

Molecular characterization using ISSR primers of *Magnolia mexicana* DC. from two regions in Zongolica, Veracruz, Mexico

Caracterización molecular mediante iniciadores ISSR de *Magnolia mexicana* DC. de dos regiones de Zongolica, Veracruz, México

Jessica M. Medrano-Hernández¹; José L. Rodríguez de la O¹;
Benito Reyes-Trejo²; M. Gisela Peña-Ortega*¹

¹Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

²Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Preparatoria Agrícola, Área de Química. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

*Corresponding author: mgise310@gmail.com, tel.: +52 (595) 952 1500 ext. 6236.

Abstract

Introduction: *Magnolia mexicana* DC. is a threatened species according to NOM-059-SEMARNAT-2010, a situation attributed to the fragmentation and destruction of its habitat. There are no studies on the genetic diversity of *M. mexicana*, even though it is endemic to our country.

Objective: To evaluate genetic variability in two *M. mexicana* populations using ISSR molecular markers.

Materials and methods: The collections come from Amatitla and Zapotla in Zongolica, Veracruz. The DNA was extracted from the young leaves. A total of 55 ISSR primers were tested; the 10 that produced the highest number of polymorphic bands were selected and amplified by PCR.

Results and discussion: The ISSR primers showed 86 % polymorphism. Cluster analysis, using Ward's minimum variance method, was able to separate the collections by their geographical origin. Analysis of molecular variance showed that the greatest variability (90.88 %) is found within each population. The Shannon-Weaver diversity index was 0.47 and 0.41 for Amatitla and Zapotla, respectively.

Conclusion: The *M. mexicana* populations have not undergone changes in their genetic structure; there is no evidence at genetic level of alterations caused by population reduction or habitat fragmentation.

Keywords:

Threatened species,
fragmented habitat,
genetic variability,
Shannon-Weaver index.

Resumen

Introducción: *Magnolia mexicana* DC. es una especie amenazada según la NOM-059-SEMARNAT-2010, situación atribuida a la fragmentación y destrucción del hábitat. No existen estudios sobre la diversidad genética de *M. mexicana*, a pesar de que es endémica de nuestro país.

Objetivo: Evaluar la variabilidad genética en dos poblaciones de *M. mexicana* mediante marcadores moleculares tipo ISSR.

Materiales y métodos: Las colectas provienen de Amatitla y Zapotla en Zongolica, Veracruz. El ADN se extrajo de las hojas jóvenes. Se probaron 55 iniciadores ISSR, se seleccionaron los 10 que produjeron mayor número de bandas con polimorfismo y se amplificaron por PCR.

Resultados y discusión: Los iniciadores ISSR mostraron 86 % de polimorfismo. El análisis de agrupamiento, con el método de varianza mínima de Ward, fue capaz de separar las colectas por su procedencia geográfica. El análisis de varianza molecular demostró que la mayor variabilidad (90.88 %) se encuentra dentro de cada población. El índice de diversidad de Shannon-Weaver fue de 0.47 y 0.41 para Amatitla y Zapotla, respectivamente.

Conclusión: Las poblaciones de *M. mexicana* no han sufrido cambios en su estructura genética; no hay evidencia, a nivel genético, de alteraciones ocasionadas por la reducción de poblaciones o fragmentación del hábitat.

Palabras clave: Especie
amenazada, hábitat
fragmentado, variabilidad
genética, índice de
Shannon-Weaver.

Introduction

Species of the family Magnoliaceae are considered primitive because their sepals and petals are not clearly differentiated, and because their flower parts are arranged in spirals rather than rings as in most other angiosperms (Cicuzza, Newton, & Oldfield, 2007). This feature is of great interest in evolutionary, biogeographical, taxonomic and ecological studies (Endress & Doyle, 2009). *Magnolia mexicana* DC. is a species endemic to Mexico that is found in high tropical evergreen and tropical montane cloud forest (TMCF) (Palacios, 2006). The habitat of the species is seriously threatened; approximately 50 % of the original TMCF area has been replaced by other types of cover (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2010). This situation is related to climate change and anthropogenic activities such as road construction, shepherding and hunting (CONABIO, 2010; Nora, Albaladejo, González-Martínez, Robledo-Arnuncio, & Aparicio, 2011). For this reason, *M. mexicana* was included in the NOM-059-SEMARNAT-2010 list of threatened species (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2010). Currently, there are viable populations in the states of Chiapas, Oaxaca, Veracruz and Puebla; some are remnants associated with crops, mainly in coffee plantations, where they are used as shade (Palacios, 2006).

In threatened plant species such as *M. mexicana*, it is important to know the population's genetic structure, levels of variation and genetic differentiation, as well as the effects of microevolutionary mechanisms. Natural selection, inbreeding, genetic drift, mutation, and gene flow are influenced by the population's demographic dynamics, caused by birth, mortality, and migration rates (Hamrick, Godt, & Sherman-Broyles, 1992). Although *M. mexicana* is a species endemic to our country, to date there are no studies on the existing genetic diversity. Levels of genetic variation between organisms of a species or between different taxonomic levels can be determined through traditional methods of morphological comparisons and modern DNA analysis techniques (Mohammadi & Prasanna, 2003). Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs) are a type of genetic marker that allows measuring the levels of variation in the intermicrosatellite regions dispersed in the genome. ISSRs are semi-arbitrary markers, so they are amplified from a primer complementary to the microsatellite region (Cornejo, Serrato, Rendón, & Rocha, 2014). These markers have been used in species such as sorghum and banana (Godwin, Aitken, & Smith, 1997), coffee tree (Aga, Bekele, & Bryngelsson, 2005) and primitive cataloged plants such as cycads (Xiao, Ge, Gong, Hao, & Zheng, 2004). The aim of this study was to evaluate the genetic variability present in two populations of *M. mexicana* through the use of

Introducción

Las especies de la familia Magnoliaceae son consideradas primitivas debido a que los sépalos y pétalos no están claramente diferenciados, además están dispuestos en espiral y no en anillo como en las demás angiospermas (Cicuzza, Newton, & Oldfield, 2007). Esta característica es de gran interés en los estudios de evolución, biogeográficos, taxonómicos y ecológicos (Endress & Doyle, 2009). *Magnolia mexicana* DC. es una especie endémica de México que se encuentra en selvas altas perennifolias y bosque mesófilo de montaña (Palacios, 2006). El hábitat de la especie se encuentra seriamente amenazado; aproximadamente, 50 % de la superficie original del bosque mesófilo ha sido reemplazado por otros tipos de cobertura (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2010). Esta situación se relaciona con el cambio climático y actividades antropogénicas como la construcción de caminos, pastoreo y depredación (CONABIO, 2010; Nora, Albaladejo, González-Martínez, Robledo-Arnuncio, & Aparicio, 2011). Por esta razón, *M. mexicana* fue incluida en la lista de la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de especie amenazada (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2010). Actualmente podemos encontrar poblaciones viables en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Puebla, algunas son remanentes asociados a cultivos, principalmente en cafetales, donde se utilizan como sombra (Palacios, 2006).

En las especies vegetales amenazadas como *M. mexicana*, es importante conocer la estructura genética poblacional, los niveles de variación y la diferenciación genética, así como los efectos de los mecanismos microevolutivos. La selección natural, endogamia, deriva génica, mutación y flujo génico son influenciados por la dinámica demográfica poblacional, causada por las tasas de natalidad, mortalidad y migración (Hamrick, Godt, & Sherman-Broyles, 1992). A pesar de que *M. mexicana* es una especie endémica de nuestro país, a la fecha no hay estudios sobre la diversidad genética existente. Los niveles de variación genética entre organismos de una especie o entre diferentes niveles taxonómicos se pueden determinar a través de los métodos tradicionales de comparaciones morfológicas y las técnicas modernas de análisis del ADN (Mohammadi & Prasanna, 2003). Las Inter Secuencias Simples Repetidas o ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) son un tipo de marcador genético que permite medir los niveles de variación en las regiones intermicrosatélite dispersas en el genoma. Los ISSR son marcadores semiarbitrarios por lo que se amplifican a partir de un iniciador complementario a la región microsatélite (Cornejo, Serrato, Rendón, & Rocha, 2014). Estos marcadores se han utilizado en especies como sorgo y

ISSR molecular markers. The populations belong to the regions of Amatitla and Zapotla in the municipality of Zongolica, Veracruz, Mexico.

Materials and methods

Plant material

Due to technical difficulties related to the collection of young leaves of *M. mexicana* in average-height trees of 35 m and in order to obtain good quality DNA, it was decided to evaluate plant material provided by the environmental management unit of Yoloxóchitl, located in the municipality of Zongolica, Veracruz, Mexico. Seeds from Amatitla (18° 39' 34.77" N, 96° 59' 43.38" W) and Zapotla (18° 38' 46.72" N, 96° 58' 20.61" W), localities located at a distance of 2 248 m from one another, were collected and germinated *in situ*. Subsequently, six and seven specimens corresponding to each locality were used to obtain the young leaves and carry out the DNA extraction.

Extraction and purification of genomic DNA

DNA extraction was done according to the method reported by Dellaporta, Wood, and Hicks (1983). For this purpose, 0.3 g of plant material were weighed and suspended in a solution (pH 8.0) of Tris-HCl (100 mM), EDTA-Na₂ (50 mM), NaCl (500 mM), 2-Mercaptoethanol (10 mM) and SDS (1.3 %), as extraction buffer. Subsequently, the solution was centrifuged at 12 000 rpm for 20 min. The supernatant was mixed with cold isopropanol and the DNA was allowed to precipitate for 60 min, then STE solution (Tris-HCl [50 mM], EDTA-Na₂ [10 mM], NaCl [100 mM], pH 8.0) and RNase (10 mg·mL⁻¹) were added and the mixture was incubated at 37 °C for one hour. Sodium acetate (3 M) and cold isopropanol were then added and the mixture was centrifuged at 8000 rpm for 5 min for DNA precipitation and supernatant removal. The DNA was washed with ethanol (70 %) and allowed to dry, then dissolved in TE buffer (Tris-HCl [10 mM], EDTA-Na₂ [1 mM], pH 8.0) and stored under refrigeration until use. The amount and purity of the DNA was measured on a Thermo Scientific® NanoDrop (LITE model, USA) and the quality was determined by electrophoresis in agarose stained with ethidium bromide. Bands were visualized under ultraviolet light on a DigiDoc-it Imaging System transilluminator (UVP®, USA) and the images obtained were documented using a Kodak® EDAS290 camera.

Obtaining ISSR-PCR patterns

A total of 55 ISSR primers (Sigma®) were tested and the 10 that produced the highest number of clear bands with polymorphism were selected (Table 1). The DNA segments were amplified by PCR. The mixture for PCR

banano (Godwin, Aitken, & Smith, 1997), cafeto (Aga, Bekele, & Bryngelsson, 2005) y plantas catalogadas primitivas como las cícadras (Xiao, Ge, Gong, Hao, & Zheng, 2004). El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad genética presente en dos poblaciones de *M. mexicana* mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSR. Las poblaciones pertenecen a las regiones de Amatitla y Zapotla del municipio de Zongolica, Veracruz, México.

Materiales y métodos

Material vegetal

Debido a las dificultades técnicas relacionadas con la colecta de hojas jóvenes de *M. mexicana* en árboles de altura promedio de 35 m y con la finalidad de obtener ADN de buena calidad, se optó por evaluar material vegetal proporcionado por la unidad de manejo ambiental de Yoloxóchitl, ubicada en el municipio de Zongolica, Veracruz, México. Las semillas de Amatitla (18° 39' 34.77" N, 96° 59' 43.38" O) y Zapotla (18° 38' 46.72" N, 96° 58' 20.61" O), localidades ubicadas a una distancia de 2 248 m entre sí, fueron colectadas y germinadas *in situ*. Posteriormente seis y siete ejemplares correspondientes a cada localidad se usaron para obtener las hojas jóvenes y realizar la extracción de ADN.

Extracción y purificación de ADN genómico

La extracción de ADN se hizo de acuerdo con el método reportado por Dellaporta, Wood, y Hicks (1983). Para tal objetivo se pesaron 0.3 g de material vegetal y se suspendieron en una solución (pH 8.0) de Tris-HCl (100 mM), EDTA-Na₂ (50 mM), NaCl (500 mM), 2-Mercaptoetanol (10 mM) y SDS (1.3 %), como amortiguador de extracción. Posteriormente, la solución se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se mezcló con isopropanol frío y el ADN se dejó precipitar por 60 min, luego se agregó solución STE (Tris-HCl [50 mM], EDTA-Na₂ [10 mM], NaCl [100 mM], pH 8.0) y ARNasa (10 mg·mL⁻¹) y se incubó a 37 °C por una hora. Después se agregó acetato de sodio (3 M) e isopropanol frío y se centrifugó a 8 000 rpm por 5 min para la precipitación del ADN y eliminación del sobrenadante. El ADN se lavó con etanol (70 %) y se dejó secar, después se disolvió en amortiguador TE (Tris-HCl [10 mM], EDTA-Na₂ [1 mM], pH 8.0) y se almacenó en refrigeración hasta su uso. La cantidad y pureza del ADN se midió en un NanoDrop Thermo Scientific® (modelo LITE, EUA) y la calidad se determinó mediante electroforesis en agarosa teñida con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador DigiDoc-it Imaging System (UVP®, EUA) y las imágenes obtenidas se documentaron mediante una cámara Kodak® EDAS290.

had a total volume of 25 μL , including the following reagents: 5.2 μL of molecular biology-grade H_2O , 10 μL of dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) at a concentration of 500 μM , 2.5 μL of PCR buffer (10X), 1.5 μL of MgCl_2 (50 mM), 3.0 μL of primer (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0.3 μL of Taq DNA polymerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) and 2.5 μL of genomic DNA from samples homogenized at a concentration of 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. The mixture was subjected to an initial denaturation cycle of 8 min at 93 $^\circ\text{C}$, followed by: 40 cycles of 1 min at 93 $^\circ\text{C}$, 1 min at the recommended annealing temperature for each primer (Table 1), 1 min at 72 $^\circ\text{C}$, and a final extension cycle of 6 min at 72 $^\circ\text{C}$. The amplification was performed in a Techne[®] TC-412 model thermocycler (USA). Separation of the amplified products was done by electrophoresis on 1 % agarose gel with TAE buffer (Tris acetate [40 mM], pH 7.6, Na_2EDTA [1 mM]), stained with ethidium bromide to visualize bands in ultraviolet light on the DigiDoc-it Imaging System transilluminator (UVP[®]). The images obtained were documented with the Kodak[®] EDAS290 camera.

Statistical analysis

The number of bands, product of the amplification, was quantified by assigning the value 1 to the presence and 0 to the absence thereof; in this way, a basic data matrix (BDM) was constructed to perform the analyses. Genetic similarities were obtained with the Jaccard coefficient with $\sqrt{1-S}$ transformation and cluster analysis was performed using Ward's minimum variance method; in addition, the analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted to quantify the distribution of molecular variability within and between populations (Balzarini, Bruno, Peña, Teich, & Di Rienzo, 2010), and finally the Shannon-Weaver diversity index was calculated.

To obtain a spatial representation of the distribution of the *M. Mexicana* samples, a Principal Coordinates

Obtención de patrones ISSR-PCR

Se probaron 55 iniciadores ISSR (Sigma[®]) y se seleccionaron los 10 que produjeron el mayor número de bandas nítidas y con polimorfismo (Cuadro 1). Los segmentos de ADN se amplificaron mediante PCR. La mezcla para PCR tuvo un volumen total de 25 μL , incluyendo los reactivos siguientes: 5.2 μL de H_2O grado biología molecular, 10 μL de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) a una concentración 500 μM , 2.5 μL de amortiguador de PCR (10X), 1.5 μL de MgCl_2 (50 mM), 3.0 μL de iniciador (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0.3 μL de Taq ADN polimerasa (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y 2.5 μL de ADN genómico de las muestras homogeneizado a una concentración de 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. La mezcla se sometió a un ciclo inicial de desnaturalización de 8 min a 93 $^\circ\text{C}$; 40 ciclos de 1 min a 93 $^\circ\text{C}$, 1 min a la temperatura de alineamiento recomendada para cada iniciador (Cuadro 1), 1 min a 72 $^\circ\text{C}$; y un ciclo de extensión final de 6 min a 72 $^\circ\text{C}$. La amplificación se realizó en un termociclador marca Techne[®] modelo TC-412 (EUA). La separación de los productos amplificados se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % con amortiguador TAE (Tris acetato [40 mM], pH 7.6; Na_2EDTA [1 mM]), teñido con bromuro de etidio para visualizar las bandas en luz ultravioleta del transiluminador DigiDoc-it Imaging System (UVP[®]). Las imágenes obtenidas se documentaron con la cámara Kodak[®] EDAS290.

Análisis estadístico

El número de bandas, producto de la amplificación, se cuantificó asignándose el valor 1 a la presencia y 0 a la ausencia, de esta manera se construyó una matriz básica de datos (MBD) para realizar los análisis. Las similitudes genéticas se obtuvieron con el coeficiente de Jaccard con transformación $\sqrt{1-S}$ y el análisis de agrupamiento se realizó con el método de varianza

Table 1. ISSR primers used in two populations of *Magnolia mexicana* in the Zongolica region, Veracruz.

Cuadro 1. Iniciadores ISSR utilizados en dos poblaciones de *Magnolia mexicana* en la región de Zongolica, Veracruz.

Primer/ Iniciador	Sequence (5'-3')/ Secuencia (5'-3')	At ($^\circ\text{C}$)/ Ta ($^\circ\text{C}$)	TB/ BT	PB/ BP	P (%)
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	62	10	10	100
ISSR3	(GA) ₈ CTC	58	9	5	55.5
ISSR4	(AG) ₈ CTG	58	9	9	100
LOL9	(CAC) ₃ GC	38	10	9	90.0
MESL3	(TG) ₇ G	46	6	6	100
PI02	(CA) ₆ AGG	46	5	5	100
PI04	(CT) ₈ AGC	58	10	8	80.0
UBC840	(GA) ₈ CTT	56	5	4	80.0
UBC842	(GA) ₈ CTG	58	8	5	62.5
17898B	(CA) ₆ GT	42	9	9	100
			81	70	86.4

At: Annealing temperature, TB: total bands, PB: polymorphic bands, P: polymorphism.

Ta: Temperatura de alineamiento, BT: bandas totales, BP: bandas polimórficas, P: polimorfismo.

Analysis (PCoA) was performed along with a Shortest-Path Tree (SPT), which is a geometric representation of the results from the cluster analysis. This analysis is suggested to improve the interpretation by also considering the deformations that occurred in the projection of the principal coordinates (Balzarini et al., 2010). All analyses were done with Info-Gen® software (Balzarini & Di Rienzo, 2004).

Results and discussion

One of the objectives of the analysis with molecular markers is the classification of individuals so that homogeneous groups can be distinguished among them. For this purpose, hierarchical cluster analysis methods are used (Balzarini et al., 2010). Figure 1 shows the dendrogram obtained for the *M. mexicana* samples, which mainly reflected the geographical origin of the materials. In this figure, at a cutting height of 0.83, two groups can be clearly distinguished: group one consisting of five of the seven specimens from Zapotla, while group two was composed of five of the six specimens from Amatitla. These results show that the genetic differentiation between populations was sufficient to change the frequency of ISSR bands allowing their clear separation. However, band patterns do not necessarily reflect the variation pattern in genes controlling important agronomic or geographic suitability traits, so ISSR markers do not always discriminate genotypes based on area of adaptation.

mínima de Ward; adicionalmente se calculó el análisis de varianza molecular (AMOVA), para cuantificar la distribución de la variabilidad molecular dentro y entre poblaciones (Balzarini, Bruno, Peña, Teich, & Di Rienzo, 2010), y finalmente se calculó el índice de diversidad de Shannon-Weaver.

Para obtener una representación espacial de la distribución de las muestras de *M. mexicana* se hizo un análisis de coordenadas principales (ACoorP) junto con un árbol de mínimo recorrido (AMR), que es una representación geométrica de los resultados provenientes del análisis de agrupamiento. Este análisis se sugiere para mejorar la interpretación al permitir considerar las deformaciones ocurridas en la proyección de las coordenadas principales (Balzarini et al., 2010). Todos los análisis se hicieron con el programa Info-Gen® (Balzarini & Di Rienzo, 2004).

Resultados y discusión

Uno de los objetivos del análisis con marcadores moleculares es la clasificación de los individuos de manera que se puedan distinguir grupos homogéneos entre ellos. Para tal fin se utilizan métodos jerárquicos de análisis de conglomerados (agrupamientos o *cluster* en inglés) (Balzarini et al., 2010). La Figura 1 muestra el dendrograma obtenido para las muestras de *M. mexicana*, el cual reflejó mayoritariamente la procedencia geográfica de los materiales. En dicha figura, a una altura de corte

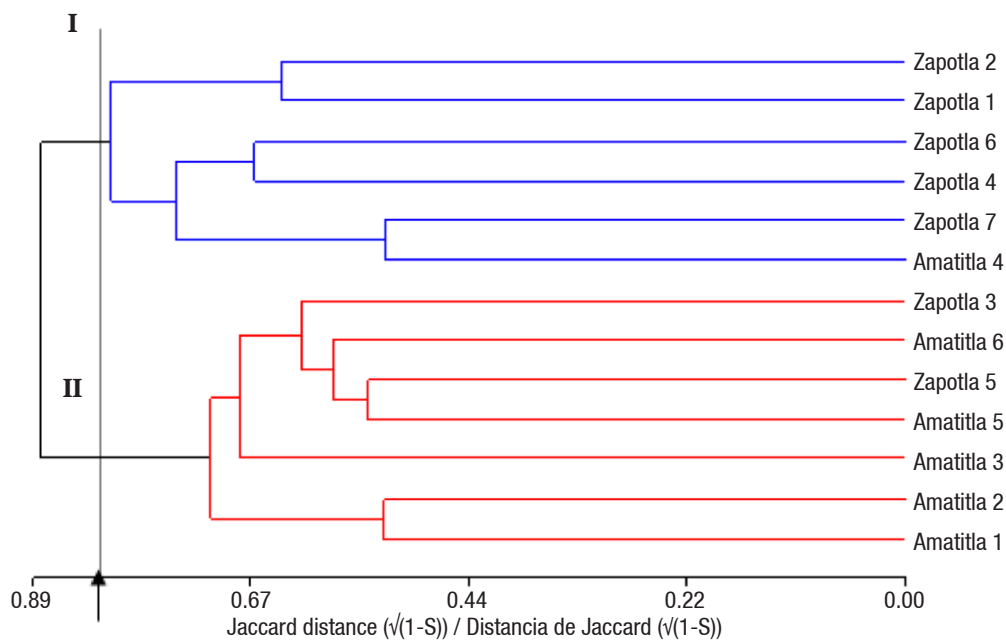


Figure 1. Dendrogram constructed by Ward's minimum variance method and Jaccard distances between samples of *Magnolia mexicana* from Zongolica, Veracruz, Mexico.

Figura 1. Dendrograma construido por el método de varianza mínima de Ward y las distancias de Jaccard entre muestras de *Magnolia mexicana* procedentes de Zongolica, Veracruz, México.

The differences between these three individuals could be due to gene flow between the two populations or due to the presence of similar evolutionary factors (Slavov et al., 2013).

The PCoA analysis, in Figure 2, shows that all elements from Amatitla can be enclosed within a circle due to their proximity, while the Zapotla specimens are located outside this group. The same tendency is observed in the SPT (Figure 2), in which the elements closest to each other, corresponding to the Amatitla trees, are connected by lines. The analyses of PCoA and SPT clusters reflected the distribution of the specimens according to the collection area (Amatitla and Zapotla), while in the dendrogram some specimens were poorly grouped.

de 0.83, se pueden distinguir claramente dos grupos: el grupo uno formado por cinco de los siete ejemplares provenientes de Zapotla, mientras que el grupo dos estuvo integrado por cinco de los seis ejemplares procedentes de Amatitla. Estos resultados muestran que la diferenciación genética entre poblaciones fue suficiente para cambiar la frecuencia de bandas ISSR permitiendo su clara separación. No obstante, los patrones de bandas no reflejan necesariamente el patrón de variación en genes que controlan caracteres de importancia agronómica o aptitud geográfica, por lo que los marcadores ISSR no siempre discriminan genotipos con base en área de adaptación. Las diferencias entre estos tres individuos pudieron originarse por flujo genético entre las dos poblaciones o bien debido a la presencia de factores evolutivos similares (Slavov et al., 2013).

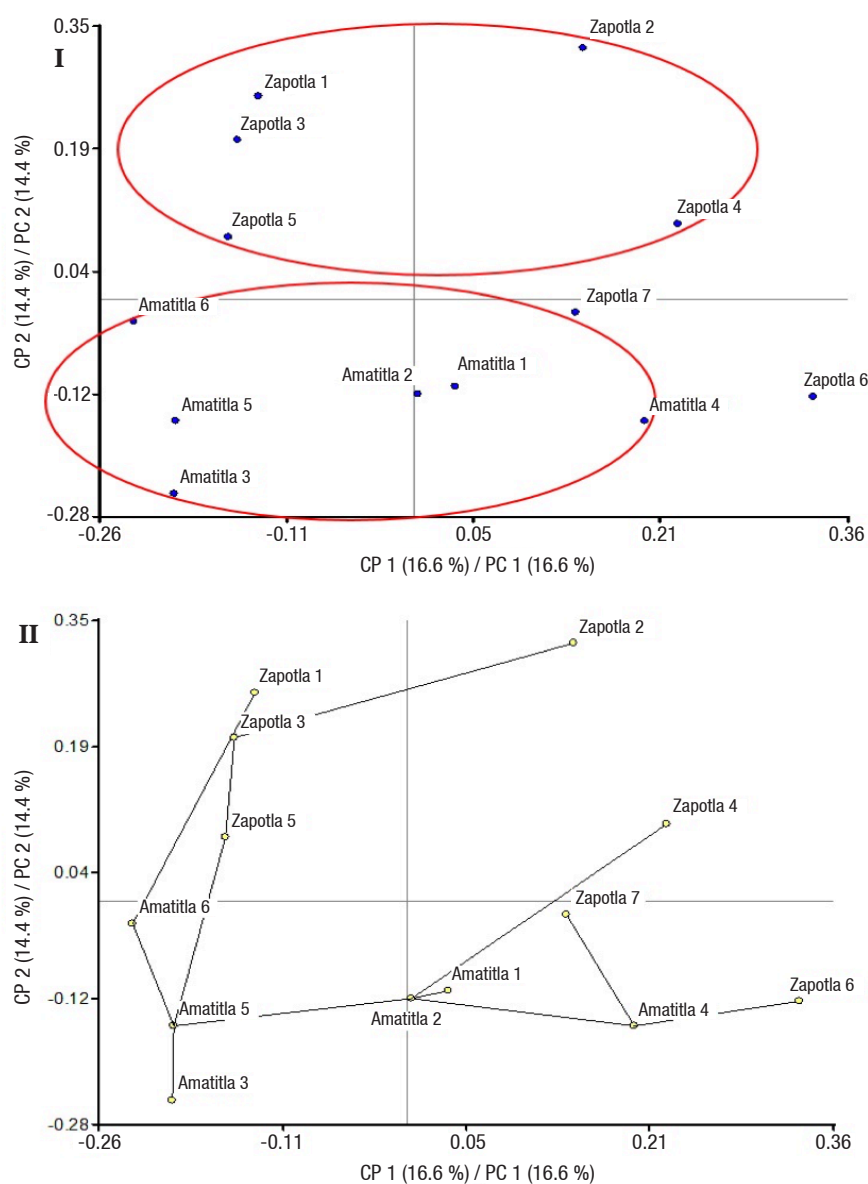


Figure 2. Principal Coordinates Analysis (I) and Shortest-Path Tree (II) of 13 samples of *Magnolia mexicana* from Zongolica, Veracruz, Mexico.

Figura 2. Análisis de Coordenadas Principales (I) y Árbol de Recorrido Mínimo (II) de 13 muestras de *Magnolia mexicana* procedentes de Zongolica, Veracruz, México.

The use of ISSR markers is a technique that allows detecting high polymorphic variation in a DNA sequence (Cornejo et al., 2014). These markers have been used successfully to distinguish the genetic variation, structure and differentiation of different tree species, among them: *Dendropanax arboreus* (L.) Decne. & Planch. in the area of Los Tuxtlas, Mexico (Figueroa-Esquivel, Puebla-Olivares, Eguiarte, & Núñez-Farfán, 2010); *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. in Brazil (Giustina et al., 2014); *Swietenia macrophylla* King in Costa Rica (Céspedes, Gutiérrez, Holbrook, & Rocha, 2003); and *S. humilis* Zucc. in Central America (White, Boshier, & Powell, 1999).

Fragmentation is a process involving the alteration of the quality and size of a habitat that leads to a loss of biodiversity at intraspecific level, which causes genetic drift and inbreeding and, therefore, reduced genetic variability (Nora et al. 2011). In the present study, the AMOVA analysis showed that 90.88 % of the genetic variation is attributable to individual differences within the two sampled populations (Table 2), so the effect of fragmentation is not evident at this level. In other studies using ISSRs, high genetic variability has been reported within populations of *Magnolia wufengensis* L. (90.9 %) (Chen, Chen, He, & Ma, 2014) and *M. officinalis* Rehder & E. H. (68.4 %) (Yu, Yang, Sun, & Liu, 2011), both studies conducted in China. Thus, the AMOVA results in the present study coincide with the general observation that woody, perennial, and exogenous species retain most of their variation within populations (Hamrick et al., 1992).

Calculating the Shannon-Weaver diversity index allows dimensioning the genetic diversity, considering a value of zero when only one allele is present in the population; as the number of alleles increases, the value also increases and thus the genetic diversity (Pla, 2006). Table 3 shows the calculated diversity indexes for the sampled *M. mexicana* populations, which were very similar (0.47 and 0.41 for Amatitla and Zapotla, respectively). Balzarini et al. (2010) consider that

El análisis AcooP, en la Figura 2, muestra que todos los elementos provenientes de Amatitla pueden ser encerrados dentro de un círculo debido a su cercanía, mientras que fuera de este grupo se localizan los ejemplares de Zapotla. La misma tendencia se observa en el AMR (Figura 2), en el cual mediante líneas se conectan los elementos más cercanos entre sí, correspondientes a los árboles de Amatitla. Los análisis de agrupamientos ACoop y AMR reflejaron la distribución de los ejemplares según la zona de colecta (Amatitla y Zapotla), mientras que en el dendrograma algunos ejemplares quedaron mal agrupados.

Los marcadores ISSR son una técnica que puede detectar una alta variación polimórfica en la secuencia de ADN (Cornejo et al., 2014). Estos marcadores se han empleado con éxito para distinguir la variación, estructura y diferenciación genética de otras especies de árboles, entre los que se encuentran *Dendropanax arboreus* (L.) Decne. & Planch. en la zona de Los Tuxtlas, México (Figueroa-Esquivel, Puebla-Olivares, Eguiarte, & Núñez-Farfán, 2010); *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. en Brasil (Giustina et al., 2014); *Swietenia macrophylla* King en Costa Rica (Céspedes, Gutiérrez, Holbrook, & Rocha, 2003); y *S. humilis* Zucc. en Centroamérica (White, Boshier, & Powell, 1999).

La fragmentación es un proceso de alteración de la calidad y extensión de un hábitat que conduce a una pérdida de biodiversidad a nivel intraespecífico, lo cual ocasiona deriva génica y endogamia y, con ello, la reducción de la variabilidad genética (Nora et al., 2011). En el presente estudio, el análisis AMOVA mostró que 90.88 % de la variación genética es atribuible a diferencias individuales dentro de las dos poblaciones muestreadas (Cuadro 2), por lo que el efecto de la fragmentación no es evidente a este nivel. En otros estudios, usando ISSR, se ha reportado alta variabilidad genética dentro de poblaciones de *Magnolia wufengensis* L. (90.9 %) (Chen, Chen, He, & Ma, 2014) y *Magnolia officinalis* Rehder & E. H. (68.4 %) (Yu, Yang, Sun, & Liu, 2011), ambos trabajos realizados

Table 2. Analysis of molecular variance (AMOVA) of two populations of *Magnolia mexicana* from Zongolica, Veracruz.

Cuadro 2. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de dos poblaciones de *Magnolia mexicana* procedentes de Zongolica, Veracruz.

Source of variation/ Fuente de variación	Sum of squares/ Suma de cuadrados	Degrees of freedom/ Grados de libertad	Mean squares/ Cuadrados medios	P-value/ P-valor	Components of variance/ Componentes de varianza	Variation (%)/ Variación (%)
Between populations/ Entre poblaciones	20.81	1	20.81	0.0300	1.27	9.12
Within a population/ Dentro de población	138.88	11	12.63	0.0175	12.63	90.88
Total	159.69	12	13.31		13.89	100.00

Table 3. Shannon-Weaver diversity index in two populations of *Magnolia mexicana* from Zongolica, Veracruz.
Cuadro 3. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en dos poblaciones de *Magnolia mexicana* procedentes de Zongolica, Veracruz.

Group/Grupo	n	I	L _L /L _I	U _L /L _S	I _{Boot}	SE _{Boot} /EE _{Boot}
Amatitla	6	0.47	0.39	0.41	0.40	0.03
Zapotla	7	0.41	0.40	0.41	0.40	0.03
Total	2	0.42	0.41	0.42	0.42	0.03

n: number of samples, I: Shannon-Weaver diversity index, L_L: lower limit, U_L: upper limit, I_{boot}: 500 bootstrap cycles with a 95 % confidence interval, SE_{boot}: bootstrap standard error.

n: número de muestras, I: índice de diversidad de Shannon-Weaver, L_L: límite inferior, L_S: límite superior, I_{boot}: 500 ciclos de remuestreo (*bootstrap*) con intervalo de confianza de 95 %, EE_{boot}: error estándar del remuestreo.

samples from two populations will always have a value greater than the mean of their diversities determined separately, except if both populations are identical in composition. In this study, the mean value of the diversity index was 0.44, while the total diversity was 0.42, indicating that the sampled populations have equal genetic diversity. The values of the Shannon-Weaver index were similar to those estimated in other species of the genus *Magnolia*. Yu et al. (2011) reported a diversity value of 0.41 in populations of *M. officinalis* (Rehder & E. H. Wilson) sampled in China, whereas Newton et al. (2008) determined an index of 0.56 in collections of *M. sharpii* Miranda and 0.50 in *M. schiedeana* Schltdl., in Mexico.

The degree of genetic differentiation usually increases when the distance between populations increases (Pusadee, Jamjod, Chiang, Rerkasem, & Schaal, 2009). However, Yu et al. (2011) assert that other factors have contributed to maximizing the genetic variability of *M. officinalis*, such as those related to its ornamental characteristics, human intrusion due to displacement by settlers and birds attracted by the high visibility of the species' red seeds. In *M. mexicana* it has been found that beetles of the genus *Cyclocephala* act as pollinating and dispersing agents in the Zongolica area (Mora-Aguilar & Delgado, 2012). Some studies have shown that pollen immigration rates can be high in fragmented populations, especially if pollination is entomophilic, estimating distances from 21 m in *Centaurea corymbosa* Pourr. (Hardy et al., 2004) to 88.6 km in *Ficus sycomorus* L. (Ahmed, Compton, Butlin, & Gilmartin, 2009).

On the other hand, it should be noted that high tropical evergreen and tropical montane cloud forests in areas of Veracruz, such as Zongolica and Los Tuxtlas, have relics of conserved areas (Sandoval et al., 2007). The results obtained in the present study suggest that the reduced habitat and decreased populations of *M. mexicana* have not yet reduced the genetic variability of the natural populations in an important way. However, it is necessary to carry out studies in other populations of *M. mexicana* considering a greater number of localities, to have a more accurate estimate of the

en China. Por tanto, los resultados del AMOVA en el presente estudio coinciden con la observación general de que las especies leñosas, perennes y exógenas mantienen la mayor parte de su variación dentro de las poblaciones (Hamrick et al., 1992).

El cálculo del índice de diversidad de Shannon-Weaver permite dimensionar la diversidad genética, considerando un valor de cero cuando solo se presenta un alelo en la población; conforme aumenta el número de alelos, el valor también incrementa y con ello la diversidad genética (Pla, 2006). En el Cuadro 3 se presentan los índices de diversidad calculados para las poblaciones de *M. mexicana* muestreadas, los cuales fueron muy similares (0.47 y 0.41 para Amatitla y Zapotla, respectivamente). Balzarini et al. (2010) consideran que las muestras de dos poblaciones siempre tendrán un valor mayor que la media de sus diversidades determinada por separado, excepto si ambas poblaciones son idénticas en su composición. En este trabajo, el valor medio del índice de diversidad fue 0.44, mientras que la diversidad total fue 0.42, lo que indica que las poblaciones muestreadas presentan igual diversidad genética. Los valores del índice de Shannon-Weaver fueron similares a los estimados en otras especies del género *Magnolia*. Yu et al. (2011) reportaron un valor de diversidad de 0.41 en poblaciones de *M. officinalis* (Rehder & E. H. Wilson) muestreadas en China, mientras que Newton et al. (2008) determinaron un índice de 0.56 en colectas de *M. sharpii* Miranda y 0.50 en *M. schiedeana* Schltdl., en México.

El grado de diferenciación genética aumenta, generalmente, cuando la distancia entre poblaciones incrementa (Pusadee, Jamjod, Chiang, Rerkasem, & Schaal, 2009). No obstante, Yu et al. (2011) consideran que otros factores han contribuido a maximizar la variabilidad genética de *M. officinalis*, como los relacionados con sus características ornamentales, la intromisión humana debida al desplazamiento por pobladores y las aves atraídas por la alta visibilidad de las semillas rojas de la especie. En *M. mexicana* se ha encontrado que los escarabajos del género *Cyclocephala* actúan como agentes polinizadores y dispersadores

changes in the genetic structure and variation of the species in the state of Veracruz, in particular, and of Mexico, in general.

Conclusions

The results of this study suggest that the *Magnolia mexicana* populations have not undergone changes that modify their genetic structure, so there is no evidence, at genetic level, of alterations caused by the population reduction or habitat fragmentation. The levels of genetic diversity of *M. mexicana* in the studied populations are similar to those reported in other species of the family Magnoliaceae, as well as in other trees in tropical montane cloud forests. ISSR molecular markers proved their usefulness in evaluating the genetic variability present in arboreal species such as *M. mexicana*.

Acknowledgments

The authors are grateful for the invaluable technical support of María Elisa Alvarado Cano and Ricardo Gaspar Hernández from the Assisted Genetic Improvement Laboratory of the Plant Science Department at Chapingo Autonomous University, and the unconditional support of Antonio Vázquez Lemus from the UMA-Yoloxochitl in Zongolica, Veracruz.

End of English version

References / Referencias

- Aga, E., Bekele, E., & Bryngelsson, T. (2005). Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in coffee forest trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica*, 124, 213–221. doi: 10.1007/s10709-005-1484-6
- Ahmed, S., Compton, S. G., Butlin, R. K., & Gilmartin, P. M. (2009). Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20342–20347. doi: 10.1073/pnas.0902213106
- Balzarini, M., & Di Rienzo, J. (2004). Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Argentina: Facultad de Ciencia Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- Balzarini, M., Bruno, C., Peña, A., Teich, I., & Di Rienzo, J. (2010). *Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en Info-Gen*. Córdoba, Argentina: Encuentro Grupo Editor.
- Céspedes, M., Gutiérrez, M. V., Holbrook, N. M., & Rocha, J. (2003). Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. *Molecular Ecology*, 12(12), 3201–3212. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01986.x

en la zona de Zongolica (Mora-Aguilar & Delgado, 2012). Algunos estudios demuestran que las tasas de polen inmigrante pueden ser elevadas en poblaciones fragmentadas, en especial si la polinización es entomófila, estimándose distancias de 21 m en *Centaurea corymbosa* Pourr. (Hardy et al., 2004) hasta 88.6 km en *Ficus sycomorus* L. (Ahmed, Compton, Butlin, & Gilmartin, 2009).

Por otro lado, cabe destacar que las selvas altas perennifolias y los bosques mesófilos de montaña de zonas de Veracruz, como Zongolica y Los Tuxtlas, tienen relictos de áreas conservadas (Sandoval et al., 2007). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la reducción del hábitat y disminución de las poblaciones de *M. mexicana* aún no han reducido la variabilidad genética de las poblaciones naturales de manera importante. Sin embargo, es necesario realizar estudios en otras poblaciones de *M. mexicana* considerando un mayor número de localidades, para tener una estimación más precisa de los cambios en la estructura y variación genética de la especie en el estado de Veracruz, en particular, y de México, en general.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio sugieren que las poblaciones de *Magnolia mexicana* no han sufrido cambios que modifiquen su estructura genética, por lo que no hay evidencia, a nivel genético, de alteraciones ocasionadas por la reducción de poblaciones o fragmentación del hábitat. Los niveles de diversidad genética de *M. mexicana* en las poblaciones estudiadas son semejantes a los reportados en otras especies de la familia Magnoliaceae, así como en otros árboles en bosques mesófilos de montaña. Los marcadores moleculares tipo ISSR demostraron su utilidad para evaluar la variabilidad genética presente en especies arbóreas como *M. mexicana*.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo técnico invaluable de María Elisa Alvarado Cano y Ricardo Gaspar Hernández del Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, y el apoyo incondicional del Ing. Antonio Vázquez Lemus de la UMA-Yoloxochitl en Zongolica, Veracruz.

Fin de la versión en español

- Chen, L., Chen, F., He, S., & Ma, L. (2014). High genetic diversity and small genetic variation among populations of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.08.003
- Cicuzza, D., Newton, A., & Oldfield, S. (2007). *Red list of the Magnoliaceae*. Cambridge, UK: Fauna & Flora International. doi: 10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T193900A2290093.en
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2010). *El bosque mesófilo de montaña en México: amenazas y oportunidades para su conservación y manejo sostenible*. México: Autor.
- Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A., & Rocha, M. M. G. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México: INECC/SEMARNAT. Retrieved from http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/?id_pub=710
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19–21. doi: 10.1007/BF02712670
- Endress, P. K., & Doyle, J. A. (2009). Reconstructing the ancestral angiosperm flower and its initial specializations. *American Journal of Botany*, 96(1), 22–66. doi: 10.3732/ajb.0800047
- Figueroa-Esquivel, E. M., Puebla-Olivares, F., Eguiarte, L. E., & Núñez-Farfán, J. (2010). Genetic structure of a bird-dispersed tropical tree (*Dendropanax arboreus*) in a fragmented landscape in Mexico. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42518439019>
- Giustina, L. D., Luz, L. N., Vieira, F. S., Rossi, F. S., Soares-Lopes, C. R. A., Pereira, T. N. S., & Rossi, A. A. B. (2014). Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). *Genetics and Molecular Research: GMR*, 13(2), 3510–3519. doi: 10.4238/2014.February.14.5
- Godwin, I. D., Aitken, E. A. B., & Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18(9), 1524–1528. doi: 10.1002/elps.1150180906
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6(1–4), 95–124. doi: 10.1007/BF00120641
- Hardy, O. J., González-Martínez, S. C., Colas, B., Fréville, H., Mignot, A., & Olivieri, I. (2004). Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. *Genetics*, 168(3), 1601–1614. doi: 10.1534/genetics.104.027714
- Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 235–248. doi: 10.2135/cropsci2003.1235
- Mora-Aguilar, E. F., & Delgado, L. (2012). A new species of *Cyclocephala* Dejean (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae: Cyclocephalini) from the cloud forests of Southeastern Mexico and description of the female of *Cyclocephala berti* Delgado. *The Coleopterists Bulletin*, 66(2), 139–142. doi: 10.1649/072.066.0209
- Newton, A., Gow, J., Robertson, A., Williams, L. A., Ramírez, M. N., González, E. M., & Ennos, R. (2008). Genetic variation in two rare endemic Mexican trees, *Magnolia sharpii* and *Magnolia schiedeana*. *Silvae Genetica*, 57(6), 348–356. Retrieved from https://www.thuenen.de/media/institute/fg/PDF/Silvae_Genetica/2008/Vol_57_Heft_6/57_6_348.pdf
- Nora, S., Albaladejo, R. G., González-Martínez, S. C., Robledo-Arnuncio, J. J., & Aparicio, A. (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Revista Ecosistemas*, 20(2-3), 35–45. Retrieved from <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/21/15>
- Palacios, E. (2006). Cuarenta y ocho especies de la flora de Chiapas incluidas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000. Retrieved from http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/W008_Fichas%20de%20especies.pdf
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583–590. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33911906>
- Pusadee, T., Jamjod, S., Chiang, Y. -C., Rerkasem, B., & Schaal, B. A. (2009). Genetic structure and isolation by distance in a landrace of Thai rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13880–13885. doi: 10.1073/pnas.0906720106
- Sandoval, M. J. B., Ramírez, S. A. F., Shesheña, H. I. M., Sormani, C., Ruiz de la Merced, F., Jarvio, A. D., & Farid, M. E. (2007). *Evaluación del estado de conservación de los ecosistemas forestales de la región denominada Uxpanapa*. Veracruz, México: Dirección General de Desarrollo Forestal, Gobierno del Estado de Veracruz - Pronatura A. C.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental- Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Retrieved from http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- Slavov, G., Robson, P., Jensen, E., Hodgson, E., Farrar, K., Allison, G., ...Donnison, I. (2013). Contrasting geographic patterns of genetic variation for molecular markers vs. phenotypic traits in the energy grass *Miscanthus sinensis*. *GCB Bioenergy*, 5, 562–571. doi: 10.1111/gcbb.12025
- White, G. M., Boshier, D. H., & Powell, W. (1999). Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology*, 8(11), 1899–1909. doi: 10.1046/j.1365-294x.1999.00790.x
- Xiao, L. Q., Ge, X. J., Gong, X., Hao, G., & Zheng, S. X. (2004). ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany*, 94(1), 133–138. doi: 10.1093/aob/mch119
- Yu, H. H., Yang, Z. L., Sun, B., & Liu, R. (2011). Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2), 71–78. doi: 10.1016/j.bse.2010.12.003