

# POLIMORFISMO PROTEICO EN *Pinus hartwegii* Lindl. DEL COFRE DE PEROTE, VERACRUZ, MÉXICO

L. G. Iglesias Andreu<sup>1\*</sup>; Y. Tivo Fernández<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada.  
Circuito Los Lagos s/n, Zona Universitaria. C. P. 91090.  
Tel. 01 (228) 8 42 27 73. Xalapa, Veracruz, México.

<sup>2</sup>Gerencia Estatal de la CONAFOR, Villahermosa, Tabasco, México.  
Correo-e: \*lgeorg01@hotmail.com; \*\*yamilet84@yahoo.com.mx.

## RESUMEN

Se evaluó la composición de globulinas en tejido megagametofítico de semillas colectadas en la población natural de *Pinus hartwegii* ubicada en el Cofre de Perote, Veracruz. Los análisis electroforéticos se realizaron en un sistema discontinuo de geles de poliacrilamida (PAGE). Los resultados mostraron una buena resolución y repetibilidad en los perfiles de proteínas obtenidos. Se detectó la presencia de cuatro haplotipos. Los árboles bajo estudio se clasificaron en tres grupos. El grupo I que contuvo la mayoría de los árboles evaluados (70 %) se caracterizó por presentar el haplotipo I. Estos resultados sugieren la presencia de cierto grado de consanguinidad en dicha población.

**PALABRAS CLAVE:** polimorfismo, proteínas, *Pinus hartwegii*, electroforesis, variación.

## PROTEIN POLYMORPHISM IN *Pinus hartwegii* Lindl. AT COFRE DE PEROTE, VERACRUZ, MÉXICO

## ABSTRACT

We evaluate the globulins and total proteins composition in megagametophytes tissue from seeds collected in a natural population of *Pinus hartwegii* located at Cofre de Perote, Veracruz. Electrophoresis was performed in a discontinuous system of polyacrylamide gels (PAGE). Results shown a good resolution and repeatability in obtained protein profile. It was detected the presence of four haplotypes. The trees under study were classified in three groups. The group I that contained the majority of evaluated trees (70 %), was characterized for the presence of haplotype I. Our results suggest the presence of certain inbreeding degree in this population.

**KEY WORDS:** protein, polymorphism, *Pinus hartwegii*, electrophoresis, variation.

## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas forestales mexicanos representan un valioso recurso biológico a nivel global ya que albergan el 1.3 % de los recursos forestales mundiales (Guevara, 1999). Sus bosques templados, incluyen entre otros a las coníferas, que ocupa 15 % del territorio mexicano del cual 90 % corresponde a bosques de coníferas, representados principalmente por árboles de género *Pinus* (Vera-Castillo, 2003). Sin embargo, esta diversidad se ha visto en los últimos años seriamente amenazados debido entre otros factores a cambios de uso del suelo para actividades de agricultura y ganadería, incendios, plagas y enfermedades y la tala ilegal

(López *et al.*, 1993, Ledig, 2001). Lo anterior ha traído como consecuencia en el estado de Veracruz, la pérdida de gran parte de su superficie forestal templada y tropical, con la consecuente disminución en su diversidad biológica (SEDARPA, 2006).

Es por ello que la preservación y estudio de la diversidad genética aún disponible, constituye una tarea de gran importancia para garantizar un manejo productivo y eficiente de los ecosistemas naturales. Así mismo, en la caracterización cuantitativa y cualitativa de esta variación, se han venido empleando con éxito desde hace años las

variantes electroforéticas de proteínas en semillas de diferentes especies forestales (Allona *et al.*, 1994; Allona *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2004).

La amplia utilización de los marcadores bioquímicos en la estimación de la variación genética de las poblaciones forestales se debe en gran medida a las ventajas que las mismas ofrecen comparada con otras clases de marcadores genéticos (Iglesias y Casas, 2004). Se ha indicado además que estos marcadores son neutrales; esto es, no están ligados a *loci* que afecten el valor de la especie, pueden resultar muy útiles para conocer la variación presente en las poblaciones (Gilliland, 1989). Por otro lado pueden ser resueltas usando las mismas técnicas básicas para la mayoría de las especies con independencia de su hábitat, tamaño o longevidad (Hamrick, 1989).

Sin embargo, a pesar de la importancia ecológica y socioeconómica que posee la especie *P. hartwegii* comúnmente conocida como pino de las alturas, no se cuenta con suficiente información sobre la variación bioquímica intrapoblacional existente, que permita contar a futuro con estrategias apropiadas para la conservación y manejo adecuado de la misma (Tivo e Iglesias, 2004; Iglesias y Tivo, 2005). Se conoce sin embargo, que algunas de sus poblaciones, como la población del Cofre de Perote, en el estado de Veracruz presenta una seria problemática reproductiva (Iglesias *et al.*, 1999; Iglesias *et al.*, 2006). Es por ello que, considerando todo lo antes expuesto se emprendió el presente estudio con el objetivo de evaluar el polimorfismo en la composición de proteínas en megagametofitos de *P. hartwegii* provenientes de la población del Cofre de Perote, Veracruz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente trabajo, se colectaron muestras de semillas de una población de *P. hartwegii* de 10 árboles seleccionados a partir de su fenotipo, tomando en cuenta los criterios de inclusión: la rectitud del fuste, la poda natural, la conformación de la copa y ramas, y que estuviesen libres de plagas y enfermedades, con base en caracteres de importancia comercial y a través de la selección de árboles superiores en los rodales naturales o plantaciones (Acosta, 1993; CONABIO-PRONARE, 2001).

El sitio de la colecta fue el Parque Nacional del Cofre de Perote, Veracruz, ubicado en los 19°03'18" de latitud norte y 97°09'34" longitud oeste a una altura de 4,282 m (Servicio Meteorológico Nacional, 1984). La zona se caracteriza por presentar suelos con una profundidad media, pedregosos y con poca materia orgánica, precipitación media anual de 519.1 mm y una temperatura media anual de 12 °C (Servicio Meteorológico Nacional, 1984).

Las semillas de los árboles en estudio debidamente

identificadas (Ph1, Ph3, Ph4, Ph8, Ph17, Ph18, Ph19, Ph20, Ph28 y Ph30) fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Las muestras de semilla fueron colocadas en cajas Petri con agrolita hasta que su radícula alcanzó una longitud de 3 a 5 mm. En esa fase se procedió a remover la testa y separar el embrión del tejido megagametofito, para extraer de éste último las proteínas totales.

Los extractos de megagametofito (M) fueron homogenizados en frío de acuerdo con la técnica descrita por Hodgskiss (1998). Los extractos obtenidos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min y posteriormente se sometió a electroforesis el sobrenadante.

La electroforesis se realizó en un sistema discontinuo de geles de poliacrilamida (por sus siglas en inglés, PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis) descrito por Davis (1964) y Ornstein (1964), adaptado a la técnica de lámina vertical por Chappel *et al.* (1974). Se emplearon geles de 1 mm de grosor, 8.5 % para la zona de separación y 5 % para la de compactación. En los electrodos se empleó tampón 0.04M Tris-Glicina pH 8.3 (Chappel *et al.*, 1974). El corrimiento se efectuó a 250 mA, durante 5 horas con una fuente de poder marca Consort (modelo E863). Los geles fueron teñidos durante 24 h en una solución de ácido tricloroacético al 12 % (p/v) de azul brillante de Coomassie R-250.

Una vez completadas las tinciones se lavaron los geles varias veces con agua corriente. Para detener la reacción enzimática y fijar las bandas reveladas, se procedió a efectuar la destinción de los geles en agua destilada durante 72 horas. Finalmente se agregó a los geles una solución fijadora de ácido acético al 7 %.

En todos los casos se analizaron seis muestras repetidas por árbol ya que de acuerdo con Conkle (1981), citado por Ramírez *et al.* (1997), con este tamaño de muestra se garantiza que la probabilidad de error en la identificación de individuos heterocigóticos como homocigóticos sea de 0.03.

Los patrones de bandas obtenidos se registraron sobre la base de número y posición relativa de cada banda detectada; esta última fue establecida al dividir la distancia de migración recorrida por la proteína entre la distancia total de migración recorrida por la banda de Kohlrausch. Posteriormente se fotografiaron los geles con una cámara digital Cannon (Zoom Browser EX), sobre un transiluminador de luz blanca. Sobre la base de la mayor resolución y repetibilidad observada se seleccionaron algunas bandas, las que fueron agrupadas en dos zonas electroforéticas de acuerdo a su movilidad aniónica. Estas se numeraron en orden decreciente de peso molecular. Dentro de cada una de las zonas electroforéticas establecidas, se determinó la frecuencia de cada banda según una escala de tres grados (muy frecuente >90 % de color negro, relativamente frecuente entre 30 a 90% de color negro con puntos blancos y de poca frecuencia <30 % de color gris con puntos blancos). A partir

de estos resultados se determinó el porcentaje de polimorfismo así como la presencia de los perfiles de bandas (haplotipos) correspondientes.

Con el fin de clasificar a los árboles en estudio sobre la base de su variación proteica, los datos bioquímicos obtenidos se codificaron con los valores 0 y 1 (estados de presencia/ausencia de cada banda), con el fin de procesarlos por análisis de conglomerado (Sneath y Sokal, 1973). Este último se realizó mediante el programa STATISTICA (1998) de forma jerárquica empleándose como índice de disimilitud la distancia de Manhattan y como algoritmo de ligamiento el método de agrupamiento pareado desbalanceado usando la media aritmética (por sus siglas en inglés, UPGMA: Unweighted Pair – Group Method with Arithmetic Averaging) (Sneath y Sokal, 1973). Además se realizó un análisis de correlación no paramétrica de Kendall para determinar posibles relaciones de ligamiento o independencia entre las bandas.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos del análisis de la fracción proteica correspondiente a las globulinas en las muestras de megagametofito de cada árbol en estudio, revelaron la presencia de una buena resolución y repetibilidad en los perfiles de bandas. Este tejido además resulta muy útil para evaluar el polimorfismo intrapoblacional considerando lo indicado por Adams (1983), con relación a que el mismo posee una estructura genética más simple que la planta madre (ya que la meiosis ha suprimido en éste la posibilidad de numerosas interacciones génicas) se facilitan las interpretaciones genéticas.

Los resultados obtenidos permitieron constatar en primer término la presencia de proteinogramas caracterizados por 13 bandas con diferentes intensidades de tinción en tejido megagametofítico. Sin embargo, sólo cuatro de ellas, (con mayor repetibilidad y nitidez), se tomaron en cuenta para el análisis de la variabilidad intrapoblacional. Las cuatro electroformas consideradas se encuentran bien delimitadas en dos regiones electroforéticas: PT1 y PT2 de menor y mayor movilidad aniónica respectivamente (Figura 1).

La región PT1 se caracterizó por presentar una banda con valor de movilidad electroforética media de 0.19. Esta resultó ser polimórfica en dicha población. Por otra parte, se apreció en la zona PT2 otras tres bandas, una de ellas fue monomórfica con valor Rf medio de 0.28. Las restantes bandas (PT3 y PT4), con mayores movilidades aniónicas (valores Rf medio de 0.32 y 0.45), resultaron ser polimórficas en este estudio (Figura 1).

Cabe referir que de las tres bandas polimórficas detectadas, sólo dos de ellas (PT1 y PT4) se presentaron en una frecuencia de 90 %, a diferencia de la banda PT3 que se presentó sólo en 30 % de los genotipos examinados (Figura 1). A partir de las variantes polimórficas detectadas se pudo

constar la presencia de cuatro perfiles de bandas distintivos; uno de ellos (haplotipo I) presente con mayor frecuencia (70 %), resultó característica de los árboles: Ph1, Ph3, Ph17, Ph19, Ph20, Ph28 y Ph30. Los tres perfiles de bandas restantes (haplotipos II, III y IV) resultaron específicos de los árboles: Ph4, Ph8 y Ph18, respectivamente (Figura 1).

Por otra parte, el resultado del análisis de conglomerado efectuado permitió clasificar a los árboles en estudio en tres grupos (Figura 2). El grupo I estuvo compuesto por siete árboles (Ph1, Ph3, Ph17, Ph19, Ph20, Ph28 y Ph30), los cuales mostraron similar perfil de banda (haplotipo I). Los grupos II y III estuvieron representados cada uno de ellos por los árboles Ph8 y Ph18 (haplotipos III y IV, respectivamente) y el árbol Ph4 (haplotipo II).

Los resultados del análisis de correlaciones no paramétricas realizado (tomando las variantes proteicas detectadas como variantes), reveló la presencia en algunos casos de combinaciones más frecuentes de lo que correspondería si estuvieran al azar, por lo que parece existir un ligamiento entre los genes que codifican para las bandas PT1 y PT4 (Cuadro 1).

### POLIMORFISMO PROTEICO EN *Pinus hartwegii* Lindl.

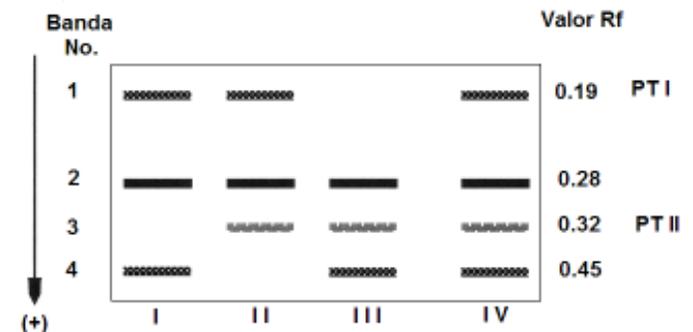


FIGURA 1. Variación en los proteinogramas de megagametofitos de ocho árboles de la población de *P. hartwegii* del Cofre de Perote, Veracruz. (PTI y PTII: zonas electroforéticas; I, II, III y IV: haplotipos: >90 %, >30 a 90 % y <30 %. La fecha muestra la dirección de migración hacia el ánodo).

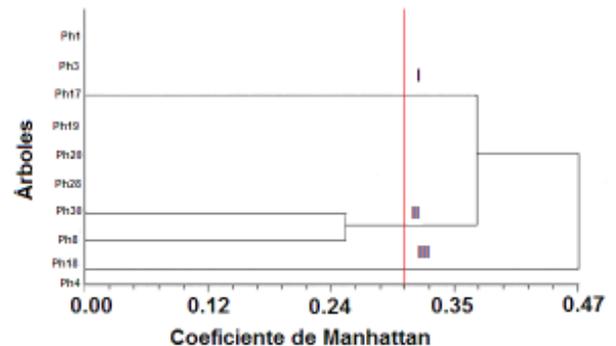


FIGURA 2. Dendrograma de la clasificación de los árboles de *P. hartwegii* en base a su variación de los perfiles de proteínas totales. Grupos: I, II y III.

Cabe destacar la utilidad que pudieran brindar las restantes fracciones proteicas no examinadas para complementar el estudio de la variabilidad genética en esta población. Todo lo antes expuesto pudiera explicar la existencia de una menor variabilidad en los electroferogramas detectados con relación a lo reportado para la población de *P. hartwegii* del Pico de Orizaba (Solís e Iglesias, 2001). En *P. pinea* Álvarez *et al.* (2004) detectaron perfiles de bandas complejos y un elevado nivel de polimorfismo proteico al analizar 20 poblaciones naturales de esta especie en España.

Por otra parte, la presencia de un porcentaje relativamente elevado de genotipos (70 %) con el mismo perfil de bandas (haplotipo I) sugiere la existencia de un cierto grado de consanguinidad en la población. Al respecto cabe significar que en particular la población de *P. hartwegii* del Cofre de Perote ha sufrido en los últimos años serias afectaciones por talas clandestinas e incendios. Según la SEMARNAT, en 1998 se dañaron 121 hectáreas del volcán del Cofre de Perote (SEMARNAT, 2001). Todo ello ha ocasionado una disminución en el tamaño efectivo de la misma que participa en el mecanismo de la polinización (Iglesias y Tivo, 2005) y una sensible disminución en la producción y calidad de sus semillas (Iglesias *et al.*, 2006). Esto pudiera explicar la seria reducción de la tasa reproductiva observada en esta población. Todo ello, al parecer constituye manifestaciones del fenómeno de depresión consanguínea, bastante común en especies de coníferas (Williams y Savolainen, 1996). Por otra parte, estos resultados concuerdan, en general, con los valores de porcentaje relativamente menos elevado de polimorfismo detectado al analizar la variación isoenzimática en esta población (Iglesias y Luna, 2008) con relación a lo obtenido por Solís e Iglesias (2001), quien detectara una mayor variación en la composición de esterases a partir de megagametofitos colectados en la población de esta especie ubicada en el Pico de Orizaba.

Otro aspecto que se puso en evidencia en este trabajo, es que no se observó una clara asociación entre la variabilidad genética contemplada en los proteinogramas detectados con la distribución espacial de los árboles examinados. Los árboles Ph1 y Ph30 ubicados más distantes en la población presentaron similitudes en sus perfiles proteicos.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que parece existir relaciones de ligamiento entre los genes que

codifican algunas de las bandas detectadas (PT1 y PT4). Sin embargo, estudios más amplios que se realicen a futuro en esta población, permitirá contar con marcadores genéticos útiles que favorezcan el desarrollo de estrategias apropiadas para la conservación y manejo adecuado, sobre todo, de aquellas poblaciones que presentan problemas reproductivos similares a la población del Cofre de Perote.

## LITERATURA CITADA

- ACOSTA, M. M. 1993. Fenología de *Abies religiosa* (HBK) Schl. et Cham. In: Memorias del 1er. Encuentro de Ciencia y Tecnología del Sector Agropecuario y Forestal del estado de Puebla. SARH/CITAEF/Gobierno del Estado 8-10/IX. Puebla, Pue. México, 90 p.
- ADAMS, W. T. 1983. Application of isozymes in tree breeding. En: Isozymes in plant genetics and breeding. Part A (S. D. Tanksley y T. J., Orton, eds.). Elsevier Science Publishers, p. 382-400.
- ALVAREZ, J. B.; TOLEDO, M. J.; ABELLANAS, B.; MARTÍN, L. M. 2004. Use of megagametophyte storage proteins as markers of the genetic diversity in stone pine (*Pinus pinea* L.) in Andalucía, Spain. Genetic Resources and Crop Evolution, 51: 621-627.
- ALLONA, I.; COLLADA, C.; CASADO, R.; ARAGONCILLO, C. 1994. Electrophoretic analysis of seed storage proteins from gymnosperms. Electrophoresis. 15: 1062-1067.
- ALLONA, I.; SAIZ-OMENACA, J. A.; CASADO, R.; ARAGONCILLO, C. 1996. Megagametophyte salt-soluble proteins as genetic markers in *Pinus pinaster* Ait. Silvae Genet., 45: 21-24.
- CHAPPEL, T.; IGLESIAS, L.; BARRETO, A.; BAISRE, F.; SIMÓN, J. P. 1974. A simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrylamide gel. Laboratory Practice. 23: 311-312.
- CONABIO-PRONARE. 2001. Aguilera R. Manuel. Archivo personal. *Pinus greggii* Engelm. SIRE: Paquetes tecnológicos. 7 p.
- DAVIS, B. 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. Ann. NY. Acad. Sci. 121: 31-349.
- GILLILAND, T. J. 1989. Electrophoresis of sexually and vegetative propagated cultivars of allogamous species. Plant Varieties and Seeds. 2: 15-25.
- GUEVARA, S. 1999. Aspectos medioambientales y de diversidad biológica en México. Cuadernos de Biodiversidad. CIBIO. Publicación cutrimestral del Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. Universidad de Alicante, España. 2: 5-8.
- HAMRICK, J. L. 1989. Isozymes and analyses of genetic structure of plant populations. In: Isozymes in Plant Biology (D. Soltis y P. Soltis, eds.) Dioscorides Press, Portland Oregon. p. 87-105.
- HODGSKISS, P. 1998. Isozymes, allozymes: Assays of genetic variation. Institute of Forest Genetics. USDA Forest Service. 16 p.
- IGLESIAS, L.; ALBA, J.; ENRIQUEZ, J. L. 1999. Estrategias para la conservación de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. en la región del Cofre de Perote, Veracruz. Monte Bravo (4-5): 20-22.
- IGLESIAS, L.; TIVO, F. Y. 2005. Contribución al manejo de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote. Agroentorno. FUNPROVER, Fundación Produce Veracruz. 61(8): 16-17.
- IGLESIAS, L. MORA, I.; CASAS, J. L. 2006. Morfometría, viabilidad y variabilidad de las semillas de la población de *Pinus*

**CUADRO 1. Coeficientes de correlación de Kendall entre las variantes polimórficas detectadas.**

Variantes electroforéticas	PT1	PT3	PT4
PT1	1	0.40	0.55
PT3	0.40	1	0.40
PT4	0.55	0.40	1

Nota: Valores marcados en rojo son significativos con  $P < 0.05$

- hartwegii* del Cofre de Perote, Veracruz, México. Cuadernos de Biodiversidad CIBIO. Publicación cuatrimestral del Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. Universidad de Alicante, España. 19: 14-22.
- IGLESIAS, L.; LUNA, M. 2008. Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México. Ecosistemas, 17(1): 115-122.
- LEDIG, F. T. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñón, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). American Journal of Botany, (88): 1977-1987.
- LÓPEZ, J.; JASSO, J.; VARGAS, J.; AYALA, C. 1993. Variación de características morfológicas en conos y semillas de *Pinus greggii*. Agrociencia. Serie Recursos Naturales Renovables. Montecillo, México, 1(3): 81-95.
- ORNSTEIN, L. 1964. Disc electrophoresis. I. Background and Theory. Ann. NY. Acad. Sci., 121: 321-349.
- RAMÍREZ, C.; VARGAS, J. J.; JASSO, J.; CARRILLO, G.; GUILLEN, H. 1997. Variación isoenzimática en diez poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. Agrociencia, 31: 223-230.
- SEDARPA. 2006. Dirección General de Desarrollo Forestal-SEDARPA. Gerencia Regional X –Golfo- Centro-CONAFOR. Plan Sectorial Forestal Estatal. Actualización 2006-2028, 127p.
- SEMARNAT. 2001. Incendios forestales y deforestación en México: una perspectiva analítica. 5 p. [En Línea]. (Consultado: Enero 16, 2003). [<http://www.semarnat.com.mx>].
- SERVICIO METEOROLÓGICO NACIONAL. 1984. Normales Climatológicas. Dirección General de Geografía y Meteorología. México. 799 p.
- SNEATH, P. A.; SOKAL, R. R. 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman. San Francisco. 573 p.
- SOLÍS, L.; IGLESIAS, L. 2001. Variación en la composición isoenzimática en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Pico de Orizaba, Veracruz. Cuadernos de Biodiversidad. CIBIO. Publicación cuatrimestral del Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. Universidad de Alicante, España, 4-7.
- STATISTICA. 1998. STAT SOFT, Inc. Statistica for Windows. Statistica: User guide. 2325 East 13<sup>th</sup> Street, Tulsa OK. 74104. EUA.
- TIVO, F. Y.; IGLESIAS, L. 2004. Problemática de la población e importancia de la conservación de *Pinus hartwegii* Lindl. Agroentorno. FUNPROVER, Fundación Produce Veracruz, 60(8): 4-5.
- VERA-CASTILLO, G. 2003. Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en el Sur y Sureste de México. Documentos de Trabajo: Recursos Genéticos Forestales. FGR/61S. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales, FAO, Roma.
- WILLIAMS, C. G.; SAVOLAIENEN, O. 1996. Inbreeding depression in conifers: Implications for breeding strategy. For. Sci., 42: 102-117.