



MARCADORES RAPDs ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DEL SEXO EN *Ceratozamia mexicana* Brongniart (Zamiaceae)

RAPD MARKERS ASSOCIATED WITH SEX EXPRESSION IN *Ceratozamia mexicana* Brongniart (Zamiaceae)

L. Iglesias-Andreu¹; M. Luna-Rodríguez²; M. Durán-Vázquez¹;
A. Rivera-Fernández¹; N. Sánchez-Coello¹

¹Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. Universidad Veracruzana (INBIOTECA). Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte. Av. de las Culturas Veracruzanas Núm. 101. Colonia Emiliano Zapata, Xalapa, Ver., C. P. 91090.

²Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa, Veracruz. (LATEX, S. C.), Universidad Veracruzana, Médicos Núm. 5, Unidad del Bosque, Xalapa, Ver. C. P. 91010. MÉXICO. (Autor de correspondencia).

RESUMEN

Ceratozamia mexicana Brongniart es una especie estrictamente dioica con un largo estadio juvenil. Con el fin de detectar marcadores moleculares asociados al azar (RAPD) y al análisis masal segregante (BSA), se trabajó con muestras de tejido foliar de individuos maduros de la población de esta especie en Coacoatzintla, Veracruz, México. Se usaron cinco iniciadores para amplificar tres mezclas de ADN de individuos de sexo conocido. Se produjeron un total de 37 bandas de las cuales el 63 % fueron polimórficas. Los iniciadores OPB08 y OPK10 generaron bandas distintivas al sexo. Con el iniciador OPK10 se observó una banda de 500 pb en dos de las tres mezclas de machos analizados, mientras que con el iniciador OPB08 se detectaron 2 bandas (1,400 y 1,100 pb) presentes en dos de las tres mezclas de machos examinados. Aunque es necesario validar los resultados obtenidos, pueden abrir una nueva alternativa para determinar tempranamente el sexo en *C. mexicana*.

Recibido: 6 de abril, 2010
Aceptado: 6 de mayo, 2010
doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.04.016
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE: *Ceratozamia mexicana*, identificación del sexo, marcadores moleculares, RAPD, análisis masal segregante (BSA).

ABSTRACT

Ceratozamia mexicana Brongniart is a strictly dioecious species with a long juvenile stage. In order to detect molecular markers associated with sex, it was analyzed by the technique of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and masal segregant analysis (BSA) samples of leaf tissue of sexually differentiated individuals of the population of this species located at Coacoatzintla, Veracruz, México. 5 primers were used to amplify three bulk DNA samples of five known individuals from each sex. A total of 37 bands were produced of which 63% were polymorphic. The OPB08 and OPK10 primers generated distinctive bands to male sex in *C. mexicana*. With the OPK10 primer a band of 500 bp was observed in two of the three male bulk samples tested, while the OPB08 primer detected two bands (1400 and 1100 bp) in the male samples tested. Although it is necessary to validate this observation, these results could open a new alternative to early determination of sex in *C. mexicana*.

KEY WORDS: *Ceratozamia mexicana*, sex identification, RAPD, molecular markers, bulked segregate analysis (BSA).

INTRODUCCIÓN

En plantas la determinación genética de la expresión sexual no está completamente dilucidada, pues ésta puede asociarse en especies dioicas a dos fenómenos (Ainsworth, 2000). Así, en algunas de ellas el sexo está basado en un sistema XY, en el que el macho es el sexo heterogamético XY, como es el caso de *Cannabis*, *Humulus*, *Silene* y diversas especies de cícadas (Ainsworth, 2000, Charlesworth, 2002, Sangduen *et al.*, 2009), mientras que en otras el sexo está determinado por factores citoplasmáticos (Charlesworth, 2002).

Pese a la importancia de las cícadas (Jones, 1993), poco se conoce sobre la determinación de su sexo. Casi

INTRODUCTION

In plants the genetic determination of sexual expression has not been completely elucidated, given that it can be associated to two phenomena in dioecious species (Ainsworth, 2000). In some of these species sex is based on an XY system, in which the male is the heterogametic XY, as in the case of *Cannabis*, *Humulus*, *Silene* and diverse species of cycads (Ainsworth, 2000; Charlesworth, 2002, Sangduen *et al.*, 2009), whereas in others sex is determined by cytoplasmic factors (Charlesworth, 2002).

Despite the importance of cycads (Jones, 1993), little is known of the determination of their sex. Nearly

todas las especies mexicanas de cícadas son dioicas, con los sexos masculino y femenino en diferentes plantas. Dentro de ellas está *C. mexicana* Brongn, endémica de Veracruz, que, al igual que la mayoría de las especies de cícadas, se encuentra bajo amenaza, de acuerdo con la NOM-ECOL-059-94 (SEMARNAT). No es posible determinar el sexo de esta cícada hasta que los individuos alcanzan su madurez reproductiva, que en esta especie puede tardar de 15 a 20 años, ya que los individuos juveniles de ambos sexos no presentan un dimorfismo sexual en sus características morfológicas. Es por ello que resulta de gran utilidad disponer de un método no destructivo, rápido y confiable que permita conocer el sexo en estadios tempranos de desarrollo, a fin de contribuir a su conservación -a través de una adecuada proporción de individuos machos y hembras en la población,- y a conocer el mecanismo de determinación del sexo en esta especie.

En los últimos años ha recibido una atención especial el desarrollo de marcadores moleculares, particularmente aquellos basados en la técnica de PCR, para identificar tempranamente el sexo (Samantaray *et al.*, 2010, Prakash y Van Staden, 2006). La amplificación al azar de ADN Polimórfico (RAPD) basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha sido empleada como marcador de ADN vinculado al fenotipo sexual en diversas especies vegetales como: *Phoenix dactylifera* L. (Younis *et al.*, 2008), *Populus tomentosa* Carr. (Wanwei *et al.*, 2009), *Carica papaya* L. (Chaves-Bedoya y Nuñez, 2007), *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider (Agrawal *et al.*, 2007) y *Commiphora wightii* (Arnott) Bhandari (Samantaray *et al.*, 2010).

En este tipo de estudio ha sido igualmente útil el uso del análisis masal segregante (*bulk segregant analysis*, BSA, Michelmores *et al.*, 1991). Este método ha sido utilizado con éxito para identificar marcadores moleculares ligados al sexo en varias especies dioicas. Mulcahy *et al.* (1992) identificaron 4 iniciadores que produjeron marcadores asociados al sexo en *Silene latifolia* (Mill. Greuter y Burdet). Hormaza *et al.* (1994) detectaron un marcador simple asociado al sexo femenino y ausente en machos en *Pistacia vera* L. Sakamoto *et al.* (1995) reportaron un marcador RAPD de 730 pb que estaba asociado con el sexo masculino de *Cannabis sativa*. Empleando secuencias inter-microsatélites (ISSR, simple sequence repeats), Sharma *et al.* (2008) detectaron un iniciador (UBC-807), de los 45 evaluados, que produjo un fragmento de ~1,200 pb asociado al sexo masculino en *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider.

En Cicadales se cuenta hoy en día con dos marcadores candidatos de ADN específicos al sexo masculino. Ambos fueron desarrollados con la técnica de RAPD y han sido usados en la identificación del sexo en plantas de *Encephalartos natalensis* (Dyer and Verdoorn) (Prakash y Van Staden, 2006) y *Cycas circinalis* L.

all of the Mexican species of cycads are dioecious, with the male and female sexes in different plants. Within these is *Ceratozamia mexicana* Brongniart, endemic to Veracruz, which along with most of the cycad species, is now threatened, according to the NOM-ECOL-059-94 (SEMARNAT). It is not possible to determine the sex of this cycad until the individuals reach their reproductive maturity, which in this species can take from 15 to 20 years, given that the juvenile individuals of both sexes do not present a sexual dimorphism in their morphological characteristics. Therefore, it is very useful to have a method that is non-destructive, rapid and reliable that makes it possible to know the sex in early development stages, in order to contribute to their conservation through an adequate proportion of male and female individuals in the population, and to know the sex determination mechanism in this species.

In recent years the development of molecular markers has received special attention, particularly those based on the PCR technique for early sex identification (Samantaray *et al.*, 2010, Prakash and Van Staden, 2006). The random amplification of Polymorphic DNA (RAPD) based on the chain reaction of the polymerase (PCR) has been employed as a DNA marker linked to the sexual phenotype in diverse plant species, such as *Phoenix dactylifera* L. (Younis *et al.*, 2008), *Populus tomentosa* Carr. (Wanwei *et al.*, 2009), *Carica papaya* L. (Chaves-Bedoya and Nuñez, 2007), *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider (Agrawal *et al.*, 2007) and *Commiphora wightii* (Arnott) Bhandari (Samantaray *et al.*, 2010).

In this type of study the application of bulked segregant analysis (BSA) has been equally useful (Michelmores *et al.*, 1991). This method has been used successfully to identify molecular markers linked to sex in various dioecious species. Mulcahy *et al.* (1992) identified 4 primers that produced markers associated to sex in *Silene latifolia* (Mill. Greuter and Burdet). Hormaza *et al.* (1994) detected a simple marker associated to the female sex and absent in males in *Pistacia vera* L. Sakamoto *et al.* (1995) reported a RAPD marker of 730 pb that was associated with the male sex of *Cannabis sativa*. Employing inter-microsatellite sequences (ISSR, simple sequence repeats), Sharma *et al.* (2008) detected a primer (UBC-807), of the 45 evaluated, that produced a fragment of ~1,200 pb associated to male sex in *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider.

In Cycads there exist now two DNA marker candidates specific for the male sex. Both were developed with the RAPD technique and have been used in sex identification in plants of *Encephalartos natalensis* (Dyer and Verdoorn) (Prakash and Van Staden, 2006) and *Cycas circinalis* L. (Gangopadhyay *et al.*, 2007). However, there is no similar information in *C. mexicana* that would allow an early diagnosis of sex in this species. Therefore the objective of the present study was to detect RAPDs markers associated with sex in this species that will contribute to the

(Gangopadhyay *et al.*, 2007). En cambio, no se cuenta con información similar en *C. mexicana* que permita efectuar un diagnóstico temprano del sexo en esta especie. Por ello se propuso en el presente estudio detectar marcadores RAPDs asociados al sexo en esta especie que contribuyan a establecer estrategias efectivas para su conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Descripción del área de estudio y colecta del material vegetal

La colecta se realizó en la población de *C. mexicana* ubicada en el cerro de Coacoatzintla (19° 35' 35.0", N 96° 56' 52.3" W, 1,545 m), perteneciente al municipio de Coacoatzintla, Ver. (Figura 1). *C. mexicana* se localiza bajo el dosel del bosque mesófilo de montaña (Rzedowski, 1978) a una altitud que varía de los 1,450 a los 1,700 m, con una pendiente muy próxima al 40 %. Entre las especies asociadas a este tipo de vegetación se encuentran: *Quercus* spp., *Alnus jorullensis* Humboldt, Bonpland y Kunth, *Clethra mexicana* Conzatti, *Lysiloma divaricata* Jacq. y *Trophis racemosa* L. Urban (Alejandre *et al.*, 1990). Esta población ha estado sometida a fuertes presiones antropogénicas debido, principalmente, a la extracción desmedida de individuos para su venta ilegal en el mercado.

Se colectaron muestras de tejido foliar de 30 individuos sexualmente diferenciados (15 individuos machos e igual número de individuos hembras). Para ello se seleccionaron sólo aquellas hojas localizadas en la parte superior de la planta, que tuviesen una apariencia sana. El material foliar colectado se etiquetó debidamente y se trasladó, para su análisis, en una hielera conteniendo paquetes de geles congelados. Una vez en el laboratorio, se conservaron bajo condiciones de refrigeración a 4°C hasta el momento de su procesamiento.

Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir del tejido foliar de *C. mexicana*, se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Steward y Vía (1993) basado en el uso del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). El procedimiento fue ligeramente modificado en este trabajo en cuanto al tiempo de la primera centrifugación (8 min) a 2,000 rpm y el tiempo (20 min) de la centrifugación final realizada a 14,000 rpm. Concluida la centrifugación, se desechó la fase acuosa y se dejó secar la pastilla y al final se resuspendió en 100 µL de agua. Las muestras se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su análisis. Posteriormente se efectuó la determinación cualitativa del ADN extraído por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % en tampón TBE 0.5 X a un voltaje de 90 voltios. Al término de la electroforesis los geles fueron teñidos con solución de bromuro de etidio (10 mg·mL⁻¹) y se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Electrofor 365 Uvifor L20). La cuantificación del ADN total

establishment of effective strategies for its conservation.

MATERIALS AND METHODS

Description of the study area and collection of plant material

The collection was made in the *C. mexicana* population located on the hill of Coacoatzintla (19° 35' 35.0" N, 96° 56' 52.3 W, 1,545 m), pertaining to the municipality of Coacoatzintla, Veracruz (Figure 1). *C. mexicana* is found under the canopy of the cloud forest (Rzedowski, 1978) at an altitude that varies from 1,450 to 1,700 m, with a slope approaching 40 %. Among the species associated with this type of vegetation are the following: *Quercus* spp., *Alnus jorullensis* Humboldt, Bonpland and Kunth, *Clethra mexicana* Conzatti, *Lysiloma divaricata* Jacq. and *Trophis racemosa* L. Urban (Alejandre *et al.*, 1990). This population has been subjected to strong anthropogenic pressure, due mainly to the uncontrolled extraction of individuals for their illegal sale in the market.

Leaf tissue samples were collected from 30 sexually differentiated individuals (15 male individuals and an equal number of female individuals). For this purpose only the leaves located in the upper part of the plant were selected, which had a healthy appearance. The collected leaf material was properly labeled and transferred for its analysis in a cooler containing packet of frozen gel. Once in the laboratory, they were conserved under refrigeration conditions at 4 °C until the moment of processing.

Extraction of DNA

The extraction of DNA from the leaf tissue of *C. mexicana* was carried out following the procedure

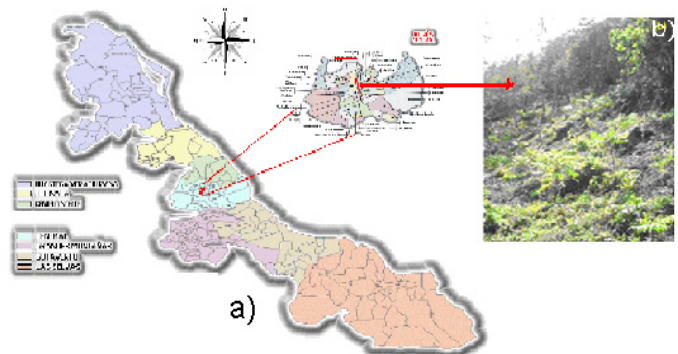


FIGURA 1. Población de *C. mexicana*. a) Ubicación de la población de estudio en la localidad de Coacoatzintla, Ver. (INEGI, 2008); b) Vista panorámica de la población estudiada (Foto. Iglesias, 2008).

FIGURE 1. Population of *C. mexicana*. a) Location of the population of study in the locality of Coacoatzintla, Ver. (INEGI, 2008); b) Panoramic view of the population under study (Photo. Iglesias, 2008).

se realizó por espectrofotometría, en un espectrofotómetro GENESYS 20 determinando la absorbencia a 260 nm del ADN presente en cada una de las muestras obtenidas. El ADN presente se estimó con la fórmula propuesta por (Valadez y Günter, 2000). La pureza del ADN se determinó con los valores 260/280 (Sambrook y Russell, 2001).

Análisis masal segregante (BSA)

Una vez analizado el contenido y calidad del ADN genómico extraído se realizaron las diluciones del ADN total de cada uno de los individuos en estudio (30 individuos en total). Con ello se aseguró contar con la misma concentración de ADN en cada una de las mezclas de ADN formadas (tres mezclas de ADN conformadas por 5 individuos por género) siguiendo el análisis masal segregante (BSA) descrito por Michelmore *et al.* (1991).

Análisis RAPD

El ADN genómico de cada mezcla formada fue sometido a la reacción de PCR para detectar marcadores RAPDs usando 5 iniciadores (Kit B: OPB₀₈, Kit K: OPK₁₀ y OPK₁₅, Kit E: OPE₁₇ [marca Operon Technologies] y S₁₅₂, este último usado en coníferas por Xie *et al* [2009] (Cuadro 1). Las reacciones de RAPD fueron efectuadas en un Termociclador Perkin Elmer (PE480) en un volumen final de 25 µL conteniendo una concentración de 1x del tampón de PCR (3 mM MgCl₂, 30 mM KCl y 10 mM Tris, pH 8.3), 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada uno de los dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 15 picomol de iniciador, 0.5 unidades de Taq DNA polimerasa (marca Promega) y 20 ng de ADN genómico. El programa seguido fue el siguiente: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, y 45 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94 °C; 2 minutos de alineación del iniciador a 40 °C y 2 minutos de elongación a 72 °C. Posteriormente se mantuvo constante a 72 °C por 5 minutos y luego se conservó a temperatura de 4 °C hasta la realización de la electroforesis. Todas las amplificaciones fueron repetidas dos veces. La separación de los productos amplificados se realizó por electroforesis horizontal en gel de agarosa (1.8 % p/v) conteniendo bromuro de etidio (5 µL de solución 10 mg·mL⁻¹ de bromuro de etidio para un gel de 120 mL). Se utilizó como tampón de corrida para la electroforesis 1x TBE [54 mg·mL⁻¹ de Tris-HCl; 27.5 mg·mL⁻¹ de ácido bórico; 0.01 M de EDTA pH 8,0] al igual que el empleado en la preparación del gel. Se utilizó una fuente de poder Scie-Plas (modelo PSU400/200) para realizar las corridas a 100 volt por 2.5 horas. Cada pozo del gel fue cargado con 5 µL de los productos amplificados y 3 µL de tampón de carga (marca Promega). Se aplicaron al inicio y fin de cada gel 2 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (marca Promega). Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (marca Consort).

Las amplificaciones fueron repetidas varias veces para asegurar la adecuada reproducibilidad y consistencia

reported by Steward and Vía (1993) based on the use of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The procedure was slightly modified in this work with respect to the time of the first centrifugation (8 min) at 2,000 rpm and the time (20 min) of the final centrifugation made at 14,000 rpm. When the centrifugation was concluded, the aqueous phase was discarded and the pellet was allowed to dry, and then was re-suspended in 100 µL of water. The samples were maintained under freezing conditions at -20 °C until their analysis. Then, the qualitative determination was made of DNA extracted by electrophoresis in agarose gels at 0.8 % in TBE 0.5 X tampon at a voltage of 90 volts. At the conclusion of electrophoresis, the gels were stained with ethidium bromide solution (10 mg·mL⁻¹) and were visualized in a UV light transilluminator (Electrofor 365 Uvifor L20). The quantification of the total DNA was made by spectrophotometry, in a GENESYS 20 spectrophotometer, determining the absorbance at 260 nm of the DNA present in each one of the samples obtained. The DNA present was estimated with the formula proposed by Valadez and Günter (2000). The purity of the DNA was determined with the values 260/280 (Sambrook and Russell, 2001).

Bulked segregant analysis

Once the content and quality of the extracted genomic DNA had been analyzed, the dilutions of the total DNA were made of each one of the individuals under study (a total of 30 individuals). This insured having the same concentration of DNA in each one of the DNA mixtures formed (three DNA mixtures formed by 5 individuals *per genus*) following the bulked segregant analysis (BSA) described by Michelmore *et al.* (1991).

RAPD analysis

The genomic DNA of each mixture formed was subjected to the reaction of PCR to detect RAPD markers using 5 primers (Kit B: OPB₀₈, Kit K: OPK₁₀ and OPK₁₅, Kit E: OPE₁₇ (Operon Technologies) and S₁₅₂, the latter used in conifers by Xie *et al.* (2009) (Table 1). The reactions of RAPD were carried out in a Perkin Elmer Thermocycler (PE480) in a final volume of 25 µL containing a concentration of 1x of the tampon of PCR (3 mM MgCl₂, 30 mM KCl and 10 mM Tris, pH 8.3), 2 mM of MgCl₂, 200 µM of each one of the dNTPs (dATP, dGTP, dCTP and dTTP), 15 picomol of primer, 0.5 units of Taq DNA polymerase (Promega) and 20 ng of genomic DNA. The following program was applied: 2 minutes of initial denaturalization at 94 °C; 2 minutes of alienation of the primer at 40 °C and 2 minutes of elongation at 72 °C. It was then kept constant at 72 °C for 5 minutes and then was conserved at a temperature of 4 °C until the electrophoresis was carried out. All of the amplifications were repeated twice. The separation of the amplified products was carried out through horizontal electrophoresis in agarose gel (1.8 % p/v) containing ethidium bromide (5 µL of solution 10 mg·mL⁻¹ of ethidium bromide for a gel of 120 mL) A tampon of 1 x TBE (54 mg·mL⁻¹ of Tris-HCl; 27.5

de los perfiles de bandas obtenidos. Las bandas que no mostraron adecuada resolución y repetibilidad se consideraron como artefactos de la PCR y no se incluyeron en el análisis. Cada banda amplificada RAPD se registró con base en el tipo de iniciador y peso en pares de bases (pb). El tamaño de los alelos se determinó por comparación de movilidad en el gel con el marcador de tamaño molecular de ADN de 100 pb (marca Promega).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de perfiles de bandas RAPDs repetibles y reproducibles en las mezclas de ADN de los individuos sexualmente diferenciados con los cinco iniciadores evaluados (Figura 2).

En el Cuadro 1 se resumen los iniciadores y sus secuencias (5'-3'), así como el número y rango en peso molecular (pb) de los productos de amplificación generados por cada iniciador. Se detectó un total de 37 bandas. De ellas, el 63 % resultaron polimórficas. El número de productos amplificados por iniciador varió de 4 a 10 para machos y de 3 a 8 para hembras. El número de bandas por sexo osciló entre 2 y 11 para machos y de 3 a 9 para hembras, con un número promedio de 7 y 5 bandas para machos y hembras, respectivamente.

De los cinco iniciadores analizados, sólo OPK₁₀ y OPE₁₇ mostraron bandas distintivas al sexo en *C. mexicana*. Con el decámero OPK₁₀ se observó la presencia de una

CUADRO 1. Secuencia de los iniciadores RAPDs analizados, número y rango en peso molecular de los fragmentos amplificados usados en la determinación del sexo en

TABLE 1. Sequence of the RAPDs primers analyzed, number and rank in molecular weight of the amplified fragments used in the determination of sex in *Ceratozamia mexicana*.

Iniciador	Secuencia del iniciador (5'-3')	Número de Bandas			Rango tamaño de los fragmentos (pb)
		M	P	T	
OPK ₁₀	GTGCAACGTG	4	8	12	1500-320
OPK ₁₅	CCCGCTACAC	3	3	6	800-300
OPB ₀₈	GTCCACACGG	4	3	7	1300-500
OPE ₁₇	CTACTGCCGT	3	3	6	900-300
S ₁₅₂	TTATCGCCCC	5	1	6	1000-400

*M, P y T: bandas monomórficas, polimórficas y totales; pb: pares de bases.

mg·mL⁻¹ of boric acid; 0.01 M of EDTA pH 8.0) was used for the electrophoresis, the same used in the preparation of the gel. A Scie-Plas (model PSU400/200) power source was used to carry out the runs at 100 volts for 2.5 hours. Each well of gel was loaded with 5 µL of molecular weight marker of 100 pb (Promega). At the start and end of each gel 2 µL of molecular weight marker (Promega) were applied. The gels were visualized in an ultraviolet light transilluminator (Consort).

The amplifications were repeated various times to insure the adequate reproducibility and consistency of the profiles of bands obtained. The bands that did not show adequate resolution and repeatability were considered as artifacts of the PCR and were not included in the analysis. Each amplified RAPD band was registered based on the type of primer and weight in pairs of bases (pb). The size of the alleles was determined by comparing the mobility in the gel with the marker of molecular size of DNA of 100 pb (Promega).

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained showed the presence of profiles of repeatable and reproducible RAPD bands in the mixtures of DNA of the sexually differentiated individuals with the five primers evaluated (Figure 2).

In Table 1 the primers and their sequences are summarized (5'-3'), as well as the number and rank in molecular weight (pb) of the products of amplification generated for each primer. A total of 37 bands were detected, of which 63 % were polymorphic. The number of products amplified per primer varied from 4 to 10 for males and from 3 to 8 for females. The number of bands per sex oscillated between 2 and 11 for males and from 3 to 9 for females, with an average number of 7 and 5 bands for males and females, respectively.

Of the five primers analyzed, only OPK₁₀ and

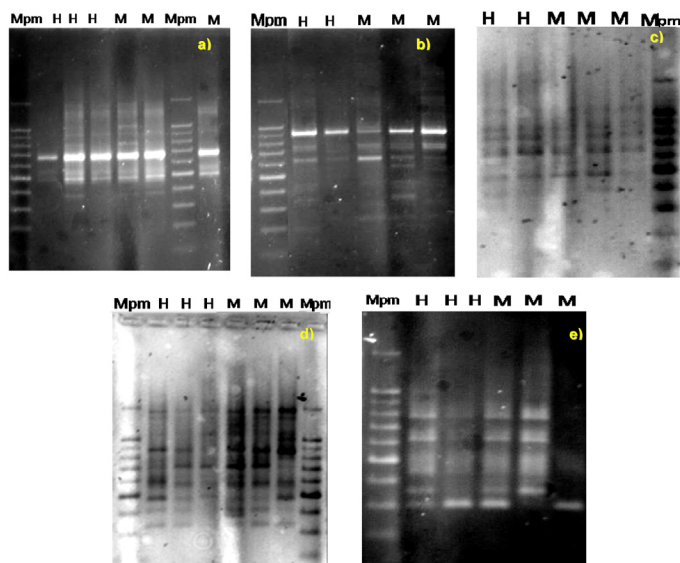


FIGURA 2. Perfiles RAPDs obtenidos de mezclas de ADN (H₁₋₃: hembras y M₁₋₃: machos) de *Ceratozamia mexicana* utilizando cinco iniciadores (a: OPB₀₈, b: OPE₁₇, c: S₁₅₂, d: OPK₁₅ y e: OPK₁₀), M_m: Marcador ADN 100 pb.

FIGURE 2. RAPDs profiles obtained from mixtures of DNA (H₁₋₃: females and M₁₋₃: males) of *Ceratozamia mexicana* using five primers (a: OPB₀₈, b: OPE₁₇, c: S₁₅₂, d: OPK₁₅ and e: OPK₁₀), M_m: DNA marker 100 pb.

banda de 500 pb, en dos de las tres mezclas de machos evaluadas, mientras que con el OPE₁₇ se detectaron dos bandas (1,400 y 1,100 pb) que tipificaron a las mezclas de individuos machos evaluados (Figura 3).

Los marcadores específicos al sexo pueden representar ADN amplificado de un cromosoma sexual o bien polimorfismo de ADN (ej. mutaciones puntuales) que están ligadas a genes sexuales (Valadez y Günter, 2000). Sin embargo, es posible que las bandas detectadas no estén estrechamente ligadas al locus determinante del sexo en esta especie. Como se sabe, las bandas ligadas al sexo por lo regular se presentan en muy baja frecuencia y no siempre de modo consistente. Algunos autores han requerido del empleo de un mayor número de iniciadores (20 iniciadores) para detectar la presencia de marcadores asociados al sexo masculino en *Cannabis sativa* (Sakamoto et al., 1995, Mandolino et al., 1999), y de 400 a 900 iniciadores RAPDs en *Pistachio vera* L. y *Humulus lupulus* L. (Hormaza et al., 1994; Polley et al., 1997).

Por ello es de esperar que el análisis de un mayor número de iniciadores y mezclas de individuos sexualmente diferenciados permitan detectar marcadores estrechamente ligados al sexo en esta especie. En ese caso se tiene previsto convertir los marcadores RAPDs asociados al sexo masculino detectados (OPK₁₀ 500 así como OPE₁₇ 1000 y OPE₁₇ 1400) en marcadores SCARs (sequence characterized amplified regions), más específicos y altamente reproducibles, para proceder a validar estos resultados en la identificación temprana del sexo, en esta y otras especies de cícadas amenazadas del estado de Veracruz, como *Zamia furfuracea* L. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que la expresión del sexo en *C. mexicana* tenga una base epigenética (cambios en los patrones de expresión genética que ocurren sin alteraciones en la secuencia nucleotídica), como ha sido establecido en otras especies vegetales (Janoušek et al., 1996; Spielman et al., 2001).

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento recibido para la realización de este trabajo, parte del proyecto (CB-CONACYT: 00000000083156): Bases bioquímicas y moleculares para la identificación temprana del sexo en *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae): un fósil viviente de México amenazado.

LITERATURA CITADA

- AGRAWAL, V.; SHARMA. K.; GUPTA, S.; KUMAR, S.; PRASAD, M. 2007. Identification of sex in *Simmondsia chinensis* (Jojoba) using RAPD markers. *Plant Biotechnology Reports* 1(4): 207-210.
- ALEJANDRE-ROSAS, J. A.; SÁNCHEZ-TINOCO, M. Y.; VÁZQUEZ-

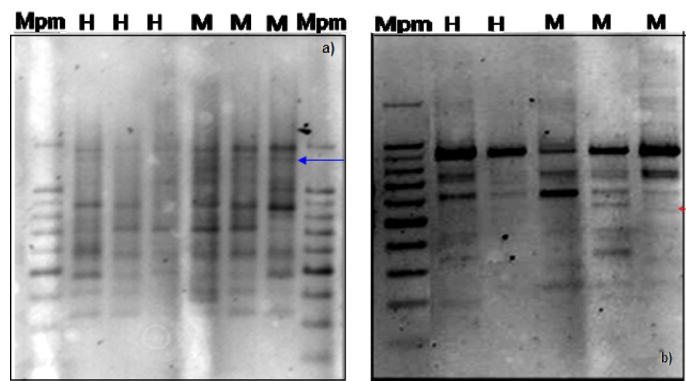


FIGURA 3. Perfiles RAPDs de mezclas de ADN (H1-3: hembras y M1-3: machos) de *Ceratozamia mexicana* obtenidos con los iniciadores a) OPK10 y b) OPE17; Mm: Marcador ADN 100pb. Las flechas indican las bandas distintivas del sexo masculino.

FIGURE 3. RAPDs profiles of mixtures of DNA (H1-3: females and M1-3: males) of *Ceratozamia mexicana* obtained with the primers a) OPK10 y b) OPE17; Mm: DNA Marker 100pb. Arrows indicate the distinctive bands of sex.

OPE₁₇ showed bands distinctive to sex in *C. mexicana*. With OPK₁₀, the presence of a band of 500 pb was observed, in two of the three mixtures of males evaluated, whereas with the OPE₁₇ two bands were detected (1,400 and 1,100 pb) that typified the mixtures of individual males evaluated (Figure 3).

The markers specific to sex can represent amplified DNA of a sexual chromosome or polymorphism of DNA (ex. punctual mutations) that are linked to sexual genes (Valadez and Günter, 2000). However, it is possible that the detected bands are not closely linked to the sex determining locus in this species. As it is known, the bands linked to sex generally appear with very low frequency and not always consistently. Some authors have required the use of a greater number of primers (20 primers) to detect the presence of markers associated to the male sex in *Cannabis sativa* (Sakamoto et al., 1995; Mandolino et al., 1999), and 400 to 900 RAPDs primers in *Pistachio vera* L. and *Humulus lupulus* L. (Hormaza et al., 1994; Polley et al., 1997).

Therefore it is to be expected that the analysis of a greater number of primers and mixtures of sexually differentiated individuals would make it possible to detect markers closely linked to sex in this species. In this case it is foreseen to convert the RAPDs markers detected associated to the male sex (OPK₁₀ 500 as well as OPE₁₇ 1000 and OPE₁₇ 1400) into SCARs (sequence characterized amplified regions) markers, more specific and highly reproducible, to validate these results in the early identification of sex, in this and other threatened cycad species of the state of Veracruz, such as *Zamia furfuracea* L. However, the possibility that the expression of sex in *C. mexicana* has an epigenetic base (changes in the genetic expression patterns that occur without alterations in the nucleotide sequence) has not been ruled out, as has been

- TORRES, M.S. 1990. Estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae) en un bosque del centro de Veracruz. *Revista La Ciencia y el Hombre*. 5:93-112.
- AINSWORTH, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Ann. Bot.* 86:211-221.
- CHARLESWORTH, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity*. 88:94-101.
- CHAVES-BEDOYA, G.; NUÑES, V. 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica*. 53: 215-220.
- GANGOPADHYAY, G.; ROY S., K.; GHOSE, K.; PODDAR, R.; BANDYOPADHYAY, T.; BASU, D.; MUKHERJEE, K. K. 2007. Sex detection of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD. *Current Science*. 92:524-526.
- HORMAZA, J. I.; DOLLO, L.; POLITO, V. S. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 89(1): 9-13.
- INEGI. 2008. Carta topográfica E14-3 (Veracruz) Escala 1: 250 000. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México, D. F.
- JANOUSĚK, B.; ŠIROKÝ, J.; VYSKOT, B. 1996. Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Molecular and General Genetics*. 250(4):483-490.
- JONES, D. L. 1993. *Cycads of the world. Ancient plants in today's landscape*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. (U.S.A), 312 pp.
- MANDOLINO, G.; CARBONI, A.; FORAPANI, S.; FAETI, V.; RANALLI, P. 1999. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98(1): 86-92.
- MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 88:9828-9832.
- MULCAHY, D. L.; WEEDEN, N. F.; KESSELI, R.; CARROLL, S. B. 1992. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sex Plant Reprod.* 5:86-88.
- RZEDWOSKI, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 p.
- SEMARNAT, 2001. Modificación a la Norma Oficial Mexicana Nom-059-Ecol-1994, Diario Oficial. México, 16 de mayo de 1994.
- POLLEY, A.; SEIGNER, E.; GANAL, M. W. 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome*. 40:357-361.
- PRAKASH, S.; VAN STADEN, J. 2006. Sex identification in *Encephalartos natalensis* (Dyer and Verdoorn) using RAPD markers. *Euphytica*. 152:197-200.
- SAKAMOTO, K.; SHIMOMURA, K.; KOMEDA, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. A. 1995. Male-Associated DNA sequence in a dioecious plant, established in other plant species (Janousek *et al.*, 1996; Spielman *et al.*, 2001).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like thank to the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the funding received for carrying out his work, part of the project (CB-CONACYT; 000000000083156): "Biochemical and Molecular bases for the early identification of sex in *Ceratozamia mexicana* Brong. (Zamiaceae): a Mexican endangered living fossil".

End of English Version

Cannabis sativa L. *Plant Cell Physiol.* 36:1549-1554.

- SAMANTARAY, S.; GEETHA, K. A.; HIDAYATH, K. P.; SATYABRATA, M. 2010. Identification of RAPD markers linked to sex determination in guggal [*Commiphora wightii* (Arnott.) Bhandar. *Plant Biotechnol.Rep.*4:95-99.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGDUEN, N.; TOAHSAKUL, M.; HONGTRAKUL, V. 2009. Comparative Karyomorphological Study between Male and Female Plants of Some Cycas and Zamia Species. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 43: 476 - 485.
- SHARMA, H.; AGRAWAL, V.; GUPTA, S.; KUMAR, R.; PRASAD, M. 2008. ISSR marker-assisted selection of male and female plants in a promising dioecious crop: jojoba (*Simmondsia chinensis*). *Plant Biotechnology Reports*. 2(4): 239-243.
- SPIELMAN, M.; VINKENOOG, R.; DICKINSON, H. G.; SCOTT, R. J. 2001. The epigenetic basis of gender in flowering plants and mammals. *Trends in Genetics*. 17: 705-711.
- STEWART, C. N. Jr.; VIA, L. E. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*. 14:748-751.
- VALADEZ, M. E.; GÜNTER, K. 2000. *Huellas de ADN en genoma de plantas*. Edit. Mundi Prensa. Madrid, España, 164 p.
- WANWEI, H.; FAN, J.; ZHOU, F.; ZHAO, S. 2009. RAPD markers related to sex locus in *Populus tomentosa*. *Frontiers of Forestry in China*. 4(2):223-226.
- XIE, Y.; LI, Z.; HUANG, R.; XIAO, X.; HUANG, Y. 2009. Genetic diversity of *Betula luminifera* populations at different elevations in Wuyi Mountain and its association with ecological factors; *Front. For. China*. 4(1): 90-95.
- YOUNIS, R. A.; OMAYMA, M. I.; SOLIMAN, S. S. 2008. Identification of Sex-specific DNA Markers for Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Using RAPD and ISSR Techniques. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 4(4): 278-284.