

Perfiles electroforéticos de las proteínas de semilla de pinos como caracteres taxonómicos

Pine seed protein electrophoretic profiles as taxonomic characters

Norma Almaraz Abarca*, José Antonio Ávila Reyes*, Néstor Naranjo Jiménez*,
Jesús Herrera Corral*, Martha Celina González Güereca*

RESUMEN

Las proteínas de semilla o de reserva son sustancias que juegan un papel importante durante la germinación. Su composición es muy conservada dentro de un grupo taxonómico de plantas, por lo que la determinación de los patrones electroforéticos de estas proteínas son útiles en estudios agronómicos, fisiológicos, taxonómicos, moleculares y en estudios de fitopatología. En este trabajo se realizó la caracterización electroforética, en geles de acrilamida, de las proteínas de semilla de cinco especies de pinos del Estado de Durango (*Pinus cembroides*, *P. ayacahuite*, *P. durangensis*, *P. engelmannii* y *P. cooperi*) y uno de Zacatecas (*P. maximartinezii*), México, para determinar su utilidad como caracteres bioquímicos en taxonomía. Los resultados obtenidos permiten sugerir la validez de los perfiles electroforéticos de proteínas de reserva como marcadores taxonómicos a nivel subgenérico y específico, ya que los perfiles de las tres especies del subgénero *Strobus* (*P. maximartinezii*, *P. cembroides* y *P. ayacahuite*) presentan perfiles semejantes entre sí pero claramente diferentes a los perfiles de las tres especies del subgénero *Pinus* (*P. durangensis*, *P. engelmannii* y *P. cooperi*). A su vez, los perfiles de cada una de las seis especies son especie-específicos sin presentar variabilidad intrapoblacional.

Palabras clave: Proteínas de semilla, taxonomía de *Pinus*, proteínas de reserva.

ABSTRACT

Seed proteins play a very important role in germination. Seeds from a single taxon have a highly stable composition of storage protein. This stability is useful in agronomic, ecological, physiological, taxonomic, molecular and phytopathological studies. This paper describes the electrophoretic characterisation in acrylamide gels of seed protein from five pine species (*Pinus cembroides*, *P. ayacahuite*, *P. durangensis*, *P. engelmannii*, *P. cooperi* and *P. maximartinezii*) from México to determine the importance of their protein profile as biochemical markers in taxonomy. The results suggest that pine reserve protein electrophoretic profiles have chemical attributes having taxonomic importance at subgenus and species level.

Key words: Seed proteins, *Pinus* taxonomy, reserve proteins.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas que se sintetizan y acumulan durante el desarrollo de las semillas se llaman proteínas de almacenamiento o de reserva. Estas proteínas alcanzan su máxima concentración cuando las semillas maduran. Durante la germinación y durante el crecimiento de las plántulas,

las proteínas de reserva se movilizan y degradan, de esta manera constituyen una fuente de suministro de aminoácidos libres, los cuales son necesarios para la construcción de nuevas y diferentes proteínas,

* Laboratorio de Biotecnología, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango (CIIDIR-IPN-Dgo.), México. Becarios de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA). e-mail: noralab@yahoo.com

Recibido: mayo 10 de 2002; aceptado: octubre 31 de 2002

Las semillas de las plantas contienen una amplia variedad de tipos diferentes de proteínas. De acuerdo a su solubilidad, se clasifican en albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas, solubles en agua, soluciones salinas, soluciones ácidas o básicas y soluciones alcohólicas, respectivamente (Misra, 1995).

Se considera que las proteínas de reserva de las semillas de las plantas no son afectadas por variaciones ambientales y que son altamente específicas. Por tales razones, la variabilidad encontrada en sus patrones electroforéticos ha sido de gran utilidad en diferentes disciplinas. Se han utilizado como marcadores genéticos para estudiar sistemas de cruzamiento e identificar híbridos, para estudiar estructuras poblacionales, flujos génicos y ploidias (Rogl y Javornik, 1996; Bult y Kiang, 1993), y también como marcadores taxonómicos en estudios de sistemática (Badr, 1995; Sánchez-Yelamo y col., 1995).

El análisis electroforético es una herramienta poderosa para separar y aislar proteínas y los perfiles o patrones electroforéticos así obtenidos permiten detectar variabilidad en cuanto a tipos y concentraciones de proteínas en muestras de diferente origen.

La relación directa que existe entre la estructura primaria de una proteína y su secuencia codificante en el genoma de un organismo (relación no encontrada en caracteres químicos ni morfológicos) es el principal interés para emplear a estas moléculas con fines taxonómicos.

Con interés taxonómico, las proteínas pueden analizarse de manera individual o como un todo o perfil de un tejido dado. Cuando se consideran proteínas individuales, la principal información se obtiene comparando la secuencia de aminoácidos. Cuando se compara un perfil completo de proteínas presente en un extracto de tejido específico, cada banda en un electroferograma se puede considerar como un carácter presente o ausente.

Estudios electroforéticos de proteínas en el género *Pinus* han estado principalmente enfocados al análisis de la correlación entre una proteína determinada y la resistencia a enfermedades fúngicas como un método de seleccionar pinos resistentes (Ekramoddoullah, 1993) y a la correlación entre la presencia de proteínas específicas y la resistencia al congelamiento (Ekramoddoullah y Davidson, 1995).

México, principal centro mundial de diversidad del género *Pinus*, con más de la mitad de las aproximadamente 110 especies reconocidas (Shaw, 1909; Shaw, 1914; Mirov, 1967; Perry, 1991; Styles, 1993), es una región donde coexisten especies de pinos que representan paleoendemismo y al mismo tiempo especies consideradas de reciente evolución y especiación (Pérez de la Rosa, 1991). La gran variedad de climas y microclimas que se encuentran en las grandes cadenas montañosas de México contribuye a que en esas zonas se presente una gran diversidad de especies de pinos y que se manifiesten los extremos así como los grados intermedios de las expresiones de diferentes caracteres morfológicos, lo cual ha hecho difícil la ubicación y la delimitación de algunas taxa del género *Pinus*.

Una falta de consenso ha caracterizado la clasificación del género *Pinus* a niveles taxonómicos inferiores. Esta problemática ha sido el estímulo para buscar nuevos caracteres además de los morfológicos, que puedan ser útiles en la delimitación de especies (Almaraz, 2000) y en la ubicación de éstas dentro de un sistema filogenético.

Dentro del marco anteriormente presentado y dado que los perfiles electroforéticos de proteínas de semilla han probado tener una tendencia especie-específica en muchos grupos de plantas (Carerras y col., 1997; Badr, 1995), éste trabajo se estructuró con el objetivo de determinar la validez de los patrones electroforéticos de proteínas de semilla de individuos de diferentes especies de pinos de los Estado de Durango (*Pinus cembroides* Zuccarini, *P. ayacahuite* K. Ehrenb. Ex Schlecht, *P. durangensis* Martínez, *P. engelmannii* Carr. y *P. cooperi* C. E. Blanco) y de Zacatecas (*P. maximartinezii* Rzedowsky), México, como caracteres bioquímicos taxonómicos útiles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El estudio se realizó con ejemplares colectados en la Sierra Madre Occidental, en el Estado de Durango, México y en la Sierra de Juchipila, Zacatecas, México. Se llevaron a cabo siete colectas de conos y/o semillas de un total de 70 individuos, 10 individuos por población y por especie (excepto para *P. engelmannii*, de la cual se muestrearon 20 individuos)

Tabla 1. Descripción de los sitios de muestreo.

Muestra	Latitud/Longitud	Altitud (m)	Localidad	Fecha
<i>P. engelmannii</i>	23° 34' 36"/104° 05' 36"	2050	Súchil, Dgo.	Noviembre/98
<i>P. cooperi</i>	23° 23' 17"/104° 13' 57"	2050	La Michilía, Dgo.	Noviembre/98
<i>P. cembroides</i>	23° 34' 36"/104° 05' 36"	2050	La Michilía, Dgo.	Noviembre/98
<i>P. ayacahuite</i>	23° 25' 02"/104° 20' 42"	2300	El Mezquital, Dgo.	Enero/99
<i>P. engelmannii</i>	23° 25' 02"/104° 20' 42"	2300	El Mezquital, Dgo.	Enero/99
<i>P. durangensis</i>	23° 37' 23"/105° 50' 12"	2090	El Palmito, Dgo.	Noviembre/99
<i>P. maximartinezii</i>	nr	nr	Juchipila, Zac.	Noviembre/99

nr: no registrado

de las siguientes especies de pinos: *P. maximartinezii*, *P. ayacahuite*, *P. cembroides*, *P. engelmannii*, *P. cooperi* y *P. durangensis*, las cuales presentaron semillas maduras en las diferentes fechas de colecta realizadas. De cada muestra se colectó un ejemplar de referencia ("Voucher"). Estos ejemplares se depositaron en el Herbario CIIDIR. La descripción de los sitios de muestreo se presenta en la tabla 1.

Los perfiles de proteínas de semilla se interpretaron considerando las identificaciones del material realizadas previamente con base en caracteres morfológicos.

Preparación de las muestras colectadas

Las semillas se separaron y remarcaron por especie. Se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Extracción de proteínas de semilla

Las semillas se desgrasaron con hexano a temperatura ambiente durante 12 hrs. Se extractaron proteínas totales de acuerdo el método propuesto por Feirer (1995). Los tejidos vegetales se homogeneizaron en un regulador (buffer) conteniendo ácido N-(2-hidroxietilpiperazina-N')-2-etanosulfónico (HEPES) a una concentración de 50 mM, pH 7.5 y fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) a 1 mM. Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 rpm, durante 5 minutos a 5°C y el sobrenadante fue descartado. Las pastillas (pellets) se reextractaron dos veces más con el regulador de HEPES. Las pastillas se resuspendieron en un regulador conteniendo urea 6 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) y mercaptoetanol 2.5%; se centrifugaron

bajo las mismas condiciones descritas y se recuperaron los sobrenadantes. Las proteínas de los sobrenadantes se precipitaron con acetona al 80%, incubando en hielo durante una hora. Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación a 10 000 rpm, durante 10 minutos a 5°C y se disolvieron en el regulador de urea.

Caracterización electroforética de proteínas

Los reguladores, las cámaras y los geles de poli-acrilamida para los corrimientos electroforéticos de las muestras de proteínas se prepararon de acuerdo a lo propuesto por Rogl y Javornic (1996).

Se realizaron electroforesis en geles de poli-acrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en sistemas discontinuos. La concentración de acrilamida del gel concentrador fue de 7%. La concentración de acrilamida del gel separador fue del 10%. El volumen de muestra utilizado fue de 35 microlitros/pocillo. El voltaje aplicado fue de 50 V, de manera constante.

Después del corrimiento electroforético, los geles se tiñeron durante 2 hrs. en la solución de tinción, la cual contenía metanol al 50%, ácido acético al 7% en agua y azul de Coomassie al 0.1%.

La destinción de los geles se realizó utilizando la misma solución pero sin la presencia del colorante.

A partir de los electroferogramas se obtuvieron los patrones electroforéticos de las proteínas de semilla por especie de pino.

Análisis fenético de los resultados

Para cada banda se registró el valor de su movilidad relativa (Rf) y se calculó, con base en este valor y los correspondientes a las proteínas utilizadas como marcadores estándares (high molecular weight standard mixture, Sigma SDS-6H), su peso molecular. Para esto se obtuvo una curva patrón, graficando en el eje de las abscisas los pesos moleculares de las proteínas marcadoras de peso molecular y en el de las ordenadas los valores correspondientes de sus Rf. Con los valores de Rf de cada banda de proteína calculado directamente de los electroferogramas fue posible estimar, por medio de interpolaciones, el peso molecular de cada una de esas bandas, previo análisis de regresión para obtener una línea recta de la curva patrón.

Cada banda de proteína se trató como un carácter cualitativo y se construyó una matriz de datos basada en la presencia o ausencia de las bandas de las diferentes proteínas.

La matriz de datos anterior sirvió de base para el análisis fenético de Cluster, usando el programa de cómputo NTSyS-pc versión 1.8 (Rohlf, 1993). Las relaciones taxonómicas se interpretaron a partir del fenograma obtenido.

RESULTADOS

Bajo las condiciones electroforéticas utilizadas, se obtuvo lo siguiente: un perfil de 10 bandas para las semillas de *Pinus engelmannii*, 13 para *Pinus cooperi*, 13 para *Pinus cembroides*, 11 para *Pinus ayacahuite*, 11 para *Pinus durangensis* y 12 para *Pinus maximartinezii*. Un total de 19 bandas diferentes. Los perfiles electroforéticos de cada especie y los pesos moleculares de cada proteína, estimados con base en sus Rf y los Rf de las proteínas marcadoras estándares, se muestran en la tabla 2.

El resultado del análisis fenético de Cluster, basado en la matriz de datos de la tabla 2, se muestra en la figura 1.

Tabla 2. Perfiles electroforéticos de las proteínas de semilla de las seis especies de pinos analizadas.

Banda	Proteína (PM)	<i>Pinus maximartinezii</i>	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Pinus ayacahuite</i>	<i>Pinus durangensis</i>	<i>Pinus engelmannii</i>	<i>Pinus cooperi</i>
1	145088	+	+	+	+	+	+
2	135241	+	+	+	+	+	+
3	127278	+	+	+	+	+	+
4	116960	+	+	+	+	+	+
5	111621	-	-	-	+	-	-
6	101174	+	+	+	+	+	+
7	96337	+	+	+	-	-	-
8	90029	+	+	+	+	+	+
9	85890	-	-	-	-	-	+
10	80443	-	-	-	-	-	+
11	75346	-	+	-	-	-	-
12	66767	+	+	+	+	+	+
13	63921	+	+	+	-	-	-
14	34333	-	-	-	+	+	+
15	12090	+	-	-	-	-	-
16	8500	-	-	-	-	-	+
17	7707	-	+	-	-	-	-
18	4504	+	+	+	+	+	+
19	2152	+	+	+	+	+	+

+ : presencia - : ausencia

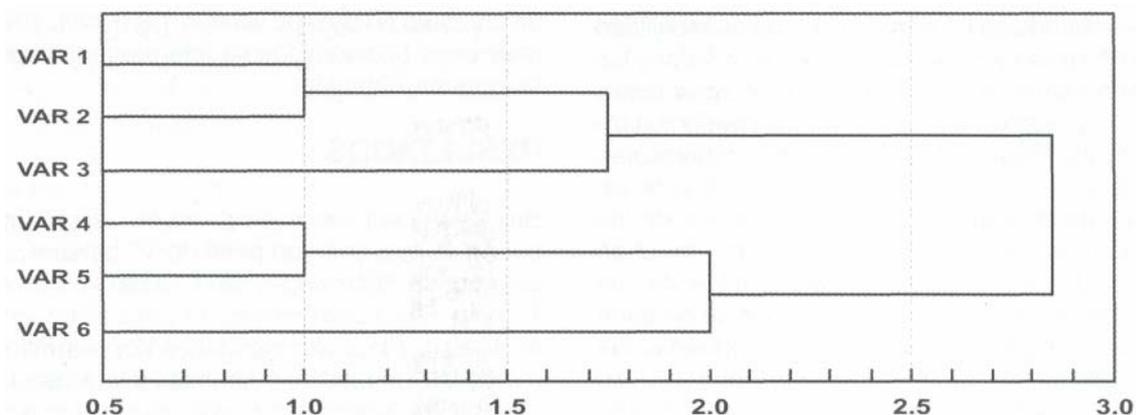


Figura 1. Análisis fenético de Cluster. VAR 1: *Pinus maximartinezii*, VAR 2: *Pinus ayacahuite*, VAR 3: *Pinus cembroides*, VAR 4: *Pinus durangensis*, VAR 5: *Pinus engelmannii*, VAR 6: *Pinus cooperi*.

DISCUSIÓN

Del análisis electroforético de las proteínas de semilla de las seis especies de pino analizadas se puede apreciar que existe una gama amplia de proteínas, cuyo peso molecular varía desde 2152 a 145 088. Esta gama tan diversa podría estar asociada a la gran diversidad de funciones metabólicas que ocurren en la semillas durante su germinación.

El análisis de las proteínas de semilla usando SDS-PAGE reveló que las semillas de las especies analizadas de pinos son relativamente ricas en composición de proteínas de almacenamiento (un total de 19). Esta riqueza proporciona criterios adicionales para la clasificación de las especies de este género.

En la tabla 2 se puede observar que los perfiles de proteínas de semilla son más parecidos entre *P. engelmannii*, *P. cooperi* y *P. durangensis* que entre cualquiera de los correspondientes a estas especies y los de *P. cembroides*, *P. ayacahuite* y *P. maximartinezii*. Este hecho concuerda con el agrupamiento de las tres primeras especies dentro del subgénero *Diploxylon* o *Pinus* (Price y col., 1998) y de las tres últimas en el subgénero *Haploxylon* o *Strobis* (Price y col., 1998).

Todas las muestras tuvieron en común nueve bandas (tabla 2), las cuales son la 1,2,3,4,6,8,12,18 y 19 (las bandas se numeraron desde 1 a 19 desde el extremo superior al inferior de los electroferogramas).

Las bandas 7 y 13 fueron únicas a las especies *Pinus maximartinezii*, *Pinus cembroides* y *Pinus ayacahuite*. La banda 14 lo fue sólo a las especies *Pinus durangensis*, *Pinus engelmannii* y *Pinus cooperi*. La banda 5 estuvo presente únicamente en *Pinus durangensis*. Las bandas 9, 10 y 16, únicamente en *Pinus cooperi*. Las 11 y 17, en *Pinus cembroides* y la 15 en *Pinus maximartinezii*.

Para evaluar la variabilidad intrapoblacional con relación a los perfiles electroforéticos de proteínas de semilla, se realizaron extracciones de proteínas de diez semillas de manera individual elegidas al azar, para cada una de las seis especies de pinos que se trabajaron. Los electroferogramas correspondientes indicaron que no existe variabilidad a nivel intrapoblacional ya que los 10 perfiles correspondientes a una especie fueron idénticos entre sí, correspondiendo, en cada caso, a lo presentado en la tabla 2. Esta característica de uniformidad en los perfiles es común a otro tipo de caracteres químicos de los pinos, los flavonoides agliconas de acículas (Almaraz, 2000).

Esta uniformidad en los perfiles electroforéticos de proteínas de semilla a nivel específico encontrada en nuestros resultados concuerdan con lo manifestado por otros autores con relación a que dichos perfiles son caracteres taxonómicos útiles (Badr, 1995; Sánchez-Yelamo y col., 1995).

Las diferencias en los perfiles de proteínas entre estos representantes de los dos subgéneros del género *Pinus* consisten tanto en número de bandas proteicas como en tipo de proteínas (partiendo de la suposición de que las bandas con un Rf diferente corresponden a proteínas diferentes), como ha sido reportado en otras especies (Sánchez-Yelamo y col., 1995; Badr, 1995).

El análisis fenético (figura 1) muestra una separación clara entre las especies del subgénero *Pinus* (*P. durangensis*, *P. engelmannii* y *P. cooperi*) y las especies del subgénero *Strobilus* (*P. maximartinezii*, *P. cembroides* y *P. ayacahuite*), lo cual concuerda con lo reconocido con base en caracteres morfológicos por Mirov (1967) y muchos otros autores, entre ellos Farjon y Styles (1997) y Pricey col. (1998).

En el fenograma obtenido (figura 1), se observa una relación más cercana entre *P. maximartinezii* y *P. cembroides* que cualquiera de estas dos con *P. ayacahuite*. Esto concuerda con los sistemas actuales de clasificación del género, los cuales agrupan a las dos primeras especies en una misma sección y a la última en una sección diferente (Farjon y Styles, 1997; Pricey col., 1998).

Por otro lado, en el mismo fenograma (figura 1) se aprecia una mayor cercanía entre *P. durangensis* y *P. engelmannii* que entre cualquiera de ellas y *P. cooperi*.

Los resultados de este trabajo permiten considerar que los perfiles electroforéticos de semilla de las especies de pinos trabajadas son especie-específicos y por lo tanto pueden ser útiles como caracteres taxonómicos. El perfil electroforético de proteínas de almacenamiento de las especies de pino estudiadas, a diferencia de algunos caracteres morfológicos, no reveló formas intermedias entre ellas, como se ha encontrado con relación a algunos caracteres morfológicos (McVaugh, 1992), una proteína está o no presente y cada una de las seis especies de pino expresa un perfil que es único a ella.

Semillas de *P. engelmannii* colectadas en diferentes localidades (en Súchil, Dgo. y en El Mezquita!, Dgo.) no mostraron perfiles electroforéticos diferentes indicando que esos caracteres bioquímicos no muestran una variabilidad geográfico-poblacional, es decir, no mostraron una variabilidad que pueda asociarse a diferencias en las condiciones ambientales.

CONCLUSIONES

Los perfiles electroforéticos de las proteínas de almacenamiento de *P. maximartinezii*, *P. cembroides*, *P. ayacahuite*, *P. durangensis*, *P. engelmannii* y *P. cooperi* se pueden considerar como caracteres químicos con validez taxonómica a nivel subgenérico y específico, dado que son tan estables dentro de los elementos de cada subgénero y dentro de cada especie que se pueden reconocer perfiles tipo para cada una de ellas.

Existe diferencia significativa entre los perfiles de proteínas de almacenamiento de las especies de pino analizadas, ya que cada una de ellas presenta un perfil característico, de tal manera que en el análisis fenético (Cluster) cada una se identifica como una especie independiente.

La uniformidad de los perfiles de proteínas de almacenamiento entre todos los individuos de una misma población de una misma especie indica que esos perfiles son caracteres muy estables y genéticamente determinados, valiosos para determinar variabilidad a nivel subgenérico y específico, pero de poco valor para estimar variabilidad intrapoblacional.

El perfil electroforético de proteínas de almacenamiento de *Pinus engelmannii* no muestra variabilidad geográfico-poblacional, lo que sugiere una estabilidad a este nivel y confirma la validez de este tipo de caracteres como marcadores taxonómicos.

Los perfiles electroforéticos de proteínas de semilla son caracteres bioquímicos más accesibles para manejar con fines taxonómicos que los de isoenzimas, por la facilidad de su interpretación y los menores requerimientos en los procesos de extracción y de corrimiento electroforético.

Los resultados de este trabajo sugieren que los estudios bioquímicos y la creación de base de datos de los perfiles electroforéticos de proteínas de semilla de las especies mexicanas de pinos, constituyen una alternativa útil para abordar el problema de las controversias taxonómicas que existen en muchos de los taxa de este género.

BIBLIOGRAFÍA

- Almaraz, A. N. 2000. Estudio quimiotaixonómico de *Pinus* sección *Leiophyllae* (Pinaceae). Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional. México, pp. 120.
- Badr, A. 1995. Electrophoretic studies of seed proteins in relation to chromosomal criteria and the relationships of some taxa of *Trifolium*. *Taxon* 44: 183-191.
- Bult, C. J. and Y. T. Kiang. 1993. One-dimensional electrophoretic comparison of plant proteins. *Methods in Enzymology*. 224: 81-97.
- Carreras, M. E.; E. Fuentes and E. F. Merino. 1997. Seed protein patterns of nine species of Cactaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 25(1):43-49.
- Ekramoddoullah, A. K. M. 1993. Analysis of needle proteins and N-terminal aminoacid sequences of two photosystem II proteins of western white pine (*Pinus monticola* D. Don). *Tree Physiology*. 12: 101-106.
- Ekramoddoullah, A. K. M. and J. J. Davidson. 1995. A method for the determination of conifer foliage proteins extracted using sodium dodecylsulphate and mercaptoethanol. *Phytochemical Analysis*. 6: 20-24.
- Farjon, A. and B. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica*. Monograph 75. The New York Botanical Garden. New York. pp. 239.
- Feirer, R. P. 1995. The biochemistry of conifer embryo development: aminoacids, polyamidas and storage proteins. In: *Somatic embryogenesis in wood plants*. Vol. 1. (Edited by Jain, S. M.; P. K. Gupta and R. J. Newton). Kluwer Academic Publisher. London. pp. 317-336.
- McVaugh, R. 1992. *Flora Novo-Galiciana*. Vol. 17. Gymnosperms and Pteridophytes. The University of Michigan Herbarium. Ann Arbor. USA.
- Mirov, N. T. 1967. The genus *Pinus*. The Ronald Press Company. USA. pp:520-568
- Misra, S. 1995. Molecular analysis of zygotic and somatic conifer embryos. In: *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol 1. (Edited by Jain, S. M.; P. K. Gupta and R. J. Newton). Kluwer Academic Publishers. London. pp. 119-142.
- Pérez de la Rosa, J. A. 1991. Identificación de los pinos silvestres de Jalisco, atendiendo la morfología de las acículas. *Boletín del Instituto de Botánica* 1(1):23-32.
- Perry, J. P. 1991. *The Pines of México and Central America*. Timber Press, Inc. Portland, Oregon. pp. 231
- Price, R. A.; A. Listón and S. H. Strauss. 1998. Evolution, Phylogeny and Systematics of *Pinus*. In: *Ecology and Biogeography of Pinus*. (Dited by Richardson, D. M.). Cambridge University Press United Kingdom. pp. 49-68.
- Rogl, S. and B. Javornic. 1996. Seed protein variation for identification of common buchweat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivars. *Euphytica* 87: 111-117.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSyS-pc. Versión 1.8. Numerical taxonomy and multivariate analysis system.
- Sánchez-Yelamo, M. D.; M. C. Espejo; F. Ortega and S. A. Guerra. 1995. Electrophoretical evidence of variation in populations of the fodder legume *Chamaecytisus proliferus* from the Canary Islands. *Biochemical Systematics and Ecology* 23 (1): 53-63.
- Shaw, G. R. 1909. *The pines of México*. Publication of the Arnold Arboretum. No. 1. Riverside Press. Cambridge.
- Shaw, G. R. 1914. *The genus Pinus*. Publication of the Arnold Arboretum. No. 5. Riverside Press. Cambridge.
- Styles, B. T. 1993. Genus *Pinus*: A Mexican Purview. In: *Biological Diversity of México: Origin and Distribution*. (Edited by Ramamoorthy, R. B.; A. Lot. and J. Fa). Oxford University Press. New York.