

**Universidad Nacional Autónoma de
Mexico**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE
CIENCIAS Y HUMANIDADES
Centro de Ecología**

**"La Región de los Espaciadores Internos Transcritos
(ITS) del DNA Ribosomal del Núcleo (nrDNA):
Detección de Hibridación y Variación
Intraespecífica en Pinos "**



**BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN
ECOLOGIA BASICA**

PRESENTA:

1996

Adrián Quijada Mascareñas

Director de Tesis: Elena Alvarez-Buylla Roces



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO	Pags
Resumen	4
Capítulo I. Introducción general	
1.1 Filogenias y el DNA nuclear ribosomal	5
1.2 Evolución concertada de las familias multigénicas	7
1.3 La región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del nrDNA en angiospermas y gimnospermas	10
1.4 La región del ITS en pinos: potencial como fuente de caracteres moleculares para la inferencia filogenética.	12
1.5 Objetivos y estructura de la tesis	14
Capítulo II. The ITS region of nrDNA as a tool in studies of hybridization in pines	16
2.1 Abstract	17
2.2 Introduction	18
2.3 Methods	19
2.4 Results	20
2.5 Discussion	21
2.6 Acknowledgments	24
Capítulo III. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S region of <i>Pinus rzedowskii</i>	30
3.1 Abstract	31
3.2 Introduction	32
3.3 Methods	34
3.4 Results	36
3.5 Discussion	38
3.6 Acknowledgments	42

Capítulo IV. Discusión y conclusiones generales

4.1 Los estudios de hibridación en pinos usando el ITS como marcador molecular	55
4.2 Implicaciones del estudio con <i>P. rzedowskii</i>	57
4.3 Perspectivas de estudio con el ITS en pinos	59
Agradecimientos	60
Referencias	61

RESUMEN

Los genes del DNA nuclear ribosomal (nrDNA) existen como elementos repetidos en tandem, cada unidad repetida compuesta por secuencias codificadoras altamente conservadas y regiones espaciadoras no codificadoras mas variables. El grado de homogenización de estas unidades dependen de mecanismos conocidos en conjunto como evolución concertada. Recientemente, la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del nrDNA ha mostrado ser una fuente útil de caracteres para estudios filogenéticos en angiospermas y gimnospermas. En gimnospermas, la región del ITS es considerablemente mas larga y variable que en angiospermas. En el género *Pinus*, la región del ITS tiene una longitud de ca. 3000 bp. El ITS1 es mas largo que el ITS2 y tiene la resolución para inferir divergencia interespecífica. Asimismo, potencialmente puede detectar heterogeneidad en las unidades repetidas como producto de hibridación, la cual se expresaría como patrones aditivos de aquellos de las líneas parentales en el híbrido, tanto en secuencias como sitios de restricción. Sin embargo, secuencias parciales del ITS1 indican que esta región esta evolucionando rapidamente, y probablemente sea variable inclusive a nivel intraespecífico. En la presente tesis se probaron las hipótesis de aditividad del ITS en híbridos controlados de varias especies de pinos, y la existencia de variación intraespecífica en la especie *P. rzedowskii*. Para tal objetivo, la región del ITS fue amplificada usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores conservados tanto para el ITS total como el ITS2. Los productos fueron analizados usando enzimas de restricción (PCR-RFLP) y analizando los polimorfismos en la movilidad de cadenas únicas del ITS2 (PCR-SSCP). Se encontró aditividad del ITS de los patrones de PCR-RFLP y PCR-SSCP en los híbridos, tanto para cruza F1 como F2, revelando la contribución de cada linea parental. El análisis con PCR-RFLP del ITS en cuatro poblaciones de *P. rzedowskii* mostró variación intraespecífica. La mayoría de las variantes del ITS en las poblaciones fueron mutaciones por adición en los patrones de sitios de restricción. Esto sugiere la existencia de variación intraindividual en el ITS. Una comparación de las medidas de diversidad y estructura poblacional del ITS e isoenzimas, obtenidas a partir de los mismos individuos, muestran resultados muy similares. La variación intraespecífica encontrada en el ITS de *P. rzedowskii* ofrece dificultades potenciales en la inferencia filogenética a niveles superiores. Sin embargo, el descubrimiento reciente de la existencia de subunidades repetidas conservadas y poco conservadas dentro del ITS1 podría aminorar esta dificultad con el diseño de cebadores muy específicos que amplifiquen la región que ofrezca la resolución requerida para cada estudio.

Abstract

Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) genes exist as tandemly repeated cistrons, each repeat unit composed of a highly conserved coding sequence plus shorter and more variable non coding spacer regions. Recently, the internal transcribed spacer (ITS) region of 18S-26S nuclear ribosomal DNA (nrDNA) has proven to be a useful source of characters for phylogenetic studies in some plant groups. However, there are additional advantages in several properties of the ITS region for evolutionary studies. Unlike cpDNA, ITS data can provide direct evidence of reticulate evolution if concerted evolution fails to act across repeat units contributed by different parental species. Firstly, I investigated the maintenance of parental ITS using controlled hybrids from six pine species in the subgenus *Pinus*. Restriction fragment patterns in the ITS region for three endonucleases showed the parental contribution patterns in the hybrids. Additionally, I used Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) analysis, a novel and growing tool in systematics capable of detecting small differences between taxa as changes in gel mobilities of single strand DNA from products of PCR. SSCP of the ITS2 region showed that gel mobilities in the hybrids have combined patterns in relation to patterns of parental species.

As a second objective, I surveyed variability of the ITS region in four populations of *Pinus rzedowskii*, an endemic pine from Michoacan, Mexico, using PCR-RFLP analysis. A total of 86 individuals were assayed with five restriction endonucleases revealing thirteen variants. The same individuals were assayed with nine polymorphic isozymes. Most ITS variants were length mutations of 300-900 bp. A moderate degree of population differentiation in *P. rzedowskii* was detected. The average ITS diversity of fragment size patterns (based on Shannon's index) was 1.19, which represents 66 percent of total species diversity, while differences between populations account for 33 per cent of total diversity. Diversity measures for each restriction endonuclease and polymorphic isozymes show very similar results. Therefore, most of the ITS variability results from intrapopulation differences similar to variation at other nuclear loci. Implications of the nature of variants and diversity patterns in *P. rzedowskii* populations are discussed.

Vo.Bo. Tutor



Dra. Elena Alvarez-Buylla

Capítulo I

Introducción general

1.1 Filogenias y el DNA nuclear ribosomal

Durante las últimas tres décadas, el campo de la sistemática ha sufrido de varias revoluciones simultáneas. Los tres cambios mas significativos han sido el desarrollo y refinamiento de la teoría en sistemática, el refinamiento tecnológico en el procesamiento de los datos con el desarrollo de las computadoras, y la introduccion del análisis molecular. A pesar de que la sistemática molecular no debe ser considerada como la Panacea para los biólogos sistemáticos, esta ciertamente permite abordar muchos problemas que previamente habían sido considerados intratables por la mayoría de los sistemáticos morfológicos (Hillis y Davies, 1988). Mientras que existen muy pocos caracteres morfológicos homólogos que puedan ser comparados entre todos los organismos vivientes, un buen número de genes con funciones bioquímicas fundamentales pueden ser analizados por medio de diferentes técnicas, las cuales se encuentran ahora disponibles en muchos laboratorios de sistemática molecular. Algunos de estos genes han permitido la inferencia de las relaciones filogenéticas entre taxa muy distantes, definiendo las ramas mas profundas de lo que se conoce como el "arbol de la vida" (Hillis y Davies, 1988). Otros genes pueden ser usados para el esclarecimiento de las relaciones entre taxa a niveles específicos e intraespecíficos, aún en aquellos casos donde los taxa involucrados son indistinguibles con caracteres morfológicos. Este amplio rango de aplicación, desde el origen de la vida hasta los eventos evolutivos mas recientes, han sido abordados estudiando los genes ribosomales (rRNA) y sus regiones espaciadoras asociadas, colectivamente llamado DNA ribosomal del núcleo (nrDNA) (Hillis y Dixon, 1991).

El arreglo del DNA ribosomal nuclear (nrDNA) de un genoma eucariótico, típicamente consiste de algunos cientos de copias repetidas en tandem (Fig 1), tanto de la unidad transcrita , como de la región de los espaciadores no transcritos. En procariontes

existen de una a algunas copias de genes del DNA ribosomal (rDNA) y los genes pueden estar organizados en un operón único o pueden estar dispersos por todo el genoma. En eucariontes, usualmente existen tres o cuatro subunidades de nrDNA en una especie. Estas subunidades son caracterizadas en unidades de velocidad de sedimentación (S, por Svedburg): a) Una subunidad larga cuyo rango en tamaño va desde 16S (alrededor de 1500 nucleótidos) hasta 28S (arriba de 4000 nucleótidos); b) La subunidad 5.8S (160 nucleótidos) en eucariontes, el cual es un derivado de la subunidad 23S de procariontes y continua tanto estructural como funcionalmente relacionado con la subunidad grande del nrDNA; c) Una subunidad pequeña 18S (1800 nucleótidos); d) una subunidad 5S (120 nucleótidos).

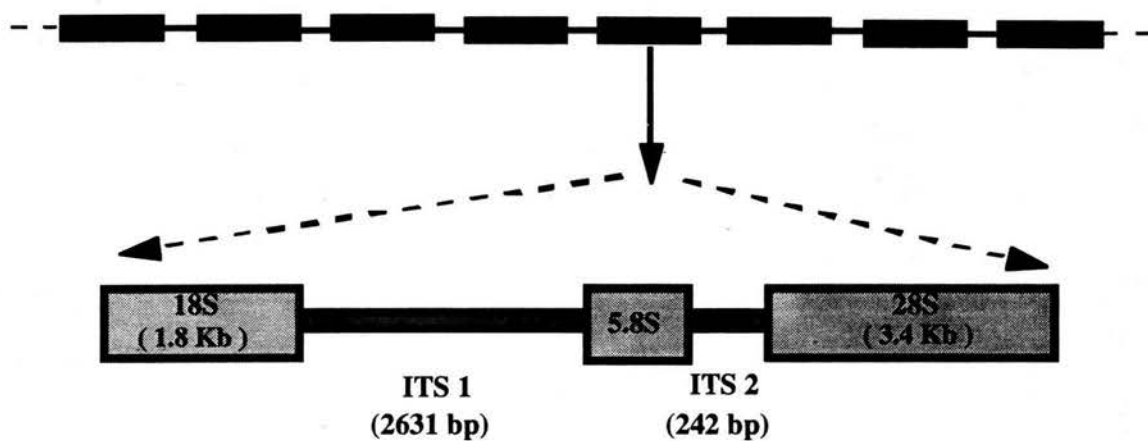


Fig 1. Organización en tandem de las unidades repetidas del nrDNA en pinos, mostrándose en detalle la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del nrDNA.

En eucariontes, dos espaciadores internos transcritos (ITS1 y ITS2) separan las subunidades 18S, 5.8S y 28S (o sus homólogos), y un espaciador externo transcrito (ETS) esta localizado mas allá de la subunidad 18S (Fig 1). Los espaciadores transcritos contienen señales para procesar el transcrito del rRNA. Copias adyacentes de la unidad repetida de

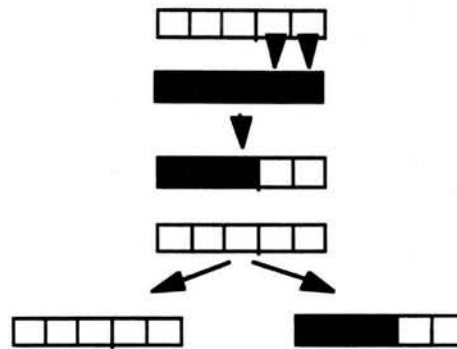
nrDNA ("nrDNA repeat") son separadas por un espaciador no transcrito (NTS) también llamado espaciador intergénico por algunos autores. Esta región contiene elementos que sirven como estimuladores de la transcripción (Hillis y Dixon, 1991; Baldwin et al., 1995).

Una de las razones por la cual el nrDNA es útil para el análisis filogenético es que diferentes regiones de la unidad repetida del nrDNA evolucionan a tasas muy distintas. Como consecuencia, la variación en las subunidades del nrDNA puede ser seleccionada y usada para cualquier pregunta relacionada con la filogenia de un grupo con una resolución apropiada. Adicionalmente, las islas de secuencias altamente conservadas dentro de la mayoría de los genes del nrDNA son muy útiles en el diseño de cebadores ("primers") "universales" que pueden ser usados para analizar el nrDNA o su transcrito mediante su amplificación vía la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o usándolo como sondas en análisis de sitios de restricción con endonucleasas (RFLP) o sus combinaciones (e.g. PCR-RFLP, Liston 1992).

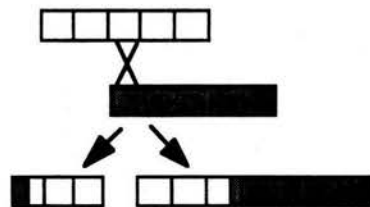
1.2 Evolución concertada de familias multigénicas

Los miembros de una familia multigénica tienden a ser similares y evolucionan juntos (de manera concertada) debido a mecanismos que operan en la homogenización de las secuencias dentro de la familia. Esta tendencia hacia la homogenización es conocida como evolución concertada. Diversos mecanismos de evolución concertada han sido propuestos, pero los más importantes parecen ser la conversión génica y el entrecruzamiento desigual (Arnheim et al., 1980; Coen et al. 1982, Dover 1982; 1989). La conversión génica es un proceso en el cual el apareamiento entre dos genes homólogos se acompaña de la pérdida de parte o toda la secuencia de nucleótidos en un gen y es reemplazado por una réplica de la secuencia de nucleótidos del otro gen. El resultado es que la secuencia de un gen "convierte" la secuencia del otro gen, haciéndolo exactamente igual al primero (Fig. 2a). En el caso del entrecruzamiento desigual, las familias multigénicas se encuentran pareadas de manera no alineada durante la meiosis, por lo que el entrecruzamiento resulta en gametos que pueden tener tanto un incremento como un decremento en el número de copias. El

entrecruzamiento desigual por sí mismo no resulta en un incremento del número de copias, mas bien en un aumento de la varianza en el número de copias. Esto es, un entrecruzamiento subsecuente puede corregir el número de copias o incrementarlo. El resultado final es genéticamente similar a la conversión génica, debido a que la secuencia de nucleótidos de algunos miembros de la familia multigénica han sido reemplazados con las secuencias de nucleótidos de los otros miembros. Al mismo tiempo que el entrecruzamiento desigual incrementa la varianza en el número de copias, actua homogenizando las secuencias de los miembros de la familia (Fig. 2b).



a) Conversión génica



b) Entrecruzamiento desigual

Fig 2. Mecanismos de evolución concertada que pueden homogenizar las secuencias de los miembros de familias multigénicas

Una vez que la duplicación ha ocurrido, la deriva génica y la selección natural pueden afectar la probabilidad de que la duplicación se fije en la población. Aún si la

fijación es ligeramente deletérea, la deriva génica puede causar fijación a través de un proceso conocido como obstáculo de Muller ("Muller's ratchet"; Charlesworth, 1985). El obstáculo de Muller se refiere al decremento paulatino de la adecuación máxima dada la fijación aleatoria de genes subóptimos. Si existe una ventaja del heterócigo sobre el gen, entonces una duplicación por entrecruzamiento desigual puede generar gametos que contengan ambos alélos, otorgando a la duplicación una ventaja. La duplicación de una par de genes funcionales podría tener en inicio una ventaja si existe un balance entre mutación y selección en la población. Si la mutación ocurre en una u otra copia del gen duplicado, y si se hace necesario tener ambos tipos de copias para retener suficiente actividad génica, entonces las restricciones selectivas continuarán siendo importantes. Si la duplicación se fija en la población, y no existen impedimentos funcionales para tener las dos copias de genes, entonces las restricciones selectivas pueden ser relajadas. Dependiendo del balance de las fuerzas de mutación, conversión génica, y entrecruzamiento desigual, los pares de genes pueden mantenerse activos y muy similares, o pueden divergir en función, o pueden perder su función y convertirse en pseudogenes.

La conversión génica y el entrecruzamiento desigual mantienen la similaridad entre copias de genes en familias multigénicas (Fig. 3). En conjunto, los efectos de la conversión génica y el entrecruzamiento desigual en la presencia de mutaciones ventajosas y deletéreas han sido estudiadas haciendo uso de simulaciones numéricas (Ohta 1987; 1988). La tasa a la cual la evolución de las familias multigénicas se lleva a cabo, depende fuertemente de la tasa de recombinación desigual. Las familias multigénicas pueden evadir la acumulación de mutaciones cuando existe selección natural intensa, y la selección natural positiva es necesaria para los genes que evolucionan a nuevas funciones. Aparentemente, los genes de una familia multigénica pueden "escapar" de la conversión génica y entonces ser capaces de evolucionar hacia nuevas funciones (Walsh, 1987). Algunos ejemplos empíricos de tales escapes han sido identificados, tales como la subunidad 18S del nrDNA en humanos y monos (Brownell et al., 1983). Los efectos de la conversión génica y la selección sobre las

familias multigénicas han recibido atención teórica (Slatkin, 1986; Walsh, 1987), y estos modelos muestran que los efectos de selección pueden ser acumulativos sobre la familia multigénica, aumentando de manera importante el efecto de la selección.

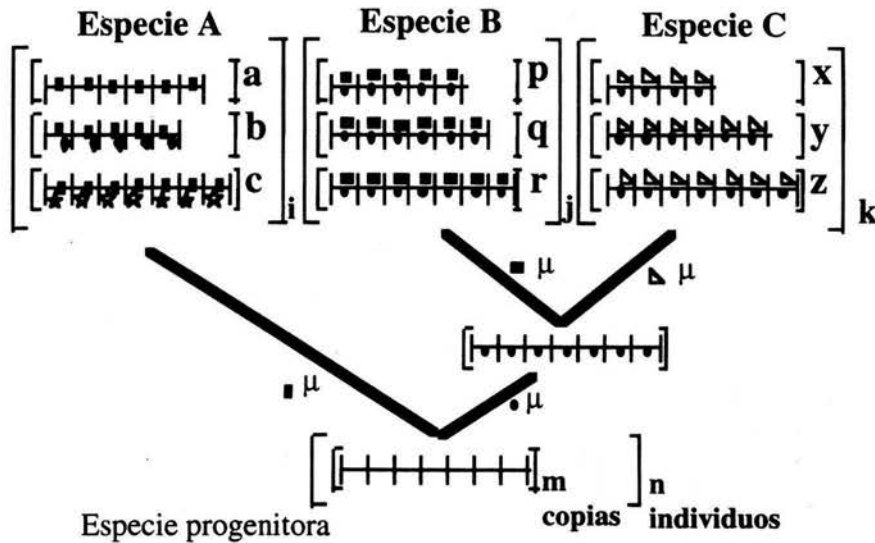


Fig 3. Eventos de especiación inferidos a partir de evolución concertada de una familia multigénica. Las μ corresponden a eventos de mutación. Las letras minúsculas (m) son las copias de unidades repetidas en los n individuos de cada población.

1.3 La región de los espaciadores internos transcritos ITS del nrDNA en angiospermas y gimnospermas.

Existen cientos de copias de nrDNA en el genoma de las plantas, arreglados en unidades repetidas en tandem y distribuidos en uno o algunos loci cromosómicos denominados regiones organizadoras nucleares (NORs) (Hamby y Zimmer, 1992). Esta familia de genes repetidos sufre de evolución concertada rápida vía el entrecruzamiento desigual y conversión génica (Baldwin et al., 1995, Wendel et al. 1995, SECCION 1.2). Como consecuencia, se espera que la región del ITS se encuentre homogénea dentro del genoma, por lo que se puede decir que una sola secuencia del ITS es característica de un individuo. Resumiendo, la evolución concertada y la recombinación sexual tienden a promover la

uniformidad del ITS dentro de individuos y entre individuos dentro de poblaciones (Soltis y Kuzoff, 1993).

Una limitación de la utilidad del ITS en sistemática, es que este locus provee de una relativamente pequeña cantidad de datos de secuencia. En angiospermas, el ITS varía entre 565 a 700 pares de bases (bp) en longitud. Puesto que la subunidad 5.8S (163-164 bp) exhibe niveles muy bajos de variación en su secuencia, solamente los 400-535 bp del ITS1 y el ITS2 son generalmente analizables para comparaciones filogenéticas entre especies relacionadas y géneros. En cambio, la región del ITS en gimnospermas es considerablemente mas larga que en las angiospermas típicas. Bobola et al. (1992) mapearon la unidad repetida del nrDNA de *Picea rubens* y *P. mariana*, haciendo uso de análisis de sitios de restricción (RFLPs) con sondas heterólogas del nrDNA, y estimaron que la longitud del ITS de *Picea* mide alrededor de 3000 bp. Karvonen et al. (1993) usaron una metodología similar en *Pinus sylvestris* y determinaron que la longitud del ITS fue de 3000 bp. Por su parte, Qu et al. (1993) tambien notaron que el ITS de las gimnospermas es mas largo que el de angiospermas.

Liston et al. (en prensa), presentan mas detalle sobre la variación en la longitud del ITS en gimnospermas. Ellos construyeron mapas de sitios de restricción del ITS amplificado con PCR para 32 especies de gimnospermas, representando catorce familias y cuatro órdenes. De acuerdo con sus resultados, existe una variación substancial en la longitud del ITS en gimnospermas (975-3125 bp) en comparación con angiospermas (600-700 bp). El análisis de los sitios de restricción indican que el ITS2 junto con la subunidad 5.8S tiene un rango de 350-425 bp, mientras que el ITS1 es responsable de la mayor parte de la variación en la longitud del ITS de gimnospermas.

Los representantes de la familia Pinaceae exhiben la mayor variación en la longitud del ITS (1550-3125 bp) (Karvonen y Savolainen, 1993; Qu et al., 1993; Bobola et al. 1994; Liston et al., 1995; Liston et al., en prensa). En cambio, la longitud del ITS de las familias Cupressaceae, Taxodiaceae, Cephalotaxaceae, y Taxaceae son relativamente

estables (975-1125). Las longitudes observadas en *Sciadopityaceae* (1250 bp) y *Araucariaceae* (1325-1350 bp) son algo mayor, mientras que el ITS de *Podocarpaceae* (2000-2100 bp) caen el rango observado en *Pinaceae*. Fuera del orden Coniferales, la longitud del ITS es similar entre *Cycadales* (1150-1450 bp), *Gynkgoales* (1200 bp), y *Gnetales* (1200-1500 bp). Por otro lado, el ITS del género *Welwitschia* es de solo 725 bp, el mas corto encontrado en este estudio, y ligeramente mayor que la longitud reportada para angiospermas (Liston et al., 1995; Liston et al., en prensa).

Los niveles de variación en las secuencias, estimados a partir del análisis de los sitios de restricción, sugiere que el análisis filogenético con el ITS es informativo a nivel intragenérico en la mayoría de las gimnospermas. En la familia *Cupressaceae* las comparaciones intergenéricas son factibles. Sin embargo, poca homología en la variación de la longitud del ITS y pocos sitios de restricción compartidos a nivel de los taxos mayores ha sido documentada (Liston et al., 1995; Liston et al., en prensa), por lo que el ITS parece tener poca resolución en comparaciones por arriba del nivel intergenérico.

1.4 La región del ITS en pinos: potencial como fuente de caracteres moleculares para la inferencia filogenética.

Los niveles de variación observados en la región del ITS en plantas terrestres generalmente tienen el nivel de resolución necesarios para la inferencia de relaciones interespecíficas e intergenéricas en muy diversos taxa, incluyendo gimnospermas (Baldwin et al. 1995; Liston et al., en prensa). El genero *Pinus* es particularmente interesante dado que la longitud de la region del ITS es excepcional (ca. 3000 bp), solo superado por el género *Picea* (3400 bp) (Bobola et al., 1994; Liston et al. En prensa). En *Pinus pinea*, el ITS1 tiene una longitud de 2631 bp y el ITS2 de 242 bp (Marroco et al., 1996). Las secuencias de nucleótidos del ITS2 en coníferas son menos variables que en angiospermas y puede ser alineado entre géneros de *Pinaceae*. Asimismo, provee la resolución necesaria para inferir las relaciones filogenéticas entre subsecciones en *Pinus*.. El patrón de variación en las secuencias en el ITS1 es mas heterogéneo. Las terminaciones 5' y 3' del ITS1 estan

evolucionando rapidamente, y las secuencias entre los subgéneros *Pinus* y *Strobus* no pueden ser alineadas (Liston et al., en prensa).

La comparación de mapas de sitios de restricción usando la técnica de PCR-RFLP (Liston, 1992) de la región del ITS muestra que las especies dentro de una subsección comparten la mayoría de los sitios de restricción, mientras que los subgéneros poseen pocos sitios en común (Liston et al., en prensa; Mendez-Cardenas y Alvarez-Buylla, en prep.). Esto indica que el ITS1 tiene el potencial de ser útil para resolver las relaciones dentro de los subgéneros. El ITS1 contiene también cinco subunidades repetidas organizadas en tandem, las cuales suman ca. 1100 bp (Marroco et al., 1996). Aún cuando la conservación en las secuencias de estas subunidades en otras especies es desconocida, análisis preliminares indican que la terminación 3' de la subunidad terminal del ITS1 es alineable entre los dos subgéneros de *Pinus* (Alvarez-Buylla y Liston, en preparación), permitiendo una alta resolución en las relaciones de niveles superiores dentro del género *Pinus*. Por otro lado, la variación en el ITS1 es alta, similar a lo que ocurre en la región total del ITS en angiospermas. Sin embargo, la longitud de la secuencia no repetida en el ITS1 de los pinos es tres veces la de las angiospermas, lo cual provee de datos de secuencia suficientes para una buena resolución de las relaciones filogenéticas dentro de cada subgénero.

La heterogeneidad observada en el ITS1 ofrece dos aspectos potenciales adicionales, mismos que son los objetivos de esta tesis. La variación encontrada entre subsecciones y entre especies sugiere que el ITS1 podría detectar variación a nivel intraespecífico, lo cual ofrece la posibilidad de un nuevo locus para inferir relaciones entre poblaciones. Asimismo, la heterogeneidad del ITS1 indica que la homogenización de variantes en el ITS1 puede ser relativamente lenta, por lo que unidades repetidas de distinto origen puede ser mantenido e identificado (Baldwin et al., 1995). Esto abre también la posibilidad de un nuevo locus capaz de detectar eventos de introgresión o evolución reticulada. La región del ITS puede proveer de información sobre eventos de introgresión o

evolución reticulada si la homogenización de las unidades repetidas por evolución concertada es baja o retardada, por lo que en un evento de hibridación, las unidades repetidas de las líneas parentales se ven expresadas en el híbrido como secuencias o patrones de restricción complementarios (Baldwin et al., 1995, Sang et al., 1995; Quijada et al., 1995). Entre los factores que pueden favorecer la falta de homogenización de las unidades repetidas en los híbridos están: a) el tiempo transcurrido desde la hibridación es corto, b) las unidades repetidas del ITS se encuentran en distintos loci en los taxa de las líneas parentales y la conversión génica interlocus no operó en el híbrido, c) el híbrido es asexual.

La posibilidad de variación intraespecífica y el mantenimiento de las unidades repetidas de las líneas parentales en híbridos no solo ofrecen la posibilidad de un marcador molecular muy versátil, sino también implican problemas metodológicos y de análisis. Por ejemplo, la existencia de variación intraespecífica podría dificultar el análisis a niveles taxonómicos mayores, produciendo ambigüedades e inconsistencias dada la existencia de polimorfismos dentro de cada especie. Esto implicaría que cada especie debería ser muestreada adecuadamente para tener control sobre esta variación. Por otro lado, los métodos de análisis filogenético en general suponen un modelo de evolución vertical (eventos de divergencia), y los métodos que consideran casos de evolución reticulada (especiación por hibridación) han sido poco desarrollados (Rieseberg, 1995). Esto implica que debe tenerse un cuidado especial en el análisis de distintas especies de pinos, y en el caso de encontrarse individuos híbridos, estos deben ser considerados con cautela en el análisis y excluirlos del mismo.

1.5 Estructura y Objetivos de la tesis

La tesis está estructurada de la siguiente forma:

El capítulo I (introducción) trata de los aspectos relacionados con el uso del DNA ribososomal como marcador molecular para inferir filogenias, así como los aspectos más importantes de la evolución molecular del nrDNA y la variación documentada de la región

de los espaciadores internos transcritos (ITS) en plantas. Los capítulos II y III son la esencia de la tesis y se presentan en un formato para su publicación. El capítulo final pretende dar una discusión general que permita delinear las preguntas que quedaron sin contestar sentando las bases para estudios futuros sobre la región del ITS en pinos.

Los objetivos de la presente tesis son

A) Establecer la existencia de aditividad de tipos diferentes de unidades repetidas del ITS en híbridos de cruas controladas de especies diferentes de pinos.

B) Probar si existe variación intraespecífica en el ITS de *P. rzedowskii*.

Capítulo II
**The ITS region of nrDNA as a tool in studies of
hybridization in pines**

Adrián Quijada, Aaron Liston*, William Robinson*, and Elena Alvarez-Buylla

Centro de Ecología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México D.F., 04510, Mexico
phone: (525) 622-9013
fax: (525) 616-1976
e-mail: aquijada@miranda.ecologia.unam.mx

*Dept. of Botany and Plant Pathology,
Oregon State University,
Corvallis, Oregon, 97331, USA

First draft March 25 1996

2.1 ABSTRACT

Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) genes exist as tandemly repeated cistrons , each repeat unit composed of a highly conserved coding sequence plus shorter and more variable non coding spacer regions. Recently, the internal transcribed spacer (ITS) region of 18S-26S nuclear ribosomal DNA (nrDNA) has proven to be a useful source of characters for phylogenetic studies in some plant groups. However, there are additional advantages in several properties of the ITS region for evolutionary studies. Unlike cpDNA, ITS data can provide direct evidence of reticulate evolution if concerted evolution fails to act across repeat units contributed by different parental species. We investigated the maintenance of parental ITS using controlled hybrids from six pine species in the subgenus *Pinus*.. Restriction fragment patterns in the ITS region for three endonucleases showed the parental contribution patterns in the hybrids. Additionally, we used Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) analysis, a novel and growing tool in systematics capable of detecting small differences between taxa as changes in gel mobilities of single strand DNA from products of PCR. SSCP of the ITS2 region showed that gel mobilities in the hybrids have combined patterns in relation to patterns of parental species.

2.2 INTRODUCTION

Eukaryotic nuclear ribosomal DNA (nrDNA) has two internal spacers located between the small subunit (16S-18S) and 5.8S rRNA coding regions (ITS1) and between the 5.8S and large subunit (16S-18S) rDNA coding regions (ITS2). The two spacers and the 5.8S subunit are collectively known as the Internal Transcribed Spacer (ITS) region and have become an important nuclear locus for molecular systematic investigations in flowering plants (Baldwin et al., 1995). ITS variation in gymnosperms has only recently called the attention of systematists (Liston et al., in press). Additionally, ITS data can provide direct evidence of reticulate evolution if concerted evolution fails to act across repeat units contributed by different parental species (Baldwin et al., 1995; Sang et al., 1995). The underlying causes of non-homogenization of repeats may be: a) the hybridization event was recent, b) ITS repeats are at different loci in parental taxa and interlocus gene conversion is non-operative in the hybrid, c) the hybrid is asexual. Parentage of suspected early generation hybrids may be resolved simply by screening for presence or absence of restriction sites diagnostic for ITS sequences of each of the presumed parental species. In such cases, additivity for the parental restriction patterns can provide excellent evidence of hybridity (See also Baldwin et al., 1995; Sang et al., 1995).

In pines, like other gymnosperms, the ITS region is significantly longer than in flowering plants (Bobola et al., 1992; Karvonen et al., 1993; Liston et al., in press). Additionally, ITS1 is considerably longer than ITS2 and most of ITS length variation in gymnosperms is due to length variation of ITS1. The large size of ITS1 makes direct sequencing of this region difficult, so restriction length variation analyses using restriction site analyses of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP, Liston, 1992) are alternative strategies. One may also focus on ITS2, that is suitable for direct sequencing or alternative

DNA screening techniques such as single strand conformation analysis of PCR-amplified fragments (PCR-SSCP, Hayashi, 1992; Lessa and Applebaum, 1993).

Here we focus on the utility of ITS region to detect hybridization events using controlled hybrids of pines and we discuss the potential of this marker for studies of reticulate evolution in natural populations of pines.

2.3 METHODS

We used fourteen individuals of F1 and F2 hybrids and their correspondent parental lines provided by the Institute of Forest Genetics, Plaerville, CA. Parental lines belonged to the following species: *Pinus flexilis*, *P. strobiformis*, *P. griffithi*, *P. cembroides*, *P. edulis*, and *P. quadrifolia*. Hybrid individuals were from the following crosses: *P. flexilis* X *strobiformis*, *P. flexilis* X *griffithi*, *P. strobiformis* X *griffithi*, *P. cembroides* X *edulis*, and *P. quadrifolia* X *edulis*.

Isolation of total genomic DNA followed the protocol of Murray and Thompson (1980). Polymerase chain reaction amplifications of the ITS region followed the protocol of Liston (1992) with the addition of 1% BSA, and 5% DMSO to each 100 µl reaction. The primers 26S-25R (5'-TAT GCT TAA ACT CAG CGG GT-3') (Nickrent et al., 1994) and a modification (5'-GGG AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') of the ITS-5 primer of White et al.(1990) were used with a 55 C annealing step. For ITS2 amplifications the ITS-3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') and the 26S-25R primers of White et al. (1990) were used with a 52 C annealing step. Restriction digests of ITS region were conducted with 250-500 ng (5-10 µl) of unpurified PCR product and the addition of manufacturer's (NEB) recommended buffer. The ITS of each individual was digested with nine endonucleases, which recognize 4-bp sites. Electrophoresis of digested samples was conducted with Tris-Borate-EDTA buffer in 2% agarose gels at 100 V. Bands were

visualized with ethidium bromide and photographed with a CCD video imager. The size of restricted products was estimated with a 100 bp ladder (BRL).

Single Strand Conformation Polymorphisms (PCR-SSCP) analysis of the amplified ITS2 was conducted following Sheffield et al. (1993). The amplified DNA was mixed with an equal volume of formamide loading dye (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, and 0.05% xylene cyanol). The samples were denatured for 5 minutes at 95 C and then loaded onto a gel consisting of 6% acrylamide (49:1 acrylamide:bis), 5% (V/V) glycerol and 0.5 X TBE. Samples were electrophoresed for at least 2.5 h at 120V in a water cooled vertical chamber (BIORAD) in 0.5 X TBE running buffer. Single stranded bands were visualized with ethidium bromide and photographed with a CCD video imager.

2.4 RESULTS

From the nine assayed enzymes (*Alu* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Fok* I, *Hha* I, *Msp* I, *Bfa* I, *Scr* FI, *Dpn* II), three (*Alu* I, *Rsa* I, and *Hae* III) produced polymorphic patterns among parental species analyzed. Digests of ITS region in hybrids showed patterns of restriction site additivity concordant with patterns of parental species. Although additivity was present in all hybrids, this was most clear in the crosses *P. flexilis* X *griffithi* and *P. strobiformis* X *griffithi* (Fig. 1). Digests with *Alu* I in *P. cembroides* X *quadrifolia* and *P. edulis* X *quadrifolia* (not shown) indicated additivity but similarity between RFLP patterns of parental species made identification of bands contributed by each parent difficult. Total ITS length of hybrids varied because repeats of both parents were present in them. For example, *Rsa*I bands of hybrids added to ca. 4180 bp, about 1180 bp more than the usual ITS size, while *Hae* III bands of hybrids added to ca. 3780 bp, about 780 bp more. These patterns were also evident in F2 hybrid individuals analyzed, where parental additivities were the same as in F1 hybrids. Because of the small sample size used, F2 segregation

patterns were not evident and homozygotes of each parental species were not observed in the few F2 individuals analyzed.

PCR-SSCP analysis showed further patterns of additivity in gel mobilities. While the parental species exhibited two strands, hybrids showed four strands which mobilities were complementary enabling the detection of the contribution of each parental species in most cases (Fig 2). Again, for *P. cembroides X quadrifolia* and *P. edulis X quadrifolia* additivity and parentage was less clear, because the patterns of the parental species were very similar.

2.5 DISCUSSION

Our results show that ITS in pines could be used as a suitable marker to screen events of hybridization. PCR-RFLP and PCR-SSCP are some of the many different techniques alternative to direct sequencing that may be used to screen hybrid patterns of the ITS in putative parental species and the suspect hybrids. PCR-SSCP could be particularly useful because they enable screening of differences for a large number of individuals in a relatively short time. However, as our results show, detection of hybridization events depends on how different the banding patterns of the parental species are.

The ITS region in pines offers a large set of characters for phylogenetic reconstruction, but the detection of hybrids could be restricted to those cases in which the banding patterns of the suspected parental species are different enough. Such differences among banding patterns are likely to depend on the degree of divergence polymorphism in the ITS region among suspected parental species. This potential limitation is evident in the *P. cembroides X quadrifolia* and *P. edulis X quadrifolia* crosses when analyzed by both PCR-RFLP and PCR-SSCP techniques. The fact that both of these techniques yield similar

patterns for the same pairs of species of these three that belong to the same subsection (Cembroides), suggests that the similarity of the banding patterns might be, in fact, related to the low percent of divergence in the ITS sequences being compared. However, from the crosses analyzed in this study it is hard to ascertain that the similarities between the banding patterns of these species reflect a relatively smaller divergence than those of the other species analyzed for which clear differences were found (*flexilis*, *strobiformis*, and *griffithii*.), because all three of these other species also belong to the same subsection (Strobi).

In any case, it is clear that in some cases, sequence data might be needed to detect the parental species based on the sequence of the suspected hybrid. This approach has been successfully used to reconstruct reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) from samples collected both from natural populations and from a botanical garden (Sang et al. 1995). It is also important to keep in mind that at least part of the intraindividual heterogeneity among repeats might not result from a recent hybridization event and such variation might make the identification of parental species difficult. This should be kept in mind when trying to identify potential parental species in the field.

The techniques tested here to detect hybridization may be limited also if the rate of homogenization among repeats in the nrDNA multigene family in the parental species and their hybrids is very low. Lack of homogenization in the nrDNA repeats has been reported in some plants including a pine species (King and Schaal, 1989, Capposela et al. 1992; Karvonen and Savollainen, 1993). Recent studies (Wendel et al., 1995; Sang et al., 1995) that have explored the potential of ITS to study hybridization in angiosperms, have discussed the effects of concerted evolution in the homogenization of parental repeats. The few available studies indicate that homogenization rate is variable among plants, but the mechanisms underlying such variability are still not clear. Several models have been

proposed and the most accepted include unequal crossing-over and gradients of gene conversion (Ohta, 1980; Dover et al., 1993) as the main genetic mechanisms of concerted evolution, but further empirical evidence is needed in order to evaluate such models.

Although the possibility of homogenization of ITS repeats in hybrid pines under natural conditions should be considered, evidence from angiosperms (Sang et al., 1995) suggest that additive patterns may be conserved for long time periods. Furthermore, it has been suggested that in long-lived organisms, such as pines, homogenization events could be delayed (Sang et al 1995). We also expect that homogenization of repeats takes longer in conifers in general, than in angiosperms, because the ITS in pines is considerably longer and tandem repeats of nrDNA are found in many more loci than in angiosperms (Karvonen and Savolainen 1993).

In a systematic and evolutionary context, the use of ITS open the possibility to detect reticulate evolution events in cases where other markers (e.g. mtDNA or cpDNA) have suggested divergent events that conflict with morphological and historical evidence (Powell, 1983; Wagner, et al. 1987). Recent studies (Wendel et al., 1995; Sang et al., 1995) have shown the potential of ITS to study hybridization in angiosperms. Such studies might be particularly relevant in pines among which several species are suspected to be of hybrid origin and hybridization in natural conditions has been reported for some species (Wagner, et al. ,1987; Wang, et al. 1990; Wang and Szmidt 1990). The techniques evaluated in this study could be useful also to explore the frequency and importance of hybridization in natural populations as a possible speciation mechanism in non-polyploid events of hybridization. Additionally, ITS region could be a useful marker to obtain measurements of introgression rates among natural populations and to evaluate the consequences of hybridization on the maintenance or loss of genetic variation between species that occur in hybrid zones.

2.6 ACKNOWLEDGMENTS

David R. Johnson, Institute of Forest Genetics, kindly provided material of hybrid pines and their parental lines. We thank Alejandra Covarrubias for advice and support in her lab during some parts of this work. Alejandra Vazquez Lobo and Rosalinda Tapia patiently assisted during PCR-SSCP analyses, and Angeles Cortez kindly helped with various important tasks. This study was financed by CONACYT and PAPIIT (DGAPA, UNAM) grants awarded to EAB and a CONACYT scholarship to A.Q.



BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

Fig. 1. Restriction patterns of some hybrids and their parental species lines digested with Rsa I and Hae III. Restriction fragment patterns in hybrids are complementary related to parental species. A) *Pinus flexilis*; B) *P. strobiformis*; C) *P. griffithi*; D) Flex X Strob; E) Flex X Griff; F) Flex/griff X Flex/griff; G) Strob X griff.

Fig. 2. PCR-SSCP results for some hybrids and parental species lines. Mobility patterns in hybrids are complementary related to parental species. A) Cem X quad; B) Edu X quad; C) *Pinus quadrifolia*; D) *P. cembroides*; E) *P. edulis*; F) Strob/griff X strob/griff; G) Strob X griff; H) Flex X griff; I) Strob X flex; J) *P. griffithi*; K) *P. strobiformis*; L) *P. flexilis*

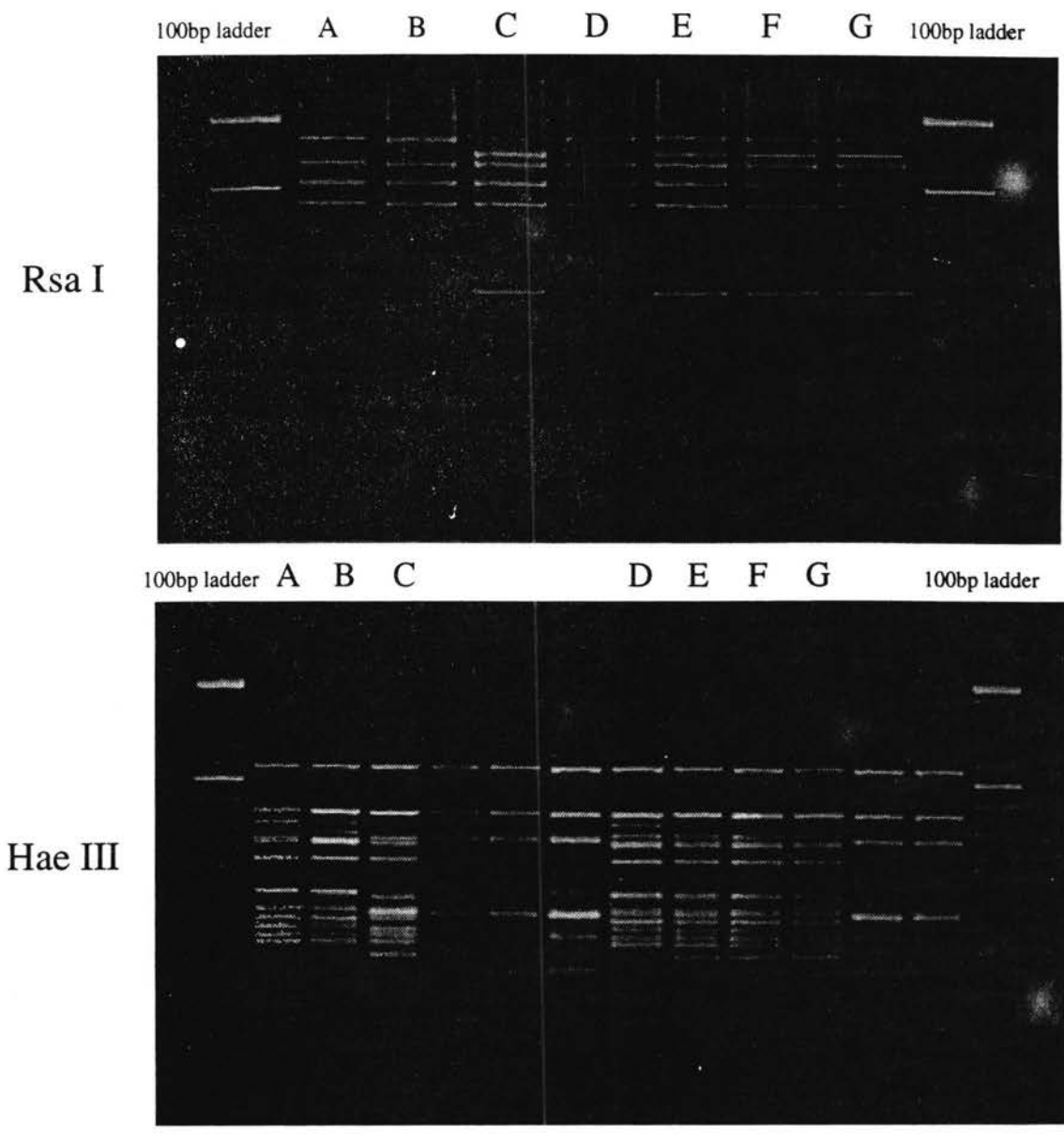


FIG. 1

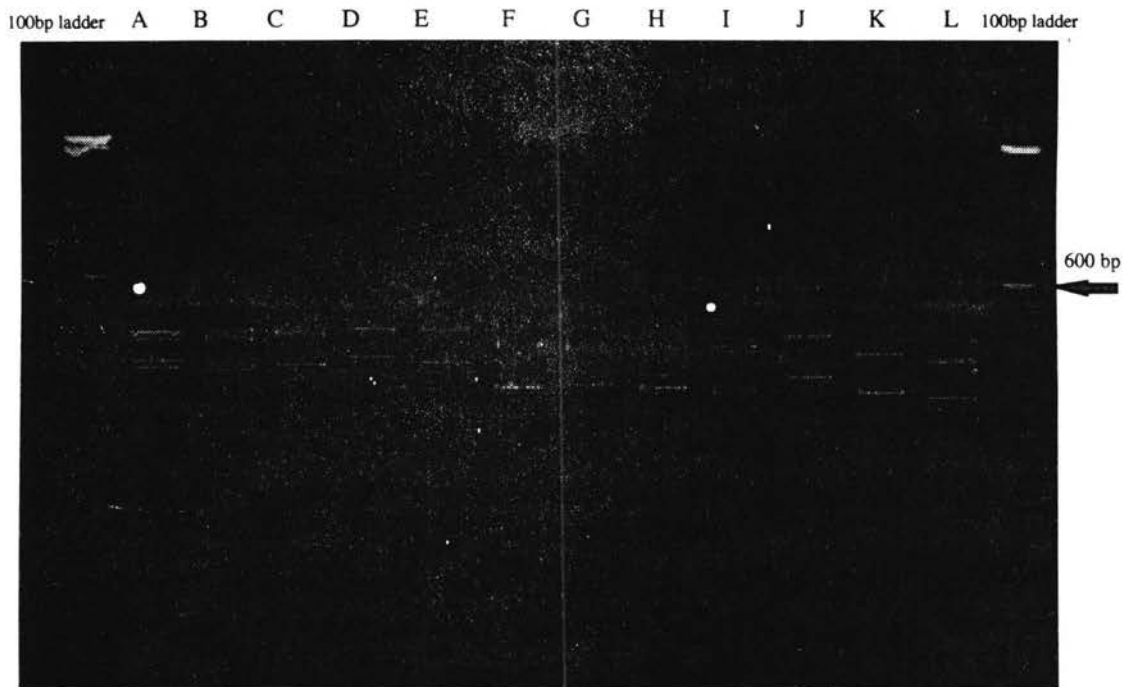


FIG. 2

Capítulo III

Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S region of *Pinus rzedowskii*

Adrian Quijada, Aaron Liston*, Patricia Delgado, Alejandra Vázquez-Lobo, and Elena
R. Alvarez-Buylla

Centro de Ecología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México D.F., 04510, Mexico
phone: (525) 622-9013
fax: (525) 616-1976
e-mail: aquijada@miranda.ecologia.unam.mx

*Dept. of Botany and Plant Pathology,
Oregon State University,
Corvallis, Oregon, 97331, USA

First draft March 25 1996

3.1 ABSTRACT

In the genus *Pinus* the the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and 5.8S region of the nuclear ribosomal DNA are ca. 3000 bp in length. The ITS1 is considerably longer than the ITS2 and partial sequences of ITS1 indicate that this region is evolving rapidly and exhibits intraspecific variation. The ITS2 and 5.8S regions are relatively conserved. We surveyed variability of the ITS and 5.8S region in four populations of *Pinus rzedowskii*, an endemic pine from Michoacan, Mexico, using PCR-RFLP analysis. A total of 86 individuals were assayed with five restriction endonucleases revealing thirteen variants. The same individuals were assayed with nine polymorphic isozymes. Most ITS variants were length mutations of 300-900 bp. A moderate degree of population differentiation in *P. rzedowskii* was detected. The average ITS diversity of fragment size patterns (based on Shannon's index) was 1.19, which represents 66 percent of total species diversity, while differences between populations account for 33 per cent of total diversity. Diversity measures for each restriction endonuclease and polymorphic isozymes show very similar results. Therefore, most of the ITS variability results from intrapopulation differences similar to variation at other nuclear loci. Implications of the nature of variants and diversity patterns in *P. rzedowskii* populations are discussed.

3.2 INTRODUCTION

Eukaryotic nuclear ribosomal DNA (nrDNA) has long been recognized as an important marker for studies in plant systematics (Hamby and Zimmer 1992). The nrDNA is organized in tandemly repeated units, each of which consists of coding sequences and several transcribed and non-transcribed spacer regions. Coding regions and spacers differ widely in their rate of evolution, and hence nrDNA clusters have the potential to reveal variation ranging from the level of major phyla to the population level (Appels and Dvorak 1982; Hillis and Dixon 1991; Hamby and Zimmer 1992). A difficulty with the use of nrDNA loci stems from the existence of polymorphisms among repeat units, which may cause differentiation even within a single individual. However, it is generally assumed that concerted evolution results in the homogenization of individual repeats and yields mostly uniform sequences among repeats within a species. Different mechanisms of concerted evolution have been proposed, including unequal crossing over and gene conversion (Arnheim et al. 1980; Dover 1982; 1989; Soltis and Kuzoff 1993; Sang et al. 1995; Wendel et al. 1995). Unequal crossing over assumes recombination among tandem repeats in either homologous or heterologous chromosomes, resulting in the stochastic elimination of variation in individuals and panmictic sexual populations. In contrast, non-stochastic processes, such as directed gene conversion, assume selection or "drive" for the homogenization of tandem repeats (Arnheim et al. 1980; Dover 1982; 1989).

The nrDNA has two internal transcribed spacers located between the small subunit (16S-18S) and 5.8 rRNA coding regions (ITS1), and between the 5.8S and large subunit (23S-28S) rRNA coding regions (ITS2). The two spacers and the 5.8S subunit are collectively known as the internal transcribed spacer (ITS) region and have become an important nuclear locus for molecular systematic studies of flowering plants (Baldwin et al. 1995). The ITS of non-flowering seed plants has been shown to be longer than the typical angiosperm ITS (Bobola et al. 1992; Brown et al. 1993; Karvonen et al. 1993; Qu et al.

1993; Liston et al. in press). Additionally, there are considerable ITS length variation in non-flowering seed plants. Restriction site analyses indicate that the ITS2 plus 5.8S subunit ranges from 350-425 bp, while ITS1 is responsible for most of ITS length variation found in non-flowering seed plants (Liston et al. in press). In the genus *Pinus*, there are no conserved restriction sites (outside of the 5.8S subunit) in the ITS region between the two subgenera recognized, and partial sequences of the ITS1 for different species of *Pinus* (Alvarez-Buylla and Liston unpublished) indicate that this region is evolving rapidly, and it was hypothesized that it might be variable at the population level. This opens the possibility of a valuable nuclear locus for studies of population variation at the DNA level in pines and permits a microevolutionary approach to study the homogenization mechanisms of nrDNA repeats.

Sequence variation of genes in multigene families and its distribution among and within populations is determined by the rates of mutation they experience and the effect of evolutionary forces at play at the population level. Namely, gene flow, selection, drift and mating systems. However, the process of concerted evolution, a non-mendelian genetic mechanism, affects variability of multigene families at the molecular level. The rate of homogenization of repeats by concerted evolution, depends on the number of copies, the number of loci and chromosomes on which the gene copies are found, the location of the loci along the chromosomes and the rate of DNA exchange within and between chromosomes (Dover 1982, Wendel et al. 1995). In pines, both the number of nrDNA repeats and loci are greater than in angiosperms and we expect their nrDNA to experience slower rates of homogenization (Karvonen and Savolainen 1993).

Very few studies have evaluated within population variability in pines of nrDNA and even fewer have compared such variation to that obtained with isozyme loci scored for the same individuals (Karvonen and Savolainen 1993). Such comparisons may help

evaluate alternative hypotheses concerning the evolutionary forces and genetic mechanisms determining the microevolutionary dynamics of such multigene families. Additionally, such comparative surveys are needed to evaluate the usefulness of nrDNA loci as markers for genetic studies of natural populations. In this study we tested the hypothesis that the ITS region can detect intraspecific variation in *Pinus rzedowskii* Madrigal et Caballero, a Mexican pine endemic to the state of Michoacan. *P. rzedowskii* has a very restricted distribution and is considered as endangered by some authors (Perry 1991). ITS variation was surveyed using a PCR-RFLP approach, which enables rapid and efficient exploration of restriction site variation in a large number of samples (Liston 1992). ITS data was compared to isozyme data collected from the same individuals.

3.3 METHODS

Needles from 86 individuals of *P. rzedowskii* were collected from the following locations (Fig. 1): Pinabete (n=14), Varoloso (n=29), Fresno (n=17), and Chiqueritos (n=26). Isolation of total genomic DNA followed the protocol of Murray and Thompson (1980) with some modifications. Needle tissue (10 g, fresh weight) was frozen with liquid nitrogen and quickly homogenized into crude powder. The powder was mixed with cold DNA extraction buffer (50mM Tris, pH 8.0/ 5nM EDTA/ 0.35 M Sorbitol/ 10% (wt/vol) polyethylene glycol (Mr 3350)/ 0.1% 2-Mercaptoethanol) and further homogenized with a Polytron homogenizer. After these steps the DNA extraction followed the procedure of Wagner et al. (1987). Each isolation used leaf tissue from a single individual.

Polymerase chain reaction amplifications of the ITS region followed the protocol of Liston (1992) with the addition of 1% BSA, and 5% DMSO to each 100µl reaction. The primers 26S-25R (5'-TATGCTTAAACTCAGCGGGT-3') (Nickrent et al. 1994) and a modification (5'-GGGAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3') of the ITS-5 primer of White et al. (1990) were used with a 55 C annealing step. Restriction digests of the ITS region were

conducted with 250-500 ng (6-10 μ l) of unpurified PCR product and the addition of manufacturer's (NEB) recommended buffer. Sixteen enzymes were assayed: *Aci* I, *Alu* I, *Bfa* I, *Bsa* II, *BST* UI, *Dde* I, *Dpn* II, *Hae* III, *Hha* I, *Hin* fI, *Msp* I, *Rsa* I, *Sau* 96I, *Scr* FI, *Taq* I, *Bsm* AI, *Fok* I. Electrophoresis of digested samples was conducted with Tris-Borate-EDTA buffer in 2% agarose gels at 100 V. Bands were visualized with ethidium bromide and photographed with a CCD video imager. The size of restricted products was estimated with a 100 bp ladder (BRL).

Diversity in the frequency of fragment-size patterns from digests was apportioned within and among *P. rzedowskii* populations using Shannon's information measure H (Hutchenson, 1970). Diversity estimates of fragment size patterns were obtained using: a) frequencies of fragment size patterns for each enzyme in each population, and b) frequencies of combined fragment-size patterns for all enzymes per individual in each population. H was calculated for two levels of fragment-size pattern diversity: H_{pop} is the average diversity within populations, and H_{sp} is the diversity within species. The proportion of diversity within populations is H_{pop} / H_{sp} , and the proportion of diversity among populations is $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$. Further analyses of population structure were based on Kruskal-Wallis ANOVA test to detect differences among populations, and using the F_{st} estimate according to a program (Alvarez-Buylla et al 1996) that applied Weir and Cockerham's (1994) procedure, where the value of p is the frequency of variable fragment size pattern per enzyme for each population. The significance of F_{st} values was tested by calculating $\chi^2 = 2NF_{st}(k-1)$, where the degrees of freedom are given by $(k - 1)(s - 1)$ and where k = number of fragment size pattern variants per enzyme, s = number of populations, and N = total sample size (King and Schaal 1989). Gene flow among populations was estimated by $F_{st} = 1 / (4Nm(n/(n-1)) + 1)$, where n = number of populations and m = the migration rate.

In addition, we compared patterns between isozyme and ITS variation among populations sampled. For this purpose, electrophoretic analyses of nine polymorphic isozymes were assayed using the same individuals sampled for ITS variation. Electrophoretic procedures followed standard protocols (Mitton et al. 1979; Conkle et al. 1982) and details on methods and buffer systems will be described elsewhere (Delgado 1996). The polymorphic isozymes used were anodic peroxidase (APX), cathodic peroxidase (CPX), glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), menadione reductase (MNR), leucine aminopeptidase (LAP), esterase (EST), shikimate dehydrogenase (GDH), isocitrate dehydrogenase (IDH), and isocitrate dehydrogenase (IDH). For the comparison Shannon's diversity index (H), UPGMA and Fst analyses were performed both ITS region as isozyme variation obtaining values and phenograms for the four populations sampled.

3.4 RESULTS

From the sixteen assayed enzymes five were informative detecting ITS region variability. The observed products are expected to be 3100 bp, approximately 100 bp longer than actual ITS (3000 bp), due to the position of the PCR primers in the small subunit and large subunit at the rDNA repeat. *Hae* III, *Sau* 96I, *Alu* I, *Rsa* I, and *Dpn* II revealed twelve fragment-size patterns (Table 1), which differences were characterized by the presence of one or two extra bands that yielded a total ITS length 300-900 bp longer than the normal 3000 bp. Note that estimated total lengths are in fact somewhat above or below the expected size due to errors while estimating band length based on the 100bp ladder. However, it is clear that banding patterns b, c, e, f, h, j and l from table 1 clearly add up to more than 3100 bp. The banding patterns reported in this table correspond to those in which the extra bands were easily visualized and their intensity was similar to that of other bands (fig 2). Additional less intense bands were also observed in some digests suggesting presence of several different ITS repeats within some individuals. Of 86

individuals analyzed, 71 showed extra light bands in at least one polymorphic enzyme. Replicate digests were performed for at least one pattern for each enzyme and population, and the extra light bands appeared consistently.

Table 1 shows the combined PCR-RFLP patterns for all enzymes tested. Combined fragment size patterns from each enzyme per individual produced thirteen types which varied in frequency among populations. The *adgik* pattern is the only one for which all enzymes tested yielded fragments that total ca 3000 bp. This pattern was present in 17.4% of all individuals sampled and occurred primarily in Chiqueritos population. All other patterns had extra bands for at least one of the enzymes and were found in all populations, including Chiqueritos. The most common patterns were *adhjk* (29%) and *adhik* (27.9%). Other patterns were rare, represented only by one individual in some populations.

The diversity, based on Shannon's index of combined fragment-size patterns averaged for the four populations was 1.195. This represents 66 per cent of total species diversity (Table 3), while differences among populations account for 33 per cent of total diversity. However, when diversity estimates were obtained for each enzyme separately (Table 4), average population diversity was 0.318, representing 79.7 per cent of total species diversity, while differences among populations account for 20.3 per cent of total diversity (Table 4). Absolute estimates are different because combined fragment-size patterns per individual produced eight rare variants, while the number of rare variants per enzyme is two at most. The differences between these two estimates may be attributed to the impact of rare variants when Shannon's index is calculated. Nonetheless, in both diversity estimates, most of variability in ITS results from differences among individuals within a population, rather than among populations.

Isozyme data revealed greater levels of population variation and greater absolute diversity estimates in comparison to ITS data. However, similar results of population genetic structure to those obtained with ITS, were obtained when using the isozyme data. Isozyme average population diversity was 0.943, and this represents 79.5 per cent of total species diversity. Differences among populations account for only 20.5 per cent of total diversity. F_{ST} estimates using both ITS and isozyme data coincide with diversity estimates, indicating moderate but significant differentiation among populations. Mean F_{ST} for ITS was 0.152 (SD = 0.075), that is significantly different from zero ($\chi^2 = 16.25$, $P < 0.05$). In contrast, a Kruskal-Wallis ANOVA was not capable of detecting significant population differentiation for the ITS variation ($H = 0.5059$, $P > 0.05$). Isozyme F_{ST} estimates were similar to those obtained with ITS, and also significantly different from zero (mean = 0.107; SD = 0.104; $\chi^2 = 17.05$, $P < 0.05$). F_{ST} estimates obtained with ITS and enzyme data were not significantly different ($t = 0.400$, $P > 0.05$). Likewise, gene flow (Nm) estimates were similar indicating relatively high gene flow both for ITS (mean = 2.45; SD = 1.57) as isozyme data (mean = 4.06; SD = 2.86), which were not significantly different ($t = 1.15$, $P > 0.05$).

Clustering patterns obtained with UPGMA analyses of isozyme and ITS variation (Fig. 3) were slightly different. Isozyme data produced two clusters, one of Pinabete and Chiqueritos and another one of Varoloso and Fresno. In contrast, ITS variation revealed a distinct cluster formed by Chiqueritos, Fresno and Varaloso populations separated from Pinabete population by a longer genetic distance than clusters from isozyme data.

3.5 DISCUSSION

Our results show that there is considerable intraspecific variation in the ITS region of *P. rzedowskii*. Because previous studies (Liston et al. in press) showed that most length and sequence variation in Pinaceae is due to ITS1 variation, while the 5.8S and ITS2 are more

conserved, we attribute the population-level variation observed in *P. rzedowskii* to ITS1. Therefore this region may be a locus suitable to explore levels of population DNA variation and its distribution. Additionally, the similarity in levels and distribution of this locus variation and that revealed with isozyme data, suggest that ITS1 variation could be useful to assess population genetic structure of natural populations. However, the nature of the ITS variation is intriguing and complex and deserves a careful treatment.

Previous documentation of nrDNA variation in the Pinaceae have revealed within-individual and within population variation (Bobola et al. 1992, and Karvonen and Savolainen 1993). The presence of bands of lower intensity in some individuals of *P. rzedowskii* suggest intraindividual ITS polymorphism in this study. The nature of this variation should be further pursued by mapping variable restriction sites for several individuals. But we also observed intense extra bands that yield total ITS length greater than 3000 bp. Similar patterns were obtained for several enzymes by Karvonen and Savolainen (1993). The intensity of these bands suggests that they occur at the same frequency as those bands of the 'standard' repeats. The fact that the fragment size is constant for each particular enzyme used and that such bands were repeatedly obtained in replicate digestions assures that they are not the result of partial digestions. Different enzyme sensibility to methylation could also explain these extra bands. However, of the five polymorphic restriction enzymes used, only two (Sau96I and Dpn II) are known to be sensitive to methylation levels.

There are two possible explanations for these intense extra bands. The first possibility is that they correspond to a different repeat variant with an extra restriction site in one of the larger bands of the 'standard' pattern, but the other complementary band cannot be resolved for one of two reasons. It is of the same size of one of the other bands or it is so small that it can not be seen in the gel. The second possibility is that extra bands

are produced by a hybridization event and that the ITS of the two parental species were slightly different in size. We have detected slight differences in total ITS length among pine species, particularly belonging to either of the subsections *Cembroides* and *Strobi* (E. Alvarez-Buylla and A. Liston unpublished data, see also Marrocco et al 1996 and references therein). Length variation in other regions of nrDNA has been reported previously. For example, non-transcribed spacers (NTS) exhibit wide length heterogeneity in flowering plants both at population and intraindividual level (Appels and Dvorak 1982; Capposela et al. 1992; Flavell et al., 1986; King and Schaal, 1989; Schaal et al., 1987). Spacer length heterogeneity appears in several instances to be due to variability in the number of subrepeating elements in the NTS, possibly arising from unequal crossing over among arrays of subrepeats (Appels and Dvorak 1982; Flavell et al. 1986; King and Schaal 1989).

Our data suggest that ITS reveals similar patterns of distribution of the variation within and among populations as isozyme data. Although, isozyme data revealed greater absolute levels of genetic variation than ITS data, both predict that most of this variation is found within rather than among populations. Similar results have been obtained for other rDNA studies (King and Schaal 1989; Appels and Dvorak 1982; Flavell et al. 1986; Karvonen and Savolainen 1993). For example, population structure in *Pinus sylvestris* in Finland was similar when inferred from variation of the entire rDNA repeat or from isozyme variation (Karvonen and Savolainen 1993, Muona and Harju 1989). These and results presented in this paper suggest that processes that govern the distribution of ITS and isozyme variation are similar, and that the genetic mechanisms affecting homogenization rates of repeats in the nrDNA multigene family do not bias genetic structure estimates.

Variability in a multigene family and the rate of homogenization of its repeats by concerted evolution, depends on the number of copies, the number of loci and

chromosomes on which the gene copies are found, the location of the loci along the chromosomes and the rate of DNA exchange within and between chromosomes (Dover 1982, Wendel et al. 1995). In pines, and in gymnosperms in general, slower rates of homogenization are expected for several causes. First, concerted evolution forces have long been known to homogenize repeats within individual arrays, but there are few robust demonstrations of concerted evolution of repeats among different arrays (but see Wendel 1995). Therefore, based on the few studies available, that show that *Pinus* and *Picea* have 10-12 nucleolus organizer regions (NORs) and a larger number of loci of nrDNA arrays of repeats than in angiosperms we expect slower rates of homogenization in pines than in angiosperms that have only one or two NOR (see Wendel et al. 1995 and studies cited in Karvonen and Savolainen 1993). Nonetheless, further research is needed in this area because a recent study of cotton accessions has inferred bi-directional interlocus concerted evolution based on ITS sequence data and phylogenetic analysis (Wendel et al. 1995). Secondly, based on basic probability laws, we expect that the longer ITS sequence of gymnosperms determines a slower rate of homogenization among repeats than in angiosperms. Finally, the localization of the arrays of tandem repeats along chromosome arms also affects the homogenization rate (e.g. telomeric localization favors interchromosomal crossing over).

ITS sequence data have become very popular to infer phylogenetic relationships of angiosperms. However, the type of within individual and population variation encountered in this and other previous studies in pines (see citations above) may bias phylogenetic inferences and should be taken into consideration. Empirical and theoretical evidence indicate that under special and rare circumstances, intraspecific polymorphisms make phylogenetic inference difficult, specifically when speciation rates exceeds homogenization rates (e.g. during explosive radiation) or when a hybridization event has occurred (Coen et al. 1982, Suzuki et al. 1986, Hillis and Davies 1988, Hillis and Dixon 1991). However, cautious analyses are particularly important when dealing with ITS1 data that seems to be

responsible for most of the variation encountered among species or genera where the ITS region is used as molecular marker to infer divergence events.

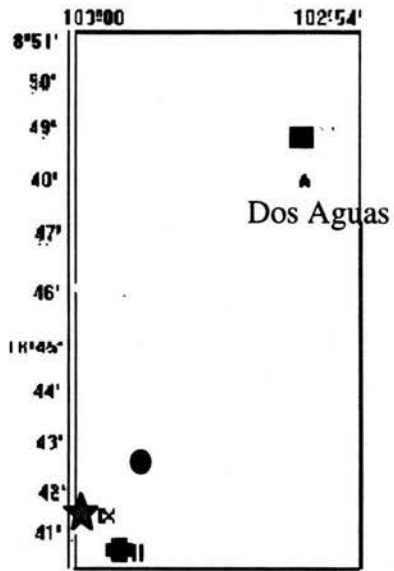
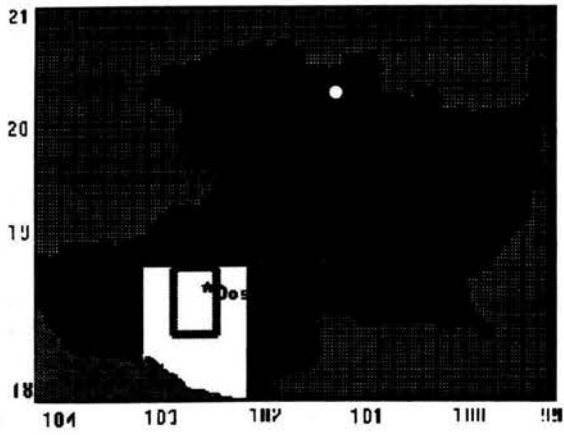
3.6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Manuel Zapien and Seferino Moreno for field support and assistance and the people of Dos Aguas and Varaloso for friendly support, Alejandra Covarrubias for advice and support in her lab during some parts of this work. Rosalinda Tapia gently assisted during PCR-RFLP analyses, and William Robinson and Angeles Cortez kindly helped with various important tasks and provided technical assistance. This study was financed by CONACYT and PAPIIT (DGAPA, UNAM) grants awarded to EAB, and CONACYT scholarship to A.Q.

Fig. 1. Geographical localization of *Pinus rzedowskii* population sampled in Michoacan, Mexico.

Fig. 2. Examples of fragment-size patterns variation for different individuals and populations of *P. rzedowskii*

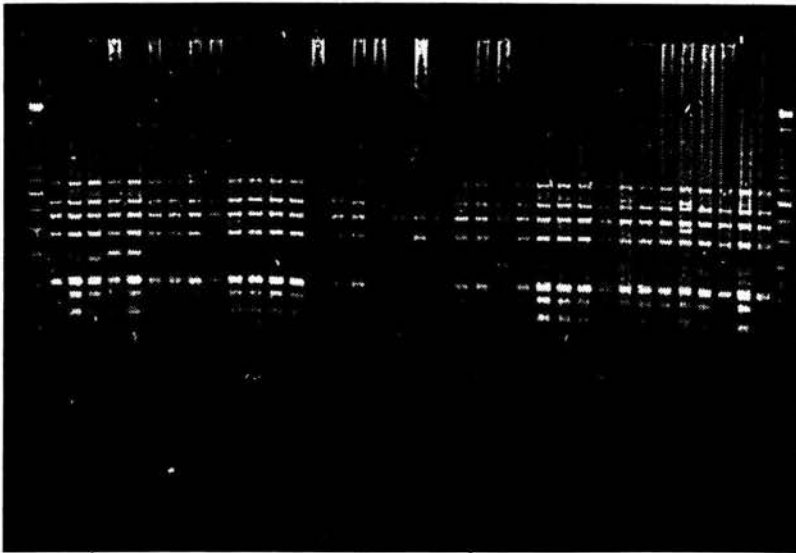
Fig. 3. Phenograms generated by UPGMA clustering of isozyme variation data (A) and ITS fragment-size patterns (B)



- Varaloso ★ Pinabete
- Chiqueritos ✚ Fresno

Fig 1

Hae III



Rsa I

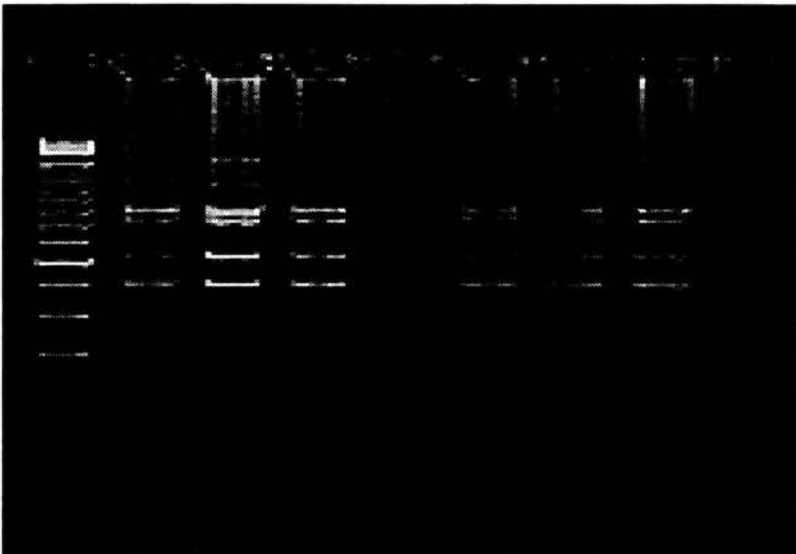


Fig 2

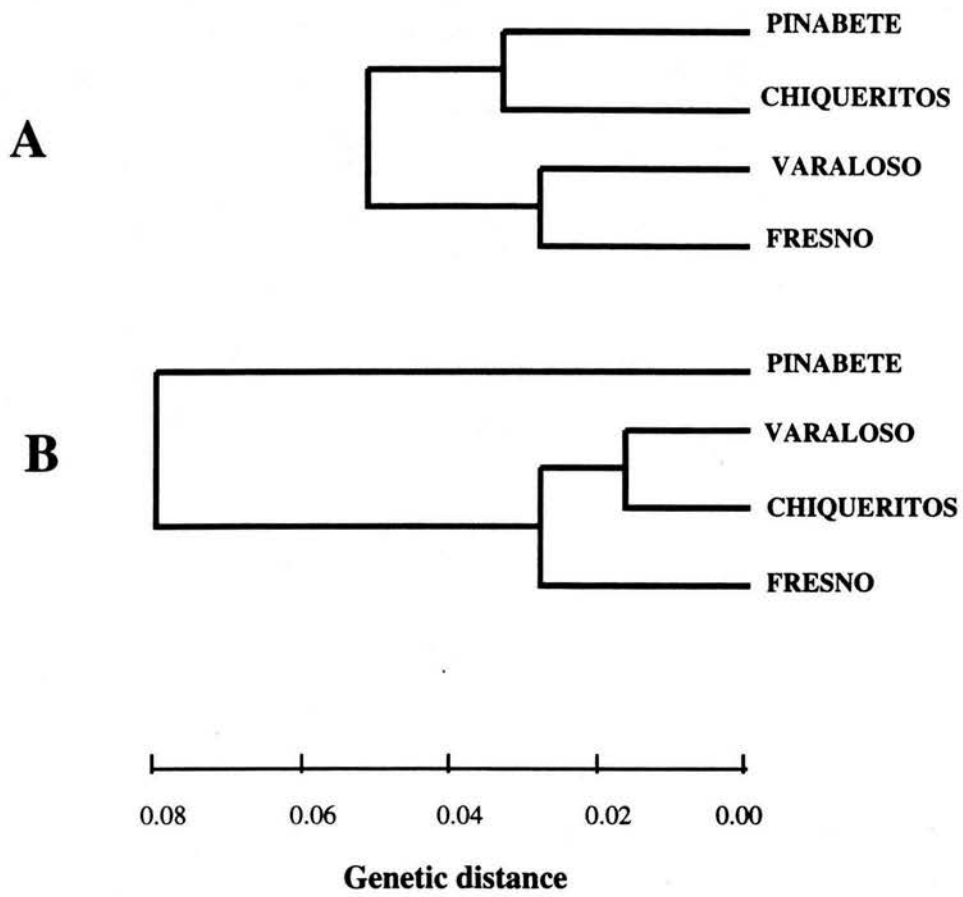


FIG. 3

Table 1. Fragment sizes for digests of the ITS region in *P. rzedowskii* according to 100bp ladder marker.

Size (bp)	Enzymes											
	Hae III			Sau96 I			Alu I		Rsa I		Dpn II	
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
1500											+	+
1200							+	+				
950									+	+		
880									+	+		
750				+	+	+						
680	+	+	+									
650				+	+	+			+	+		
630							+	+				
600												
580						+		+			+	+
560												+
520	+	+	+									
510			+									
500				+	+	+			+	+		
450	+	+	+		+		+	+				
430												
420			+									
400				+	+	+					+	+
360	+	+	+							+		
320							+	+				
300		+		+	+	+					+	+
290							+	+				
220									+	+		
200	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+
180	+	+	+									
170	+	+	+									
160	+	+	+									
150											+	+
140				+	+	+						
130	+	+	+									
120	+	+	+	+	+	+						
100				+	+	+						
90	+	+	+									
70	+	+	+									
40	+	+	+									
30				+	+	+						

Total fragment size pattern: a = 3170, b = 3470, c = 4100, d = 3190, e = 3640, f = 3770
g = 3080, h = 3660, i = 3200, j = 3560, k = 3130, l = 3690

Table 2 Distribution of the combined fragment size patterns of the digested ITS region among *P. rzedowskii* populations.

Pattern					Frequency in population				
HaeIII	Sau96I	AluI	RsaI	DpnII	Pinabete	Varoloso	Fresno	Chiqueritos	Total
a	d	g	i	k	1	0	1	13	15
a	d	g	j	k	3	5	1	0	9
a	d	g	i	l	0	5	0	0	5
a	d	h	i	k	0	1	0	0	1
a	d	h	j	k	7	7	4	7	25
a	d	h	i	l	0	0	1	0	1
a	d	h	j	l	0	0	1	0	1
a	d	h	i	k	0	10	9	5	24
a	f	g	j	k	1	0	0	0	1
b	d	g	j	k	0	1	0	0	1
b	d	h	j	k	1	0	0	0	1
b	f	h	j	k	1	0	0	0	1
c	e	h	j	k	0	0	0	1	1

Table 3. Partitioning of the ITS variability from combined fragment size patterns between and within populations using Shannon's diversity index (H) in *P. rzedowskii* populations

	N	H
Hpop		
Pinabete	14	1.02
Varaloso	29	1.198
Fresno	17	1.325
Chiqueritos	26	1.124
Mean Hpop		1.195
H species	86	1.800
Hpop / Hspecies		0.66
H species - Hpop / H species		0.33

Table 4. Diversity estimates from fragment size patterns of the ITS region and allelic isozyme variation between and within populations using Shannon's diversity index (H) in *P. rzedowskii* populations.

Enzyme	Hpop	Hsp	Hpop/Hsp	(Hsp-Hpop)/Hsp
ITS region				
Hae III	0.070	0.120	0.583	0.461
Sau96 I	0.170	0.210	0.809	0.190
Alu I	0.620	0.690	0.898	0.101
Rsa I	0.540	0.691	0.781	0.219
Dpn II	0.190	0.284	0.669	0.331
Mean	0.318	0.399	0.797	0.203
Isozyme data				
APX-1	1.162	1.330	0.874	0.126
APX-2	1.410	1.860	0.758	0.242
CPX-2	0.196	0.257	0.763	0.237
EST-2	1.340	1.680	0.798	0.202
GOT-1	1.960	2.060	0.951	0.049
LAP-1	0.489	1.180	0.414	0.586
SDH-1	1.330	1.500	0.886	0.114
IDH-1	0.220	0.330	0.666	0.334
GDH-2	0.380	0.479	0.793	0.207
Mean	0.943	1.186	0.795	0.205

Capítulo IV

Discusión y conclusiones generales

4.1 Los estudios de hibridación en pinos usando el ITS como marcador molecular

Cada vez es mas clara la importancia de la hibridación como un fenómeno evolutivo en las plantas (Soltis y Soltis,1993; Rieseberg y Wendel, 1993). Asimismo, se reconoce que la hibridación puede constituir una fuerza que puede conducir a eventos de especiación. Cabe destacar que entre 40-50 % de las angiospermas son aloploiploides, es decir producto de alguna variante de introgresión (Soltis y Soltis, 1993; Rieseberg y Wendel, 1993). El avance mas reciente en relación a la frecuencia de la hibridación y su efecto en las hipótesis filogenéticas, lo constituye el descubrimiento de lo que ha sido llamado captura de cloroplasto (Rieseberg, 1995). Esto es, cuando caracteres morfológicos o marcadores moleculares nucleares indican que una o varias poblaciones pertenecen a una especie particular, pero poseen el genóma de cloroplasto de otra especie o género. Este fenómeno tiene como consecuencia inmediata incongruencias entre hipótesis filogenéticas basadas en marcadores moleculares de núcleo y de cloroplasto. Tal patrón ha sido interpretado como evidencia directa de introgresión citoplasmática o especiación por hibridación, y aparentemente esta ampliamente distribuido en angiospermas (Wendel et al , 1991; Rieseberg y Wendel, 1993; Rieseberg, 1995).

En pinos, el uso de DNA de cloroplasto (cpDNA), ha mostrado congruencia con caracteres morfológicos y nucleares, especialmente a nivel de subgéneros y secciones (Wang y Szmidt, 1993, Krupkin et al. 1996). Sin embargo, se sabe que la hibridación natural dentro de secciones es bastante común (Wagner et al. 1987; Wang y Szmidt, 1994;

Matos, 1995). Por otro lado, no se han realizado estudios que incorporen distintos marcadores, especialmente cpDNA y nrDNA, con la suficiente resolución interespecífica como para esclarecer las relaciones intraseccionales usando el mismo conjunto de especies. Es a este nivel donde el mayor número de incogruencias morfológicas y moleculares se ha observado (Alvarez-Buylla y Liston, en prep.), y la evolución reticulada puede jugar un papel importante. El unico caso bien documentado de evolución reticulada es el caso de *Pinus densata*, una especie asiática que aparentemente se originó en el Terciario como consecuencia de hibridación entre especies de secciones diferentes (Wang et al. 1990, Wang y Szmidt, 1990). Con respecto a *P. densata*, cabe destacar que su estudio es un ejemplo de la utilidad de distintos marcadores moleculares y morfológicos para llegar a conclusiones con respecto al origen de una especie en particular. Asimismo, *P. densata* constituye el sistema idóneo para probar el mantenimiento de las unidades repetidas del ITS de líneas parentales diferentes. Un análisis de las secuencias del ITS de *P. densata* proveería de información muy interesante acerca de la evolución del ITS y los mecanismos implicados en la homogenización de las unidades repetidas.

Existen algunos grupos dentro de las secciones del género *Pinus* donde el ITS puede ser de utilidad para detectar eventos de evolución reticulada . Esto es patente en el subgénero *Strobus*, donde existe un mayor número de casos de discrepancia. Algunos de estos ejemplos incluyen el status seccional de especies como *Pinus nelsonii*, *P. rzedowskii*, *P. maximartinezii*, y *P. johannis* (Perez de la Rosa et al., 1995, Passini, en preparación). El análisis del ITS1 en estos grupos podría arrojar luz sobre la situación de éstas especies, pero se hace indispensable una comparación con secuencias de cpDNA. Cierta línea de evidencia analizando el ITS2 con la técnica de PCR-SSCP (Quijada, observ. pers.), sugiere aditividad en las movilidades en algunos individuos de las especies mencionadas, pero es necesario un estudio mas profundo en este respecto.

El ITS1 ofrece un locus muy útil para medir tasas de introgresión en zonas híbridas. Cada individuo híbrido en las zonas de contacto puede ser caracterizado por la aditividad de

sus secuencias, por lo que la frecuencia de los eventos de hibridación puede ser cuantificada. Esto permitiría estimaciones de la tasa de introgresión entre las poblaciones de las especies en contacto, y con ello puede contribuir como fuente de información adicional (a la par de otros marcadores moleculares) que permita un enfoque microevolutivo de las relaciones filogenéticas y los procesos que dieron origen a las especies que constituyen la zona híbrida.

4.2 Implicaciones del estudio con *Pinus rzedowskii*

La variación encontrada en *P. rzedowskii* confirmó las expectativas producto de la rápida evolución de las secuencias del ITS1 en pinos. El problema básico que emerge de este estudio proviene de la naturaleza de la variación del ITS en las poblaciones estudiadas. Las variantes, constituidas por adiciones en los patrones de fragmentos de restricción (ver Capítulo III) han sido interpretados como evidencia de heterogeneidad intraindividual en las poblaciones de *P. rzedowskii*. Una interpretación es que el origen de esta variación es producto de una escasa homogenización de las unidades repetidas del ITS debida a tasas de evolución concertada bajas en *P. rzedowskii*. Como se discutió en el capítulo III, existen unidades repetidas del nrDNA en más loci (NORs) que en angiospermas diploides, lo que podría retrasar el proceso de homogenización en tales unidades. Esta interpretación indicaría la existencia de polimorfismo en el ITS a niveles que pueden dificultar la inferencia filogenética. Existe evidencia de que tales niveles de heterogeneidad intraindividual son poco probables en otros pinos mexicanos, como lo sugiere un estudio en proceso que indica homogenización en replicas dentro de distintas especies y una resolución adecuada de la variación a nivel de especies y secciones en la mayoría de los pinos mexicanos, de acuerdo a análisis de PCR-RFLP, tanto de la sección Haploxilon como Diploxilon (Mendez-Cardenas et al., en prep.). Sin embargo, estudios recientes documentan la existencia de varias unidades repetidas en un solo individuo para varias especies de pinos europeos (Karvonen y Savolainen, 1994; Morroco et al., 1996). No obstante este potencial de heterogeneidad en el ITS de los pinos, la amplificación vía PCR

de la región del ITS ha resultado consistentemente en un único producto. La secuenciación directa revela bajos niveles de bases ambiguas en algunas especies (1-2%), las cuales pueden ser registradas como valores perdidos sin poner en peligro el análisis filogenético (Alvarez-Buylla y Liston, en prep.). La heterogeneidad en la longitud de las unidades repetidas del ITS, la cual impediría la secuenciación directa, no ha sido detectada en secuencias de 45 especies de pinos (Alvarez-Buylla et al., en prep.). Sin embargo, se ha detectado heterogeneidad en el tamaño de los productos amplificados del ITS entre distintas especies (Morroco et al., 1996; Mendez-Cardenas et al., en prep.). Una pregunta por resolver es pues si existe homología en la variación de la longitud del ITS entre especies de pinos. Un análisis de este tipo arrojaría luz sobre el efecto de la variación en la longitud en las tasas de homogenización del ITS.

Recientemente, la secuenciación de toda la región del ITS en *P. pinea* (Morroco et al., 1996) esta despertando considerable interés, porque documenta la existencia de subunidades repetidas dentro del ITS1. Esta organización no habia sido reportada previamente y constituye un nuevo foco de atención sobre la evolución del ITS en gimnospermas. El ITS1 de *P. pinea* tiene una longitud de 2631 bp y está constituido por cinco subunidades repetidas de 219-237 bp de longitud cada una, lo cual constituye ca. 1180 bp. La terminación 3' de la subunidad terminal es alineable entre los dos subgéneros de *Pinus*. El resto del ITS1 (ca. 1450 bp) podría ser responsable de la variación inter e intraseccional y muy probablemente de la variación intraespecifica encontrada en *P. rzedowskii*. El diseño de cebadores especificos que permitan amplificar aquellas regiones variables de las mas conservadas en el ITS1 permitiría separar los efectos de la variación intraindividual de la variación interespecifica localizada en las regiones mas conservadas del ITS1.

Una consideración adicional en lo que respecta a la naturaleza de la variación del ITS en *P. rzedowskii*, es la posibilidad de que la heterogeneidad intraindividual sea producto de hibridación. Múltiples bandas en patrones de PCR-RFLP del ITS sugieren de

entrada que subunidades repetidas distintas están presentes en el individuo, lo cual puede ser interpretado como evidencia de hibridación (Quijada et al, 1995; Quijada et al. 1996). El escenario para un evento así, consistiría en la introgresión entre dos especies de pinos que difieren ligeramente en la longitud de la región del ITS, pero que son conservados en cuanto a los sitios de restricción, por lo que las bandas extra que se presentan en los PCR-RFLPs en *P. rzedowskii* serían productos directos de diferencias en la longitud. El hecho de que una proporción de los individuos presenten adiciones mientras otra proporción sea conservada con respecto al tamaño, puede ser producto de diferencias en la tasa de homogenización entre poblaciones, lo que sería una consecuencia directa del grado de entrecruzamiento y flujo génico entre las mismas. Desafortunadamente, las condiciones geográficas en relación con otras especies de pinos no permiten discernir a los protagonistas del evento de hibridación. No existe otro pino de la misma sección en simpatria con *P. rzedowskii* y la especie más cercana, *P. ayacahuite*, se encuentra a aproximadamente 300 Km de distancia de las poblaciones de *P. rzedowskii*. Experimentos con la técnica de PCR-SSCP han mostrado múltiples bandas que sugieren aditividad en la movilidad de cadenas únicas de DNA (Quijada et al., en prep.). Incluso ha sido posible discernir los representantes de las líneas parentales, los cuales pertenecen a secciones diferentes (Parrya y Strobi). Asimismo, los individuos con variantes de bandas extra en las poblaciones estudiadas coinciden con los patrones complementarios de *P. flexilis* y *P. edulis* en digestiones con Rsa I del ITS completo.

4.3 Perspectivas de estudio con el ITS en pinos

La información disponible indica que la región ITS en angiospermas y gimnospermas provee de un conjunto adecuado de caracteres moleculares para la inferencia filogenética. Sin embargo, es evidente que en gimnospermas esta región ofrece un mayor número de caracteres informativos dada su mayor longitud, por lo que se espera que el grado de resolución a niveles taxonómicos bajos sea mayor. Esto establece una gran ventaja sobre

otros marcadores nucleares y las hipótesis filogenéticas generadas con este marcador deben ser consideradas a la par de hipótesis basadas en caracteres morfológicos o a partir de marcadores del cpDNA.

La popularidad reciente del ITS en estudios con angiospermas obedece a su facilidad para ser amplificado por PCR y ser secuenciado e interpretado. El tamaño pequeño, los flancos altamente conservados, el número considerable de copias, rápida homogenización vía la evolución concertada de las unidades repetidas del nrDNA, y la longitud conservada del ITS de angiospermas, son propiedades que garantizan una amplificación exitosa con PCR, su secuenciación con un ahorro considerable de tiempo y recursos, y una fácil alineación y análisis filogenético (Baldwin et al. 1995). La limitación primaria del ITS en angiospermas es el número pequeño de caracteres, lo cual se ve mas desfavorable si consideramos que con frecuencia es necesario eliminar del análisis filogenético, regiones pequeñas de indeles debido a la incertidumbre en la alineación de ciertas secuencias. Estas limitaciones podría requerir el uso simultáneo de otras fuentes de caracteres para ser combinados con la evidencia proveniente del ITS y garantizar un conjunto adecuado de caracteres para una resolución filogenética bien apoyada (Hillis y Dixon, 1991).

La longitud mayor en el ITS de gimnospermas, especialmente en los pinos, aminora sustancialmente el problema del número de caracteres disponibles. Sin embargo, poco sabemos sobre el patrón de evolución de las secuencias del ITS en gimnospermas, especialmente del ITS1. Es necesario establecer que mecanismos de homogenización estan implicados en el origen de los patrones de variación del ITS, y especialmente en la relación de tales mecanismos con la longitud y organización en subunidades repetidas dentro del ITS1. La mejor arena para poner a prueba hipótesis sobre los mecanismos implicados en la evolución del ITS parecen ser las zonas híbridas, donde el origen de los distintos variantes de las unidades repetidas pueda ser identificado.

Agradecimientos

Mi agradecimiento profundo y sincero a los revisores por la prontitud y comprensión que tuvieron al revisar esta tesis

Referencias

- Alvarez-Buylla, E.R., Chaos, A., Piñero, D., and Garay, A. 1996. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal and
- Appels, R. and Dvorak, J. 1982. The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in populations and among species. *Theor. Appl. Genet.*, 63: 337-348
- Arnheim, N. M. Krystal, R. Schmickel, G. Wilson, O. Ryder, and E. Zimmer. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7323-7327
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell, and M.J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 82:247-277.
- Bobola, M.S., D.E. Smith, and A.S. Klein. 1992. Five major nuclear ribosomal repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *P. mariana*. *Mol. Biol. Evol.* 9:125-137.
- Brown, G.R., V. Amarasinghe, G. Kiss, and J.E. Carlson. 1993. Preliminary karyotype and chromosomal localization of ribosomal DNA sites in white spruce using fluorescence in situ hybridization. *Genome* 36:310-316.
- Brownell, E., M. Krystal, and N. Arheim. 1983. Structure and evolution of human and African ape rDNA pseudogenes. *Mol. Biol. Evol.* 1: 29-37

- Capossela, A., J.A. Silander, R.K. Jansen, B. Bergen, and D.R. Talbot. 1992. Nuclear ribosomal DNA variation among ramets and genets of white clover. *Evolution* 46:1240-1247.
- Charlesworth, B. 1985. Recombination, genome size and chromosome number. pp. 489-513. In T. Cavallier-Smith (ed.), *The Evolution of Genome Size*. Wiley, New York.
- Coen, E.S., T. Strachan, and G. A. Dover. 1982. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 158: 17-35.
- Conkle, M.T., P.D. Hodskiss, L.B. Nunnally, and S.C. Hunter. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. Gen. Tech. Rep. PSW-64, Berkeley, CA.
- Delgado, P. 1996. Estructura genética y demográfica de una especie del género *Pinus* (*P. rzedowskii* Madrigal & Caballero) endémica del Estado de Michoacán, México. M. Sc. Thesis, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Dover, G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299:111-116.
- Dover, G. 1989. Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics* 122:249-252.
- Dover, G.A., A.R. Linares, T. Bowen, and J.M. Hancock. 1993. Detection and quantification of concerted evolution and molecular drive. *Methods in Enzimology*. 224:525-541.
- Flavell, R.B., M. O'Dell, P. Sharp, E. Nevo, and A. Beiles. 1986. Variation in intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat, *Triticum dicoccoides* in Israel. *Mol. Biol. Evol.* 3:547-558.

- Hamby, R.K. and E.A. Zimmer. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. Pp 50-91 in *Molecular systematics of plants*, eds. P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle. New York: Chapman & Hall.
- Harrison, G. R. 1993. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, New York, USA.
- Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *GATA* 9(3): 73-79.
- Hillis, D.M. and M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quar. Rev. Biol.* 66: 411-453
- Hillis, D.M. and S.K. Davies. 1988. Ribosomal DNA: intraespecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction. *Syst. Zool.* 37(1): 63-66
- Hutchenson, K. 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *J. Theor. Biol.* 29: 151-154.
- Karvonen, P., and O. Savolainen. 1993. Variation and inheritance of ribosomal DNA in *Pinus sylvestris* L. (Scots pine). *Heredity* 71:614-622.
- Karvonen, P., M. Karjalainen, and O. Savolainen. 1993. Ribosomal RNA genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): chromosomal organization and structure. *Genetica* 88:59-68
- King, L.M. and B.A. Schaal. 1989. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution* 43: 1117-1119.
- Krupkin, A.B., A. Liston, and S.H. Strauss. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*, Pinaceae) from chloroplast DNA restriction site analysis. *American Journal of Botany*, in press.
- Lessa, E.P., and G. Applebaum. 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Molecular Ecology*. 2:119-129.

- Liston, A. 1992. Variation in the chloroplast genes *rpoC1* and *rpoC2* of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from restriction site mapping of a PCR-amplified fragment. *Am. J. Bot.* 79: 953-961
- Liston, A., W.A. Robinson, J.M. Oliphant, and E. Alvarez-Buylla. 1996. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers of non-flowering seed plants. *Systematic Botany* (in press).
- Liu, J.S. and C.L. Schardl. 1994. A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant Mol. Biol.* 26: 775-778
- Madrigal, S.X. and D.M. Caballero. 1969. Una nueva especie Mexicana de *Pinus*. *Bol. Téc. Ins. Nac. Inv. For. Mexico.* 26: 95-110.
- Matos, J.A. 1995. *Pinus hartwegii* and *P. rudis*: A critical assessment. *Systematic Botany* 20:6-21
- Mitton, J. B., Y.B. Linhart, K. Sturgeon, and J.L. Hamrick. 1979. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *Journal of Heredity* 70: 86-89
- Marroco, R., M.T. Gelati, and F. Maggini. 1995. Nucleotide sequence of the internal transcribed spacers and 5.8S region of ribosomal DNA in *Pinus pinea* L. DNA Sequence, in press.
- Muona, O. and A. Harju. 1989. Effective population sizes, genetic variability and mating system in natural stands and seed orchards of *Pinus sylvestris*. *Silv. Genet.* 38 : 221-228
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Nickrent, D.C., K.P. Schuette, and E.M. Starr. 1994. A molecular phylogeny of *Arceuthobium* (Viscaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Am. J. Bot.* 81:1149-1160.
- Ohta, T. 1987. Simulating evolution by gene duplication. *Genetics* 115: 207-213

- Ohta, T., 1988. Further simulation studies on evolution by gene duplication. *Evolution* 42: 375-386
- Perez de la Rosa J., S.A. Harris., and A. Farjon. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theor. App. Genet.* 91: 1101-1106.
- Perry, J.P. Jr. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, Oregon 231 pp
- Powell, J.R. 1983. Interspecific cytoplasmatic gene flow in the absence of nuclear gene flow: evidence from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 492-495.
- Qu, L.-H., B.-Q. Xi, S.-H. Shi, and H.-D. Zhang. 1993. A characteristic size of the ITS in gymnosperm rDNA. Pp. 201 in XV International Botanical Congress Abstracts Yokohama, Japan: International Union of Biological Sciences.
- Quijada A., A. Liston, and Elena Alvarez-Buylla. 1995. The ITS region of rDNA as a sensitive tool in studies of reticulate evolution. VII National 1st. Joint Mexico-US Symposium on agrobiolgy, molecular physiology and biotechnology of crops important for Mexican agriculture. Cuernavaca, Morelos, Mexico Abstracts Pp 192.
- Quijada A., Alvarez-Buylla, E., Liston, A. 1996. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S region in *Pinus rzedowskii*. 14th North American Forest Biology Workshop. Université Laval, Québec City, Canada. Abstracts Pp 157
- Rieseberg, L.H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82(7): 944-953.
- Rieseberg, L.H. and J. Wendel. 1993. Introgression and its consequences in plantas. In R. Harrison (ed), *Hybrid zones and the evolutionary process*. 70-109. Oxford University Press, Oxford.
- Sang T., D.J. Crawford, and T.F. Stuessy. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear

- ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6813-6817.
- Sang T., D.J. Crawford, and T.F. Stuessy. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6813-6817.
- Schaal, B.A. W.J. Leverich, and J. Nieto-Sotelo. 1987. Ribosomal DNA variation in the native plant *Phlox divaricata*. Mol. Biol. Evol. 4:611-621.
- seed-banks. Evolution (in press).
- Sheffield, V.C., J.S. Beck, A.E. Kwitek, D.W. Sandstrom, and E.M. Stone. 1993. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analyses for the detection of single base substitutions. Genomics 16:325-332.
- Slatkin, M. 1986. Interchromosomal biased gene conversion, mutation and selection in a multigene family. Genetics 112: 681-698.
- Soltis, D.E. and P.S. Soltis. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. Critical Reviews of Plant Biology. 12: 243-273
- Soltis, P.S. and R.K. Kuzoff. 1993. ITS sequence variation within and among populations of *Lomatium grayi* and *L. laevigatum*. Mol. Phyl. Evol. 2:166-170.
- Suh, Y., L.B. Thien, H.E. Reeve, and E.A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. Am. J. Bot. 80:1042-1055.
- Suzuki, H., N. Miyashita, K. Moriwaki, R. Kominami, M. Muramatsu, T. Kanehisa, F. Bonhomme, M. Petras, Z. Yu, and D. Lu. 1986. Evolutionary implication of heterogeneity of the nontranscribed spacer region of ribosomal DNA repeating units in various subspecies of *Mus musculus*. Mol. Biol. Evol. 3: 126-137.

- Wagner D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghai-Marooof, S.M. Williams, B.P. Dancik, and R.W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2097-2100.
- Walsh, J.B. 1987. Sequence-dependent gene conversion: can duplicated genes diverge fast enough to escape conversion? *Genetics* 117: 543-557.
- Wang, X.-R., A.E.Szmidt., A. Lewandowski, Z. -R Wang. 1990. Evolutionry analysis of *Pinus densata* Masters, a putative Tertiary hybrid. 1 Allozyme variation. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 635-640
- Wang, X.-R., and A.E.Szmidt. 1990. Evolutionry analysis of *Pinus densata* Masters, a putative Tertiary hybrid. 2 A study using species-specific chloroplast DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 641-647
- Wendel, J.F., A. Schnabel, and T. Seelanen. 1995. Bi-directional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 92:280-284.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications.*(M. Innis, D. Gelfeand, J.Sninsky, and White, T. Eds.) pp 315-322. Academic Press, San Diego.