LA REGIÓN DE LOS ITS DEL ADN RIBOSOMAL DEL NÚCLEO (nrADN), FUENTE DE CARACTERES MOLECULARES EN LA SISTEMÁTICA DE LAS GIMNOSPERMAS

ADRIÁN QUIJADA, GUADALUPE MÉNDEZ-CÁRDENAS, SOL ORTIZ-GARCÍA
Y ELENA R. ÁLVAREZ-BUYLLA

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México.

Resumen. Se ha observado que los ITS de las gimnospermas son más largos que los ITS típicos de las angiospermas y presentan una variación considerable en su longitud. El mayor tamaño en relación con las angiospermas ofrece un mayor número de caracteres para la reconstrucción filogenética, lo cual hace de los ITS un marcador adecuado para la inferencia a distintos niveles taxonómicos. A diferencia del ADN de cloroplasto (cpADN), la información con los ITS puede proveer evidencia directa de hibridación interespecífica. Esto permite el uso de los ITS para obtener medidas de tasas de introgresión entre poblaciones y para detectar eventos de evolución reticulada. Se ha reportado variación intraespecífica de los ITS en el género *Pinus*, lo cual puede comprometer la inferencia de relaciones interespecíficas. Este potencial debe ser considerado en la inferencia filogenética de gimnospermas.

Palabras clave: nrADN, región de los ITS, gimnospermas, filogenias, sistemática, hibridación.

Abstract. The ITS region of gymnosperm plants has shown to be longer than the typical angiosperm ITS and shows considerable length variation. The larger size relative to the ITS in angiosperms offers more characters for phylogenetic reconstruction, which make this marker suitable for inference at different taxonomic levels. Unlike chloroplast DNA (cpDNA), ITS data can provide direct evidence of interspecific hybridization. This permits the use of the ITS to obtain measurements of introgression rates among populations and to detect events of reticulate evolution. Intraspecific ITS variation in the genus *Pinus* has been reported, which can compromise the inference of interspecific relationships. This potential must be taken into account in phylogenetic inference of gymnosperms.

Key words: nrDNA, ITS region, gymnosperms, phylogeny, systematics, hybridization.

La sistemática estudia la organización y el origen de la diversidad biológica. Los biólogos sistemáticos analizan patrones de variación entre los organismos con el fin de inferir sus relaciones filogenéticas, así como los procesos evolutivos involucrados en la especiación. Durante las últimas tres décadas la sistemática ha incorporado nuevos enfoques y herramientas para llegar a este objetivo. El acceso y el uso extensivo de nuevos marcadores moleculares han proporcionado una nueva fuente de datos a la sistemática, lo que ha permitido abordar muchos problemas que previamente habían sido considerados intratables bajo los enfoques tradicionales (Hillis y Davies, 1988).

Dentro de la sistemática molecular de las plantas, los genes ribosomales del núcleo (nrADN) han sido ampliamente utilizados, ya que permiten la inferencia de relaciones filogenéticas entre taxa muy distantes, debido a que presentan secuencias de bases altamente conservadas con tasas de evolución muy lentas (Baldwin *et al.*, 1995; Hamby y Zimmer, 1992; Hillis y Dixon, 1991; Hillis y Davies, 1988; Appels y Dvorak, 1982). Los genes ribosomales y sus regiones espaciadoras asociadas, en conjunto llamados ADN ribosomal del núcleo tienen un amplio rango de aplicación, desde el origen de la vida hasta los eventos evolutivos más recientes (Hillis y Dixon, 1991).

El arreglo del ADN ribosomal nuclear (nrADN) de un genoma eucariótico, típicamente consiste de algunos cientos de copias repetidas en tandem. Cada una de estas copias se compone de la unidad transcrita y de la región de los espaciadores externos no transcritos.

En procariontes existen de una a varias copias de genes de ADN ribosomal y estos genes pueden estar organizados en un operón único o pueden estar dispersos por todo el genoma. En eucariontes, generalmente existen tres o cuatro subunidades de nrADN. Estas subunidades son caracterizadas por su velocidad de sedimentación (S, por Svedburg), y consisten en: a) la subunidad larga cuyo rango en tamaño va desde 16S (alrededor de 1500 nucleótidos) hasta 28S (mas de 4000 nucleótidos); b) la subunidad pequeña 5.8S (de 160 nucleótidos); y en algunos organismos d) la subunidad 5S (con 120 nucleótidos). En eucariontes, dos

espaciadores internos transcritos (ITS) separan las subunidades 18S, 5.8S y 28S (o sus homólogos). Copias adyacentes de la unidad repetida de nrADN ("nrDNA repeat") son separadas por la región del espaciador no transcrito (NTS), también llamado espaciador intergénico (IGS) por algunos autores. Esta región contiene elementos que sirven como estimuladores de la transcripción (Hillis y Dixon, 1991; Baldwin *et al.*, 1995).

La región de los espaciadores internos transcritos (ITS) ha sido usada ampliamente para el esclarecimiento de las relaciones entre taxa a niveles inter e intra-genéricos, así como intraespecíficos en angiospermas (Hamby y Zimmer, 1992; Baldwin *et al.*, 1995; Buckler y Holsford 1996; Liston *et al.*, 1996).

En esta revisión se examina el potencial de la región de los ITS del nrADN en gimnospermas, con base en estudios recientes que muestran que, similarmente a las angiospermas, este marcador ofrece una reso-

Figura 1. Organización en tandem de las unidades repetidas del nrADN de gimnospermas. Se muestra en detalle la región de los espaciadores internos transcritos (ITS).

lución adecuada para la inferencia filogenética. Asimismo, se discuten las ventajas y desventajas relativas a su uso en las gimnospermas, dadas sus peculiaridades estructurales.

La región de los espaciadores internos transcritos (ITS) del nrADN en angiospermas y gimnospermas

La región de los ITS comprende el ITS2, la subunidad 5.8S y el ITS1 (figura 1). Las copias de nrADN en el genoma de las plantas, están distribuidas en uno o varios loci cromosómicos denominados regiones organizadoras nucleares (NORS) (Hamby y Zimmer, 1992; Arnheim *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1993). El número de NORS determina de alguna manera la velocidad de los procesos de homogenización. En angiospermas se encuentran entre uno y dos, mientras que el número de NORS en algunas gimnospermas es de 10 a 12 (Karvonen y Savolainen, 1993). La familia de genes repetidos experimenta una homogenización rápida en sus secuencias de bases, un proceso conocido como evolución concertada y cuyos mecanismos principales lo constituyen el entrecruzamiento desigual y la conversión génica (Baldwin *et al.*, 1995; Wendel *et al.*, 1995). Como consecuencia, la región de los ITS se encuentra relativamente homogénea dentro del genoma, por lo que puede decirse que una sola secuencia caracteriza a los individuos de una determinada especie (Baldwin *et al.*, 1995). La evolución concertada y la recombinación sexual tienden a promover la uniformidad de los ITS dentro de individuos y entre individuos de poblaciones (Hillis *et al.*, 1991; Soltis y Kuzoff, 1993), por lo que en teoría basta muestrear algunos individuos para establecer las relaciones filogenéticas entre distintas especies.

La variación en las secuencias de genes en familias multigénicas y su distribución entre y dentro de poblaciones es determinada por las tasas de mutación y el efecto de fuerzas evolutivas (flujo génico, selección natural, deriva génica y sistemas de apareamiento), que actúan a nivel poblacional. Sin embargo, el proceso de evolución concertada, un mecanismo genético no Mendeliano, afecta la variabilidad de las familias multigénicas a nivel molecular. La tasa de homogenización de las unidades repetidas del nrADN mediante evolución concertada, depende del número de copias, el número de loci y cromosomas en los cuales se encuentran las copias de estos genes, la localización de los loci en los cromosomas y la tasa de intercambio dentro y entre cromosomas (Dover, 1982; Hillis *et al.*, 1991; Suh *et al.*, 1993; Wendel *et al.*, 1995). Se conocen poco los factores que afectan la evolución de los ITS en gimnospermas, pero la evi-

dencia encontrada en pinos sugiere que tanto el número de copias como de loci del nrADN es mayor que en angiospermas, por lo que se espera encontrar tasas de homogenización relativamente bajas en gimnospermas (Karvonen y Savolainen, 1993).

La región de los ITS ha sido considerada como una fuente muy útil de caracteres para estudios filogenéticos en angiospermas (Baldwin *et al.*, 1995). Son varias las ventajas que proporciona el uso de este marcador molecular. Dado que los ITS se encuentran altamente representados en el genoma, se pueden amplificar con cantidades pequeñas de ADN. Las secuencias altamente conservadas dentro de la mayoría de los genes del nrADN son muy útiles en el diseño de oligonucleótidos ("primers") "universales", lo que facilita la amplificación de los ITS mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Liston 1992). Los espaciadores internos transcritos son la parte más variable de la región de los ITS; debido a que se encuentran flanqueando a la subunidad 5.8S, que es más conservada, se posibilita la alineación no ambigua de esta región.

Una limitación en la utilidad de los ITS en la sistemática de angiospermas, es que este locus presenta una cantidad relativamente pequeña de nucleótidos. En angiospermas, los ITS tienen de 565 a 700 pares de bases (bp) en longitud (Baldwin *et al.*, 1995). 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 útiles para la reconstrucción filogenética entre géneros y especies relacionadas. En contraste, la región de los ITS de gimnospermas es considerablemente más larga y tiene un mayor rango de variación que va desde 750 bp en *Welwitschia mirabilis* hasta 3125 bp en *Picea abies* (Qu *et al.*, 1993; Liston *et al.*, 1996). Recientemente se realizó un estudio detallado sobre la variación en la longitud de la región de los ITS en gimnospermas, incluyendo 32 especies de gimnospermas, en catorce familias y cuatro órdenes, y se construyeron mapas de sitios de restricción de los ITS amplificados con PCR (PCR-RFLP) (Liston *et al.*, 1996). El análisis de los sitios de restricción indica que el ITS2 junto con la subunidad 5.8S está compuesto de 350-425 bp, y es relativamente constante para todas las especies estudiadas. Por lo tanto el ITS1 es el responsable de la mayor parte de la variación en la longitud de los ITS en gimnospermas.

Los representantes de la familia Pinaceae exhiben la mayor variación en la longitud de los ITS (1550-3125 bp) (Karvonen y Savolainen, 1993; Qu *et al.*, 1993; Bobola *et al.*, 1994; Liston *et al.*, 1996). En cambio, la longitud de los ITS de las familias Cupressaceae, Taxodiaceae, Cephalotaxaceae, y Taxaceae son relativamente estables. Las longitudes observadas en Scia-

dopityaceae (1250 bp) y Araucariaceae (1325-1350 bp) son algo mayores, mientras que los ITS de Podocarpaceae (2000-2100 bp) caen dentro del rango observado en Pinaceae. Fuera del orden Coniferales, la longitud de los ITS es similar entre Cycadales (1150-1450 bp), Gynkgoales (1200 bp), y Gnetales (1200-1500 bp). Por otro lado, los ITS del género *Welwitschia* son de solo 725 bp, y por lo tanto el más corto encontrado, pero ligeramente mayor que la longitud reportada para angiospermas (Liston *et al.*, 1996).

Los niveles de variación en las secuencias, estimados a partir del análisis de los sitios de restricción, sugiere que el análisis filogenético con los ITS es informativo a nivel intragenérico en la mayoría de las gimnospermas. En la familia Cupressaceae las comparaciones intergenéricas son factibles. Sin embargo, se ha documentado poca homología en la variación de la longitud de los ITS y pocos sitios de restricción compartidos a nivel de los taxa mayores (Liston *et al.*, 1996).

Actualmente se desconocen las causas de la variación en el tamaño de los ITS en gimnospermas. Estudios comparativos del ITS1 en las gimnospermas pueden proporcionar evidencia sobre la existencia de restricciones funcionales en la región y probablemente permitan esclarecer los mecanismos evolutivos implicados en la homogenización de las familias multigénicas. Dado que se desconocen tanto las restricciones funcionales como la fuente de variación en el tamaño del ITS1, no es posible determinar si el tamaño de este espaciador tiene un valor informativo para el establecimiento de las relaciones filogenéticas de las gimnospermas. Dentro de las coníferas las familias Cupressaceae, Taxodiaceae, Taxaceae y Cephalotaxaceae, presentan niveles de variación similares en los tamaños de la región de los ITS (975-1125 bp), esto es consistente con los resultados obtenidos por Chaw *et al.*, (1995) y Price (1995) quienes con el uso de 18S rARN y rbcL, respectivamente, encontraron que estas

Figura 2. Ejemplo de patrones de restricción de la región de los ITS usando la técnica de PCR-RFLP con la endonucleasa *Hae* III para algunas especies y secciones del género *Pinus*.

familias forman un clado monofilético muy robusto. Esta evidencia sugiere que la región de los ITS en gimnospermas podría ser informativa a niveles taxonómicos por encima de género para algunos grupos.

La región de los ITS en pinos

En el género *Pinus* la región de los ITS es excepcionalmente larga (ca. 3000 bp), sólo superada por el género *Picea* (3400 bp) (Bobola *et al.*, 1992; Liston *et al.*, 1996). Recientemente se publicó la secuencia completa de la región de los ITS para *P. pinea* (Marroco *et al.*, 1995). Se encontró que el ITS1 contiene cinco subunidades repetidas organizadas en tandem, las cuales suman ca. 1100. Éstas subunidades continuas están flanqueadas por secuencias no repetidas que suman una longitud total de 2631 bp. Aún cuando la homogeneidad 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 especies de los dos subgéneros.

El análisis de sitios de restricción con PCR-RFLP (figura 2) sugiere la presencia de subunidades similares en otras especies del subgénero *Pinus* (Liston *et al.*, 1996). También se ha encontrado que la variación dentro de secuencias parciales en el ITS1 es alta, similar a lo que ocurre en la región total de los ITS en angiospermas. Sin embargo, la longitud de la secuencia no repetida en el ITS1 de los pinos es tres veces mayor que la de angiospermas, lo cual proporciona datos de secuencias suficientes para una buena resolución de las relaciones filogenéticas, incluso dentro de cada subsección.

El ITS 2 de *Pinus pinea* mide 242 bp; esta longitud es similar a la encontrada en otras especies estudiadas dentro del género (Liston *et al.*, en preparación), aparentemente con una longitud menos variable que la del ITS1. El ITS2 en *Pinus* es informativo para resolver relaciones entre subsecciones. Un estudio realizado para resolver las relaciones filogenéticas de 47 especies del género en donde se utilizaron secuencias del ITS2, la subunidad 5.8S y alrededor de 140 bp del ITS1, muestra que el uso parcial de la región resuelve la mayoría de las relaciones de las especies dentro de subsecciones (Ortiz-García *et al.*, 1997).

La comparación de mapas de sitios de restricción de los 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.*, 1996; Méndez-Cárdenas *et al.*, 1997). Esto es consistente con clasificaciones tradicionales antes propuestas para el género. Además el análisis de los ITS presenta agrupaciones

de especies que no se habían propuesto (*P. leiophylla* y *P. lumholtzi* dentro de un subgrupo de la subsección *Oocarpae*). Con este enfoque se ha encontrado que *P. nelsoni*, una especie problemática para su clasificación (Malusa, 1992; Farjon 1996), se agrupa como la especie más ancestral de los pinos piñoneros. En la subsección *Strobi*, *P. reflexa* que ha sido considerada una variedad de *P. flexilis*, se separa claramente de ésta. En cuanto al subgénero *Pinus*, los ITS presentan una mayor resolución dentro de la subsección *Oocarpae* que en el resto de los pinos duros mexicanos.

Detección de eventos de hibridación usando los ITS

Cada vez es más 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 induce eventos de especiación. Cabe destacar que entre 40-50 % de las angiospermas son alopoliploides, es decir producto de alguna variante de introgresión (Soltis y Soltis, 1993; Rieseberg y Wendel, 1993). El avance más reciente en relación a la frecuencia de la hibridación y su efecto en las hipótesis filogenéticas, lo constituye el descubrimiento de lo que se ha 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 genoma de cloroplasto de otra especie. Este fenómeno tiene como consecuencia inmediata incongruencias entre hipótesis filogenéticas basadas en marcadores moleculares de núcleo y cloroplasto. Tal patrón ha sido interpretado como evidencia directa de introgresión citoplasmática o especiación por hibridación, y aparentemente está ampliamente distribuido en plantas (Wendel *et al.*, 1995; Rieseberg y Wendel, 1993; Rieseberg, 1995).

En un contexto evolutivo el uso de los ITS abre la posibilidad de detectar eventos de evolución reticulada donde otros marcadores (e.g. mtADN o cpADN) sugieren eventos de divergencia que entran en conflicto con evidencia morfológica y biogeográfica (Wagner *et al.*, 1987). Algunos estudios recientes (Wendel *et al.*, 1995; Sang *et al.*, 1995) han mostrado el potencial de los ITS en estudios de hibridación en angiospermas. Tales estudios pueden ser particularmente relevantes en gimnospermas, especialmente en aquellas especies donde se sospechan eventos de introgresión (Wagner *et al.*, 1987; Wang *et al.* 1990; Wang and Szmidt, 1990). Asimismo, los ITS pueden ser útiles para obtener medidas de tasas de introgresión entre poblaciones naturales y para evaluar las consecuencias de la hibridación en el mantenimiento o pérdida de

variación genética entre especies que ocurren en zonas híbridas.

En pinos, el uso de ADN de cloroplasto (cpADN), en general ha mostrado congruencia con caracteres morfológicos y nucleares, especialmente a nivel de subgéneros y secciones (Wang y Szmidt, 1990; Krupkin *et al.*, 1996). Sin embargo, a nivel intraseccional se ha observado un mayor número de incongruencias morfológicas y moleculares (Méndez-Cárdenas *et al.*, 1997). Apparently procesos de evolución reticulada pueden jugar un papel importante en este patrón. Se sabe que la hibridación natural dentro de algunas secciones es bastante común (Wagner *et al.*, 1987; Wang y Szmidt, 1990; Matos, 1995) y se requiere de un marcador para poder establecer cuáles especies pueden ser producto de introgresión. La longitud del ITS1 en pinos sugiere que la homogenización

de variantes puede ser relativamente lenta, por lo que unidades repetidas de distinto origen pueden ser mantenidas e identificadas (Baldwin *et al.*, 1995; Quijada *et al.*, 1997). La región de los ITS puede proveer información sobre eventos de introgresión si la homogenización de las unidades repetidas por evolución concertada es baja o retardada. Esto tendría como efecto que las unidades repetidas de las líneas parentales se vean expresadas en el híbrido como secuencias o patrones de restricción complementarios (figura 3) (Baldwin *et al.*, 1995, Sang *et al.*, 1995; Quijada *et al.*, 1997). Entre los factores que pueden favorecer la falta de homogenización de las unidades repetidas en los híbridos se han propuesto los siguientes: a) eventos de hibridización recientes; b) la conversión génica no opera eficientemente en el híbrido debido a que las unidades repetidas de los ITS se

Figura 3. Patrones de restricción (PCR-RFLP) de lagunos híbridos y sus especies padre digeridos con la endonucleasa *Rsa* I. Los patrones de bandas en los híbridos son complementarios en relación con las líneas parentales.

encuentran en distintos loci en los taxa de las líneas parentales; y c) la tasa de homogenización se retarda como consecuencia de la longitud de los ITS.

El único caso bien documentado de evolución reticulada en pinos es el 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 conjuntar distintos marcadores moleculares y morfológicos para llegar a conclusiones con respecto al origen de una especie en particular. Esta especie constituye el sistema idóneo para estudiar el mantenimiento de las unidades repetidas de los ITS provenientes de líneas parentales diferentes, por lo que un análisis de las secuencias de los ITS de *P. densata* proporcionaría información muy interesante acerca de la evolución de los ITS y los mecanismos implicados en la homogenización de las unidades repetidas del nrADN.

Existen algunos grupos dentro de las secciones del género *Pinus* donde el ITS puede ser de utilidad para detectar eventos de evolución reticulada. Tal es caso del subgénero *Strobus*, donde existe un mayor número de discrepancias respecto a las relaciones filogenéticas de sus miembros. Por ejemplo, el estatus de especies como *Pinus nelsoni*, *P. rzedowskii*, *P. maximartinezii*, y *P. johanis* es controvertida (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995). El análisis del ITS1 en estos grupos podría arrojar luz sobre las relaciones de estas especies, en donde habría que incluir una comparación con secuencias de cpADN. Patrones de variación observados en el ITS con PCR-RFLP revelan la existencia de bandas extras que sugieren patrones complementarios entre especies, particularmente en la subsección *Cembroides* (Méndez-Cárdenas *et al.*, 1997). Mediante el análisis del ITS2 con la técnica de PCR-SSCP (PCR-conformación polimórfica de hebras únicas) se sugiere aditividad en las movilidades en algunos individuos de las especies del grupo mencionado (Quijada *et al.*, 1997).

En particular, el ITS1 es 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 permite obtener estimaciones de la tasa de introgresión entre las poblaciones de las especies en contacto. El uso de esta técnica proporciona una fuente de información adicional, que complementada con el uso de otros marcadores moleculares, permite establecer una conexión entre un enfoque microevolutivo y los procesos que dieron origen a las especies que constituyen la zona híbrida.

Variación intraespecífica de los ITS

Son pocos los estudios en los que se ha documentado la existencia de variación intraindividual e intrapoblacional en la región de los ITS de gimnospermas (Bobola *et al.*, 1992; Karvonen y Savolainen, 1993). En un estudio realizado con *P. rzedowskii* usando PCR-RFLP se encontró evidencia de polimorfismo intraespecífico (Quijada *et al.*, 1996). Los fragmentos polimórficos, constituidos por adiciones en los patrones de restricción se pueden interpretar como evidencia de heterogeneidad intraindividual en las poblaciones de *P. rzedowskii*. El origen de esta variación es probablemente producto de una escasa homogenización de las unidades repetidas de los ITS, debido a bajas tasas de evolución concertada. Una interpretación complementaria sería que el origen de esta variación se debe a que esta especie es producto de un evento reciente de evolución reticulada. El escenario para un evento así, consistiría en la introgresión entre dos especies de pinos que difieren ligeramente en la longitud de la región de los ITS, pero que son conservados en cuanto a los sitios de restricción, por lo que las bandas extra que se presentan en los PCR-RFLP serían producto directo 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 (Quijada *et al.*, 1996). 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 ADN en *P. rzedowskii* (Quijada *et al.*, en prep.). Incluso ha sido posible identificar patrones de bandas similares a miembros que 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 la endonucleasa Rsa I de la región completa de los ITS.

En pinos existe un mayor número de unidades repetidas del nrADN en más loci que en angiospermas diploides. Esto podría retrasar el proceso de homogenización en las unidades, lo que se traduce en un alto polimorfismo en los ITS a niveles que podrían

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 que indica homogenización en réplicas 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 los subgéneros *Strobus* como *Pinus* (Mendez-Cardenas *et al.*, 1997). Otros estudios documentan la existencia de varias unidades repetidas en un solo individuo para varias especies de pinos europeos (Karvonen y Savolainen, 1993; Marroco *et al.*, 1996). No obstante, la amplificación vía PCR de la región de los ITS ha resultado consistentemente en un único producto, por lo que el potencial de heterogeneidad intraindividual en los ITS de los pinos requiere un análisis más profundo. Se ha detectado heterogeneidad en la longitud de las unidades repetidas de los ITS entre distintas especies (Marroco *et al.*, 1996; Méndez-Cárdenas *et al.*, 1997). Un problema por resolver es la existencia de 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 de los ITS.

Perspectivas de estudio con los ITS en gimnospermas

La información disponible indica que la región de los 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 cpADN.

La posibilidad de variación intraespecífica y el mantenimiento de las unidades repetidas de las líneas parentales en híbridos, no sólo 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 mo-

delo 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 considerarse con cautela en el análisis y excluirllos del mismo.

La popularidad reciente de la región de los 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 nrADN, 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 más 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 podrían requerir el uso simultáneo de otras fuentes de caracteres para ser combinados con la evidencia proveniente de los ITS y garantizar un conjunto adecuado de caracteres para una resolución filogenética bien apoyada (Hillis y Dixon, 1991).

La longitud de los 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 de los ITS en gimnospermas, especialmente del ITS1. Es necesario establecer qué mecanismos de homogenización están implicados en el origen de los patrones de variación de los 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 de la región de los ITS parecen ser las zonas híbridas, donde el origen de los distintos variantes de las unidades repetidas del nrADN pueda ser identificado.

Agradecimientos

El desarrollo de la presente revisión debe mucho a los resultados de la colaboración entre el Laboratorio de Genética y Evolución Molecular del Instituto de Ecología (UNAM) y el *Department of Botany and Plant*

Pathology en Corvallis (Oregon State University). En especial queremos expresar nuestro agradecimiento a Aaron Liston, Daniel Piñero, William Robinson, Jim Oliphant, Rodolfo Salas, Alejandra Vasquez-Lobo y Rosalinda Tapia. Esta revisión se elaboró gracias al apoyo de CONACyT (proyecto 4715N) y PAPIIT (DGAPA IN-212995, UNAM).

Referencias

- Appels R. y Dvorak J. 1982. The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in populations and among species. *Theoretical and Applied Genetics* **63**:337-348.
- Arnheim N., Krystal M., Schmickel R., Wilson G., Ryder O. y Zimmer E. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **77**:7323-7327.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S. y Donoghue M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**:247-277.
- Bobola M.S., Smith D.E. y Klein A.S. 1992. Five major nuclear ribosomal repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *P. mariana*. *Molecular Biology and Evolution* **9**:125-137.
- Brown G.R., Amarasinghe V., Kiss G. y Carlson J.E. 1993. Preliminary karyotype and chromosomal localization of ribosomal DNA sites in white spruce using fluorescence *in situ* hybridization. *Genome* **36**:310-316.
- Buckler E.S. y Holtsford T.P. 1996. *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology and Evolution* **13**:612-622.
- Chaw S-M., Zharkikh A., Sung H-M., Lau T-C. y Li W-H. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* **14**:56-68.
- Dover G.A., Linares A.R., Bowen T. y Hancock J.M. 1993. Detection and quantification of concerted evolution and molecular drive. *Methods in Enzymology* **224**:525-541.
- Farjon A. 1996. Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* **121**:365-384.
- Hamby R.K. y Zimmer E.A. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. En: Soltis P.S., Soltis D.E. and Doyle J.J. Eds. *Molecular systematics of plants*. New York: Chapman & Hall, 50-91.
- Hillis D.M. y Davies S.K. 1988. Ribosomal DNA: intraespecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction. *Systematic Zoology* **37**:63-66.
- Hillis D.M. y Dixon M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* **66**:411-453.
- Hillis D.M., Moritz C., Porter C.A. y Baker R.J. 1991. Evidence of biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* **251**:308-310.
- Karvonen P. y Savolainen O. 1993. Variation and inheritance of ribosomal DNA in *Pinus sylvestris* L. (Scots pine). *Heredity* **71**:614-622.
- Krupkin A.B., Liston A. y Strauss S.H. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*, Pinaceae) from chloroplast DNA restriction site analysis. *American Journal of Botany* **83**:489-498.
- 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. *American Journal of Botany* **79**:953-961.
- Liston A., Robinson W.A., Oliphant J.M. y Álvarez-Buylla E.R. 1996. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers of non-flowering seed plants. *Systematic Botany* **21**:1-12.
- Malusa J. 1992. Phylogeny and biogeography of the Pinyon pines (*Pinus* subsect. *Cembroides*). *Systematic Botany* **17**:42-66.
- Matos J.A. 1995. *Pinus hartwegii* and *P. rudis*: A critical assessment. *Systematic Botany* **20**:6-21.
- Méndez-Cárdenas G., Castañeda A., Ortiz-García S., Liston A., Álvarez-Buylla E.R. y Piñero D. 1997. Morphological evolution and biogeography in pines using phylogenetic evidence from ITS sequences and restriction-site variation. Annual meeting of the ASN, SSB, and SSE. Boulder, Colorado, USA.
- Marroco R., Gelati M.T. y Maggini F. 1996. Nucleotide sequence of the internal transcribed spacers and 5.8S region of ribosomal DNA in *Pinus pinea* L. DNA Sequence: *The Journal of DNA Sequencing and Mapping* **6**:175-177.
- Ortiz-García S., Seitz V., Álvarez-Buylla E., Piñero D., Robinson W. y Liston A. 1997. Separate and combined phylogenetic analyses of morphological and ITS data in *Pinus* (Pinaceae). *American Journal of Botany* **84** (supplement): 21.
- Price, R.A. 1995. Familial and generic classification of the conifers. *American Journal of Botany* **82** (supplement): 110.
- Perez de la Rosa J., Harris S.A. y Farjon A. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theoretical and Applied Genetics* **91**:1101-1106.
- Qu L-H., Xi B-Q., Shi S-H. y Zhang H-D. 1993. A characteristic size of the ITS in gymnosperm rDNA. En: XV International Botanical Congress Abstracts Yokohama, Japan: International Union of Biological Sciences. 201.
- Quijada A., Álvarez-Buylla E.R. y Liston A. 1996. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S region in *Pinus rzedowskii*. In: 14th North American Forest Biology Workshop abstracts. Université Laval, Québec City, Canada. 157.
- Quijada A., Liston A., Robinson W. y Álvarez-Buylla E.R. 1997. The ITS region as a marker to detect hybridization in pines. *Molecular Ecology* (En prensa).
- Rieseberg L.H. 1995. The role of hybridization in evolu-

- tion: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82**:944-953.
- Rieseberg L.H. y Wendel J. 1993. Introgression and its consequences in plants. En: Harrison, R. Edr. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, Oxford. 70-109.
- Sang T., Crawford D.J. y Stuessy T.F. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**:6813-6817.
- Soltis D.E. y Soltis P.S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews of Plant Biology* **12**:243-273.
- Soltis P.S. y Kuzoff R.K. 1993. ITS sequence variation within and among populations of *Lomatium grayi* and *L. laevigatum*. *Molecular Phylogeny and Evolution* **2**:166-170.
- Suh Y., Thien L.B., Reeve H.E. y Zimmer E.A. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *American Journal of Botany* **80**:1042-1055.
- Wagner D.B., Furnier G.R., Saghai-Marooof M.A., Williams S.M., Dancik B.P. y Allard R.W. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**:2097-2100.
- Wang X-R., Szmidt A.E., Lewandowski A. y Wang Z-R. 1990. Evolutionary analysis of *Pinus densata* Masters, a putative Tertiary hybrid 1 Allozyme variation. *Theoretical and Applied Genetics* **80**:635-640.
- Wang X-R., y Szmidt A.E. 1990. Evolutionary 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., Schnabel A. y Seelanen T. 1995. Bi-directional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**:280-284.