

150



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMA DE APAREAMIENTO Y VARIACIÓN GENÉTICA EN *Pinus maximartinezii* RZEDOWSKI

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A:
ALEJANDRA CITLALI MORENO LETELIER

DIRECTOR DE TESIS:
DR. DANIEL PIÑERO DALMAU

2002



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a Usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Sistema de apareamiento y variación genética en *Pinus maximartinezii* Rzedowski."

realizado por Alejandra Citlalli Moreno Letelier

Con número de cuenta 09754601-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de **Biología**.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis
Propietario

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Daniel Piñero

Propietario

Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa

Ana Elena Mendoza Ochoa

Propietario

Dra. Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María de Guadalupe Souza Saldívar

Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María de Guadalupe Souza Saldívar

Suplente

M. en C. Patricia Delgado Valerio

Patricia Delgado Valerio

Suplente

Biol. Rodolfo Salas Lizana

Rodolfo Salas Lizana

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA**

A mi abuela Olga

RESUMEN

El estudio de los sistemas de apareamiento utilizando marcadores moleculares permite distinguir los patrones genéticos que se generan en poblaciones naturales debidos a las tasas de entrecruzamiento y autopolinización, así como los niveles de endogamia presentes. Esto último es importante para entender la evolución de los sistemas de apareamiento y para evaluar hasta que punto el purgamiento de los alelos deletéreos puede eliminar las causas de la depresión por endogamia y favorecer la disminución de la tasa de entrecruzamiento en poblaciones pequeñas. Además, los estimados de desequilibrio de ligamiento son útiles para inferir eventos poblacionales pasados que pudieron afectar la estructura genética de la población y mediante estimadores de variación genética poder determinar la riqueza genética de una población y las estrategias de conservación más adecuadas.

Pinus maximartinezii está considerado como la especie de pino con la distribución más restringida del mundo, y estudios anteriores la consideran como sobreviviente de un cuello de botella pasado y muy vulnerable a la extinción. En el presente estudio se observó que esta especie no está empobrecida genéticamente, ya que posee niveles de heterocigosis esperada mayores a las de otras especies de pinos mexicanos con un rango de distribución mayor a la de *P. maximartinezii*. Comparándola con pinos de todo el mundo, posee variación genética intermedia, además de poseer exceso de heterocigos significativo en al menos un locus, fenómeno rara vez observado en los pinos. Estos datos sugieren la existencia de depresión por endogamia en esta especie, lo que posiblemente ayuda a mantener relativamente altos los niveles de variación, contrario a lo que se esperaría tratándose de una población tan pequeña y con probabilidad de que actuaran fenómenos azarosos en la determinación de la estructura genética. Por lo anterior, puede concluirse que no hay evidencias claras de un cuello de botella pasado en esta especie.

ABSTRACT

The study of mating systems using molecular markers is useful to distinguish the genetic patterns produced by selfing, outcrossing and inbreeding in natural populations. This is specially important to understand the evolution of the mating systems and allows us to evaluate the efficiency of purging deleterious alleles. Purging could eliminate the causes of inbreeding depression and lower the outcrossing rate in small populations. On one hand, the estimates of linkage disequilibrium can be helpful to infer past events that affected the population's genetic structure and, on the other hand, the estimators of genetic diversity can determine the genetic richness of a population and the most adequate conservation strategies to follow.

Pinus maximartinezii is considered the pine species with the most restricted distribution in the world. Past studies have considered this species to have gone through a very strong bottleneck and to be very vulnerable to extinction. In the present work we could observe that this species is not genetically depauperate, because the levels of expected heterocigosity are higher than the estimates for other species of mexican pines that have wider distribution ranges than *P. maximartinezii*. Compared to the levels of genetic variation of pines around the world, this species has a intermediate value, but it presents heterocigote excess in at least one locus, something rarely observed in pine trees. The latter suggests the existence of inbreeding depression in this species that could actually help to maintain a relatively high genetic variation. This observation is contrary to what is expected in such a small population, where random forces are more likely to be modelling the genetic structure. Thus, there is no clear evidence of a past bottleneck in this species.

AGRADECIMIENTOS

Esta es, creo yo, una de las partes fundamentales de cualquier trabajo. Ya que como seres sociales, los humanos somos prácticamente incapaces de hacer algo sin ayuda de otros, y esta tesis no es la excepción.

Antes que nada, quiero agradecer a Daniel Piñero por brindarme la oportunidad de trabajar con estos bichos tan maravillosos que son los pinos y por darme a mi y al resto de los miembros del laboratorio de Genética y Evolución la libertad creativa que nos ha permitido aprender tanto y adquirir experiencias que de otra forma no tendríamos. También está Paty que fue mi gurú en el trabajo de laboratorio y el análisis de datos además de ser una muy buena amiga y la autora intelectual de todo el trabajo con pinos que hemos hecho en el laboratorio. Lo mismo va para Miro, con quien muchas veces nos quedamos hasta tarde tratando de sacar los datos que tantos dolores de cabeza nos dieron. Gracias a Ale por enseñarme las primeras cosas de biología molecular, por su amistad y su apoyo en todas situaciones. También a Rodo, Karen, Cecilia y Lev por todos los buenos ratos en el laboratorio y fuera de él.

Además quiero hacer un reconocimiento especial a Daniel, Lev, Ale, Paty y Dieter que fueron conmigo al campo, ya que soportaron sin quejarse las horas de sudor, cansancio y dolor de pies para llegar a la cima de ese cerro. Gracias en especial a Dieter por sacar más de 620 semillas de esos conos endemoniadamente resinosos y a nuestro inolvidable guía, Eliodoro Rosales y a su mula por acompañarnos hasta arriba y ayudarnos con las cosas.

Gracias al resto de los miembros del laboratorio de Genética y Evolución: Argelia, Clementina, Rocío, Oscar y Katya. También a las Dras. Valeria Souza y Ana Mendoza por aceptar revisar mi tesis tan amablemente y por todos los comentarios que ayudaron a mejorarla.

Ahora, quiero hacer mención a mis padres, que siempre han creído en mi y me han animado a seguir adelante. También a mis hermanas, Jimena y Verónica, a Juan Antonio y al resto de la familia extendida (incluido el Jimbo), sin ustedes las cosas serían muy aburridas.

A Dieter, por estar a mi lado durante todos estos años, a pesar de los malos momentos. Gracias por tu amor y paciencia, y por todas las cosas que hemos pasado juntos y que nos han ayudado a crecer. En este párrafo también quiero agradecer a Karl e Irene por su cariño y haber tenido ese hijo tan maravilloso.

A mis amigos Diana, Lev, Natalia, Gaby, Niza, Enrique, Erika, Yuri, Marisol, Robert y Matthias B. aunque estén muy lejos, y a toda la banda. Un besote a todos.

El financiamiento para la realización de este trabajo provino de los proyectos de CONACYT No. 31777 otorgado a D. Piñero y D. Gernandt y de CONABIO No. R116 otorgado a P. Delgado y D. Piñero y a PROBETEL.

Índice General

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	La reproducción en plantas	1
1.2	Sistemas de apareamiento	3
1.2.1	Entrecruzamiento y endogamia	3
1.2.2	Sistemas de apareamiento de las plantas en la naturaleza.	5
1.2.3	Depresión por endogamia	8
1.2.4	Evolución de los sistemas de apareamiento	11
1.3	Sistemas de apareamiento en pinos	13
1.3.1	Reproducción en pinos	13
1.3.2	Características genéticas y de sistema de apareamiento	14
1.4	La especie	19
1.4.1	Localización, hábitat y ecología	19
1.4.2	Clasificación	21
1.4.3	Descripción	22
1.4.4	Antecedentes de estudios genéticos	23
1.5	Modelos y herramientas para el estudio del sistema de apareamiento	24
1.5.1	Modelos	24
1.5.2	Uso de microsátélites para caracterizar sistemas de apareamiento	27
1.6	Justificación	29
1.7	Objetivos	31
1.7.1	Generales	31
1.7.2	Particulares	32
1.8	Hipótesis	32

2	MATERIALES y MÉTODOS	34
2.1	Colecta de material biológico	34
2.2	Extracción de ADN	34
2.3	Amplificación de microsátélites	36
2.4	Análisis estadísticos	38
2.4.1	Sistema de apareamiento	38
2.4.2	Diversidad genética	39
3	RESULTADOS	42
4	DISCUSIÓN	48
4.1	Amplificación de microsátélites	48
4.2	Diversidad genética : frecuencias alélicas y heterocigosis esperada .	50
4.3	Hardy-Weinberg e índice de fijación	55
4.4	Sistema de apareamiento	57
4.5	Desequilibrio de ligamiento	59
5	CONCLUSIONES	61
A	Detalles de los métodos	72

Índice de Tablas

1.1	Número de equivalentes letales en varias especies de pinos	16
2.1	Concentraciones de los componentes para cada reacción de PCR	37
2.2	Iniciadores utilizados, tamaño del fragmento y tiempo de corrida	38
3.1	Frecuencias alélicas para los grupos de edades, polen y óvulos.	43
3.2	Valores de p de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg. H_1 =El locus no está en equilibrio ($p<0.05$)	44
3.3	Relación entre heterocigosis observadas y esperadas, índices de fijación y valores de p de la prueba de Hardy-Weinberg para detectar exceso de heterócigos (El exceso de heterócigos estadísticamente significativo está en negritas)	45
3.4	Estimados de tasas de entrecruzamiento multilocus, para un solo locus y de apareamientos correlacionados. (d.s.)	46
3.5	Valores de p de la prueba de desequilibrio de ligamiento	47
4.1	Valores de H_e y H_o para distintas especies de pinos, usando isoenzimas y/o microsatélites	55

Índice de Figuras

1.1	Representación esquemática de los ciclos de vida de las plantas. Tomado de (Holsinger, 2000)	2
1.2	Localización de la única población de <i>Pinus maximartinezii</i>	20
1.3	Individuo adulto de <i>Pinus maximartinezii</i> en Cerro de Piñones, Zatecas. ¹	22

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

"... it is an almost universal law of nature that the higher organic beings require an occasional cross with another individual; or, which is the same thing, that no hermaphrodite fertilises itself for a perpetuity of generations." (Darwin, 1895)

1.1 La reproducción en plantas

La biología reproductiva de las plantas es extraordinariamente diversa, lo cual representa un campo de estudio muy fértil dentro de la biología. Esta diversidad llamó la atención a los naturalistas antes del advenimiento de la teoría de la evolución, y fue Charles Darwin uno de los primeros en buscar una explicación evolutiva del origen y mantenimiento de la complejidad de los sistemas reproductivos de las plantas (Barret, 2002).

La diversidad en los sistemas reproductivos puede ser apreciada en varios niveles, desde el ciclo de vida hasta aspectos morfológicos específicos de ciertos grupos. Una representación gráfica de los distintos ciclos de vida de las plantas puede verse en la figura 1.1. En las briofitas (musgos y hepáticas) los gametofitos haploides producen tanto óvulos como polen, que al unirse forman un cigoto que dará paso al esporofito (diploide) completamente dependiente del gametofito. Este esporofito lleva a cabo meiosis y libera esporas haploides que germinarán produciendo otro gametofi-

to (Holsinger, 2000). En las pteridofitas, tanto el gametofito como el esporifito son de vida libre. Un mismo gametofito puede producir ambos tipos de gametos, o ser producidos por gametofitos distintos, como es el caso de *Selaginella*. En las planta con semilla, el ciclo de vida es muy distinto, ya que la fase de gametofito es reducida al mínimo y se encuentra dentro de las estructuras reproductivas (Holsinger, 2000). Otro aspecto importante de la biología reproductiva de las plantas es la disposición de los órganos de distinto sexo, ya que pueden coexistir en la misma planta (monoecia) pero estar en distintas estructuras o en una misma (flores cosexuales); o que cada sexo se encuentre en un individuo distinto (dioecia), así como sus variaciones: gindioecia (hembras y cosexuales) y androdioecia (machos y cosexuales) (Barret, 2002).

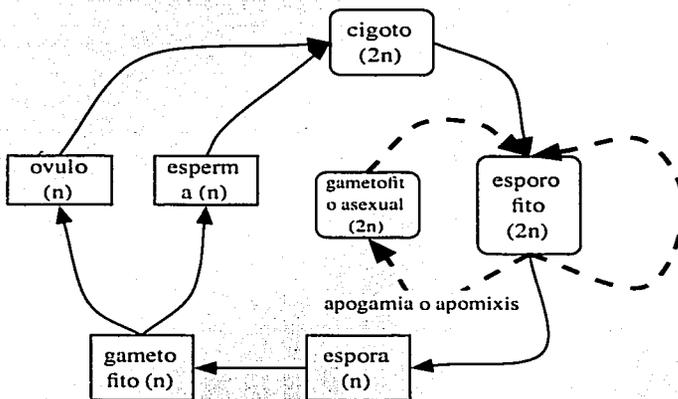


Figura 1.1: Representación esquemática de los ciclos de vida de las plantas. Tomado de (Holsinger, 2000)

Ahora, considerando únicamente la reproducción sexual, las plantas presentan va-

rias formas de producir los cigotos: por autofertilización o por entrecruzamiento, aunque también se presentan variaciones en la frecuencia con que cada tipo de apareamiento se presenta, y en las distintas "estrategias" con que las plantas promueven o evitan un tipo de apareamiento u otro (Barret, 2002; Holsinger, 2000).

Además de la reproducción sexual en las plantas, también existe la reproducción asexual, ya sea por reproducción vegetativa a través de yemas; o por la producción de semillas o esporas genéticamente idénticas a la planta progenitora (apomixis y apogamia). Cada tipo de reproducción tiene consecuencias demográficas y genéticas distintas en las poblaciones (Holsinger, 2000).

En resumen, el campo de estudio de la evolución de las formas de reproducción es muy extenso y abarca morfología, fisiología, embriología, genética y ecología de individuos, poblaciones y especies de plantas. Por lo que una de las formas de aproximarse a éste es la caracterización genética de los sistemas de apareamiento y de los patrones que éstos generan.

1.2 Sistemas de apareamiento

1.2.1 Entrecruzamiento y endogamia

El sistema de apareamiento se refiere a la forma en que los gametos masculinos y femeninos se unen para producir la siguiente generación, y se compone de los porcentajes de cigotos producidos por apomixis, autofertilización o entrecruzamiento, así como de los patrones de fertilidad y de la disposición espacial y temporal de la progeie (dispersión, número de apareamientos durante el ciclo de vida, etc.) (Brown, 1990; Ledig, 1998; Reusch, 2000). La apomixis es la generación de un nuevo in-

dividuo sin que haya un evento de fertilización. El entrecruzamiento se refiere a los apareamientos con distintos individuos, no emparentados y que ocurren al azar (panmixia), pero como consecuencia de la estructura poblacional de muchas especies, los apareamientos no son al azar, sino que hay apareamientos entre parientes. A este fenómeno se le llama endogamia (Futuyma, 1998). Así una población endógama es aquella en la que la probabilidad de que un individuo sea autóctigo (con un alelo idéntico por descendencia) es mayor debido al apareamiento entre parientes, con respecto a una población panmíctica. Junto a esto, el coeficiente de endogamia (F), es la probabilidad de que un individuo tomado al azar de una población sea autóctigo. Este coeficiente es también una medida de la diferenciación de las proporciones panmícticas: $F = 1 - \frac{H_{obs}}{H_{esp}}$ (índice de fijación) donde H_{obs} es la heterocigosis observada y H_{esp} es la heterocigosis esperada (Futuyma, 1998; Hartl y Clark, 1989; Sweigart et al., 1999). El coeficiente de endogamia debe ser definido con respecto a una generación de referencia, y cualquier evento de endogamia anterior no se toma en cuenta (Williams y Savolainen, 1996).

Otros estimadores que permiten caracterizar el sistema de apareamiento es la tasa de autofertilización (s), que es la proporción de progenie producto de una autofertilización del total de la progenie producida por un individuo; y la tasa de entrecruzamiento (t), definida como la proporción de progenie producto de apareamiento con otro individuo: $t = 1 - s$ (Ritland y Jain, 1981).

Los efectos genéticos de la endogamia en las poblaciones son los siguientes: 1) Redistribución de genes del estado heterócigo al estado homócigo sin alterar las frecuencias alélicas (Eguiarte y Piñero, 1990); 2) aumento de la probabilidad de expresión de alelos deletéreos debido a la deriva génica; 3) disminución de la variabilidad neutra y 4) disminución del tamaño efectivo de la población (Kelley y

Waller, 2002; Viard et al., 1996).

En general, puede decirse que los sistemas de apareamiento determinan el número y composición genética de las siguientes generaciones, sobre todo porque los niveles de endogamia presentes determinan, en gran medida, la forma en que se distribuirá la variación genética en las poblaciones, que en última instancia es la materia prima de la evolución (Brown, 1990).

1.2.2 Sistemas de apareamiento de las plantas en la naturaleza.

La distribución de los sistemas de apareamiento puede considerarse como un continuo de formas que van desde la completa autofertilización y apomixis hasta el entrecruzamiento obligado, pasando por todas las opciones intermedias (Brown, 1990). La distribución de las frecuencias de la tasa de entrecruzamiento de las especies de plantas es bimodal para las especies polinizadas por viento, con un mayor número de especies que presentan autofertilización predominante o entrecruzamiento predominante, y en menor proporción las que tienen tasas intermedias (Schemske y Lande, 1985; Vogler y Kalisz, 2001). De esta observación se ha concluido que la autofertilización predominante o el entrecruzamiento predominante representan dos estados estables de sistema de apareamiento (Lande y Schemske, 1985). Por regla general, no se puede decir que el sistema de apareamiento esté correlacionado con las relaciones taxonómicas de las especies, ya que taxa cercanamente relacionados pueden mostrar sistemas de apareamiento muy distintos, donde generalmente la autofertilización evolucionó a partir del entrecruzamiento (Schemske y Lande, 1985). También, dentro de una misma especie, el sistema de apareamiento puede variar en distintas poblaciones debido a factores ambientales y demográficos que afectan la

tasa de entrecruzamiento. Esto ocurre especialmente en especies polinizadas por animales, ya que la presencia de éstos puede variar, mientras que el viento es factor más constante (Awadalla y Ritland, 1997; Barrett y Charlesworth, 1991; Schemske y Lande, 1985; Vogler y Kalisz, 2001). Aunque los sistemas de apareamiento en la naturaleza representan un contínuo, existen tipos cuyas características propias requieren de enfoques distintos para su estudio, por lo que es importante saberlos distinguir.

Autofertilización predominante

Estas especies que son alrededor del 20% de todas las plantas vasculares, producen la gran mayoría de sus semillas por autopolinización (más del 80%), por lo que los puntos de mayor interés en el estudio de este tipo de plantas es si existe entrecruzamiento, cuánto y cómo varía temporal y/o espacialmente, sobre todo para saber cómo mantienen estas especies algún nivel de variación y la capacidad de "responder" evolutivamente a los cambios ambientales (Schemske y Lande, 1985; Brown, 1990).

Entrecruzamiento predominante

Este sistema de apareamiento lo presentan muchas especies de plantas, ya que nunca o casi nunca se autofertilizan, produciendo más del 80% de sus semillas por apareamientos con individuos diferentes (entrecruzamiento). Este sistema de apareamiento caracteriza a las especies dióicas (sexos separados) o a las monóicas (sexos en la misma planta) que poseen formas de autoincompatibilidad o algún otro mecanismo que promueva el entrecruzamiento. En este caso, los aspectos del sistema de

apareamiento que hay que considerar es si existe algún grado de endogamia, ya sea por autofertilización o por apareamiento entre parientes, o variación en la fertilidad masculina o femenina (Brown, 1990).

Sistema de apareamiento intermedio

El sistema de apareamiento intermedio es el que presenta tasas variables de entrecruzamiento y autofertilización, presentándose en varios niveles como: en distintas poblaciones aisladas, como procesos de colonización; en poblaciones contiguas; en distintas plantas dentro de las poblaciones; en distintos frutos de la misma planta y en diferentes semillas en un mismo fruto (Brown, 1990). El sistema de apareamiento intermedio se ha utilizado para construir los modelos matemáticos enfocados al estudio de la evolución de los sistemas de apareamiento, ya que permite distinguir los procesos ecológicos y evolutivos que dan lugar a la variación en los sistemas de apareamiento y el mantenimiento de los sistemas más estables.

Apomixis (o agamosperma) facultativa u obligada

La apomixis se refiere a la formación de semilla sin meiosis y fertilización, por lo que es una forma de reproducción uniparental. Este fenómeno no aumenta la homocigosis, por lo que su efecto sobre la estructura genética de las poblaciones es distinto a la endogamia, y más parecida a la reproducción vegetativa.

Autofecundación haploide (o apogamia)

La autofecundación haploide es lo contrario a la apomixis en el sentido de que genera un completo homócigo en un solo paso; se ha observado en helechos y otras

plantas que presentan gametofitos (haploides) de vida libre. En este caso se da la formación de anteridios y arquegonios en el mismo gametofito. Estos se autofecundan y producen un cigoto diploide completamente homocigoto (Brown, 1990).

1.2.3 Depresión por endogamia

La depresión por endogamia se define como la reducción de los valores promedio de adecuación de la progenie, producida por un evento de endogamia. Se debe, por un lado, a la acumulación de alelos deletéreos, o por otro lado, a la homocigosis (Futuyma, 1998). Este es un fenómeno importante, ya que es la principal fuerza que dirige la evolución de los sistemas de apareamiento (Schemske y Lande, 1985). En particular cobra gran importancia en el cultivo de plantas con interés económico, y recientemente en programas de conservación *in situ* y *ex situ*, ya que la presencia de depresión por endogamia significa menor vigor y fecundidad. La depresión por endogamia, a raíz de la autofertilización, se describe como la desventaja adaptativa de la progenie producto de autocruza, relativa a la progenie producto de entrecruzamiento $\delta = 1 - \left(\frac{w_s}{w_c}\right)$ donde w_s y w_c son los valores de adecuación para la progenie autofertilizada y la entrecruzada (Schemske y Lande, 1985; Williams y Savolainen, 1996). Para poder entender la depresión por endogamia y sus efectos, es importante conocer su base genética. Los modelos genéticos de depresión por endogamia consideran a dos alelos para un mismo locus, al valor de adecuación (w), el coeficiente de selección para cada genotipo (s) y el grado de dominancia (h) (Williams y Savolainen, 1996). Los principales modelos de depresión por endogamia son los siguientes:

Sobredominancia:

En este modelo, los heterócigos poseen mayor adecuación que los homócigos, por un efecto sinérgico entre los alelos alternativos. Este modelo no explica la mayoría de los casos de depresión por endogamia, pero sí existen algunos loci sobredominantes que puedan influenciar la adecuación, como se ha visto en los trabajos sobre *P. taeda* (Williams y Savolainen, 1996; Remington y O'Malley, 2000a). Con la sobredominancia como causa de la depresión por endogamia, la adecuación promedio disminuye con cada generación endógama debido al aumento de homócigos. Coeficientes de selección simétricos mantendrán el polimorfismo, pero coeficientes de selección asimétricos fijarán el alelo con mayor adecuación en el estado homócigo (Williams y Savolainen, 1996).

Dominancia parcial

En este caso la depresión por endogamia es debida a la expresión de alelos deletéreos o letales, recesivos o parcialmente recesivos en el estado homócigo. Así, como la endogamia aumenta en número de individuos homócigos, todos aquellos individuos homócigos para estos alelos deletéreos presentarían una disminución en la adecuación o morirían (Williams y Savolainen, 1996; Ritland, 1996). A los alelos mutantes que causan la muerte de un individuo en la población cuando están en estado homócigo, se les conoce como equivalentes letales (Remington y O'Malley, 2000a; Kärkkäinen et al., 1996). En este caso, al pasar varias generaciones con endogamia, los alelos deletéreos pueden ser eliminados o purgados de la población, fijando a la larga, los alelos normales, y disminuyendo la depresión por endogamia (Williams y Savolainen, 1996). El purgamiento solamente puede ser eficiente

cuando aumenta el número de individuos homocigos, ya que estos alelos deletéreos son silenciosos en estado heterocigo y si los coeficientes de selección son altos; si son bajos y actúa la deriva génica, algunos alelos deletéreos podrían fijarse (Williams y Savolainen, 1996; Remington y O'Malley, 2000a; Remington y O'Malley, 2000b).

Sobredominancia aparente o sobredominancia asociativa

Este modelo se basa en la observación de que algunos marcadores poseen una correlación con caracteres relacionados con la adecuación, lo cual produce un exceso de heterocigos (Bierne et al., 2000). Esto puede darse por varios factores: 1) la pseudo-sobredominancia puede darse por dos loci ligados, con alelos ventajosos, en la fase de repulsión de los cromosomas; 2) cuando los efectos selectivos en contra de un locus deletéreo causan un exceso de heterocigos en otro y 3) debido a correlaciones entre genotipos, cuando un individuo es heterocigoto en un locus, generalmente es heterocigoto en otro locus (Williams y Savolainen, 1996). Estudios recientes han relacionado a los cuellos de botella, alta depresión por endogamia y variación en los niveles de autofertilización con la ocurrencia de la sobredominancia asociativa (Bierne et al., 2000). Este fenómeno se ha visto principalmente en pinos, peces salmónidos y bivalvos (Remington y O'Malley, 2000a; Bierne et al., 2000).

Epistásis:

Se refiere a la interacción entre varios loci que contribuyen a la depresión por endogamia, siempre y cuando las interacciones sean entre alelos dominantes en distintos loci o entre alelos dominantes y aditivos (Williams y Savolainen, 1996).

1.2.4 Evolución de los sistemas de apareamiento

La evolución del sistema de apareamiento depende de factores controlados genéticamente, como la depresión por endogamia y de mecanismos precigóticos que evitan que la fertilización por polen de la misma planta polinize los óvulos determinados por genes modificadores del sistema de apareamiento (Clegg y Epperson, 1988). Entre estos mecanismos están los relacionados con la fenología, como la protandria y la protoginia, donde las flores masculinas o femeninas maduran antes que las del sexo opuesto en la misma planta. Existen también barreras anatómicas, como la heterostilia, donde las flores, a pesar de ser bisexuales, son incapaces de autopolinizarse, por la disposición del estilo y las anteras; otro mecanismo es la autoincompatibilidad que impide que el polen con el mismo genotipo de la flor receptora, germine, y por lo tanto, fertilice algún óvulo (Kärkkäinen et al., 1996; Schemske y Lande, 1985; Ritland, 1996; Futuyma, 1998).

La depresión por endogamia es el principal mecanismo postcigótico de selección contra los individuos producto de autofertilización, y es la intensidad de este fenómeno lo que dirige finalmente la evolución de un sistema de apareamiento en particular y en última instancia de los mecanismos precigóticos que lo mantienen (Schemske y Lande, 1985).

Existe una relación directa entre la depresión por endogamia y la tasa de autofertilización, ya que generalmente las poblaciones que históricamente mantienen una tasa de entrecruzamiento alta, poseen una depresión por endogamia mayor al 50%, mientras que aquellas poblaciones, generalmente pequeñas y aisladas, que mantienen tasas de autofertilización altas, tienen una depresión por endogamia menor al 50% (Schemske y Lande, 1985). Esto último se debe a que si una población su-

fre endogamia por un tiempo suficientemente largo, por ejemplo, debido a un cuello de botella, los genes deletéreos pasarían del estado heterócigo al homócigo y serían eliminados de la población, reduciendo así la carga genética y por consiguiente, la depresión por endogamia (Barrett y Charlesworth, 1991; Morgante et al., 1991; Kärkkäinen et al., 1996; Lande y Schemske, 1985; Schemske y Lande, 1985). Este purgamiento de genes deletéreos sólo es eficiente si su coeficiente de selección en contra es alto, como en el caso de alelos letales, y si la tasa de mutación no es lo suficientemente alta como para restaurar la carga genética antes de que el purgamiento de alelos deletéreos pueda modificar las tasas de entrecruzamiento (Remington y O'Malley, 2000a; Williams et al., 1999). Es este equilibrio entre mutación y purgamiento el que mantiene los sistemas de apareamiento, ya que cualquier ventaja en la fecundidad debida a la autopolinización, que superara las desventajas de la depresión por endogamia, fijaría este sistema de apareamiento (Lande y Schemske, 1985; Schemske y Lande, 1985; Kärkkäinen et al., 1996; Futuyma, 1998; Schultz y Willis, 1995; Clegg y Epperson, 1988).

La evolución de la autofertilización como sistema de apareamiento tiene las siguientes ventajas: seguridad reproductiva en ambientes cambiantes, perpetuación de genotipos con alta adecuación, conservación de energía y capacidad de colonizar nuevos hábitats (Futuyma, 1998; Lande y Schemske, 1985; Schultz y Willis, 1995). Sin embargo, incluso las especies que tienen a la autofertilización como sistema de apareamiento, presentan "vigor híbrido" y heterosis cuando se entrecruzan dos líneas puras y, por lo general, son los individuos más variables los involucrados en eventos de colonización (Schemske y Lande, 1985); mientras que las especies con entrecruzamiento predominante presentan autofertilización ocasional, lo que indica que la determinación de los sistemas de apareamiento depende no sólo de mecanismos

genéticos altamente heredables, sino también de condiciones ambientales y demográficas, que evitan que el sistema de apareamiento se fije en autocruza o entrecruza obligada (Kärkkäinen et al., 1996; Ledig, 1998; Lande y Schemske, 1985; Schemske y Lande, 1985; Morgante et al., 1991).

1.3 Sistemas de apareamiento en pinos

Los pinos tienen una alta variación genética en niveles inter e intrapoblacionales y esto es el resultado de su sistema genético y reproductivo (Ledig, 1998). Además, existen ciertos factores que les dan características particulares. Por ejemplo, el polen, y en muchos casos, las semillas son dispersados por viento, lo que le da cohesión a las poblaciones; permite el flujo genético a grandes distancias y la fundación de nuevas poblaciones. En otros casos las semillas se dispersan por animales, lo que promueve que los parientes estén agrupados (Farjon y Styles, 1997; Ledig, 1998; Vander-Wall, 1992).

1.3.1 Reproducción en pinos

El sistema reproductivo de los pinos se considera exclusivamente sexual, ya que se han reportado muy pocos casos de reproducción clonal dentro de este género (Ledig, 1998). La maduración de los estróbilos empieza en primavera, a partir de los primordios, en un periodo de dos a tres semanas. Los estróbilos masculinos liberan el polen y los femeninos entran al estado receptivo, la fertilización ocurre un año después de la polinización (Ledig, 1998). El megasporocito sufre meiosis más o menos al mismo tiempo en que los conos masculinos liberan el polen, sólo una

célula persiste y da origen al megagametofito y al óvulo. Cada óvulo se encuentra en un arqueogonio, pero puede haber arquegonios múltiples en una semilla (Ledig, 1998; Williams et al., 2001). Mientras los arquegonios maduran, el tubo polínico se desarrolla rápidamente, promovido por secreciones del óvulo, hasta que llega a las células del cuello del arqueogonio y descarga su contenido en la vacuola receptiva del óvulo. Como muchos granos de polen pudieron haber llegado a la cámara polínica, cada uno de los múltiples arquegonios puede fertilizarse, lo que da lugar a una competencia entre embriones (Ledig, 1998). La mayoría de los individuos producto de autofertilización muere en la competencia embrionaria y no en la fase cigótica (Williams et al., 2001). Durante la embriogénesis, el megagametofito (haploide y con el mismo genotipo del óvulo), provee al embrión y a la futura plántula de elementos nutritivos.

1.3.2 Características genéticas y de sistema de apareamiento

Los pinos presentan, en general, una tasa de entrecruzamiento superior al 90%, a pesar de ser monóicos, autocompatibles y no contar con mecanismos precigóticos efectivos para evitar la autopolinización (Ledig, 1998). Así, la autocruza en estos organismos es una consecuencia natural de su reproducción, y sus niveles pueden ser en realidad más altos que los reportados, debido a que no se puede determinar la cantidad de autofertilización en el estadio de cigoto (Williams y Savolainen, 1996). Además, los pinos presentan una fuerte depresión por endogamia, debido a que poseen en promedio de 5 a 10 equivalentes letales, que eliminan a muchos de los embriones productos de autofertilización, dando como resultado una viabilidad menor de aquellas semillas y un exceso de semillas producto de entrecruzamiento (Mor-

gante et al., 1991; Eguiarte y Piñero, 1990; Schemske y Lande, 1985; Kärkkäinen et al., 1996; Ledig, 1998).

Esta depresión por endogamia se presenta en etapas tempranas, especialmente durante el desarrollo de la semilla, dando como resultado semillas vacías, si es que la competencia embrionaria eliminó a todos los homólogos (Williams y Savolainen, 1996). Se puede estimar el número de equivalentes letales en una especie con base en el porcentaje de semillas llenas vs. vacías, producto de entrecruzamiento y de autofertilización o utilizando mapeo genómico con marcadores moleculares (Remington y O'Malley, 2000a; Williams et al., 1999; Williams y Savolainen, 1996). Los pinos tienen mayor número de equivalentes letales que muchas otras especies (Williams y Savolainen, 1996) debido a la alta tasa de mutación presente en este género, dada en parte por su longevidad y la falta de una línea germinal que permite el paso de mutaciones somáticas a las siguientes generaciones (Williams y Savolainen, 1996; Klekowski y Godfrey, 1989). Muchos de los alelos relacionados con la viabilidad de las semillas no son completamente letales, ya que su efecto puede ir de letal a semi-letal o sólo causar una baja en la adecuación. Es por ello, que en las futuras generaciones de individuos, aumentaría la depresión por endogamia en lugar de disminuir como sucede por el purgamiento de los alelos letales (Remington y O'Malley, 2000a). En la tabla 1.1 se muestra el número de equivalentes letales para varias especies de pinos. Cabe hacer notar que en muchos casos un número bajo de equivalentes letales, como en *Pinus resinosa* o *Pinus radiata* va ligado con cuellos de botella históricos o con distribuciones fragmentadas y poblaciones pequeñas, lo que sugiere que estos alelos han sido eliminados de las poblaciones (Williams y Savolainen, 1996), mientras que en las especies de distribuciones amplias y continuas, como las de climas templados y boreales, se espera un mayor número de

equivalentes letales (Williams et al., 1999). Sin embargo, no existe un patrón claro, sino que el número de equivalentes letales en una población depende de la historia evolutiva particular de la misma. Por ejemplo, se ha reportado que en el caso de *Pinus patula*, una especie de pino neotropical con distribución fragmentada, posee de 6 a 8 equivalentes letales, un número similar al de *Pinus sylvestris*, una especie de amplia distribución. Esto sugiere un mecanismo de purgamiento ineficiente o una tasa de mutación muy alta que restituye la carga genética, manteniendo la depresión por endogamia en esta especie y contrario a lo que se esperaría para una especie con distribución fragmentada (Williams et al., 1999).

Tabla 1.1: Número de equivalentes letales en varias especies de pinos .

Especie	No. de equivalentes	Distribución
<i>Pinus radiata</i>	3.3	endémico-fragmentada
<i>Pinus resinosa</i>	0.1	amplia-cuellos de botella
<i>Pinus sylvestris</i>	6.2	amplia- Norte de Europa
<i>Pinus sylvestris</i>	8.5	amplia-Sur de Europa
<i>Pinus virginiana</i>	10.4	amplia
<i>Pinus patula</i>	7	neotropical-fragmentada

Referencias: (Williams y Savolainen, 1996; Williams et al., 1999; Kärkkäinen et al., 1996)

Aunque la depresión por endogamia en pinos actúa principalmente a los embriones, también afecta otros estadios del ciclo de vida. Se ha reportado una tasa de mortalidad mayor en plántulas producto de autofertilización que de entrecruzamiento, aunque también puede afectar la tasa de crecimiento y la fecundidad (Remington y O'Malley, 2000a). *Pinus ponderosa* que presenta una reducción de 30% en el creci-

miento de individuos producto de autopolinización, y en *Pinus taeda* se ha reportado una reducción de la fertilidad también del 30% (Williams y Savolainen, 1996; Sorensen y Miles, 1982). Podría decirse que la depresión por endogamia, sobre todo en la etapa embrionaria es una barrera postcigótica contra la autofertilización y se compone principalmente por la presencia de alelos letales específicos a un estadio del ciclo de vida, que eliminan a los homócigos, disminuyendo así el número de embriones productos de autofertilización, sin que esto afecte mucho la cantidad de semillas, debido a la competencia embrionaria (Williams et al., 2001; Remington y O'Malley, 2000a; Remington y O'Malley, 2000b). Pero en el caso de que los alelos fueran semi-letales o sólo parcialmente deletéreos, la eliminación de los homócigos sólo dependería de la competencia con los individuos productos de entrecruzamiento y de su interacción con el ambiente (Kelley y Waller, 2002); por lo que, bajo ciertas condiciones, las barreras postcigóticas contra la autofertilización no son completas y pueden dar lugar a que un árbol produzca el 100% de sus semillas por autofertilización, como se ha visto en *Pinus radiata* y *Pinus contorta*, colonizadores en el Hemisferio Sur (Ledig, 1998; Remington y O'Malley, 2000a). Un ejemplo de esto último son los estudios en un árbol tropical, *Dalbergia sissoo*, que también presenta competencia embrionaria en sus frutos, se ha reportado que la competencia es menor cuanto más relacionados genéticamente están los embriones (Mohana et al., 2001). Esto sugiere que si el árbol materno sólo se autofertiliza en una pequeña proporción, la competencia entre embriones producto de entrecruza y autocruza sería más severa; mientras que si la autopolinización es frecuente y predominante, los embriones resultantes serían genéticamente muy similares y la competencia entre ellos sería menor, por lo que muchos llegarían a sobrevivir (Mohana et al., 2001). Considerando lo anterior, se esperarían también cierta flexibilidad en el sistema de apareamiento

de los pinos, dada en parte por su alta fertilidad, que puede compensar e incluso enmascarar la depresión por endogamia (Kelley y Waller, 2002). Tal es el caso de *Pinus cembra* y *Pinus resinosa* que presentan tasas de entrecruzamiento del 70%, considerablemente menores al 90% promedio de las coníferas (Ledig, 1998). Además se han reportado variaciones de la tasa de entrecruzamiento a nivel geográfico, como en *Pinus leucodermis*, que tiene tasas de entrecruzamiento de 62-88% dependiendo de la población, o de *Pinus sylvestris*, cuyas poblaciones más septentrionales poseen menor carga genética y menor tasa de entrecruzamiento que las poblaciones de más al sur (Morgante et al., 1991; Kärkkäinen et al., 1996).

El hecho de que ciertas especies de pinos presenten mayor autocruza que el promedio de las coníferas en condiciones naturales, tiene varias consecuencias: la endogamia aumenta la homocigocis sin alterar las frecuencias alélicas (Eguiarte y Piñero, 1990); aumenta la probabilidad de expresión de los alelos deletéreos y disminuye la variabilidad neutral y el tamaño efectivo de la población (Viard et al., 1996). También los cuellos de botella reducen la diversidad genética, causando en general los mismos efectos que la endogamia, y dan paso a la fijación de alelos deletéreos por deriva génica, pudiendo poner en peligro la supervivencia de la población (Lukiart et al., 1998; Remington y O'Malley, 2000a; Viard et al., 1996). No obstante, los cuellos de botella pueden llegar a permitir el purgamiento de los alelos deletéreos, reduciendo así la carga genética y la depresión por endogamia asociada a ésta, favoreciendo la autofertilización como sistema de apareamiento o al menos alterando las tasas de entrecruzamiento de la población (Schemske y Lande, 1985). Esto último sólo sería posible si la tasa de mutación es menor que la tasa en que los alelos deletéreos son removidos, ya que si está en equilibrio, como es posible en el caso de *Pinus patula*, el número de equivalentes letales se mantiene a pesar de que exista cierto grado de

purgamiento (Williams et al., 1999).

En resumen, el sistema de apareamiento de los pinos, tomando en cuenta los eventos de fertilización, es del tipo intermedio, ya que no hay barreras previas que eviten que el polen de un mismo árbol fertilice los óvulos, pero el resultado a nivel de semillas es de entrecruzamiento predominante, debido a la fuerte depresión por endogamia (Williams y Savolainen, 1996) y a que, por tener los sexos separados dentro de la misma planta y polinización por viento, siempre habría un porcentaje de polen dedicado al entrecruzamiento, por lo que la adecuación debida a la reproducción de un individuo que se autopoliniza en gran medida, también estaría dada por la progenie que produzco por su contribución de polen a otros árboles (Holsinger, 1992).

1.4 La especie

1.4.1 Localización, hábitat y ecología

Pinus maximartinezii es considerado el pino con la distribución más restringida del mundo, ya que sólo cuenta con una población identificada. Se localiza en el Sur del estado de Zacatecas y comprende un área de 5 a 10 km² en la Sierra de Morones (figura 1.2), pero sobre todo en el Cerro de Piñones que se encuentra al oeste del poblado de Pueblo Viejo (21° 21' 15" N, 103° 21' 22" W), municipio de Juchipila. Tiene un rango altitudinal de 1800-2400 msnm, con una precipitación anual de 700-800 mm (Perry, 1991). El suelo está muy pobremente desarrollado y las rocas presentes son principalmente areniscas, calizas y algunas metamórficas (Farjon y Styles, 1997). El tipo de vegetación en esta zona es muy heterogéneo, ya que en las laderas, *Pinus maximartinezii* se asocia con *Quercus macrophylla*. En las caña-

das y cerca de arrollos, con fresnos y vegetación riparia y en lo alto de la meseta sólo se encuentran algunos arbustos espinosos y cactáceas. La única especie de pino asociado a *P. maximartinezii* fueron algunos individuos de *P. lumholtzii* (Perry, 1991).

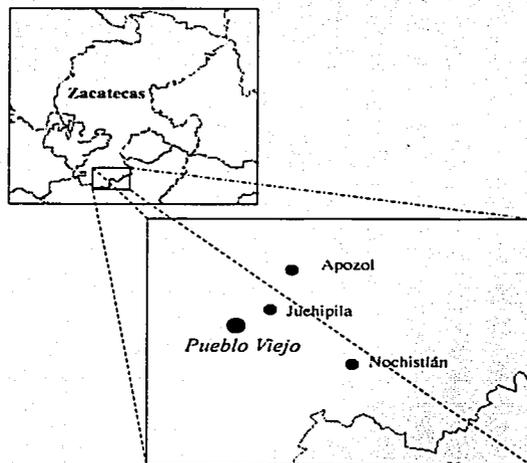


Figura 1.2: Localización de la única población de *Pinus maximartinezii*

La liberación del polen es generalmente en los meses de mayo y junio y los conos femeninos toman de 18 a 24 meses para madurar, lo que ocurre generalmente en los meses de agosto y septiembre, que coincide con el final de la época de lluvias (Farjon y Styles, 1997). La mayoría de las semillas permanecen en los conos por lo que tal vez sean animales los dispersores de las semillas. Se ha sugerido que existe

poca regeneración en la población de *P. maximartinezii* debido al fuego recurrente y al pastoreo (Farjon y Styles, 1997; Perry, 1991), pero en el campo en septiembre del año 2000, se pudo observar la presencia abundante de plántulas (se supuso que habían germinado ese año, ya que tenían todavía los cotiledones) y de muchos individuos juveniles ya con hojas secundarias [obs. personal].

1.4.2 Clasificación

La clasificación de *Pinus maximartinezii* Rzedowski, según Farjon y Styles (1997) es:

Género: *Pinus*

Subgénero: *Strobus*

Sección: *Parryanae*

Pinus maximartinezii

En esta clasificación se incluye a *P. rzedowskii*, mientras que Price et al. (1998) clasifica a *P. maximartinezii*, dentro de la Sección *Parrya*, Subsección *Cembroides*, junto con *P. nelsonii* y *P. pinceana*, quedando *P. rzedowskii* en la Subsección *Rzedowskianae*.

Otros análisis más recientes utilizando la región ITS (internal transcribed spacer) del ADN ribosomal nuclear (Gernandt et al, 2001) agrupa a *P. maximartinezii* con *P. pinceana* y *P. rzedowskii*, que forman el grupo hermano de los miembros de la subsección *Cembroides*, pero las relaciones entre ellos no están muy claras todavía, sólo se mantiene su posición basal en el clado, por lo que se considera a estas especies como relictuales.

1.4.3 Descripción

Los árboles de *P. maximartinezii* (figura 1.3) son de pequeños a medianos (de 5 a 15 m. de altura y un diámetro a la altura del pecho de 40-50 cm.). El tronco es monopodial pero ramifica abundantemente dándole a la copa una apariencia redondeada (Perry, 1991). Los fascículos constan de 5 acículas de 7 a 11 cm de largo, de un verde azulado. La vaina del fascículo es semipersistente y se recurva hacia atrás formando una roseta. Los conos de polen se encuentran en la mitad proximal de los meristemas apicales, miden de 8-10 mm y son amarillentos. Los conos femeninos son laterales en las ramas terminales, ovales-cilíndricos de 14-27cm de largo y 10-12 cm de ancho, al madurar son amarillo ocre y pueden pesar hasta 3 kg. Las escamas son masivas, de 35 a 50 mm de ancho, apófisis piramidales, umbo sin espinas de 10-15 mm de ancho. Las semillas son las más grandes que cualquier pino (2-2.5 cm de largo), con un ala vestigial (Farjon y Styles, 1997; Perry, 1991).



Figura 1.3: Individuo adulto de *Pinus maximartinezii* en Cerro de Piñones, Zacatecas. ¹

1.4.4 Antecedentes de estudios genéticos

Sólo existe un antecedente de estudios de variabilidad genética y de sistema de apareamiento para *P. maximartinezii* y es el realizado por Ledig et al. (1999), con isoenzimas. En ese trabajo se reporta un número de loci polimórficos de 30.3% y una heterocigosis esperada de 0.122 y observada de 0.11, comparable a la de otros pinos y especialmente a la reportada para *P. pinceana* (0.128-0.187), también con isoenzimas (Ledig et al., 1999). El trabajo de Ledig et al. (1999) es importante porque señala características genéticas muy peculiares en esta especie, como el hecho de haber encontrado sólo un máximo de dos alelos por locus, y frecuencias alélicas intermedias en su mayoría (0.5:0.5) y la presencia de desequilibrio de ligamiento significativo en los embriones. A partir de estos últimos datos, y especialmente basados en el desequilibrio de ligamiento obtenido en los embriones, se supuso que *P. maximartinezii* sufrió un cuello de botella muy severo hace aproximadamente 1000 años, seguido de una expansión demográfica acelerada que restauró los niveles de variación a los observados hoy en día (Ledig et al., 1999).

En cuanto al sistema de apareamiento, se ha reportado una tasa de entrecruzamiento de $t_m=0.816$ y $t_s=0.761$, pero con variaciones que iban de $t_m=0.42$ a 1.00, y un porcentaje de semillas llenas de 90.3% para los individuos con menor tasa de entrecruzamiento (42-46%) y de 72.6% para los que presentan mayor tasa de entrecruzamiento, lo que sugeriría poca carga genética (Ledig et al., 1999). En parte, el presente trabajo intenta corroborar esa información utilizando otros marcadores y arrojar luz sobre la depresión por endogamia en esta especie.

¹Foto: Lev Jardón

1.5 Modelos y herramientas para el estudio del sistema de apareamiento

1.5.1 Modelos

Modelo de apareamiento mezclado

Uno de los principales modelos que se han utilizado para el estudio de los sistemas de apareamiento es el modelo de apareamiento mezclado (Brown, 1990). En este modelo, la progenie de cada genotipo materno representa un grupo que se deriva de óvulos que se entrecruzan con una probabilidad t , con el polen que tiene frecuencias génicas p y se autofertilizan con una probabilidad $s=1-t$. Los supuestos son que no hay cambios genéticos debidos a la mutación y la selección después de la fertilización, así como la variabilidad de las frecuencias génicas del polen y el apareamiento selectivo (Ritland y Jain, 1981). Este primer modelo se hizo con un solo locus, sin embargo esto introduce un sesgo en las estimaciones, ya que no considera los apareamientos no al azar y sobre todo no permite distinguir los eventos de autofertilización del apareamiento entre parientes. Por ello se introdujo un modelo de estimación de las tasas de entrecruzamiento multilocus (Brown, 1990; Ritland y Jain, 1981; Ritland y El-Kassaby, 1985). Así, al modelo original se añade la estimación de la autofertilización efectiva, dada por: $E = F s_i + (1 - F) s_o$, donde s_i es la tasa de autofertilización para los padres endógamos (parientes) y s_o es la tasa de autofertilización de los padres no emparentados (Brown, 1990).

Paternidad

Otras aproximaciones a la caracterización genética de los sistemas de apareamiento, que también han tenido un impacto sustancial en otras disciplinas, son los análisis de paternidad. En ecología y biología evolutiva, los análisis de paternidad nos muestran las desviaciones de la panmixia que ocurren en poblaciones naturales, así como permiten distinguir eventos de apareamiento selectivo, diferencias en el éxito reproductivo de los individuos, etc. (Brown, 1990).

Correlación de apareamientos

La correlación de apareamientos, permite establecer la relación genética entre los hijos de una misma madre utilizando dos estimadores: la correlación de la autofertilización (r_s) y la correlación de la paternidad (r_p). Estos conceptos surgieron a partir de que dos hermanos maternos, en una población que presente autofertilización parcial, pueden ser fruto de los siguientes eventos: 1) Ambos son producto de autofertilización ó 2) Uno es producto de autofertilización y uno es producto de entrecruzamiento. Si ambos son producto de entrecruzamiento, pueden ser: a) hermanos completos, o b) medios hermanos (distinto padre) (Ritland, 1989).

Así, r_s nos indica la varianza entre la autofertilización en una familia, es decir, nos dice hasta qué punto dos hermanos maternos pueden ser producto del mismo tipo de apareamiento (entrecruzamiento o autofertilización); r_p se refiere a la proporción de hermanos completos dentro de todos los hermanos producto de entrecruzamiento (Ritland, 1989). Por ejemplo, si $r_s = 1$, los pares de hermanos son los dos producto de entrecruzamiento o de autofertilización y si $r_p = 1$, todos los hermanos productos de entrecruzamiento, son hijos también del mismo padre (hermanos completos). Para

la estimación de los apareamientos correlacionados, se necesita conocer los niveles de endogamia en la generación parental y filial, con f como la correlación de los genotipos paternos (probabilidad de identidad por descendencia de dos gametos en la progenie) y F como el coeficiente de endogamia de los padres (Ritland, 1989):

$$rp = \left(\frac{2}{1+F} \right) f$$

Determinar el grado de parentesco entre los hermanos maternos adquiere importancia en los casos en que los hermanos interactúen o compitan (Brown, 1990; Sweigart et al., 1999).

Depresión por endogamia

Como la depresión por endogamia es el principal fenómeno que dirige la evolución de los sistemas de apareamiento (Schemske y Lande, 1985), hacer inferencias sobre la magnitud de la depresión por endogamia es importante para su mejor comprensión. Tradicionalmente, estas inferencias se hacían comparando la viabilidad y fecundidad de individuos con niveles de endogamia distintos, pero conocidos (Ritland, 1990), lo cual implicaba en muchos casos cruza controladas y estudios a largo plazo, sobre todo con especies forestales (Kärkkäinen et al., 1996). Esto último dificulta los estudios en poblaciones naturales y en organismos no modelo. Por eso se ha hecho otra aproximación al estudio de la depresión por endogamia, basado en la observación de que la depresión por endogamia y la homocigosis, en una población con autofertilización parcial, producida por eventos de autofertilización, disminuye conforme al paso del tiempo en una misma generación, es decir, si se pudiera seguir a una cohorte de individuos desde su estado embrionario hasta el estado adulto, la depresión por endogamia y la homocigosis se espera menor en los adultos (Kelley

y Waller, 2002; Lande y Schemske, 1985; Ledig, 1998). El coeficiente de endogamia de Wright o índice de fijación (F) mide directamente el exceso de homocigosis causada por la endogamia y especifica las frecuencias genotípicas de la población :

$$Freq(A_i A_i) = p_i^2(1 - F) + p_i F$$

$$Freq(A_i A_j) = 2p_i p_j(1 - F)$$

donde p_i es la frecuencia del alelo i (Ritland, 1990).

Generalmente la F en los cigotos es mayor que la F de los padres. Si esto continuara, a la larga llegaría a ser $F=1$. Esto no sucede porque en presencia de depresión por endogamia, se contrarresta el incremento de F y permite construir un modelo para estimar la intensidad de la selección (w) contra individuos producto de autofertilización, a partir de los cambios de F , en varias generaciones (Ritland, 1990). Este modelo requiere de las estimaciones de F para dos generaciones consecutivas y de s (tasa de autofertilización) para la generación parental, o del estimado de F y s de los parentales, si se supone que F se mantiene constante: $w = 2 \left(\frac{(1-s)F}{s(1-F)} \right)$. Esta última suposición tiene sus sesgos, ya que se basa en que la generación parental es producto del entrecruzamiento (lo que no es realista, ya que la tasa de entrecruzamiento puede variar temporalmente y espacialmente) debido a muchos factores, como ambientales y de fenología, entre otros (Ritland, 1990; Schemske y Lande, 1985).

1.5.2 Uso de microsatélites para caracterizar sistemas de apareamiento

Los microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencia simple (SSRs), consisten en unidades repetitivas contínuas de 1 a 10 pares de bases, como (AG) $_n$ o (AAT) $_n$, que pueden medir hasta un 1Kb de largo (Ciofi et al., 1998; Chambers y

MacAvoy, 2000). Este tipo de secuencias están ampliamente distribuidas en todos los organismos donde se han buscado y son excelentes marcadores moleculares para estudios poblacionales y de sistema de apareamiento, debido a su alto nivel de polimorfismos, su codominancia y su herencia biparental en el caso de los microsatélites nucleares (Ciofi et al., 1998; Lian et al., 2001). Los microsatélites surgen al azar en regiones del genoma donde las secuencias de ADN repetido ya son abundantes y mutan por el corrimiento de las cadenas de ADN durante el apareamiento, en la síntesis de ADN (Chambers y MacAvoy, 2000). Una de las dos cadenas forma una horquilla, provocando que la DNA polimerasa añada o elimine una unidad de repetición en la cadena nueva (Schlötterer, 2000; Chambers y MacAvoy, 2000). El modelo más aceptado de evolución de los microsatélites es el de mutación paso a paso, sin embargo, evidencia empírica muestra que los patrones de evolución pueden ser muy variables, incluyendo mutaciones puntuales, recombinación y duplicaciones y por lo que en algunos casos se usa el modelo de alelos infinitos (Karhu et al., 2000).

En pinos se han aislado 20 loci de microsatélites para *Pinus thunbergii* (Vendramin et al., 1996), uno en la mitocondria y numerosos loci nucleares para *Pinus taeda*, *P. radiata*, *P. lambertiana*, *P. strobus* y *P. densiflora* (Lian et al., 2001; Karhu et al., 2000; Elsik et al., 2000; Echt et al., 1996; Echt et al., 1999). En el caso de los microsatélites de cloroplasto, éstos se encuentran altamente conservados, especialmente la región flanqueante a las repeticiones, lo que permite su amplificación en muchas especies del género (Powell et al., 1995). Sin embargo, en el caso de los microsatélites nucleares, la amplificación de un locus con iniciadores desarrollados para otras especies resulta difícil, debido a la mayor tasa de mutación del núcleo con respecto al cloroplasto en pinos, a eventos de recombinación y a la organización del genoma de las coníferas, con ADN altamente repetitivo (Kutil y Williams, 2001). Para

superar este problema, recientemente se han reportado varios loci de microsatélites compartidos entre varias especies de pinos (Kutil y Williams, 2001; Karhu et al., 2000). especialmente los compuestos de repeticiones de trinucleótidos, que están más conservados y tienden a producir menos alineaciones inespecíficas durante la amplificación (Ciofi et al., 1998; Kutil y Williams, 2001).

Los marcadores moleculares usados en un principio para el estudio de sistemas de apareamiento eran las isoenzimas, pero su bajo polimorfismo requería tamaños de muestra muy altos (Ritland, 2002) y no permitían distinguir entre eventos de autofertilización y apareamiento entre parientes (Collevatti et al., 2001). Sin embargo, el uso de microsatélites nucleares, debido a su alto polimorfismo y codominancia, brinda mayor sensibilidad para detectar entrecruzamiento y asignar paternidad en poblaciones naturales (Lian et al., 2001).

1.6 Justificación

La única población de *Pinus maximartinezii* ha sufrido mucho disturbio, ya sea por su vulnerabilidad a los incendios como por el pastoreo y tala para obtener leña (Perry, 1991). También es una fuente importante de semillas para el consumo humano y viveros, ya que es una especie valorada como planta de ornato. Actualmente se ha calculado el tamaño poblacional en menos de 10000 árboles, pero otros autores señalan que el número de individuos reproductivos puede ser de 2000 a 2500 (Ledig et al., 1999; Perry, 1991). Por esto último se ha incluido a esta especie en la lista de especies en peligro de extinción en México, publicada en el Diario Oficial de la Federación (DOF) y resulta necesario conocer más la estructura genética y el sistema de apareamiento, no sólo para poder diseñar una estrategia de conserva-

ción adecuada, sino para también tener un esquema de aprovechamiento sustentable de esta especie con importancia comercial. En particular, el conocimiento del sistema de apareamiento y de los niveles de depresión por endogamia es importante, ya que bajo un esquema de conservación *ex situ* y de reproducción en viveros para su venta, generalmente no se toma en consideración el grado de consanguinidad de las semillas ni las características genéticas de los individuos usados para su producción, y esto puede tener consecuencias nefastas para la conservación de los recursos genéticos de la especie, por ejemplo, si existiera gran depresión por endogamia y una carga genética alta que resultara en poca adecuación de los individuos y podría poner en peligro la persistencia de la población (Kelley y Waller, 2002; Schoen et al., 1998; Williams y Savolainen, 1996; Williams et al., 1999). Por lo general, se ha considerado que las especies de pinos neotropicales, como lo es *Pinus maximartinezii*, tienen en promedio menor carga genética que los pinos de zonas templadas y con distribuciones más amplias y continuas, sin embargo, estudios realizados en *Pinus patula* concluyeron que esta especie, con una distribución fragmentada, tiene la misma carga genética que las especies templadas y boreales (Williams et al., 1999), lo cual indica que no se puede establecer un esquema generalizado de conservación sin poseer antes más información sobre la genética de los pinos neotropicales, en especial de los pinos mexicanos.

En el caso de *Pinus maximartinezii* ya se han realizado algunos estudios de sistema de apareamiento y variabilidad genética utilizando isoenzimas (Ledig et al., 1999), pero al ser estos marcadores muy poco polimórficos, pueden enmascarar mucha variación existente en la especie, por lo que el uso de microsatélites nucleares tiene mayor sensibilidad para detectar patrones de estructura poblacional, entre los que se incluyen las tasas de entrecruzamiento, el apareamiento entre parientes y las varia-

ciones de . También, la comparación de los índices de fijación en distintos grupos de edades, visto en el marco del sistema de apareamiento, nos puede dar una idea de la intensidad de la depresión por endogamia presente en esta especie (Ritland, 1990). Por tanto, esta información puede aplicarse en la elaboración de esquemas de conservación *in situ* y *ex situ* adecuados para mantener la diversidad genética. Esta última es una aproximación al estudio de la depresión por endogamia en pinos, pero puede sentar las bases para estudios más completos que puedan aumentar nuestra comprensión de la especie y de los procesos evolutivos y demográficos que aseguran su supervivencia, y posiblemente determinen su capacidad de expansión y colonización de nuevos hábitats. Antecedentes de estudios demográficos indican que esta especie tiene crecimiento poblacional positivo [Lopez-Mata, com. personal] lo que podría aumentar su potencial como colonizador, como es el caso de *Pinus radiata*, otra especie con distribución restringida y que es un colonizador exitoso en el hemisferio Sur.

1.7 Objetivos

1.7.1 Generales

1. Determinar el sistema de apareamiento a nivel poblacional de *Pinus maximartinezii* utilizando microsatélites nucleares.
2. Obtener y comparar estimados de variabilidad genética e índices de fijación para tres estadios de vida de la especie.

1.7.2 Particulares

1. Obtener estimados de la tasa de entrecruzamiento multilocus (t_m), para un solo locus (t_s), el coeficiente de endogamia (F), el estimador de cruza entre parientes (t_m-t_s), la probabilidad de encontrar hermanos completos (r_p) y de la covarianza de las tasas de entrecruzamiento entre grupos de progenie (r_i).
2. Obtener parámetros de variación genética como heterocigosis observada y esperada y frecuencias alélicas para cada uno de los grupos de edades.
3. Determinar si existe exceso de heterocigos en cada grupo de edad, para cada locus y comparar los índices de fijación (F) observados con los esperados debido al sistema de apareamiento (F_e).
4. Determinar si existe heterogeneidad en las frecuencias alélicas del polen entre las familias, para corroborar si existe apareamiento al azar.
5. A partir de las diferencias entre índices de fijación en los estadios de vida, proponer la existencia de depresión por endogamia en la especie.
6. Proponer un esquema de conservación de esta especie endémica, considerando los datos genéticos y de sistema de apareamiento obtenidos.

1.8 Hipótesis

1. Al ser *Pinus maximartinezii*, una especie con una sola población de distribución tan reducida, se espera que tenga niveles de variación genética muy bajos y una tasa de entrecruzamiento menor al promedio de los pinos e igual que

otras especies de pinos con tamaños poblacionales reducidos y distribución fragmentada.

2. Debido a las características de su población y a un posible cuello de botella sufrido en el pasado (Ledig et al., 1999), se espera encontrar coeficientes de endogamia altos y poca evidencia de selección contra homocigotos y sin diferencias significativas en todos los grupos de edades (adultos, juveniles y embriones), lo que probablemente indicaría una depresión por endogamia débil.

Capítulo 2

MATERIALES y MÉTODOS

2.1 Colecta de material biológico

La única población de *Pinus maximartinezii* se encuentra en la Sierra de Morones, al Sur del estado de Zacatecas, cerca del poblado de Pueblo Viejo, a 12km al Su- roeste de Juchipila (Perry, 1991). El área total de distribución del *P. maximartinezii* es de alrededor de 72 ha (López Mata, comunicación personal), en una meseta que va de los 1900 a 2200 m.s.n.m. Se colectaron individuos de tres grupos de edades, 40 adultos, considerados como los individuos reproductivos, 41 juveniles, es decir, árboles jóvenes no reproductivos, que contaban tanto con hojas primarias como se- cundarias y 620 semillas, provenientes de 22 conos muestreados de entre los adultos colectados (1 cono por árbol), manteniendo la identidad entre las semillas y el árbol materno. Se extrajeron los embriones de las semillas, para que el tamaño de muestra no se redujera por baja eficiencia de germinación. Todo el material vegetal se al- macenó a -70°C hasta la extracción de ADN. Para los análisis se tomaron en cuenta todos los adultos y juveniles, y 9 familias, con aproximadamente 10 embriones cada una (Collevatti et al., 2001).

2.2 Extracción de ADN

Protocolo modificado de (Vázquez-Lobo, 1996):

1. Moler en un mortero 1g de tejido con nitrógeno líquido.
2. Agregar a 0.2 g de tejido, 1ml de buffer CTAB 2X (Tris-HCl 100mM pH 8, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, CTAB 2% y β -Mercaptoetanol 0.3%)
3. Recuperar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 min. a 4°C.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 μ l de buffer CTAB 2X. Incubar en un baño a 60°C durante 10 min
5. Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7000 rpm durante 12 min. a 4°C (o 15 min. hasta que el sobrenadante quede transparente).
6. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo y precipitar el ADN con $\frac{2}{3}$ del volumen final de isopropanol frío. Dejar reposar 12hrs a -20°C.
7. Centrifugar a 9000 rpm durante 5 min. a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
8. El botón debe limpiarse con 1ml de etanol al 70% frío y centrifugar a 7000 rpm durante 5 min.
9. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón con 200 μ l del dH₂O.

Para extraer ADN de tejidos con muchos polisacáridos (como los embriones) se usa el siguiente buffer de extracción en lugar del CTAB 2X descrito anteriormente: Tris-HCl 100mM pH 8, CTAB 2%, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, PVP (polivinilpirrolidona) 4%, ácido ascórbico 5mM, DIECA 5mM, β -Mercaptoetanol 1%).

2.3 Amplificación de microsátélites

Para este trabajo se probaron 14 nucleares iniciadores de *Pinus taeda*, *Pinus strobus* [apéndice A] (Elsik et al., 2000; Echt et al., 1996; Echt et al., 1999; Karhu et al., 2000), de los cuales 7 generaron regiones del tamaño aproximado del fragmento, sin embargo para el análisis final se utilizaron sólo 3 loci, porque las bandas que generaban fueron las más constantes y permitían una lectura más exacta.

Se usaron dos programas de PCR con distintas modificaciones dependiendo del primer. Se dividen básicamente en los programas para iniciadores de pinos duros y para pinos blandos. El programa de PCR general para iniciadores de *Pinus taeda* (Elsik et al., 2000) es: paso inicial a 94°C por 5 min., después 1 min. adicional a 94°C, alineación a 64°C por otro minuto y una extensión a 72°C por otro minuto, se hace un decremento de 0.5°C/ciclo hasta llegar a los 54°C (20 ciclos), posteriormente 20 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C y 1 min a 72°C. La extensión final es de 3 min a 72°C. Para los iniciadores de *Pinus strobus* (Echt et al., 1996; Echt et al., 1999) el programa es el siguiente: Dos ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 35 seg. a 70°C; 18 ciclos de 45 seg a 93°C, 45 seg a 59°C (con un decremento de 0.5°C hasta llegar a los 50°C) y 45 seg a 70°C; y otros 20 ciclos de 30s a 92°C, 30 s a 50°C y 1 min. a 70°C. La extensión final es de 5 min a 70°C.

Las condiciones de PCR para un volumen de 12µl se muestran en la Tabla 2.1(modificadas de (Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)):

Tabla 2.1: Concentraciones de los componentes para cada reacción de PCR

Componente	Concentración	Volumen
Tris-HCl (pH 8.4) 10X	33.33mM	2 μ l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.8mM	0.5 μ l
MgCl ₂	1.6mM	0.4 μ l
dNTPs	0.16mM	1.6 μ l
Primer F	0.4mM	0.5 μ l
Primer R	0.4mM	0.5 μ l
TaqPol	0.5U/reacción	0.5 μ l
ADN	0.125 ng	3 μ l

La visualización de los microsatélites se llevó a cabo usando electroforesis desnaturante en geles de acrilamida 6%, urea 7M, a 49°C y 60 W. El tiempo de corrida varió dependiendo del tamaño de los fragmentos (Echt et al., 1996; Echt et al., 1999), como se muestra en la tabla 2.2. Los detalles sobre la elaboración de los geles y la tinción con nitrato de plata están en el apéndice A. El tamaño de los alelos se determinó visualmente, usando como referencia un marcador de 10 pb.

Tabla 2.2: Iniciadores utilizados, tamaño del fragmento y tiempo de corrida

Locus	Primers	Tamaño*	T ^o C de alineación	Tiempo
RPS34b	F) CAGTGTCTCTTATCACAGCG	120-125	59	1:55
	R) GCACTATAATGAAATAGCGCA	(145-149)		
PtTX3013	F) GCTTCTCCATTA ACTAATTCTA	115-140	64	1:55
	R) TCAAAATTGTTTCGTAAAACCTC	(116-137)		
PtTX2123	F) GAAGAACCCACAAACACAAG	165-170	57	2:40
	R) GGGCAAGAATTCATGATAA	(195-207)		

* El tamaño esperado del fragmento está entre paréntesis

2.4 Análisis estadísticos

2.4.1 Sistema de apareamiento

Para el análisis de sistema de apareamiento, se determinó el genotipo del árbol madre y la progenie para cada una de las 9 familias. Estos datos se alimentaron en una matriz para el programa MLTR (Multilocus Mating System Program) (Ritland, 2002). Este programa además de basarse en el modelos de apareamiento mezclado, acepta datos con más de dos alelos por locus, lo que permite el uso de datos de microsatélites. El uso de estos marcadores hipervariables también permitió utilizar tamaños muestrales menores a los acustrumbrados en la evaluación de sistemas de apareamiento, ya que para microsatélites, el tamaño mínimo es de 50 individuos (Ritland, 2002). Este programa computó la tasa de entrecruzamiento multilocus (t_m), la tasa de entrecruzamiento para un solo locus (t_s) y las frecuencias alélicas del polen y los óvulos, utilizando un método de máxima verosimilitud y un *bootstrap* de 100 ré-

plicas [detalles sobre las fórmulas en Ritland y El-Kassaby, 1985 y Ritland, 2002]. Se realizó una prueba de heterogeneidad de las frecuencias alélicas (por locus) del polen para cada familia, elaborando una tabla de contingencia $n \times f$, donde n es el número de alelos de cada locus y f el número de familias, y aplicando una Chi cuadrada. La diferencia entre $t_m - t_s$ es un indicador de la ocurrencia de apareamientos entre parientes, ya que la tasa de entrecruzamiento multilocus (t_m) excluye la autofertilización aparente debida al apareamiento entre parientes, mientras la tasa de entrecruzamiento para un solo locus incluye toda la endogamia presente. Sin embargo, esta diferencia depende del número de loci empleados, por lo que puede ser subestimada (Ritland, 2002). Se probó si t_m y t_s eran significativamente diferentes usando una prueba de Z (Edmonson y Druce, 1996).

En lo referente a la correlación entre apareamientos se computaron dos estimados : r_p que es la probabilidad de que dos hermanos elegidos de entre los hermanos entrecruzados sean hermanos completos; y r_t que se refiere a la correlación de entrecruzamiento entre dos miembros de una familia. El modelo original se basó en un solo locus dialélico, pero este parámetro fué computado ahora con un modelo multilocus y multialélico (Ritland, 2002) La estimación multilocus de los apareamientos correlacionados, tiene una varianza estadística menor y brinda un indicador aproximado de la fracción de autofertilización aparente debida a entrecruzamiento entre parientes ($1 - r_s$) (Ritland, 2002; Ritland, 1989).

2.4.2 Diversidad genética

Las frecuencias alélicas de adultos, juveniles y embriones fueron calculadas con el programa GENEPOP (Raymond y Rousset., 2001). También se realizaron dos

pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg, una prueba exacta utilizando una cadena de Markov de 100 000 pasos en el programa Arlequin (Schneider et al., 2000); y otro para detectar exceso de heterócigos utilizando también una cadena de Markov de 1 000 réplicas, con el programa GENEPOP.

El desequilibrio de ligamiento existe cuando no se observa una asociación al azar de los alelos de distintos genes en los gametos, ya sea por la existencia de un ligamiento físico, al no haber recombinación, o porque los alelos pudieron estar presentes, por azar, en los gametos de una población fundadora muy pequeña (Hartl y Clark, 1989). El desequilibrio de ligamiento fue calculado usando el modelo EM, con 100 000 permutaciones con el programa ARLEQUIN (Schneider et al., 2000). El índice de fijación se calculó para todos los grupos de edades utilizando el programa GENEPOP, así como las heterocigosis observadas y esperadas. Los valores de heterocigosis esperadas se comprobaron manualmente utilizando la fórmula:

$$H_e = 1 - \sum_i p_i^2$$

donde p_i es la frecuencia del i ésimo alelo (Sweigart et al., 1999).

El índice de fijación fue calculado por locus para cada uno de los grupos de edad, con el programa GENEPOP. Como el índice de fijación está relacionado con el sistema de apareamiento en una población cerrada, suponiendo que toda la endogamia está determinada por el sistema de apareamiento, el índice de fijación esperado se calculó con: $F_e = \frac{1-t}{1+t}$ (Ledig et al., 1999).

Inferencia de depresión por endogamia: El modelo propuesto por Ritland (1990) desarrolla un modelo para obtener una estimación de la selección contra homocigotos basado en F'_i que es el coeficiente de endogamia de la progenie después de la

selección, F_{t-1} es el coeficiente de endogamia de los adultos parentales y s es la tasa de autofertilización. Sin embargo, para la aplicación de este modelo se necesitan dos generaciones consecutivas de adultos, o en su defecto, los estimados de F y s para una sola generación, si es que se supone que la tasa de autofertilización y F son constantes entre generaciones (Ritland, 1990). En el presente trabajo no contamos con dos generaciones de adultos consecutivas, y no podemos suponer equilibrio en F , así que únicamente realizamos pruebas estadísticas para probar el exceso de heterócigos en cada grupo de edad para cada locus, utilizando el programa GENEPOP (Raymond y Rousset., 2001).

Capítulo 3

RESULTADOS

De los 16 primers probados sólo se pudo obtener una amplificación consistente y una lectura clara de 3 iniciadores: dos desarrollados para *Pinus taeda* (PtTX3013 y PtTX2123) y uno para *Pinus strobus* (RPS34b). Para todos los individuos utilizados en este estudio (embriones, juveniles y adultos) se encontraron 3 alelos para el locus RPS34b, 3 alelos para el locus PtTX2123 y 7 alelos para PtTX3013. Cabe hacer notar que el tamaño de los fragmentos sólo fue igual al reportado para las especies originales en el caso de PtTX3013, los otros dos loci tuvieron tamaños de fragmento entre 20 y 30 pb menores que los reportados, pero esto se considera normal tratándose de especies que no están cercanamente relacionadas. Las frecuencias alélicas para cada grupo de edad se resumen en la tabla 3.1. La prueba de heterogeneidad de las frecuencias alélicas del polen en cada familia fue significativa ($p < 0.05$). La prueba de chi cuadrada sólo se realizó para el locus PtTX3013, porque para el locus PtTX2123 todos los embriones eran homógicos y para RPS34b todas los árboles madre eran heterócigos, lo cual hizo difícil distinguir entre los alelos del polen y del óvulo.

Tabla 3.1: Frecuencias alélicas para los grupos de edades, polen y óvulos.

Locus	Alelo	Adultos	Juveniles	Embriones	Polen (d.s.)	Óvulos (d.s.)
PtTX3013	115	0	0	0.01408	0.035(0.021)	0
	119	0	0	0.01408	0.035(0.024)	0
	121	0	0.01235	0.04930	0.01(0.063)	0
	125	0.05263	0	0.25352	0.337(0.232)	0.188(0.096)
	130	0.10526	0	0.02817	0.07(0.064)	0
	134	0.82895	0.9878	0.64085	0.416(0.243)	0.812(0.096)
	140	0.01316	0	0	0	0
PtTX2123	165	0.9625	0.94048	1.0	1.0	0.944(0.059)
	168	0.025	0.04762	0	0	0
	170	0.0125	0.01190	0	0	0.056(0.059)
RPS34b	120	0.0125	0	0	0	0
	123	0.2875	0.05128	0.38415	0.411(0.225)	0.438(0.05)
	125	0.7	0.94872	0.61585	0.589(0.225)	0.562(0.05)

De las pruebas exactas de Hardy-Weinberg para detectar equilibrio y exceso de heterócigos, se obtuvo que los loci RPS34b y PtTX3013 están en equilibrio para los juveniles y este último locus está en equilibrio también para los adultos. Todos los loci de los embriones se encuentran en desequilibrio. Un caso notable es el locus PtTX2123 que no se encuentra en equilibrio en todos los grupos de edad y que además presenta índices de fijación positivos y altos (Tablas 3.2 y 3.3). Sólo se pudo detectar un exceso de heterócigos significativo ($p < 0.05$) para el locus RPS34b en los adultos, y un exceso de heterócigos no significativo para el locus PtTX3013 también

en los adultos. Los índices de fijación de todos los embriones fueron muy altos, lo cual nos indica un exceso de homócigos. F_e fue calculada con base en la tasa de entrecruzamiento ($F_e = \frac{1-t}{1+t}$) nos dió como resultado 0.018, pero con variaciones que iban de 0.2232 a -0.260 ($t \pm$ d.s.), lo cual indica que el índice de fijación (F) de los embriones no está totalmente determinado por la tasa de entrecruzamiento, lo mismo para el locus PtTX2123 en juveniles y adultos. Los índices de fijación de los loci RPS34b y PtTX3013 de los juveniles y PtTX3013 de los adultos están dentro de los valores esperados dada la tasa de entrecruzamiento ($t=0.964$ (0.389)), corroborando el equilibrio de estos loci para los adultos. (Tabla 3.2)

Tabla 3.2: Valores de p de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg. H_1 =El locus no está en equilibrio ($p<0.05$)

	RPS34b	PtTX3013	PtTX2123
Embriones	0.000	0.00193	——*
Juveniles	1.0	1.0	0.00027
Adultos	0.02151	1.0	0.01121

*Locus monomórfico

Tabla 3.3: Relación entre heterocigosis observadas y esperadas, índices de fijación y valores de p de la prueba de Hardy-Weinberg para detectar exceso de heterocigos (El exceso de heterocigos estadísticamente significativo está en negritas)

Locus RPS34b				
Grupo	H_o	H_e	F	p
Embriones	0.134	0.476	0.719	1.0
Juveniles	0.1025	0.0985	-0.041	0.9226
Adultos	0.6	0.4327	-0.394	0.0065
Locus PtTX3013				
Grupo	H_o	H_e	F	p
Embriones	0.352	0.5251	0.331	0.9638
Juveniles	0.02439	0.02439	0.000	0.9877
Adultos	0.3421	0.3028	-0.132	0.2905
Locus PtTX2123				
Grupo	H_o	H_e	F	p
Embriones	—	—	—	—
Juveniles	0.0238	0.1144	0.794	1.0
Adultos	0.025	0.0737	0.664	1.0

La tasa de entrecruzamiento multilocus para todos los embriones (tabla 3.4) muestra que *Pinus maximartinezii* presenta entrecruzamiento predominante, aunque la desviación estándar indica también que hay cierta variación en la tasa de entrecruzamiento entre familias, pero nunca llega a ser menor a 0.5. El estimado para t , es ligeramente menor que t_m , sin embargo la diferencia 0.09 no es significativamente

distinta de 0 ($p > 0.05$), aunque sí serían diferentes a un nivel de significancia de 0.01. La diferencia $t_m - t_s$, da un valor muy pequeño, lo cual indica que la endogamia dada por apareamientos entre parientes es baja y no es significativamente diferente de 0 ($p > 0.05$), pero puede estar subestimado por haber usado un número de loci tan reducido (Ritland, 2002). El valor obtenido para r_t es sumamente bajo, lo cual significa que no hay mucha variación de la autofertilización entre familias, pero este valor debe tomarse con reserva porque su desviación estándar es muy grande. Suponemos que esto último se debe al número reducido de embriones analizados por familia, lo cual arrojó desviaciones estándar de todos los estimados muy altas (no se muestran los datos), y contribuyó a la desviación estándar tan alta para r_t . En el caso de r_p , nos muestra que la mayoría de los miembros de una misma familia son hermanos completos, y puede sugerir que el número de árboles fuente de polen es reducido. Este último resultado concuerda con la heterogeneidad de las frecuencias alélicas del polen en cada familia.

Tabla 3.4: Estimados de tasas de entrecruzamiento multilocus, para un solo locus y de apareamientos correlacionados. (d.s.)

t_m	0.964(0.489)
t_s	0.874(0.329)
$t_m - t_s$	0.09(0.167)
r_t	0.09(0.866)
r_p	0.950(0.279)

El desequilibrio de ligamiento no fue constante para todos los grupos de edad, ya que sólo un par de loci, de tres posibles, presentaron desequilibrio de ligamiento significativo en los embriones, mientras que en el resto de los grupos de edad, no se

presentó este desequilibrio (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Valores de p de la prueba de desequilibrio de ligamiento

Par de loci	Embriones	Juveniles	Adultos
PtTX3013-PtTX2123	1.0	1.0	0.37382
PtTX3013-RPS34b	0.0	1.0	0.10839
PtTX2123-RPS34b	1.0	1.0	0.48692

Capítulo 4

DISCUSIÓN

4.1 Amplificación de microsatélites

La amplificación de microsatélites nucleares para esta especie resultó muy problemática ya que los iniciadores desarrollados para pinos pertenecen a especies relativamente lejanas filogenéticamente de *P. maximartinezii*. Este es un problema frecuente en el uso de microsatélites en especies no modelos, ya que debido a la especificidad de los iniciadores, no siempre se logra amplificar el fragmento deseado, ya sea por ausencia total de amplificación o por la presencia de muchos productos inespecíficos (Karhu et al., 2000; Kutil y Williams, 2001). Por otro lado, los microsatélites de cloroplasto desarrollados para *Pinus thunbergii* no presentan este problema, ya que la zona de unión al primer, que es la secuencia flanqueante al microsatélite, está sumamente conservada y permite la amplificación de un mismo locus en gran número de especies (Powell et al., 1995). El genoma nuclear de los pinos muestra dos situaciones complejas: primero, el genoma es altamente repetitivo, lo que hace difícil distinguir diferentes loci de los alelos múltiples. Además, el genoma nuclear tiene tasas de mutación más altas que las del cloroplasto, por lo que los microsatélites mismos y sus secuencias flanqueantes no necesariamente estarían conservados (Elsik et al., 2000). Por eso, se usaron iniciadores desarrollados para *Pinus strobus*, un pino blando, como *Pinus maximartinezii*, y los iniciadores desarrollados para *Pinus taeda*, un pino duro, a partir de las zonas poco repetitivas de su genoma y que

además se ha probado que están compartidos por varias especies de pinos (Kutil y Williams, 2001; Karhu et al., 2000) . Sin embargo, los loci que logramos amplificar consistentemente fueron muy pocos, y de los tres loci elegidos para realizar este trabajo, dos de ellos presentaron tamaños de fragmento menores que los reportados para las especies originales (RPS34b de *Pinus strobus* y PtTX2123 de *Pinus taeda*). El uso de los iniciadores desarrollados para *P. strobus* en otras especies de coníferas, también ha dado como resultado fragmentos de tamaños distintos al esperado (Echt et al., 1999), por lo que se requeriría secuenciar los fragmentos obtenidos para *P. maximartinezii* para estar seguros de que se trata del mismo locus. La amplificación de PtTX2123 dió como resultado dos fragmentos, uno del tamaño reportado (200 pb) que no amplificó en todos los individuos, y otro fragmento de 165 a 170 pb, más consistente y que presentaba polimorfismos. Estas duplicaciones son posibles debido al tiempo tan largo de divergencia entre *Pinus maximartinezii* y *Pinus taeda*, y han sido documentadas en *Pinus strobus* con el uso de microsatélites originalmente encontrados en pinos duros (Karhu et al., 2000) . Otra cosa que resultó notable en este estudio, es la amplificación del locus PtTX3013 de *P. taeda*, ya que intentos anteriores de amplificar este locus en *P. strobus* y *P. nelsonii* habían fracasado, y se pensaba que no amplificarían en pinos blandos o piñoneros (Kutil y Williams, 2001; Rentería-Alcántara, 2002), pero al parecer *P. maximartinezii*, si conserva este locus, que además presentó un tamaño de fragmento igual al reportado (Elsik et al., 2000), aunque en cualquier caso también se requeriría secuenciar este fragmento para corroborarlo.

4.2 Diversidad genética : frecuencias alélicas y heterocigosis esperada

Para todos los loci evaluados en este estudio se encontró el mismo patrón de un alelo muy común ($f > 0.5$) y varios alelos menos comunes hasta los raros que aparecieron en sólo un individuo. Las frecuencias alélicas de adultos y juveniles fueron significativamente diferentes para los loci PtTX3013 y para RPS34b ($p < 0.05$), y no hubo diferencias significativas para PtTX2123. Cabe notar que este último locus presentó alelos alternativos en una frecuencia sumamente baja, lo cual reduciría la probabilidad de ser pasados a la siguiente generación si el apareamiento no fuera al azar.

Los embriones presentaron alelos no encontrados en los adultos para el locus PtTX3013, lo cual es evidencia clara de entretrecruzamiento. En particular el alelo de 125 pb tuvo una frecuencia 5 veces mayor en los embriones que en los adultos, lo cual sugiere un muestreo insuficiente en los adultos y por lo tanto, no se reflejó toda la variación genética de la población, porque en efecto, las frecuencias alélicas de la poza de polen son heterogéneas y sólo unos pocos árboles actúan como donadores de polen. Un ejemplo es el estudio más fino sobre polinización de *Pinus densiflora*, en el que se encontró que los 8 árboles más cercanos de 157 posibles, fertilizaron el 42% de las semillas de un árbol (Lian et al., 2001) lo cual puede también estar sucediendo en *P. maximartinezii*. Las frecuencias alélicas del locus RPS34b son muy similares entre adultos y embriones, sólo que la distribución del alelo de 123 pb muestra que mientras todos los individuos adultos que presentaron ese alelo eran heterocigos, en los embriones, muchos individuos eran homocigos para ese alelo. Aunque también, observando las frecuencias alélicas del polen y los óvulos para

este locus, se ve claramente que son casi intermedias. En el caso de los óvulos, es claro, ya que todos los árboles madre eran heterocigos para este locus. Pero las frecuencias casi intermedias para el polen, nos puede sugerir que en su mayoría los donadores de polen eran heterocigos, considerando el exceso de heterocigos significativo encontrado para este locus.

Las diferencias entre las frecuencias alélicas de los distintos estadios de vida, y el hecho de que las frecuencias alélicas del polen entre familias, resultaron heterogéneas, sugiere que el apareamiento en *P. maximartinezii* no es al azar, lo cual puede generar estructuración dentro de la población, por lo la distribución de la variación genética sería también heterogénea (Dyer y Sork, 2001). La heterogeneidad de la poza de polen puede deberse a factores biológicos intrínsecos de los individuos o a factores extrínsecos. Tal es el caso de diferencias en la fertilidad masculina o selección de polen; factores ecológicos, como la densidad de individuos (Dyer y Sork, 2001); o factores ambientales como temporadas desfavorables que afecten el número efectivo de la población (Dinnéty y Nilsson, 2002; Epperson, 1990; Lian et al., 2001; Muona, 1990). El caso de los juveniles es particularmente notable, ya que a pesar de tener dos loci en equilibrio, las frecuencias alélicas que presentaron fueron muy distintas a las de los adultos. Además, casi no se encontraron individuos con alelos alternativos al alelo más común, a pesar de que estos alelos se presentaran en los adultos en frecuencias más o menos altas. Por lo que se puede detectar que existe una variación temporal en la tasa de entrecruzamiento de la población y en la fertilidad de los individuos, posiblemente debida a factores ambientales, como incendios, que pudieron limitar el número de individuos reproductivos entre los padres de la generación de juveniles que muestreamos (Ledig et al., 1999).

La diversidad genética, expresada como la heterocigosis esperada, es comparable al

contenido de información polimórfica (PIC), y es en promedio menor a la del resto de los pinos para microsatélites, aunque presentó una variación amplia, dependiendo del locus. Por ejemplo, para el caso de los loci caracterizados para *P. taeda* (Elsik et al., 2000), el PIC del locus PtTX2123 de *P. maximartinezii* fue de 0.073, con 3 alelos, mientras que para *P. taeda* es de 0.4918 con 5 alelos. Para el locus PtTX3013, *P. maximartinezii* tuvo un PIC de 0.30 con 7 alelos, y *P. taeda* de 0.1840 con 4 alelos. El PIC para el locus RPS34b fue de 0.43, y el promedio global fue de 0.257, lo cual es menor que lo reportado para otros pinos usando microsatélites (tabla 4.1). Sin embargo, cabe hacer notar, que muchos de los estudios de genética de poblaciones para plantas usando microsatélites, se han llevado a cabo utilizando iniciadores desarrollados específicamente para la especie, por lo que no existe el inconveniente introducido al usar únicamente aquellos loci que se lograron amplificar satisfactoriamente, y que puede representar una fracción muy pequeña de la diversidad genética en todo el genoma (Lian et al., 2001; Williams et al., 2000). En el caso de *P. maximartinezii*, sólo pudimos amplificar satisfactoriamente 3 loci de 14, lo cual no nos permite siquiera conocer el porcentaje de loci polimórficos de la especie, ni hacer una selección adecuada de los loci más polimórficos para los estimados de tasa de entrecruzamiento. El caso del locus PtTX2123 ejemplifica este problema ya que presentó exceso de homócigos en todos los estadios del ciclo de vida, contrario al comportamiento en otros loci. Este exceso de homócigos puede llevar a una sobreestimación del índice de fijación (F) ya que el bajo polimorfismo de este locus no permite distinguir bien entre los eventos de entrecruzamiento y autofertilización, por lo que ambos alelos no necesariamente son idénticos por descendencia (Ritland, 2002). Este bajo polimorfismo también puede deberse a la presencia de alelos nulos, que ocurre cuando hay una mutación en el ADN en la secuencia complementaria a

uno o los dos iniciadores y no permite la amplificación de una de las secuencias del microsatélite (Williams et al., 2000). Algunos alelos nulos han sido detectados para *Pinus taeda*, del cual se derivaron los iniciadores para el locus PtTX2123 (Williams et al., 2000; Elsik et al., 2000). Sin embargo, la solución a este problema sería lograr amplificar mayor número de loci, para elegir aquellos con nivel de polimorfismo que sea informativo (Echt et al., 1996).

Sin embargo, a pesar de que *Pinus maximartinezii* no tiene alta variación genética en términos absolutos, si se comparan los parámetros de heterocigosis observada y esperada, con los de otros pinos, se puede observar un fenómeno curioso. Como se ve en la tabla 4.1, *P. maximartinezii* tiene niveles de variación genética bajos utilizando isoenzimas, cercanos a los reportados para otros pinos neotropicales y endémicos de México (*P. rzedowskii*, *P. muricata*, *P. lagunae* y *P. pinceana*), pero todas estas especies presentan una heterocigosis observada menor a la esperada y por lo tanto exceso de homocigos. En la caso de *P. clausa* y *P. densata*, los valores se acercan a los del equilibrio, como en *P. maximartinezii*, ya que los dos valores de heterocigosis no difieren significativamente, y según los datos reportados para isoenzimas, no se encontró exceso de homocigos significativo en muchos de los loci analizados (Ledig et al., 1999). Además, cabe hacer notar, que para *P. clausa* y *P. densata*, se obtuvo el promedio de heterocigosis a partir de 9 poblaciones, y por lo tanto, la probabilidad de encontrar mayor variación es mayor que si se toma en cuenta una sola población.

Ahora, a partir los datos obtenidos de microsatélites nucleares, se puede ver que *P. maximartinezii* tiene niveles de variación genética mayores a los de otros pinos mexicanos, como lo son *P. pseudostrobus*, *P. montezumae* y *P. nelsonii*, aunque menores a los de *P. taeda* y *P. pinaster*. Sin embargo, es el único que presenta mayores

valores de heterocigosis observada que esperada, y exceso de heterócigos en al menos un locus. Considerando estos datos, en que la mayoría de las especies presentan cierto grado de exceso de homócigos y la endogamia parece ser común, el caso de *P. maximartinezii* es notable por mantener altos niveles de heterocigosis considerando que es una población tan pequeña. Por lo tanto, puede decirse que esta especie presenta una variación genética importante, y mayor que otras especies más abundantes y no consideradas en peligro de extinción. Y no sólo eso, sino que dicha variación está distribuida dentro de la población de una forma diferente que en la de otros pinos, ya que existen mayores niveles de heterocigotos que lo esperado, lo que supone que esta única población no es tan propensa a sufrir pérdida de variación genética debido a los efectos de la endogamia y la deriva génica, sino que al contrario, es capaz de mantener alta dicha variación (Kelley y Waller, 2002).

Tabla 4.1: Valores de H_e y H_o para distintas especies de pinos, usando isoenzimas y/o microsatélites

Especie	H_o	H_e	Poblaciones	Marcador	Referencia
<i>P. rzedowskii</i>	0.162	0.219	9	isoenzimas	(Delgado et al., 1999)
<i>P. muricata</i>	0.253	0.346	3	isoenzimas	(Molina-Freaner et al., 2001)
<i>P. lagunae</i>	0.188	0.386	4	isoenzimas	(Molina-Freaner et al., 2001)
<i>P. pinceana</i>	0.216	0.374	5	isoenzimas	(Molina-Freaner et al., 2001)
<i>P. clausa</i>	0.129	0.132	9	isoenzimas	(Parker et al., 2001)
<i>P. densata</i>	0.171	0.190	9	isoenzimas	(Yu et al., 2000)
<i>P. maximartinezii</i>	0.110	0.122	1	isoenzimas	(Ledig et al., 1999)
<i>P. taeda</i>	0.5258	0.610	6	nSSRs	(Williams et al., 2000)
<i>P. pinaster</i>	0.645	0.832	23	nSSRs	(Mariette et al., 2001)
<i>P. pseudostrobus</i>	0.206	0.256	3	nSSRs	(Delgado, 2002)
<i>P. montezumae</i>	0.222	0.273	5	nSSRs	(Delgado, 2002)
<i>P. nelsonii</i>	0.0709	0.073	9	nSSRs	(Rentería-Alcántara, 2002)
<i>P. maximartinezii</i>	0.3223	0.269	1	nSSRs	este estudio

4.3 Hardy-Weinberg e índice de fijación

La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg, la de exceso de heterócigos y los índices de fijación dan resultados muy interesantes. El locus PtTX2123 está en desequilibrio para todos los grupos de edad y presentó un exceso de homócigos y un índice de fijación positivo. El locus PtTX3013 está en desequilibrio para los embriones, pero en equilibrio para los juveniles y adultos; el índice de fijación para los em-

briones fue positivo, para los juveniles fue de 0 y para los adultos negativo, lo que muestra una clara disminución de la homocigocis, como la detectada en *Pinus leucodermis* (Morgante et al., 1991). Este resultado es de gran relevancia ya que puede significar la presencia de selección contra homócigos debido a la depresión por endogamia. Sin embargo, no hubo un exceso de heterócigos significativo para los adultos y los índices de fijación tanto para juveniles como para adultos están dentro del rango esperado por la tasa de entrecruzamiento, por lo que los resultados no son concluyentes. En el caso del locus RPS34b, el exceso de heterócigos para los adultos fue significativo, y el índice de fijación presenta una reducción entre embriones, juveniles y adultos, como se esperaría en presencia de depresión por endogamia (Ritland, 1990). En general, para los tres loci, la tendencia fue de disminución del índice de fijación (F) entre embriones y adultos, incluso para el locus PtTX2123, aunque sólo para uno de los loci hubo exceso significativo de heterócigos. Esto podría deberse a que este locus esté ligado a un gen de viabilidad donde los homócigos sean eliminados (Williams et al., 2000; Remington y O'Malley, 2000a). Estudios anteriores con pinos de zonas templadas, suponen que aquellas poblaciones aisladas y pequeñas, presentarían menor depresión por endogamia y menor tasa de entrecruzamiento que los pinos de poblaciones grandes y extensamente distribuidas, como es el caso de *Pinus sylvestris* (Kärkkäinen et al., 1996), sin embargo, un estudio realizado para *Pinus patula* (Williams et al., 1999), una especie neotropical como *Pinus maximartinezii*, mostró que posee una carga genética similar a la de pinos con distribuciones amplias y continuas en zonas más templadas, y que la reducción de la carga genética debido al purgamiento en una población reducida, no es suficiente para eliminar las causas de la depresión por endogamia (Williams et al., 1999), ya que el purgamiento generalmente es efectivo en condiciones muy

particulares, como cuando la endogamia ocurre gradualmente y el coeficiente de selección contra los alelos deletéreos es alto, y no funciona cuando los alelos son únicamente parcialmente deletéreos (Kelley y Waller, 2002). Por lo tanto, *Pinus maximartinezii* puede estar manteniendo una variación genética suficiente, que enmascara a los alelos deletéreos y mantenga la depresión por endogamia, ya que a pesar del número tan reducido de loci informativos que se utilizaron, se pudo encontrar exceso de heterócigos en, al menos, un locus; lo que sugiere la existencia de mecanismos para reducir el número de progenie producto de autofertilización. Otro aspecto notable, fue la presencia de embriones degradados en casi todos los conos. Las semillas aparentemente estaban llenas, pero al abrirlas, el embrión en su interior estaba completamente deshecho. Esto puede interpretarse también como evidencia de depresión por endogamia que actúa en una etapa específica del desarrollo, como ya ha sido reportado para *Pinus taeda* (Williams et al., 2001), y como base para un estudio más minucioso de los genes de viabilidad presentes en el genoma de esta especie y en que etapa del desarrollo actúan.

4.4 Sistema de apareamiento

La tasa de entrecruzamiento fue alta como la esperada para los pinos, aunque presentó cierta variación entre familias, lo cual se ha reportado en muchas otras especies arbóreas sin mecanismos de autoincompatibilidad desarrollados, como *Pinus densiflora* (0.777-1), *Pinus leucodermis* (0.765-0.947), *Pinus maximartinezii* con isoenzimas (0.42-1), *Pinus sylvestris* (0.6-1.2), *Helicteres brevispira* (0.478-0.676) y *Thuja plicata* (0.173-1.257) (O'Connell et al., 2001; Franceschinelli y Kamaljit, 2000; Kärkkäinen et al., 1996; Ledig et al., 1999; Morgante et al., 1991; Lian et al.,

2001). La variación en las tasas de entrecruzamiento puede explicarse por varios factores, entre los que se incluyen factores ecológicos que tienen que ver con la distribución espacial de las plantas, condiciones meteorológicas que permitan la dispersión del polen, y también de factores biológicos, como la diferencia en la fertilidad (Epperson, 1990; Muona, 1990; Lian et al., 2001). Sin embargo, los estimados de tasa de entrecruzamiento multilocus, pueden estar sesgados debido a una distribución no aleatoria de la poza de polen, que representa una desviación importante del modelo, y también aumenta la varianza de los estimados (Muona, 1990; Franceschinelli y Kamaljit, 2000). Además, la presencia de un locus con bajo polimorfismo, no permite distinguir muy bien los eventos de entrecruzamiento, ni la identidad por descendencia de los alelos (Reusch, 2000). Esta heterogeneidad de la poza de polen influye también en la estimación de r_p , que para *Pinus maximartinezii* indica que, en su mayor parte, los embriones son hermanos completos y nos hace pensar que únicamente unos pocos árboles actuaron como donadores de polen (Lian et al., 2001; Neff et al., 2000). Esto también puede deberse a un error de muestreo, porque las semillas provenían únicamente de un cono por árbol, y en otros estudios se ha observado que los conos en distintas posiciones en la copa de un árbol pueden ser polinizados con mayor probabilidad por árboles ubicados en esa dirección, por lo que quizá otros conos del mismo árbol podrían haber sido polinizados por otros árboles (Neff et al., 2000; Lian et al., 2001; Muona, 1990). En cuanto al estimado de apareamiento entre parientes, no fue significativamente diferente de cero, pero considerando el número pequeño de loci utilizados y a que uno de ellos no tenía mucho polimorfismo, puede ser que no se haya detectado el apareamiento entre parientes (Ritland, 2002). No obstante, algunos autores han señalado que la diferencia $t_m - t_s$ no es un buen indicador de endogamia biparental (Franceschinelli y Kamaljit, 2000). El apareamiento

miento entre parientes no detectado, y la heterogeneidad de las frecuencias alélicas pueden haber contribuido a obtener índices de fijación en los embriones mayores a los esperados dada la tasa de entrecruzamiento, al existir identidad por descendencia no debida a la autofertilización.

4.5 Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento ocurre cuando distintos loci están estadísticamente asociados, lo cual puede deberse a selección epistática, poblaciones pequeñas, altas tasas de autofertilización y migración (Hastings, 1990). En el caso de *P. maximartinezii*, sólo se encontró desequilibrio de ligamiento significativo para dos de seis pares de loci, en los embriones. Ni los adultos ni los juveniles presentaron desequilibrio de ligamiento para ninguno de los pares de loci. Este desequilibrio puede deberse a dos aspectos: i) a un efecto de acarreamiento de estos loci neutrales, que posiblemente se encuentren ligados a un loci sujeto a selección durante este estadio del ciclo de vida en particular, y ii) a que el pequeño tamaño poblacional de *P. maximartinezii* (2 500 árboles maduros aprox. (Ledig et al., 1999)), la heterogeneidad de la poza de polen y niveles variables de entrecruzamiento, pudieron generar una asociación estadística entre estos dos loci en los embriones (Hastings, 1990). Cabe hacer notar que los dos loci que resultaron en desequilibrio de ligamiento en los embriones, fueron aquellos que también tenían más polimorfismo, ya que el locus PtTX2123 fue monomórfico para este grupo de edad, lo que pudo influir en los estimados, y dar resultados erróneos; sin embargo, el valor de p obtenido para los loci RPS34b y PtTX3013 altamente significativos ($p=0.0$), por lo que no puede descartarse un desequilibrio de ligamiento real.

Para poder obtener un estimado más confiable de la presencia de desequilibrio de ligamiento en los embriones de *Pinus maximartinezii*, sería necesario utilizar más loci en los análisis, y con un mayor nivel de polimorfismo.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

- Contrario a lo que se esperaba, *P. maximartinezii* presenta variación genética (heterocigosis esperada) intermedia, menor a la de pinos con amplia distribución, pero mayor a la de otros pinos mexicanos con distribución restringida y fragmentada. La heterocigosis observada es mayor a la esperada para dos loci, resultado distinto a lo reportado anteriormente para otros pinos, en donde las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg o presentan exceso de homócigos.
- El sistema de apareamiento es similar al del promedio de los pinos, aunque variable, sin embargo, la disminución de los índices de fijación en los adultos y la presencia de exceso de heterócigos significativo en un locus, sugiere la presencia de depresión por endogamia. Dicha depresión por endogamia (debida en parte a la carga genética) y niveles de variación genética importantes, son un indicador de que esta especie no está empobrecida genéticamente y que presenta mecanismos para mantener dicha variación.
- La poza de polen heterogénea y la alta correlación de paternidad indican que los apareamientos en esta especie no ocurren al azar y que podría estarse dando subestructuración dentro de la población.
- El desequilibrio de ligamiento no indica la posible presencia de un cuello de botella reciente, ya que no fue generalizado en todos los estadios de vida.

Lo mismo puede inferirse a partir de los niveles de variación genética y de heterocigosis observada.

Los anteriores datos genéticos y de sistema de apareamiento indican que *P. maximartinezii* no está perdiendo variación genética, por lo que una estrategia de conservación adecuada sería garantizar la persistencia de la población actual protegiendo toda su área de distribución. Además, los datos demográficos (López-Mata, com. pers.) y la regeneración vista en el campo indican que la población está creciendo y que incluso podría aumentar su distribución si el pastoreo y la tala son controlados. Para la conservación *ex situ* sería importante hacer colectas de semillas de distintas parte de la población, para reducir los efectos de la subestructuración poblacional y maximizar entonces el número de genotipos diferentes colectados, para evitar así que en un futuro exista endogamia entre los individuos en los viveros y que la depresión por endogamia actúe de manera muy intensa sobre un tamaño de muestra pequeño.

Bibliografía

AWADALLA P. y K. RITLAND. 1997. Microsatellite variation and evolution in the *Mimulus guttatus* species complex with contrasting mating systems. *Molecular Biology and Evolution* 14:1023-1034

BARRETT S.C.H. y D. CHARLESWORTH. 1991. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 352:522-524

BARRETT S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*. 4:274-284

BIERNE N., A. TSITRONE y P. DAVID. 2000. An inbreeding model of associative overdominance during a population bottleneck. *Genetics* 155:1981-1990

BROWN A.H.D. 1990. Genetic characterization of plant mating systems. Pp. 145-162 En H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir, eds. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer, Sunderland Mass.

CHAMBERS G.K. y E.S. MACAVOY. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 126:455-476

CIOFI C., S.M. FUNK, T. COOTE, D.J. CHEESMAN, R.L. HAMMOND, I.J. SACCHERRI y M.W. BRUFORD. 1998. Genotyping with microsatellite markers. Pp. 195-205. En

Karp A., P.G. Isaac y D.S. Ingram eds. Molecular tools for screening biodiversity. Chapman & Hall. Londres

CLEGG M.T y B.K. EPPERSON. 1988. Natural selection of flower color polymorphisms in morning glory populations. Pp. 255-273. En Gottlieb L.D. y S.K. Jain eds. Plant evolutionary biology. Chapman & Hall. Cambridge

COLLEVATTI R.G., D. GRATTAPAGLIA y J.D. HAY. 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86:60-67

DARWIN C.R. 1895. The various contrivances by which orchids are fertilised by insects. The works of Charles Darwin. Vol. 6. AMS Press, Nueva York. pp. 1

DELGADO P., D. PIÑERO, A. CHAOS, N. PEREZ-NASSER y E. ALVAREZ-BUYLLA. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*. 86:669-676

DELGADO P. 2002. Dinámica histórica de la hibridación introgresiva de poblaciones naturales de *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus pseudostrabus* Lind, (Pinaceae). Tesis Doctoral. Instituto de Ecología UNAM

DINNÉTZ P. y T. NILSSON. 2002. Population viability analysis of *Saxifraga coryledon*, a perennial plant with semelparous rosettes. *Plant Ecology* 159:61-71

DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. 6 de Marzo de 2002.

DYER R.J. y V.L. SORK. 2001. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* 10:859-866

- ECHT C.S., P. MAY-MARQUARDT, M. HSEIH, R ZAHORCHAK. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39:1102-1108
- ECHT C.S., G.G. VENDRAMIN, C.D. NELSON, P. MARQUARDT. 1999. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifers species. *Canadian Journal of Forest Research* 29:365-371
- EDMONSON A. y D. DRUCE. 1996. *Advanced biology statistics*. Oxford University Press. Oxford. P.p. 176
- EDWARDS A.L. y R.R. SHARITZ. 2000. Population genetics of two rare perennials in isolated wetlands: *Sagittaria isoetiformis* and *S. teres* (Alismataceae). *American Journal of Botany* 87:1147-1158
- EGUIARTE L., y D. PIÑERO. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias No. especial* 4: 34-47
- ELSIK C.G., V.T. MINIHAN, S.E. HALL, A.M.SCARPA y C.G. WILLIAMS. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43:550-555
- EPPERSON B.K. 1990. Spatial patterns of genetic variation within plan populations. Pp.229-253 En H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir, ed. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer, Sunderland Mass. E.U.A.
- FARJON A. y B.T. STYLES. 1997. *Flora Neotropica: Pinus* (Pinaceae). The New York Botanical Garden. Nueva York. P.p. 291
- FRANCESCHINELLI E.V. y S.B. KAMALJIT. 2000. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity* 84:116-123

FUTUYMA, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates. Sunderland Mass. P.p. 763

GERNANDT D.S., A. LISTON y D. PIÑERO. 2001. Variation in the nrDNA of *Pinus* Subsection *Cembroides*: implications for molecular systematics studies of pine species complexes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21: 449-467

HARTL D.L. y A.G. CLARCK . 1989. *Principles of population genetics*. Sinauer. Sunderland P.p. 682

HASTINGS A. 1990. The interaction between selection and linkage in plant populations. Pp.163-180 En H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir, ed. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer, Sunderland Mass. E.U.A.

HOLSINGER K.E. 1992. Ecological models of plant mating systems and the evolutionary stability of mixed mating systems. Pp. 169-191 En R. Wyatt, ed. *Ecology and evolution of plant reproduction*. Chapman and Hall. Nueva York, E.U.A.

HOLSINGER K.E. 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97:7037-7042

KARHU A., J.H. DIETERICH y O. SAVOLAINEN. 2000. Rapid expansion of microsatellite sequences in pines. *Molecular Biology and Evolution* 17:259-265

KÄRKKÄINEN K, V. KOSKI y O. SAVOLAINEN. 1996. Geographical variation in the inbreeding depression of scots pine. *Evolution* 50:111-119

KELLER L.F. y D.M. WALLER. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*. 17:230-241

KLEKOWSKI E.J. y P.J. GODFREY. 1989. Agein and mutation in plants. *Nature* 340:389-391

KUTIL B.L. y C.G. WILLIAMS. 2001. Triplet repeat microsatellites shared among hard and soft pines. *Journal of Heredity* 92:327-332

LANDE R. y D. W. SCHEMSKE. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39:24-40

LEDIG T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. Pp. 251-280 En D.M. Richardson, ed. *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press, Cambridge Reino Unido.

LEDIG T., M. THOMPSON CONKLE, B. BERMEJO-VELÁZQUEZ, T. EGUILUZ-PIEDRA, P.D. HODGSKISS, D.R. JOHNSON y W.S. DVORAK. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53:91-99

LIAN C., M. MIWA y T. HOGETSU. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87:88-98

LUKIART G., W.B. SHERWIN, B.M. STEELE y F.W. ALLENDORF. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* 7: 963-974

MARIETTE S., D. CHAGNÉ, C. LEZIER, P. PASTUSZKA, A. RAFFIN, C. PLOMION y A. KREMER. 2001. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 87:469-479

MOHANA G.S., R.UMA SHAANKER, K.N.GANESHAIAH y S.DAYANANDAN. 2001. Genetic relatedness among developing seeds and intra fruit seed abortion in *Dalbergia sissoo* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 88:1181-1188

MOLINA-FREANER F., P. DELGADO, D. PIÑERO, N. PEREZ-NASSER y E. ALVAREZ-BUYLLA. 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany*, 29:131-138

MORGANTE M., G.G. VENDRAMIN y A.M. OLIVIERI. 1991. Mating system analysis in *Pinus leucodermis* Ant.: detection of self-fertilization in natural populations. *Heredity* 67:197-203

MUONA O. 1990. Population genetics in forest tree improvement. Pp. 282-298. En H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir, ed. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer, Sunderland Mass. E.U.A.

NEFF B.D., J. REPKA y M.R. GROSS. 2000. Parentage analysis with incomplete sampling of candidate parents and offspring. *Molecular Ecology* 9:515-528

O'CONNELL L.M., F. VIARD, J. RUSSELL y K. RITLAND. 2001. The mating system in natural populations of western redcedar (*Thuja plicata*). *Canadian Journal of Botany* 79:753-756

PARKER K.C., J.L. HAMRICK, A.J. PARKER y J.D. NASON. 2001. Fine-scale genetic structure in *Pinus clausa* (Pinaceae) populations: effects of disturbance history. *Heredity* 87:99-113

PERRY J.P. Jr. 1991. *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland Or. P.p. 231

POWELL W., M. MORGANTE, R. MCDEVITT, G.G. VENDRAMIN y J.A. RAFALSKI. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:7759-7763

PRICE R.A., A. LISTON y S.H. STRAUSS. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. P.p. 49-65 En D.M. Richardson ed. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge

RAYMOND M. y F. ROUSSET. 2001. GENEPOP. Population genetics software.
<ftp://ftp.cefe.cnrs-mop.fr/genepop/>

REMINGTON D.L. y D.M. O'MALLEY. 2000a. Whole-genome characterization of embryonic stage inbreeding depression in a selfed loblolly pine family. *Genetics* 155:337-348

REMINGTON D.L. y D.M. O'MALLEY. 2000b. Evaluation of major genetic loci contributing to inbreeding depression for survival and early growth in a selfed family of *Pinus taeda*. *Evolution* 54:1580-1589

RENTERÍA-ALCÁNTARA M. 2002. Variación y estructura genética de una especie rara de México (*Pinus Nelsonii* SHAW) Informe final de servicio social, Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

REUSCH T.B.H. 2000. Pollination in the marine realm: microsatellites reveal high outcrossing rates and multiple paternity in eelgrass *Zostera marina*. *Heredity* 85:459-464

RITLAND K. y S. JAIN. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47:35-52

RITLAND K. y Y.A. EL-KASSABY. 1985. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. *Theoretical and Applied Genetics* 71:375-384

RITLAND K. 1989. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43:848-859

RITLAND K. 1990. Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. *Evolution* 44:1230-1241

RITLAND K. 1996. Inferring the genetic basis of inbreeding depression in plants. *Genome* 39:1-8

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

RITLAND K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88:221-228

SAVOLAINEN O. y P. HEDRICK. 1995. Heterozygosity and fitness: no association in scots pine. *Genetics* 140:755-766

SCHEMSKE D.W. y R. LANDE. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39:41-52

SCHLÖTTERER C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371

SCHOEN D.J., J.L. DAVID y T.M. BATAILLON. 1998. Deleterious mutation accumulation and the regeneration of genetic resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:394-399

SCHNEIDER S., D. ROESSLI y L. EXCOFFIER. 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab. Dept. of Anthropology, University of Geneva. <http://lgb.unige.ch/arlequin/index.php3>

SCHULTZ S.T. y J.H. WILLIS. 1995. Individual variation in inbreeding depression: the roles of inbreeding history and mutation. *Genetics* 141:1209-1223

SORENSEN F.C. y R.S. MILES. 1982. Inbreeding depression in height, height growth, and survival of Douglas-fir, Ponderosa pine, and noble fir to 10 years of age. *Forest Science* 28:283-292

SWEIGART A., K. KAROLY, A. JONES y J.H. WILLIS. 1999. The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in a population of *Mimulus guttatus*. *Heredity* 83: 625-632

VANDER-WALL S.B. 1992. The role of animals in dispersing a "wind-dispersed" pine. *Ecology* 73:614-621

VÁZQUEZ-LOBO, A. 1996. Filogenia de hongos endófitos del genero *Pinus* L.: implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. P.p: 66

VENDRAMIN G.G., L. LELLI, P. ROSSI, M. MORGANTE 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 111-114

VIARD F., P. BREMOND, R. LABBO, F. JUSTY, B. DLEAY y P. JARNE. 1996. Microsatellites and the genetics of highly selfing populations in freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Genetics* 142: 1237-1247

VOGLER D.W. y S. KALISZ. 2001. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution* 55:202-204

WILLIAMS C.G., R.D. BARNES y I. NYOKA. 1999. Embryonic genetic load for a neotropical conifer, *Pinus patula* Schiede et Deppe. *Journal of Heredity* 90:394-398

WILLIAMS C.G., C.G. ELSIK y R.D. BARNES. 2000. Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. in Zimbabwe. *Heredity* 84:261-268

WILLIAMS C.G., Y. ZHOU y S.E. HALL. 2001. A chromosomal region promoting outcrossing in a conifer. *Genetics* 159:1283-1289

WILLIAMS C.G. y O. SAVOLAINEN. 1996. Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. *Forest Science* 42:102-117

YU H., S. GE y D. HONG . 2002. Allozyme diversity and population genetic structure of *Pinus densata* Master in Northwestern Yunnan, China. *Biochemical Genetics* 38:139-147

Apéndice A

Detalles de los métodos

Iniciadores para loci de microsatélites nucleares probados en *Pinus maximartinezii*

Locus	No. de acceso	Amplificación	Referencias
RPS18	PSU60244	Sí	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)
RPS25b	PSU60245	No	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)
RPS39	PSU60247	No	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)
RPS34b	PSU60246	Sí	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)
RPS127	PSU60255	No	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)
RPS60	PSU60249	No	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)
RPS20	PSU60244	No	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)
RPS1b	PSU60239	No	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)
PtTX3013	AF143966	Sí	(Elsik et al., 2000)
PtTX3019	AF143968	Sí	(Elsik et al., 2000)
PtTX3025	AF143970	Sí	(Elsik et al., 2000)
PR4.6	AF091371	Inconsistente	(Karhu et al., 2000)
PtTX2123	AF143960	Sí	(Elsik et al., 2000)
RPS118b	PSU60252	No	(Echt et al., 1996; Echt et al., 1999)

Soluciones stock

- Tris-HCl 1M pH 8.0 PM=121.1
- EDTA (sal disódica dihidratada) 0.5 M pH 8.0 PM=372.2
- NaCl 5M PM= 58.44
- Ácido ascórbico 1M PM=176.1
- DIECA 1M PM=171.3
- Sulfato de amonio 20mM PM=132.1

- Buffer Tris-KCl 10X pH 8.4 (200mM Tris-HCl y 500mM KCl)
- Persulfato de amonio 10%
- Formaldehído 37% (guardar en alícuotas de 1.5ml para evitar la evaporación)
IMPORTANTE: Sustancia tóxica, evitar la inhalación.
- Ácido acético 10%
- Buffer TBE 10X (Tris-borato) pH 8.0

Compuesto	Concentración	Cantidades para 1 Lt.
Tris	0.89M	108g
Ácido bórico (PM=61.8)	0.89M	55g
EDTA	0.02M	40ml de EDTA 0.5M

Ajustar el pH con hidróxido de sodio (NaCl)

- Acrilamida 40% (para 100 ml)

Bis-acrilamida	2g
Acrilamida	38g

IMPORTANTE: las soluciones de acrilamida son sensibles a la luz y deben guardarse en frascos amber y en refrigeración (4°C). Manéjese con cuidado, utilizando guantes, bata y mascarilla. La acrilamida sólida debe manejarse en una campana de humos y con mascarilla protectora para evitar la inhalación, ya que es un compuesto neurotóxico y cancerígeno. También deben tomarse las mismas precauciones con toda la acrilamida sin polimerizar, aunque esté en solución.

- Acrilamida 6%, UREA 7M (500 ml)

Acrilamida 40%	75ml
Urea	210g
TBE 10X	50ml

- Bind-Silane (prepárese al momento de usarse)

Etanol absoluto	666 μ l
Bind.silane	2.5 μ l
Ácido acético 10%	166 μ l

- Tiosulfato de Sodio (2g/l)
- Buffer de corrida (desnaturalizante de dos frentes)

NaOH	10mM
Formamida	95%
Azul de bromofenol	0.05%
Xilencianol	0.05%

Elaboración de geles de acrilamida

1. Limpiar los vidrios con alcohol al 70% y con agua destilada. En caso de ser necesario, lavar con un detergente suave. Secar perfectamente
2. Impregnar uno de los vidrios con la solución de Bind-silene, lo que permitirá que el gel de adhiera a dicho vidrio y no se despegue al teñir. Una vez seco el cristal, enjuagar con agua caliente y aplicar 2ml de alcohol 96% y dejar secar.
3. En el otro cristal aplicar una pequeña cantidad de Rain-X (producto que evita el empañamiento de los cristales de los automóviles a base de silicón). Dejar secar, enjuagar y esparcir etanol 96%.
4. Los vidrios se colocan uno sobre otros con las superficies tratadas hacia dentro, colocando los separadores previamente. Los vidrios se sujetan con pinzas de manera uniforme.
5. Vaciar la mezcla de acrilamida para polimerización, cuidando de que no queden burbujas. Una vez terminado esto, se coloca el peine y se deja en una superficie plana por 1hr.

Acrilamida 6%, Urea 7M	60 ml
Persulfato de amonio 10%	180 μ l
TEMED	50 μ l

NOTA: Es conveniente mantener en frío las soluciones utilizadas para la mezcla de gel de acrilamida, ya que las altas temperaturas aceleran la polimerización.

Tinción con Nitrato de plata

1. Desmontar los vidrios y lavar el gel en ácido acético 10% por 30 min.
2. Lavar el gel por 1 min. con agua destilada y repetir dos veces
3. Impregnar el gel con una solución de nitrato de plata por 30 min. La solución lleva 1 g de nitrato de plata, 1.5 ml de formaldehído 37% en un litro de agua destilada
4. Lavar el gel en agua destilada por 10 seg.
5. Revelar el gel con la solución reveladora: 30g de Carbonato de sodio, 1 ml de Tiosulfato de sodio en solución (ver soluciones Stock) y 1.5 ml de formaldehído 37%

6. Baño de paro con ácido acético al 10% (puede reutilizarse la solución fijadora inicial).

NOTA: El nitrato de plata es tóxico y mancha la piel y la ropa, es necesario utilizar guantes y bata para revelar los geles.