoenzimáticos respaldan la hipótesis que el *Pinus ayacahuite* típico tiene parecido genético cercano al *Pinus ayacahuite* var. *veitchii*, especialmente con las poblaciones de Ixtlán y Nundaco Oaxaca, México.

Nei en 1976 (citado por Niebling y Conkle, 1987) presentó una escala generalizada de distancias genéticas basadas sobre datos electroforéticos de varios estudios y reportó que las especies son caracterizadas por distancias desde 0.1 a 1.0;

las subespecies y variedades por distancias de 0.02 a 0.2 y las razas por distancias de 0.01 a 0.05 . Con base en este estudio, se encontró que la distancia genética entre *Pinus ayacahuite* típico y *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* fue de 0.249, por lo cual es aceptable seguir considerando este taxón como variedad. En relación al *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* se encontraron distancias genéticas de 0.453 y 0.530 con *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* y *Pinus ayacahuite* típico, respectivamente. Por lo tanto esta variedad debería elevarse a nivel de especie, y tal vez sería conveniente llamarla *Pinus brachyptera*. No obstante, debido a que las poblaciones muestreadas de la var. *brachyptera* solamente fueron dos, es recomendable seguir utilizando el nombre de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* hasta que se realice un muestreo más completo para tener mayor claridad del nivel taxonómico de este taxón.

Según Daubenmire (1978), y Humphries y Pareti (1986) una suposición que guía a localizar el "centro geográfico de origen" es el área en donde se encuentra la forma más primitiva o el área en la cual el grupo de organismos despliega la mayor diversidad. Considerando lo anterior, el "centro geográfico de origen" del *Pinus ayacahuite* típico se supone localizado en el Sistema Montañoso del norte de Oaxaca, México. En el caso de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* y *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* es difícil definir el "centro geográfico de origen" debido a lo reducido de las poblaciones muestreadas y especialmente porque las muestras fueron tomadas sobre los mismos Sistemas Montañosos. En el caso de las muestras de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*, ambas fueron de la Sierra Madre

Occidental del estado de Durango, y en el caso de las muestras de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* ambas fueron de la parte central del Eje Neovolcánico. Por lo tanto, para definir el "centro geográfico de origen" con más precisión, se recomienda incluir muestras de los diferentes Sistemas montañosos en los cuales crecen naturalmente estos taxa.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

a) Las frecuencias alélicas de los 14 loci isoenzimáticos diferenciaron los taxa como independientes, habiendo mayor semejanza de las poblaciones de *Pinus ayacahuite* típico y las de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* en comparación con las de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*.

b) Las mediciones de diversidad genética indicaron que los tres taxa estudiados tuvieron niveles de variación de media a alta, siendo las poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* las más variables.

c) En general para *Pinus ayacahuite* típico los valores de heterocigosidad esperada promedio tendieron a disminuir de norte a sur, desde Oaxaca hasta Honduras.

d) Las poblaciones de los tres taxa de este estudio se encuentran en equilibrio genético, de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg para los loci considerados, por lo que las poblaciones se encuentran en equilibrio genético, con frecuencias genotípicas esperadas con polinización aleatoria y sobrevivencia aleatoria dentro de cada población.

e) Las poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* fueron más semejantes genéticamente a las poblaciones de *Pinus ayacahuite* típico y estos dos taxa fueron genéticamente diferentes a las poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*. Además, las poblaciones de Ixtlán y Nundaco, Oaxaca, Méx. fueron intermedias genéticamente y aparentemente son la

transición entre el *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* y la especie típica *Pinus ayacahuite*.

f) Los agrupamientos genéticos correspondieron aproximadamente a los agrupamientos geográficos, formándose tres grupos geográficos bien marcados: 1) el primer grupo incluyendo las dos poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* y las poblaciones de Ixtlán y Nundaco, Oax., Méx.; 2) el segundo grupo incluyó las seis poblaciones de *Pinus ayacahuite* típico de Chiapas, Guatemala y Honduras; 3) el tercer grupo más distante genéticamente lo formaron las dos poblaciones de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* de Durango, Méx.

g) Filogenéticamente el *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* está en un linaje relacionado a *Pinus ayacahuite* típico y está claramente distante del *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*.

h) El *Pinus ayacahuite* típico se irradió o se diversificó durante el pleistoceno de norte a sur, con la ruta de diversificación de Oaxaca, Chiapas, Guatemala y Honduras.

i) El "centro geográfico de origen" del *Pinus ayacahuite* típico, tomando en cuenta el lugar donde se encontró la forma más primitiva y su mayor variabilidad, fue el Sistema Montañoso del norte de Oaxaca.

j) Para realizar los programas de mejoramiento genético y conservación de estos taxa, se recomiendan incluir las siguientes poblaciones, debido a que presentaron niveles altos de variación dentro de los taxa y dentro de los grupos genéticos formados por el fenograma de distancias genéticas: las poblaciones de *P. ayacahuite* var. *veitchii* de San Rafael, Méx., Méx.. Las poblaciones de *P. ayacahuite* típico de Ixtlán y Nundaco,

Oax., Méx.; El Porvenir, Chis., Méx.; Chuipachec, Totonicapan, Guat.; y en Honduras la población de Las Trancas, La Paz. Aunque para conservación de este último taxa es importante considerar las poblaciones de Palestina, Guat.; San Cristobal de las Casas, Chis., Méx. que no obstante que presentan baja heterocigosidad tienen alelos con alta frecuencia en relación con otras poblaciones con latitudes semejantes. Finalmente en el caso de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* se recomienda trabajar con la población de El progreso, Durango, Méx.

k) Se recomienda estudiar la estructura genética y las relaciones filogenéticas en toda el área de distribución faltante de los taxa de este estudio, especialmente las poblaciones de los estados de Guerrero y Jalisco que se encuentran en las conecciones de los Sistemas Montañosos de la Sierra Madre Occidental, La Sierra Madre del Sur y el Eje Neovolcánico. Esto permitiría tener mayor claridad de la variación y evolución de los taxa *P. ayacahuite* var. *veitchii* y *P. ayacahuite* típico. También es importante considerar en el muestreo, las poblaciones simpátricas de la especie típica y la variedad *veitchii* para analizar sus relaciones filogenéticas con mayor profundidad. En relación al taxa *P. ayacahuite* var. *brachyptera* se recomienda muestrear las poblaciones de los estados de Jalisco, Zacatecas, Chihuahua, Sonora, Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas y San Luis Potosí para ubicar con mayor precisión a este grupo taxonómico.

6. LITERATURA CITADA

- ADAMS, W.T. 1981. Applying isozyme analysis in tree breeding programs. In M. T. Conkle (Technical coordinator), Proc. Symp. isozymes North Am. Forest trees and Forest Insects, 27 de julio de 1979 Berkeley, CA. USDA. For. Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48. pp. 60-64.
- ADAMS, W.T. 1983. Application of isozymes in tree breeding. In Tanksley S.D. y T.J. Orton, eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Amsterdam. Elsevier Science Publishers Publishers. pp. 381-400.
- ANDRESEN, J.W. 1964. The taxonomic status of *Pinus chiapensis*. Phytologia 10(6):417-421.
- ANDREWS, A.T. 1986. Electrophoresis; theory, techniques, and biochemical and clinical applications. 2a. ed. Oxford. Clarendon press. 452 p.
- AYALA, F.J. y J.D. KIGER, Jr. 1984. Genética moderna. México. Fondo Educativo Interamericano. pp. 597-656.
- BADUI, D.S. 1984. Química de alimentos. México. Alhambra Universidad. pp. 205- 240.
- BREWER, G.J. y CH. F. SING. 1970. An introduction to isozyme techniques. New York. Academic Press. 185 p.
- BROWN, A.H.D. y MORAN, G.F. 1981. Isozymes and genetic resources of forest trees. In M.T. Conkle (Technical coordinator), Proc. Symp. isozymes North. Am. Forest trees and Forest Insects, Berkeley, CA. USDA. Forest Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48. pp. 1-10
- CARVAJAL, M.T. 1986. Notas sobre la flora fanerogámica de Nueva Galicia, III. Phytologia. 59 (2): 127-147.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. y A.W.F. EDWARDS. 1967. Phylogenetic analysis models and estimation procedures. American Journal of Human Genetics. 19(3):233-257.
- CONKLE, M.T. 1972. Analyzing genetic diversity in conifers. isozyme resolution by starch gel electrophoresis. USDA. For. Serv. Research note. PSW-264. 5 p.
- CONKLE, M.T. 1974a. Enzyme polymorphism in forest trees. In Reid C.P. y P. fechner (eds.). Proceedings of the third North American Forest Biology Workshop, Colorado State University. pp. 95-105.
- CONKLE, M.T. 1974b. Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine aminopeptidase isozymes in Knobcone Pine. Forest Science. 17(2): 190-194.

- CONKLE, M.T. 1987. Electrophoretic analysis of variation in native Monterey Cypress (*Cupressus macrocarpa* Hartw.). In Thomas S. Elias (ed.). Conservation and Management of rare and endangered plants. Proc. of a conference held 5-8 Nov., 1986. Sacramento, CA. CA Native Plant. Soc., pp. 249-256.
- CONKLE, M.T.; P. D. HODGSKISS; L. B. NUNNALLY y S.C. HUNTER. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a Laboratory Manual. Berkeley, CA. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service. General Technical Report PSW-64. 18 p.
- CRISCI J.V. y M.F. LOPEZ A. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa regional de desarrollo Científico y tecnológico. pp. 40-60.
- CRITCHFIELD, W.B. y E.L. LITTLE, Jr. 1966. Geographic distribution of the pines of the world. Washington. Forest Service. pp. 5-7.
- CHELIAK, W.M. y J.A. PITEL. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Institute. Information report PI-X-42. 49 p.
- DAUVENMIRE, R. 1978. Plant geography; with special reference to North America. New York. Academic Press. pp. 90-100.
- DIXON, M. y E.C. WEBB. 1964. Enzimes. 2a. ed. Great Britain, London. Longmans. 950 p.
- DUNCAN, T. y T.F. STUESSY. 1984. Cladistics: perspectives on the reconstruction of evolutionary History. New York. Columbia University Press. pp. 3-118.
- DVORAK, W.S. y T. EGUILUZ P. 1985. Gene conservation species in Central America and México: what is being done? "El estado actual de la Genética y del Mejoramiento Genético Forestal". Reunión internacional Satélite al IX Congreso Forestal Mundial. Comisión Forestal de América del Norte. S.A.R.H., F.A.O. pp. 82-87.
- EGUILUZ P., T. 1977. Los pinos del mundo. Chapingo, México. Escuela Nacional de Agricultura. Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Bosques. Publicación especial No. 1. 30 p.
- EGUILUZ P., T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos del género Pinus en México. Chapingo, Mex. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Bosques. pp. 88-113.

- EGUILUZ P.T. 1984. Variación natural en morfología y propiedades de la madera de los pinos mexicanos. En XIV reunión del grupo de mejoramiento genético forestal de la Comisión Forestal de América del Norte. México F.A.O. - S.A.R.H. pp.135-143.
- EGUILUZ P., T. 1985a. Descripción botánica de los pinos mexicanos. Chapingo, México. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. SARH, FAO. pp. 2-4
- EGUILUZ P., T. 1985b. Origen y evolución del género *Pinus* (con referencia a los pinos mexicanos). México. Dasonomía mexicana 3 (6): 5-31.
- EGUILUZ P., T. 1988. Distribución natural de los pinos en México. Chapingo, Mex. Centro de Genética Forestal. Nota técnica No. 1. p. 2.
- EGUILUZ P., T. 1989. Biosistemática de los pinos mexicanos. México, D.F. IX Congreso Forestal Mundial; Vol. II. Comisión Técnica I, SARH. pp. 543-555.
- EGUILUZ P., T. 1990. Biosystematics of the mexican and Central american white pines. Montreal. IX IUFRO Congres (No publicado).
- FARRIS, J.S. 1972. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. Am. Nat. 106:645-668.
- FERET, P.P. y F. BERGMANN. 1976. Gel electrophoresis of proteins and enzymes. In Miksche, J.P. (ed.) Modern methods in forest genetics; proceedings in life sciences. New York. Springer-Verlag. pp 49-77.
- FINS, L. y L.W. SEEB. 1986. Genetic variation in allozymes of western lach. CAN. J. FOR. RES. 16(5):1013-1018
- FOWLER, D.P. y R.W. MORRIS. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. Can. J. For. Res. 7: 343-347.
- HAMRICK, J.L., MITTON, J.B. y Y.B. LINHART. 1981. Levels of Genetic variation in trees: influence of life history characteristics. In M.T. Conkle (Technical coordinator), Proc. Symp. isozymes North Am. Forest trees and Forest insects, Berkeley, CA. USDA. Forest Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48. pp. 35-41.
- HARRIS, H. y D.A. HOPKINSON. 1977. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. New York. Elsevier Science Publishers. pp. 2-1 - 2-8.
- HUMPHRIES, C.J. y L.R. PARENTI. 1986. Cladistic biogeography. Oxford. Clarendon Press. 98 p.

- LEDIG, F.T. 1988. Heterozygosity, Heterosis, and Fitness in outbreeding plants. In Soule, M. E. Conservation biology; The science of scarcity and diversity. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates. pp. 77-104.
- LITTLE, E.L. 1962. Variación y evolución de los pinos mexicanos. Seminario y viajes de estudio de coníferas latinoamericanas. F.A.O. , S.A.G. , S.F.F. México. Inst. Nac. de Invest. For. Publicación 1. pp. 94-107.
- LOOCK, E.E.M. 1977. The pines of México and British Honduras; A report on a reconnaissance of México and British Honduras during 1947. 2a. ed. Pretoria, Republic of South Africa. The Department of Forestry. Bulletin 35. pp. 112-126.
- MARTINEZ, M. 1948. Los pinos mexicanos. 2a. ed. México. Ediciones Botas. 120 p.
- MIROV, N.T. 1967. The genus Pinus. New York. The Ronald Press. 602 p.
- MIROV, N.T. y J. HASBROUCK. 1976. The story of pines. Bloomington, Indiana University Press. pp. 49-55.
- MITTON, J.B. 1983. Conifers. In Tanksley, S.D. y T.J. Orton (eds.). Isosymes in plant genetics and breeding. part B. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. pp. 443-472.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- NIEBLING, CH. R. y M.T. CONKLE. 1987. Washoe pine allozyme diversity and genetic comparisons with race of ponderosa pine. Can. Journal For. Res. (en impresion).
- PRAGER, E.M. ; FOWLER, D.P. y A.C. WILSON. 1976. Rates of evolution in conifers (Pinaceae). Evolution. 30(4):637-649.
- ROGERS, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in genetics VII. Univ. Texas. Publ. 7213. pp. 145-153.
- RZEDOWSKI, J. ; L. VELA G. y MADRIGAL S. 1977. Algunas consideraciones acerca de la dinámica de los bosques de Coníferas en México. Ciencia Forestal (México) 2(5):15-35.
- SHAW, G.R. 1909. The pines of México. Arn. Arb. 1. Boston. 29 p.
- SNEATH, P.H.A. y R.R. SOKAL. 1973. Numerical taxonomy; the principles and practice of numerical classification. San Francisco. Freeman and Company. pp. 309-361.

- SRB, A.M., OWEN, R. D. y R.S. EDGAR. 1965. General genetics. 2a. ed. S. Francisco, CA. Freeman. pp. 127-145.
- STRICKBERGER, M. W. 1987. Genética. Traductores AGUDE, M. y G. P. LARREA. Barcelona. Omega. 937 p.
- SWOFFORD, D.L. y R.B. SELANDER. 1981. Biosys-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetic and systematics. The journal of Heredity 72:281-283.
- SWOFFORD, D.L. y R.B. SELANDER. 1981. Biosys-1; a computer program for the analysis of allelic variation in genetics. Illi. USA. Department of genetics and Development University of Illinois. 66 p.
- STYLES, B. T. y C.E. HUGHES. 1983. Studies of variation in Central American Pines III. Notes on the taxonomy and nomenclature of the pines and related gymnosperms in Honduras and adjacent Latin America Republics. Brenesia 21: 269-291.
- YEH, F.C. y C. LAYTON. 1979. The organization of genetic variability in central and marginal populations of lodgepole pine *Pinus contorta* spp. Latifolia. Can. J. Genet. Cytol. 24: 487-503.
- YEH F. CH.-H. y O'MALLEY. 1980. Enzyme variations in natural populations of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, from British Columbia. 1. Genetic variation patterns in Coastal Populations. Silvae Genetica 29(3-4):83-92.

7. A P E N D I C E

Cuadro 1A. Fórmulas de los buffers para los geles y para las charolas de los electrodos.

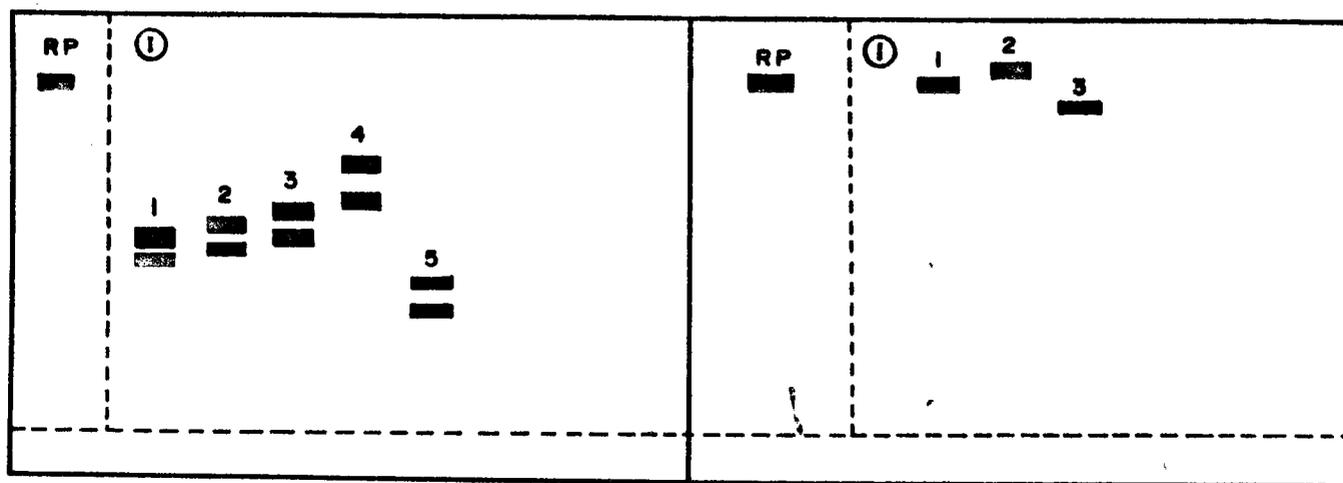
Sistema	Buffer	Volumen (l)	Químico	Cantidad (g)	pH final	Titular
A	Gel	10	Trizma base	62.0	8.3	Ninguno
			Acido cítrico	14.6		
	Charola	10	LiOH (monohid.)	12.0	8.3	Ninguno
			Acido bórico	118.9		
B	Gel	10	Trizma base	121.1	8.8	1.0 M Ac. C.
	Charola	10	Acido bórico	185.5	8.0	4 N NaOH
			NaOH	20.0		
D	Charola	8	Acido cítrico (anhídrico)	61.6	6.1	N-(3) MAP
E	Charola	8	Acido cítrico (anhídrico)	61.6	8.1	N-(3) MAP

Nota: Ac. C. = Acido cítrico, monohid = monohidratado,
N-(3)MAP = N-(3) Morfolina de Amino-propilo.

Cuadro 2A. Preparación de los buffers para hacer los geles.

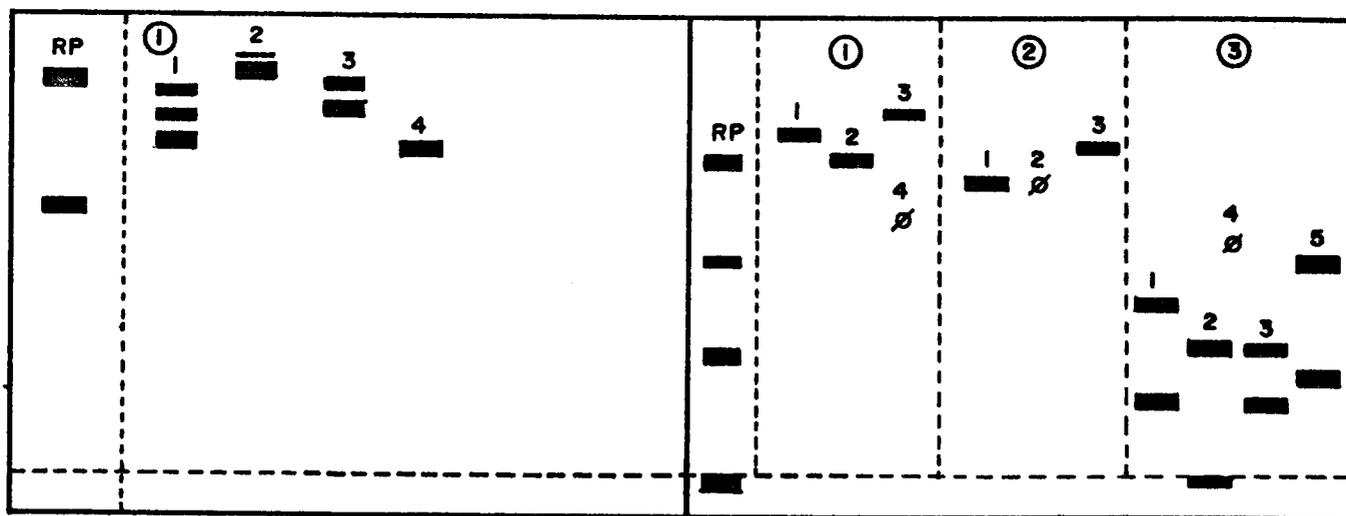
Sistema	Formulación de los buffer para geles	Formulación del buffer para la charola
A	10% buffer de charola 90% buffer del gel	100% buffer charola
B	100% buffer del gel	100% buffer charola
D	5% buffer charola 95% agua destilada	100% buffer charola
E	5% buffer charola 95% agua destilada	100% buffer charola

Nota: buffer gel = buffer especial para hacer los geles;
 'buffer charola = buffer para las charolas de los electrodos
 en las estructuras especiales de corrimientos
 electroforéticos.



Aconitasa (ACO)

Fosfoglucomutasa (PGM)

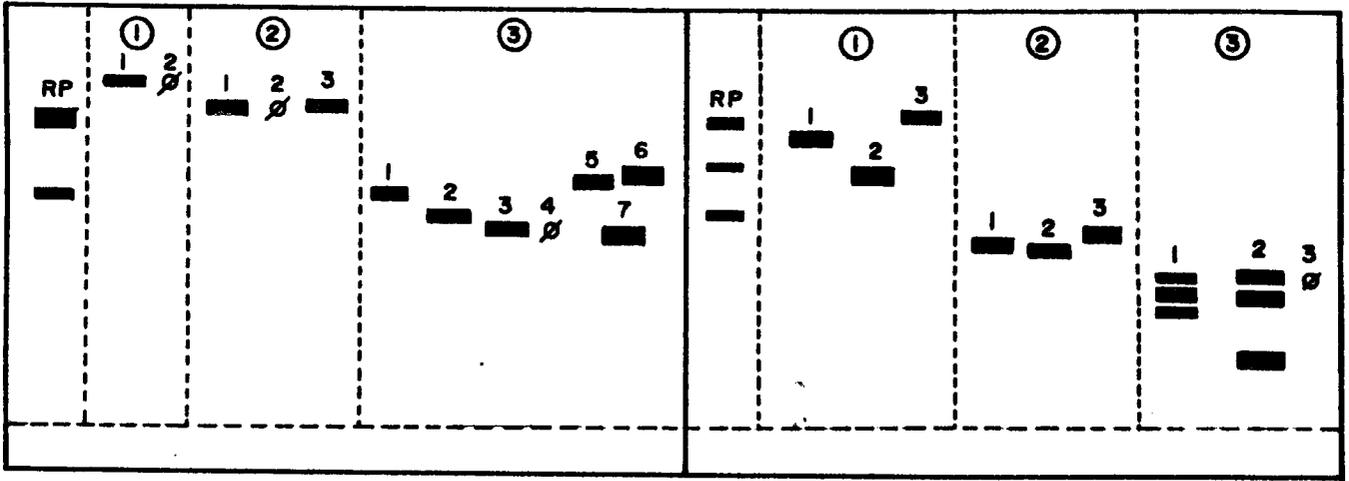


6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD)

Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT)

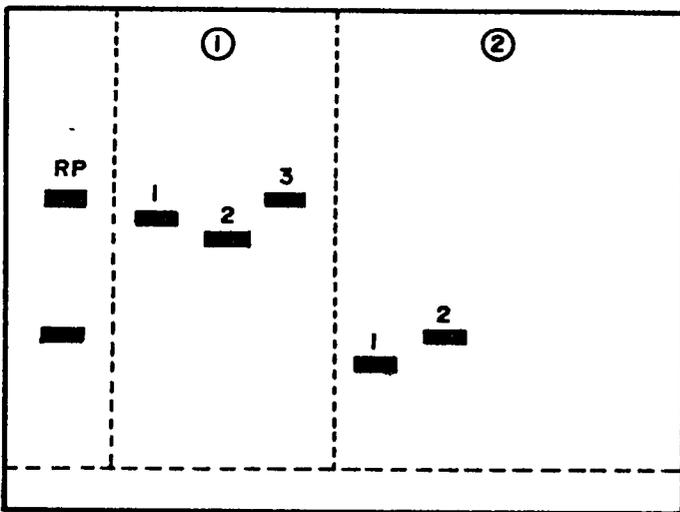
Figura 1A. Diagrama de los zimogramas de las enzimas mostrando el patrón de bandeo para cada uno de los alelos (1, 2, ..., 7) en cada uno de los loci (①, ②, ③) analizados RP= representa el patrón observado en *Pinus resinosa* para cada enzima; \emptyset representa la ausencia de la isoenzima para ese locus en particular.

— Continuación Figura 1A.



Leucina aminopeptidasa (LAP)

Menadiona reductasa (MNR)



Shikimato deshidrogenasa (SKDH)

