

DIVERSIDAD GENÉTICA DE DOS ESPECIES DE CONÍFERAS EN EL NEVADO DE TOLUCA

Una alternativa de conservación

Amaury Martín Arzate-Fernández
Guadalupe Gutiérrez-González
Rosa Laura Heredia-Bobadilla



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

COLECCIÓN CIENCIAS AGROPECUARIAS | SERIE APORTES ACADÉMICOS

DIVERSIDAD GENÉTICA DE DOS ESPECIES DE CONÍFERAS EN EL NEVADO DE TOLUCA

Una alternativa de conservación

La contribución forma parte de un esfuerzo importante para la generación de información necesaria para la conservación y uso de los ecosistemas presentes en el Nevado de Toluca.

Gregorio Ángeles Pérez
Colegio de Postgraduados

El libro aborda un tema necesario y original
en la actualidad.

Ana Laura Wegier Briuolo
Instituto de Biología, UNAM



ISBN: 978-607-422-682-9



9 786074 226829

DIVERSIDAD GENÉTICA DE DOS ESPECIES DE CONÍFERAS
EN EL NEVADO DE TOLUCA: UNA ALTERNATIVA DE CONSERVACIÓN

Este libro acreditó el proceso de revisión por pares bajo la modalidad doble ciego, recurriendo a dictaminadores externos a la institución editora. Los dictámenes de esta obra fueron presentados y avalados por el Consejo General Editorial de la UAEM en su sesión del 9 de octubre de 2015, según consta en la minuta correspondiente.

SD
397
.C7
A79
2016

Arzate Fernández, Amaury Martín.

Diversidad genética de dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca : una alternativa de conservación. / Amaury Martín Arzate Fernández, Guadalupe Gutiérrez González, Rosa Laura Heredia Bobadilla.--[1ª ed.] -- Toluca, Estado de México : Universidad Autónoma del Estado de México, 2016.
[136 p ; 23 cm.]

ISBN: 978-607-422-682-9

1. Coníferas -- Distribución geográfica -- Toluca, México (Estado) 2. Coníferas -- Genética. I. Gutiérrez González, Guadalupe. II. Heredia Bobadilla, Rosa Laura.

DIVERSIDAD GENÉTICA
DE DOS ESPECIES DE CONÍFERAS
EN EL NEVADO DE TOLUCA: UNA
ALTERNATIVA DE CONSERVACIÓN

Amaury Martín Arzate-Fernández
Guadalupe Gutiérrez-González
Rosa Laura Heredia-Bobadilla



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

“2016, Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México”

Primera edición, enero 2016

Diversidad genética de dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca: una alternativa de conservación

Amaury M. Arzate Fernández | Guadalupe Gutiérrez González | Rosa Laura Heredia Bobadilla

Universidad Autónoma del Estado de México

Av. Instituto Literario 100 Ote.

Toluca, Estado de México

C.P. 50000

Tel: (52) 722 277 3835 y 36

<http://www.uaemex.mx>

direccioneditorial@uaemex.mx



Esta obra está sujeta a una licencia *Creative Commons* Atribución 2.5 México (CC BY 2.5). Para ver una copia de esta licencia visite <http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/mx>. Puede ser utilizada con fines educativos, informativos o culturales siempre que se cite la fuente. Disponible para su descarga en acceso abierto en: <http://ri.uaemex.mx>

Citación:

Arzate Fernández, Amaury M., Gutiérrez González, Guadalupe, Heredia Bobadilla, Rosa Laura (2016), *Diversidad genética de dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca: una alternativa de conservación*, México: Universidad Autónoma del Estado de México, ISBN: 978-607-422-682-9.

Responsable editorial: Rosario Rogel Salazar. Coordinación editorial: María Lucina Ayala López. Corrección de estilo: Judith Madrid Hernández. Formación y diseño: Elizabeth Vargas Albarrán. Diseño de portada: Ángel A. Esquivel López. Apoyo administrativo: Juliana Hernández. Asesoría creativa: Pablo Mitlanian. Servicios de catalogación: Marciano Díaz Fierro. Asesoría legal: Shamara de León García. Imagen de portada: Alfredo García Trejo.

ISBN: 978-607-422-682-9

Impreso y hecho en México

Printed and made in Mexico

CONTENIDO

PRESENTACIÓN	13
1. EL ÁREA DE PROTECCIÓN DE FLORA Y FAUNA NEVADO DE TOLUCA	15
Introducción	15
Características del APFFNT	16
Conservación de los bosques templados	19
2. BIOLOGÍA DE LAS PLANTAS HOSPEDERAS	21
Introducción	21
Familia Pinaceae	21
<i>Pinus hartwegii</i> Lindley	23
<i>Pinus montezumae</i> Lamb.	26
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lind.	27
<i>Abies religiosa</i> (HBK) Schltld. et Cham.	29
3. PRINCIPALES PARÁSITOS DE PINO Y OYAMEL	33
Introducción	33
Hongos	34
Insectos	35
Descortezadores y sus hongos simbiosntes en pinos	38
Descortezadores en abetos	40

Plantas parásitas	40
<i>Arceuthobium globosum</i>	43
<i>Arceuthobium vaginatum</i>	45
<i>Arceuthobium abietis-religiosae</i>	46
4. DIVERSIDAD GENÉTICA PARA LA CONSERVACIÓN DE CONÍFERAS	49
Introducción	49
Parámetros de cuantificación genética	52
Marcadores genéticos	55
Marcadores morfológicos	55
Marcadores moleculares	56
DNA nuclear y de organelos en coníferas	60
DNA nuclear	60
DNA del megagametofito	60
DNA de mitocondria y cloroplasto	61
Aplicación de los marcadores genéticos en estudios de diversidad genética en pinos y abetos	62
Cuantificación de la diversidad genética	62
En sistemas de reproducción y de apareamiento	63
En evolución	64
En conservación	65
En resistencia a enfermedades y plagas	66
En la distribución geográfica	67
5. ESTUDIOS DE CASO: DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>Pinus hartwegii</i> y <i>Abies religiosa</i> INFESTADOS POR DESCORTEZADOR Y MUÉRDAGO	69
Caso I: <i>Pinus hartwegii</i>	69
Introducción	69
Materiales y métodos	70

Selección de los puntos de muestreo y colecta del material vegetal	70
Análisis isoenzimático	72
Análisis de DNA	74
Análisis estadístico	75
Resultados y discusión	76
Frecuencia de descortezador y muérdago	76
Diversidad genética y resistencia a descortezador y muérdago	78
Diversidad genética y distribución geográfica	86
Conclusiones	92
Recomendaciones	93
Caso II: <i>Abies religiosa</i>	95
Introducción	95
Materiales y métodos	96
Selección de los puntos de muestreo y colecta del material vegetal	96
Análisis isoenzimático	100
Análisis de DNA	101
Resultados y discusión	101
Análisis de DNA	101
Distribución geográfica de la variabilidad genética	108
La diversidad genética en coníferas y consideraciones para <i>Abies religiosa</i>	109
Conclusiones	113
Implicaciones para la conservación	114
REFERENCIAS	117

DIVERSIDAD GENÉTICA DE DOS ESPECIES DE CONÍFERAS EN EL NEVADO DE TOLUCA: UNA ALTERNATIVA DE CONSERVACIÓN

RESUMEN

Se analizó la variabilidad genética de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa* en 27 y 17 puntos de muestreo, respectivamente, situados en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, un Área Natural Protegida que por su ubicación geográfica se encuentra bajo diferentes presiones antropogénicas, las cuales a su vez generan problemas ambientales. Particularmente en los bosques de pino y oyamel existe tala ilegal y desmedida lo que provoca la propagación de plagas y enfermedades en estas coníferas, como el aumento de muérdagos enanos (*Arceuthobium* spp.) y de escarabajos descortezadores (*Dendroctonus* spp., *Pseudohylesinus* spp.). Se utilizaron marcadores genéticos como: secuencias simples repetidas ancladas (ASSR), DNA mitocondrial (mtDNA), DNA de cloroplasto (cpDNA) e isoenzimas, para determinar niveles de heterocigocidad, número de alelos, flujo génico, diferenciación poblacional y distancias genéticas. Se encontraron niveles de diversidad genética bajos para *P. hartwegii* y altos para *A. religiosa*, con base en estos resultados se realizaron propuestas de conservación para ambas especies.

Palabras clave: DNA, isoenzimas, áreas naturales protegidas.

ABSTRACT

Genetic variability of *Pinus hartwegii* and *Abies religiosa* were analyzed in 27 and 17 sampling points respectively, both located in the Area de Proteccion de Flora y Fauna Nevado de Toluca, a natural protected area which owing to its geographical position it is under antropic and ambiental issues. Particularly, pine and fir woods are submitted to illegal loggin which in turn dwarf mistletoe (*Arceuthobium* spp.) and bark beetles (*Dendroctonus* spp., *Pseudohylesinus* spp.). Genetic and biochemical markers as: Anchored Simple Sequence Repeats (ASSR), mitochondrial DNA (mtDNA), cloroplast DNA (cpDNA) AND isozymes were used in order to determine heterozygosity, number of alleles, genic flow, population differentiation, and genetic distances. Genetic diversity was low to *P. hartwegii* and high to *A. religiosa*, based on these results, conservation strategies were proposed.

Key words: DNA, isozymes, natural protected areas.

PRESENTACIÓN

Este libro ha sido escrito y revisado de manera minuciosa como parte de un continuo esfuerzo por presentar información actualizada, preservando el conocimiento y sobre todo con un lenguaje accesible para los lectores. El objetivo de este texto fue englobar las características ecológicas del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), con análisis genéticos pioneros para el área de estudios en dos especies de coníferas y presentarlos como una herramienta más para llevar a cabo estrategias de conservación.

En México, un país que posee una riqueza considerable de recursos forestales, se necesitan estudios que puedan reflejarse en el aprovechamiento y cuidado de estos recursos, y para que esto sea posible, lo primero es difundir dichos estudios. Si bien es un objetivo difícil de alcanzar, consideramos que llegar a los lectores interesados en el manejo y la conservación de los bosques es un primer gran paso.

El orden de los capítulos, bajo el cual se ha organizado esta obra, sigue un simple esquema: se inicia con los factores ecológicos y de conservación del sistema (capítulo 1), la biología de algunas coníferas del APFFNT (capítulo 2), una breve descripción de las principales especies parásitas de estas coníferas (capítulo 3), los marcadores moleculares que en últimas fechas aportan una alternativa a la conservación (capítulo 4), mediante el conocimiento de la diversidad genética de dos especies clave para los bosques del Estado de México: *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa* (capítulo 5). Ya que todos los esfuerzos para salvaguardar la biodiversidad han dependido de las estimaciones del tamaño poblacional y la distribución de dichas poblaciones mediante análisis que, en ocasiones, consideran muestreos invasivos o no estandarizados por mencionar algunos inconvenientes, por lo que el análisis con DNA promete ser una herramienta para monitorear la biodiversidad a gran escala.

Este libro contiene los análisis de diversidad genética de las poblaciones representativas del APFFNT de las coníferas antes citadas como una base para los pobladores locales, los profesionales del manejo y la conservación, las autoridades y las empresas que utilizan los recursos naturales con fines económicos para que logren la producción y uso de estos recursos, manteniendo el equilibrio de la zona a través

de propuestas con base en la diversidad genética que presentan los pinos y abetos en sus zonas de distribución, dichas estrategias con técnicas que proporcionan buenos resultados a corto y largo plazo. Sin embargo, esto puede ser considerado como un primer esfuerzo para elaborar planes de manejo y conservación con un enfoque multidisciplinario.

Agradecemos a la Universidad Autónoma del Estado de México por el apoyo brindado, a quienes hicieron posible la realización de estos estudios, así como a las personas que enriquecieron esta obra con sus comentarios y aportaciones, y de quienes aprendimos cómo comunicar el conocimiento de manera clara y veraz.

Amaury M. Arzate-Fernández
Guadalupe Gutiérrez-González
Rosa Laura Heredia-Bobadilla

1. EL ÁREA DE PROTECCIÓN DE FLORA Y FAUNA NEVADO DE TOLUCA

INTRODUCCIÓN

La abundancia de especies en México es consecuencia de una variada historia biogeográfica que ha dado como resultado una diversidad de climas que abarcan un Reino Neártico en el norte y uno Neotropical en el sur (Ramamoorthy *et al.*, 1998). Se considera que esta variación ambiental podría causar diferenciación genética en las poblaciones por adaptación a diferentes ambientes y a flujo génico limitado entre las poblaciones (Furnier y Eguiarte, 1997). Se estima que México alberga aproximadamente 30 000 especies de plantas de más de 300 géneros, entre ellas las coníferas dominan grandes extensiones del territorio nacional y pertenecen a unos 15 géneros con más de 150 especies. Debido a su heterogeneidad orográfica y climática México es considerado un centro de diversidad para estas especies (Nava *et al.*, 2006). Esta gran diversidad constituye un recurso biológico y social de gran valor por lo que su conservación se vuelve prioritaria, sobre todo ante un panorama mundial de calentamiento global, que evidentemente afectará las comunidades forestales, ya que las especies arbóreas son las primeras en resentir los cambios. Los modelos climáticos proyectan hasta un aumento de 5°C en la temperatura global en los próximos cincuenta años, además, como resultado del aumento de la concentración atmosférica de CO₂, las especies forestales migrarían a sitios más elevados, por ejemplo, esto podría conducir a la pérdida de individuos o de poblaciones (y sus genotipos) que se han adaptado a su ambiente (Ledig, 1997; Villers *et al.*, 1998).

En México existe un instrumento de política ambiental para la conservación de la biodiversidad, la delimitación de Áreas Naturales Protegidas (ANP), estas son porciones del territorio nacional representativas de los diversos ecosistemas, donde el ambiente no ha sido esencialmente alterado, se crean mediante decretos presidenciales y las actividades que se pueden llevar a cabo en ellas están establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (CONANP, 2013).

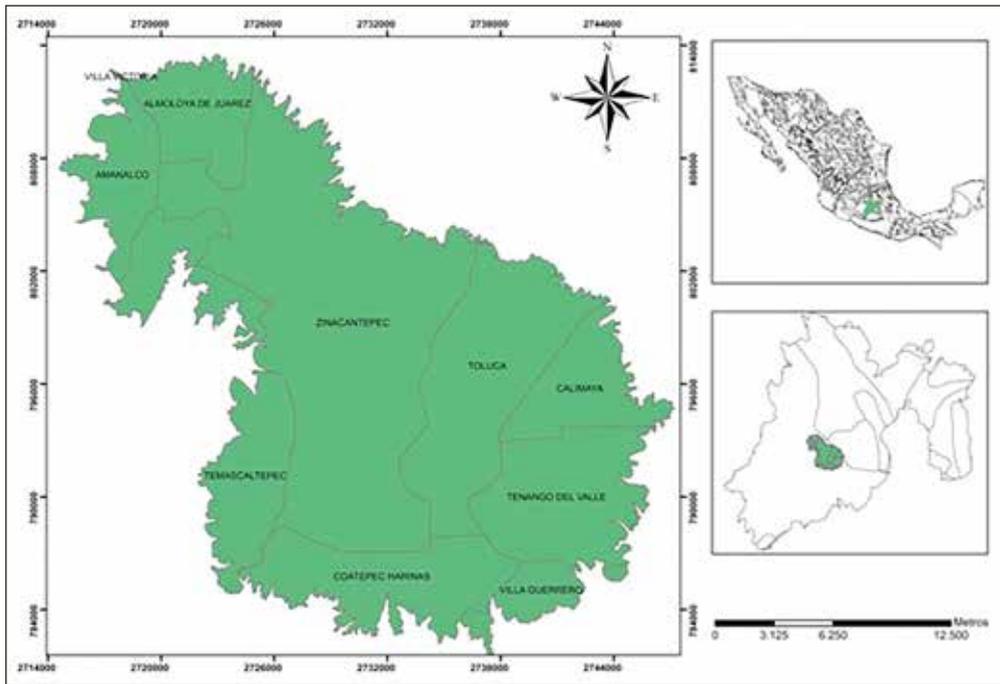
El Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT) constituye una de las principales ANP del Estado de México. Cuenta con una vasta riqueza

natural, una estructura orográfica singular y funciona como origen de la cuenca hidrográfica del río Lerma, una de las cuencas más importantes de México, además de la presencia de bosques templados que contribuye a la captura de carbono, así como a la formación y protección de los suelos. Esta ANP se encuentra bajo constantes presiones antrópicas (agrícolas y pecuarias, principalmente) debido a su posición geográfica, ya que ésta limita con áreas urbanizadas. Pese a su gran relevancia, la conservación de la región se ha visto limitada por la existencia de distintos regímenes de propiedad, lo que ha conducido a la sobreexplotación de los recursos forestales (CONANP, 2007).

CARACTERÍSTICAS DEL APFFNT

Se ubica en el Estado de México, al suroeste del valle de Toluca, dentro de una de las provincias fisiográficas más grandes del país denominada Sistema Volcánico Transversal. Se localiza entre los 18°59' y 19°13' latitud N y 99°37' y 99°58' longitud W. El volcán Nevado de Toluca representa la cuarta montaña más alta del país, alcanzando su mayor elevación en el Pico del Fraile, a los 4 660 metros sobre el nivel del mar (msnm). Tiene como límite físico la cota de los 3 000 msnm, presentando un rango altitudinal que incluye al cono volcánico y otra serie de geoformas que se extienden hacia el noroeste (Candeano y Franco, 2007; Domínguez *et al.*, 2010). El APFFNT se extiende sobre cerca de 50 mil hectáreas, abarca parte de los municipios de Toluca, Zinacantepec, Almoloya de Juárez, Amanalco, Temascaltepec, Coatepec Harinas, Villa Guerrero, Calimaya y Tenango del Valle (Figura 1.1); la temperatura media anual es de 3.1°C, la precipitación total anual es de 1 219.0 mm. En la temporada invernal presenta de 160 a 180 nevadas. Los suelos son de tipo andesítico, producto del intemperismo de cenizas volcánicas, por lo que son profundos, ligeros y con alto grado de erosión. Para tales suelos se recomienda el uso forestal (INEGI, 2001).

Figura 1.1
Localización geográfica del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca



Fuente: elaboración propia.

El Nevado de Toluca fue decretado como Parque Nacional en 1936 con la finalidad de proteger los bosques templados que rodean al Xinantécatl, sin embargo, su función se ha dificultado porque el decreto de función nunca se ejecutó, y tampoco se indemnizó a los propietarios originales de los predios, por tanto, existe una problemática generada por la necesidad de los dueños de sacar el mayor aprovechamiento posible de sus predios y la de acatar el decreto de la región como Parque Nacional, esto ha generado una serie de problemas sobre la masa forestal, tales como la sobreexplotación de recursos forestales, cambio de uso de suelo, la extracción selectiva de madera, incidencia de incendios forestales y un aumento en la presencia de parásitos forestales como los insectos descortezadores y los muérdagos (Candeau y Franco, 2007).

El 1 de octubre de 2013 se modificó el decreto presidencial de 1936, para cambiar el estatus de Parque Nacional por el de Área de Protección de Flora y Fauna, esta categoría ofrece a los habitantes opciones para cultivar y manejar el bosque, así como reproducir fauna silvestre nativa en Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAS), el objetivo de este decreto es repoblar el ANP con especies nativas y brindar alternativas productivas a los pobladores (CONANP, 2013).

La diversidad de recursos naturales es, sin duda, una de las características que presenta esta región, los bosques templados son los que predominan en la zona y conforman las poblaciones primarias de este ecosistema, integradas por tres principales tipos de comunidades: bosque de pino formado por tres especies (*Pinus montezumae*, *Pinus hartwegii* y *Pinus pseudostrobus*), bosque de oyamel, en este caso monoespecífico (*Abies religiosa*) y bosque mixto formado por pino, oyamel y encino (*Quercus* spp.) (CONABIO, 2012).

El pino de la montaña (*P. hartwegii*) se desarrolla entre los 3 500 y 4 000 msnm. Los bosques que forma están adaptados a condiciones de mayor altitud y menor temperatura, fisonómicamente es una comunidad abierta y baja con árboles espaciados entre sí. Forma bosques que constituyen una transición entre los pastizales alpinos en la medida que sus individuos arbóreos se reducen de tamaño y se dificulta el crecimiento de sus raíces en los suelos pedregosos y sueltos, además del efecto de las heladas, lo cual provoca una reducción de la diversidad y el número de especies del estrato herbáceo y de las plantas arbustivas. Por otra parte, a medida que el gradiente de altitud desciende, la diversidad y el número de especies aumenta, al igual que la abundancia, siendo el bosque de *P. hartwegii* sustituido por los bosques de *A. religiosa* o por los bosques mixtos de distinta composición (Sierra, 2008; Ceballos, 2011).

Los bosques de oyamel, típicos de la zona ecológica templada subhúmeda de México, tienen sus áreas continuas de mayor extensión en las serranías que circundan la cuenca del valle de México dentro de la faja volcánica transmexicana donde *A. religiosa* domina el estrato superior. Las comunidades de oyamel presentan una mayor abundancia de especies de plantas y animales, ya que en general constituyen una comunidad más densa, el gran follaje de los oyameles provoca un ambiente de sombra y humedad que permite la proliferación de hongos, cuya presencia en especies es quizás la más significativa de toda la entidad, sobre todo por su valor económico para la población campesina, además del desarrollo de grandes poblaciones de musgos,

helechos y hepáticas (Sánchez *et al.*, 2005). Existen fragmentos de este bosque en todas las vertientes del APFFNT, particularmente en las laderas norte, oeste y sur entre los 2 800 y 3 400 msnm (Sierra, 2008; Ceballos, 2011).

En cuanto a la fauna, existen pocas referencias que aporten información precisa sobre las especies que actualmente habitan en esta ANP, sin embargo, algunos estudios reportan la presencia de especies endémicas, entre éstas hay anfibios: *Ambystoma rivulare*, *Abronia* sp. y *Hyla plicata* y *Pseudoeurycea belii*; reptiles: *Barisia imbricata* y *Thamnophis scalaris*; aves: *Dendrortyx macroura*, *Oporornis tolmeri*, *Accipiter striatus*, *Buteo jamaicensis*, *Parabuteo unincinctus*, *Falco peregrinus*, *Vermivora crissalis* y *Xenispoza baileyi*, esta última en peligro de extinción; y mamíferos: *Neotomodon alstoni*, *Sylvilagus floridanus*, *S. cunicularius*, *Cratogeomys merriami* y *C. fumosus* (Domínguez *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2013).

CONSERVACIÓN DE LOS BOSQUES TEMPLADOS

La biología de la conservación es una ciencia cuyos intereses entran frecuentemente en conflicto con políticas y temas socioeconómicos antagónicos. Por este y otros motivos, la preservación de los hábitats naturales es difícil de llevar a cabo, cuando esto ocurre se hace altamente recomendable conservar la variación contenida en el DNA de los organismos, actualmente se desarrolla investigación con eDNA (environmental DNA), el cual es material genético obtenido directamente de muestras ambientales para monitorear la biodiversidad a gran escala, sin utilizar muestreos invasivos (Thomsen y Willersley, 2015). A medida que las poblaciones humanas crecen, las presiones ambientales sobre otros seres vivos crecen también, por esa razón un gran número de especies se han extinguido, mientras que otras más se encuentran en riesgo. La fragmentación del hábitat es un proceso que cobra importancia puesto que afecta a las poblaciones en cuanto a su número y distribución, esto a su vez reduce los niveles de variabilidad genética de las poblaciones que, aunado a la contaminación y a la introducción de especies foráneas, ha conducido a que muchas especies necesiten de intervención humana para mejorar su manejo y en consecuencia asegurar su supervivencia (Frankham, 2003).

La diversidad genética es el fundamento de la diversidad biológica puesto que el potencial evolutivo de las especies depende de ella, una especie puede sufrir desde

disminución de sus poblaciones hasta su extinción debido a la pérdida de diversidad genética. Actualmente se reconocen tres niveles de diversidad biológica: ecosistemas, especies y el nivel genético, sin embargo, a nivel mundial sólo 20% de los países implementa de manera efectiva la variación genética de plantas y animales en programas de conservación (Laikre *et al.*, 2009).

La información sobre los niveles y patrones de variación genética es importante para la conservación y manejo de los recursos genéticos. Los niveles de variación genética dentro de especies y poblaciones son necesarios porque ésta sirve como materia prima de la evolución, y está relacionada con la habilidad de las poblaciones para adaptarse a cambios ambientales (Furnier y Eguiarte, 1997).

Determinar el grado de diversidad genética así como explicar su organización y mantenimiento es fundamental en la aplicación de principios genéticos en la conservación. En otras palabras, la aplicación de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* con base en la variabilidad genética, permite establecer una manera de manejar las poblaciones para conservar su adecuación y permitir la evolución de la especie (Donoso *et al.*, 2004).

Actualmente, muchos programas de conservación no toman en cuenta la diversidad genética de las especies forestales. El calentamiento global, el mal manejo de los recursos forestales, la contaminación y destrucción de los hábitats ponen en riesgo a especies clave en los ecosistemas.

Ante este panorama resulta necesario conocer los niveles de diversidad genética de especies forestales como *P. hartwegii* y *A. religiosa* del APFFNT, con el objetivo de que este tipo de estudios puedan contribuir con los planes de manejo y conservación para esta área, la cual constituye un lugar de alto valor biológico, paisajístico, social y económico para el centro de México.

2. BIOLOGÍA DE LAS PLANTAS HOSPEDERAS

INTRODUCCIÓN

Una gran diversidad de bosques y selvas cubren 64.5 millones de hectáreas en México, que representa 33% del territorio nacional. Particularmente, los bosques templados tienen un alto valor biológico, brindan una gran cantidad de servicios ambientales y son una de las principales fuentes de ingresos para las comunidades locales que están inmersas en ellos. Es sabido que México es un importante centro de diversidad de especies forestales de alta montaña con más del 50% de todas las especies de pino y más de 150 especies de encinos (Styles, 1998; Rzedowski, 1998; Viveros *et al.*, 2006).

El Nevado de Toluca es un Área Natural Protegida caracterizada por la presencia de una gran diversidad de especies animales y vegetales. Los bosques en este lugar están formados por importantes especies de coníferas (pino y oyamel) y latifoliadas (encinos y aile) que están sometidas a una intensa presión de origen antrópica y que ponen en peligro la estabilidad de este ecosistema.

Así, resulta necesario conocer las principales características biológicas de estas especies para tener las bases suficientes para coadyuvar en la creación de planes eficientes de conservación y manejo.

En este capítulo se describe la biología de dos especies de coníferas que actualmente están amenazadas por parásitos como los muérdagos y por insectos descortezadores.

FAMILIA PINACEAE

La familia Pinaceae incluye a los árboles comúnmente conocidos como coníferas, entre ellas están los pinos, abetos u oyameles y piceas. El ciclo de vida del pino es representativo de las coníferas, y a continuación se describe.

El árbol del pino es el esporofito maduro, es heterospórico (tiene dos tipos de esporas), por lo tanto, produce microsporas y megasporas en estróbilos separados.

Los estróbilos masculinos, por lo común de 1 cm o menos de longitud, son más pequeños que los femeninos y suelen formarse en las ramas inferiores cada primavera. Los estróbilos femeninos, leñosos y más conocidos, suelen encontrarse en las ramas superiores y contienen semillas poco después de la reproducción (Raven *et al.*, 1991; Salisbury y Cleon, 1994; Solomon *et al.*, 2001).

Cada estróbilo masculino (piña de polen) está formado por esporófilos que contienen esporangios en su base. En la base de cada esporófilo hay dos microesporangios que contienen numerosos microsporocitos (células madre de microsporas), cada microsporocito experimenta meiosis para formar microsporas haploides. Las microsporas se convierten después en gametofitos masculinos, llamados también granos de polen. Dos grandes sacos aéreos dan al polen flotabilidad para ser dispersado por el viento. Los granos de polen se desprenden de los estróbilos masculinos en gran cantidad y algunos son llevados por el viento a los estróbilos femeninos inmaduros. Los esporófilos femeninos tienen megasporangios en su base, dentro de cada uno la meiosis de un megasporocito produce cuatro megasporas haploides, una de éstas se divide por mitosis (las otras tres se degeneran) y se transforma en un gametofito femenino que produce una célula ovular, cuando el óvulo está listo para recibir el polen produce una gota de una sustancia adhesiva donde los granos aterrizan. La polinización ocurre en primavera durante un periodo de 7 a 10 días, después de este lapso los conos de polen se marchitan y se desprenden del árbol (Raven *et al.*, 1991).

Uno de los muchos granos de polen que se adhieren al estróbilo femenino desarrolla un tubo polínico el cual es una proyección que digiere con lentitud la sustancia del megasporangio a su paso hacia la célula ovular. La célula ovular y la generativa entran en el tubo polínico, la segunda se divide para formar una célula pedunculada y una célula corporal, esta última se divide en dos microsporas inmóviles. Cuando el tubo polínico llega al gametofito femenino, salen por él los dos anterozoides y uno de ellos se une a la célula ovular para formar un cigoto que se convierte en un pequeño embrión de pino dentro de la semilla (Scagel *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 2001).

El embrión en desarrollo consiste en una raíz y un tallo embrionarios con varios cotiledones, está rodeado por tejido del gametofito femenino haploide, el cual se convierte en el tejido nutritivo de la semilla. En el ciclo vital del pino la generación esporofita es dominante y la generación gametofita se restringe a estructuras

microscópicas en los estróbilos (Raven *et al.*, 1991; Scagel *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 2001).

Pinus hartwegii Lindley

Pinus hartwegii o pino de las alturas como es conocido comúnmente fue nombrado en honor al botánico alemán Karl Theodor Hartweg, quien trabajó e hizo colectas en México (Figura 2.1). Este tipo de pino se encuentra confinado en los picos y montañas más altas de México (3 000-4 000 msnm), aunque también se ha encontrado en Guatemala, El Salvador y Honduras. En el APFFNT se llegaron a encontrar estos organismos hasta los 4 400 msnm. Debido a estas condiciones, es el pino con menor crecimiento en los bosques de México (Iglesias *et al.*, 1997).

En el APFFNT el *P. hartwegii* alcanza su máxima altitud a nivel mundial sobre cualquier especie de pino (Candreau y Franco, 2007). El factor altitudinal ha determinado la formación de razas geográficas con variación regional y aislamiento genético total entre ellas, como menciona Hernández (1995), afecta la longitud de las acículas en forma inversa, es decir, los árboles de las partes más bajas tienen acículas más largas.

P. hartwegii mide entre 15 y 30 m, la corteza es agrietada, color pardo rojizo; con las ramas extendidas y colocadas irregularmente, ramillas ásperas, de color rojizo o grisáceo (Figura 2.1). Las bases de las brácteas son largas y fuertes, con frecuencia se descaman. Las hojas de este pino se agrupan típicamente en tres, en otros casos de tres y cuatro, cuatro y cinco, y cinco constantes. Miden de 8 a 16 cm de largo, de color verde claro, medianamente gruesas, tiesas; carinadas (con la cara dorsal muy ancha y la costilla media apenas levantada) y bordes aserrados, presentan estomas en las tres caras, y dos haces vasculares muy próximos, rodeados de células de refuerzo. Los canales resiníferos son medios, excepcionalmente con uno o dos internos, y en número de dos a once (más común de seis) (Eguiluz, 1982; Judd *et al.*, 2002).

Figura 2.1
Ejemplar de *P. hartwegii* en el APFFNT



Fotografía de Amaury Martín Arzate Fernández.

Las vainas son de color castaño al principio, moreno y grisáceas, posteriormente. Son escamosas abajo y anilladas arriba (10 a 17 mm). Las yemas son largamente ovoides, agudas, de color moreno rojizo. Los conos son ovoides, acuminados, ligeramente oblicuos y poco encorvados, extendidos, de 7 a 14 cm de largo. Una media de diámetro de 3.73 cm y peso fresco de 54.19 g. Son de color rojo oscuro casi negros, persistentes y sésiles. Los pedúnculos presentados por pares, a veces tres, cuatro y cinco miden 10 mm; suele quedar con algunas escamas basales a la caída del cono (Judd *et al.*, 2002).

Presenta escamas numerosas, delgadas y frágiles, derechas, pocas veces reflejadas, con el umbo aplastado, angostas en el ápice, con un ángulo casi recto. Miden de 24 a 28 mm de largo y de 10 a 13 de ancho (en la región media). Apófisis aplanada, color oscuro, quilla transversal y la costilla perpendicular. La cúspide hundida con una punta corta, gruesa y persistente. La floración ocurre entre enero y abril y los conos maduran durante noviembre y diciembre (Eguiluz, 1982; Musálem y Solís, 2000; Judd *et al.*, 2002).

P. hartwegii forma comunidades clímax entre los 3 700 y 4 300 msnm, es una especie dominante por su buen desarrollo aun a bajas temperaturas y pobreza del suelo; a menor altitud sólo compete con *P. montezumae*. Es una especie muy tolerante a nevadas fuertes, soporta hasta cinco nevadas y de 110 a 115 heladas por invierno, es considerada la especie de pino más tolerante a bajas temperaturas. Actúa como regulador del ciclo hidrológico (deshielo de los volcanes) y alimentador de agua a los mantos freáticos del valle de Toluca; como amortiguador importante de los efectos de la contaminación ambiental existente en sus áreas de distribución y su localización determina el rango altitudinal de vegetación arbórea. La madera de este pino es utilizada para celulosa, papel, pulpa y pasta mecánica, aserrín, chapa, triplay, durmientes, pilotes, postes y trozos para combustible, entre otros (Musálem y Solís, 2000).

Esta especie se encuentra sometida a diversos factores que amenazan su adecuación. Earle (2005) realizó visitas a varios puntos donde se distribuye *P. hartwegii*, entre ellos el Nevado de Toluca, encontró que es un área natural protegida, sujeta a una intensa presión antrópica por su cercanía a la ciudad de Toluca con cerca de 2 millones de mexiquenses ligados, total o parcialmente, a actividades que conllevan a la sobreexplotación forestal, contaminación, déficit hídrico y erosión de los suelos. Estos factores han puesto en detrimento de la conservación de esta especie altitudinalmente endémica, y tiene como consecuencia una pérdida de la biodiversidad del lugar y de recursos esenciales como el agua (Candeau y Franco, 2007).

La tala clandestina de manera selectiva ha dinamizado la disminución de masas arbóreas, la pérdida de poblaciones y con ello del acervo genético, con lo cual deja a los individuos menos propicios para reproducir la progenie, ya que para obtener los mejores productos, el hombre ha seleccionado los mejores fenotipos (de apariencia sana, y mejor adaptados al ambiente), de lo cual, lo más riesgoso es que estas son generalmente poblaciones genéticamente únicas (Vargas *et al.*, 1997; Styles, 1998; Ledig, 1998; Musálem y Solís, 2000).

Todos estos factores han propiciado un aumento en las poblaciones de parásitos tales como insectos descortezadores y plantas parásitas; particularmente en el APFFNT, podemos encontrar la población de *P. hartwegii* fuertemente parasitada por el descortezador *Dendroctonus adjunctus*, y por los muérdagos enanos *Arceuthobium vaginatum* y *A. globosum* (Franco *et al.*, 2009). Endara y colaboradores (2012) determinaron un total de 9 358 ha infestadas de bosque de pino, pero se considera que, aunado a otros factores como la tala y los incendios, la tasa de deforestación ha aumentado un 40% con respecto al 2000, es decir, 156 ha/año.

Pinus montezumae Lamb.

Pinus montezumae (Figura 2.2), mejor conocido como ocote, su nombre deriva de las ciudades de Ocotlán, Jalisco, Ocotlán de Morelos, Oaxaca y Ocotlán, Nicaragua. Se reconocen dos variedades: *P. montezumae* Lamb. var. *Montezumae* y *P. montezumae* Lamb. var. *Gordoniana*. Se distribuye en las zonas boscosas de las montañas de México: Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Veracruz, México, Morelos, Distrito Federal, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; y también en Guatemala (Perry, 1991).

P. montezumae crece en un rango de climas cálidos a fríos, en bosques de pino y encino en lugares entre los 1 400 y 3 200 msnm, con lluvias entre 900 y 1 600 mm y con una temperatura media anual de 11 a 18°C (Nava *et al.*, 2010; Perry, 1991).

El fuste de este pino es grande, de 20 a 35 m de altura y 50 a 80 cm de diámetro (Figura 2.2). Las ramas son grandes, generalmente horizontales y rojizas; la corteza es café grisácea dividida por fisuras horizontales y profundas; sus hojas forman generalmente fascículos de 5, de 15 a 25 cm de largo, ocasionalmente 30 cm, de color verde oscuro, con 2 a 6 canales de resina en la parte media; los conos son variables de 12 a 15 cm y de 7 a 10 cuando abren y la semilla mide de 6 a 7 mm (Judd *et al.*, 2002).

Esta especie es el principal hospedero del muérdago enano *A. aureum* subsp. *aureum* (Guatemala), *A. aureum* subsp. *petersonii* (Oaxaca y Chiapas), *A. durangense* (Jalisco), *A. globosum* subsp. *grandicaule*, y *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* (Hawksworth *et al.*, 1996).

Figura 2.2
Población de árboles de *P. montezumae* en el APFFNT



Fotografía de Amaury Martín Arzate Fernández.

Pinus pseudostrobus Lind.

Es una especie de pino también llamada pino lacio, pacingo y chamite (Figura 2.3). El nombre de pseudostrobus (pseudo: falso) se le confiere por la dificultad para identificarlo taxonómicamente y su gran parecido a *P. strobus*. Se distribuye en el bosque templado desde el norte de México (Sinaloa a Jalisco), es más común en la planicie central y el estado de Chiapas. Su rango se extiende a Guatemala, El Salvador y Honduras (26° a 15° N), de 1 300-3 250 msnm. Crece en suelos profundos derivados de material volcánico, ácidos a moderadamente ácidos (pH 5.5 a 6.5), no crece en suelos con problemas de drenaje (Viveros *et al.*, 2006).

Forma grandes masas forestales principalmente cuando se asocia con el oyamel. En el Estado de México se le encuentra en el Parque Nevado de Toluca y el Parque Nacional Izta-Popo. Se reconocen tres subespecies: *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*

forma pseudostrobus (Michoacán), *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* forma *protuberans* (Distrito Federal), *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Estado de México) (Nava *et al.*, 2010; Viveros *et al.*, 2006).

Es un árbol perenne que mide de 3 a 40 metros de altura, ocasionalmente los 45 metros (Figura 2.3). Su tronco tiene un diámetro de 40 a 80 cm y el fuste recto, libre de ramas en 50% de su altura; las ramas a menudo son horizontales, copa espesa; corteza áspera, grisácea. Cerca de la copa la corteza se hace suave y rojiza a café grisáceo; el follaje es verde oscuro y las acículas se agrupan en fascículos de 5, 4 o 6, el tamaño de éstas es de 16 a 35 cm de largo; los canales resiníferos de 2 a 4 son usualmente medios (Judd *et al.*, 2002).

Figura 2.3
Acículas de árbol de *P. pseudostrobus*



Fuente: <http://juliafogtterrain.wordpress.com>).

P. pseudostrabus cohabita con especies como *P. cembroides*, *P. chihuahuana*, eventualmente *P. durangensis*, *P. hartwegii*, *P. montezumae* y *P. ayacahuite*. En algunos lugares es considerada especie canopia (su copa suele abarcar grandes espacios y generar sombra a las especies de menor altura) y de manera natural puede hibridizar con *P. montezumae*. Es una de las especies más comunes por su uso maderero, la madera es de color amarillo claro, grano recto, textura fina, es madera moderadamente liviana, suave y poco resinosa, utilizada en construcción, ventanas flexibles, muebles, ebanistería, artesanías y pulpa para papel. En México es usada comúnmente como fuente de resina (López, 2003).

Esta especie es el principal hospedero del muérdago enano *Arceuthobium aureum* subsp. *aureum* (Guatemala), *A. aureum* subsp. *peteronii* (Oaxaca y Chiapas), *A. durangense* (Jalisco), *A. globosum* subsp. *grandicaule* (sureste de México y Guatemala), y *A. oaxacanum* (Oaxaca) (Hawksworth *et al.*, 1996).

Abies religiosa (HBK) Schltdl. *et* Cham.

La distribución geográfica de los bosques de *Abies* en México es en extremo dispersa y localizada. En la mayor parte de los casos la comunidad se presenta en forma de manchones aislados muchas veces restringidos a un cerro, una ladera o una cañada, a menudo protegidos de la acción de vientos fuertes y de insolación intensa. Este tipo de vegetación está prácticamente confinado a sitios de alta montaña, por lo común entre 2 400 y 3 600 msnm (Rzedowski, 1998).

Abies religiosa (HBK) Schltdl. *et* Cham. (Figura 2.4) se encuentra distribuida en el centro de México, en los estados de Hidalgo, Puebla, Estado de México, Guerrero, Tlaxcala, Jalisco, Michoacán, Morelos y el Distrito Federal, aunque también se ha reportado la existencia de poblaciones de este oyamel en Guatemala (Aguirre *et al.*, 2000). Esta especie fue descrita por primera vez por Humboldt, Bonpland y Kunth, aunque su nombre actual fue dado por Schltdl. y Chamisso (Gómez, 2003); es la especie más frecuente en esta zona del país y los bosques que forma son extensos y muchos de ellos puros (Rzedowski, 2006).

El oyamel se desarrolla en climas fríos y húmedos, generalmente por encima de los 2 500 msnm en suelos profundos (Rzedowski, 1998). Es un árbol corpulento, monoico, perenne, resinoso, de copa simétrica y triangular. Posee hojas lineares persistentes, coriáceas, con canales de resina y aromáticas con ápice agudo y algo

córneo. El tronco es erguido de 30 a 60 m de altura y de 40 a 180 cm de diámetro (Figura 2.4). Los conos son erguidos, sésiles, agrupados, bastante resinosos de forma cilíndrica u oval. La semilla es triangular, envuelta completamente en una capa resistente papirácea y lustrosa, con un alto contenido de grupos benzeno y limoneno que le confiere a la semilla baja preferencia ante los depredadores (Nieto de Pascual, 2013), las estructuras reproductivas masculinas y femeninas se presentan desde diciembre. La fructificación se presenta de noviembre a enero, la dispersión de las semillas ocurre entre marzo y abril (CONAFOR, 2012).

Figura 2.4
Bosque de *Abies religiosa* en el APFFNT



Fotografía de Amaury Martín Arzate Fernández.

Los suelos donde se establece el oyamel son muy jóvenes, de origen volcánico (andesitas, basaltos o riolitas), presentan geformas con pendientes muy pronunciadas; aunque generalmente se establecen en suelos profundos, en el Estado de México y en Jalisco se

encuentran sobre una capa muy delgada de cenizas volcánicas; también se menciona que las propiedades físicas del suelo influyen más en el desarrollo de oyamel que las químicas, la profundidad, el drenaje, la textura, estructura y el contenido de humus son propiedades decisivas en el desarrollo del oyamel (CONAFOR, 2012; Sánchez *et al.*, 2005).

En México, la especie maderable más rica en celulosa es *A. religiosa*, en cuyos tallos jóvenes (de 20 a 40 años de edad) se encuentra hasta 75% de tejidos celulósicos, y éste a su vez con el mayor porcentaje de celulosa alfa, es empleado para la fabricación de papeles finos, por consiguiente es el que alcanza los mayores precios en el mercado. Aunque la madera es suave y liviana es utilizada para la fabricación de vigas y cajas para embalaje. Asimismo se le introduce al mercado de árboles de Navidad, sin presentar inferioridad en la calidad con respecto a especies importadas (Gómez, 2003).

Los bosques de *A. religiosa* del Sistema Volcánico Transversal son considerados como tipos de vegetación relictuales (vegetación cuya distribución actual fue determinada durante el calentamiento climático ocurrido durante los pasados 10 000 años), albergan las poblaciones hibernantes de la mariposa monarca (*Danaus plexippus* L.) más significativas del mundo. En las diversas cuencas de captación también son importantes, pues en estos bosques se registran altas precipitaciones y por las características de la cobertura de los diferentes estratos de la comunidad y las propiedades físicas del suelo, permiten una eficiente absorción y retención del agua de lluvia (Gómez, 2003; Sánchez *et al.*, 2005).

Los bosques de oyamel del APFFNT están siendo afectados por la creciente incidencia de plagas como los insectos descortezadores y plantas parásitas (Franco *et al.*, 2009). La presencia de estos organismos (tanto el muérdago como los descortezadores) en el bosque es natural, forman parte del ecosistema, sin embargo, se considera que es conveniente controlar sus poblaciones debido a que el aumento inusual de éstas pone en riesgo el equilibrio ecológico que guardan los bosques de coníferas del APFFNT, ya que al matar al arbolado y por tanto disminuir sus poblaciones en el ANP, se reduce también la variabilidad genética que de manera natural se encuentra en estos organismos. Particularmente en esta área de estudio, la población de *A. religiosa* se encuentra fuertemente infestada por insectos descortezadores como *Scolytus mundus* y *Pseudohylesinus variegatus*, así como por el muérdago enano *Arceuthobium abietis-religiosae* (Cibrián *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2009).

Los bosques de pino y abeto se encuentran distribuidos en bosque denso (los árboles se distribuyen en varios pisos y sus copas se entrelazan), bosque semidenso y bosque fragmentado o claro (la distribución de los árboles es discontinua y sus copas no se entrelazan, asociados con zonas de agricultura) (www.fao.org). En el 2005, Regil García determinó que los bosques densos de oyamel eran los más abundantes (13 040.22 ha) del APFFNT, abarcan aproximadamente 24.76% de la superficie total distribuidos en la zona norte con manchones contiguos de bosque semidenso y bosque fragmentado hacia el sur del área. Mientras que los bosques de pino denso disminuyeron de 13 279.24 ha a 7 814.52 ha (41.16%) de 1972 a 2000, distribuidos en el centro del APFFNT, es decir, cercanos al cráter a las mayores elevaciones (3 500 msnm) a causa de las actividades antrópicas, especialmente la tala selectiva.

3. PRINCIPALES PARÁSITOS DE PINO Y OYAMEL

INTRODUCCIÓN

La selección natural ha desempeñado un papel importante en la evolución de las especies. Las enfermedades, especialmente las de tipo infeccioso, han sido un importante agente evolutivo, ya que al ser un factor natural de muerte controlan la estructura de la población de una especie y en consecuencia se modifica el comportamiento de otras con las que ésta interactúa (Haldane, 1997; Jason *et al.*, 2006).

Aunque resulta lógico aseverar que para la mayoría de las especies la presencia de una enfermedad es una desventaja por los daños provocados al organismo afectado, se puede observar que la diversidad genética es mayor cuando el origen es por resistencia a una enfermedad en comparación al incremento de diversidad genética derivada de la resistencia a un depredador (Haldane, 1997; Lehmann, 2002).

En las especies vegetales existen individuos resistentes a enfermedades; esta resistencia proveniente de la diversidad genética es determinada por uno solo o un par de genes (Pastorino *et al.*, 2006), al mismo tiempo, los parásitos microscópicos han evolucionado para evadir la inmunidad de los hospederos. Pese a esta agravante, los hospederos pueden producir nuevos genotipos y con ello variedades con nueva resistencia (Haldane, 1997; Díaz y Ferrer, 2003; Leister, 2004). Estas relaciones de adaptación conocidas como simbiosis, son las responsables de la gran biodiversidad que actualmente se conoce en muchos taxa (McCutcheon y Moran, 2007; Futuyma y Agrawal, 2009).

Las interacciones insecto-planta son temporal, espacial, filogenética, biogeográfica, química y ecológicamente dinámicas; y son las causas principales de la variación y especiación de los insectos y de las plantas, es decir, son procesos englobados en la coespeciación, la cual ha sido fundamentada recientemente con estudios modernos de filogenia y técnicas moleculares (Percy *et al.*, 2004).

Algunos especialistas sugieren que el aumento en las incidencias de parásitos en especies forestales es causado por el deterioro de los bosques a causa de actividades humanas, la más sobresaliente es la tala descontrolada y en muchos casos ilegal, que además reduce considerablemente la variabilidad genética (Zobel y Talbert, 1998).

Las coníferas suelen ser parasitadas por una gran diversidad de organismos. A continuación se describen algunos de estos, sin embargo, por la naturaleza del presente estudio, sólo se explican con mayor detalle los insectos descortezadores y las plantas parásitas.

HONGOS

En el Cuadro 3.1 se describen algunos de los hongos cuyos hospederos son *Pinus* spp. y *Abies religiosa*, su presencia es reportada en el Estado de México.

Cuadro 3.1
Hongos que parasitan coníferas en el Estado de México

<i>Tipo de hongo parásito</i>	<i>Especies de hongos parásitos y sus hospederos</i>
Cancros. Enfermedad producida por los hongos y que se desarrolla en el floema, el cambium y algunas capas del xilema. Esta puede ser difusa (lo que suele causar la muerte del árbol) o discreta, lo que permite una respuesta fisiológica de la planta que se manifiesta en hipertrofia. Su control se realiza mejorando las condiciones de crecimiento de los árboles o por manipulación genética (Cibrián e Íñiguez, 2001).	Destacan dos especies que afectan a los pinos: <i>Diplodia pinea</i> , suele encontrarse en los conos del árbol y causa la muerte de las ramas con patrones dispersos de la infección. <i>Fusarium circinatum</i> (cancro resinoso), ha sido detectado en <i>P. hartwegii</i> con daños severos que se manifiestan en extravasaciones de resina (Brown, 1971; Correll <i>et al.</i> , 1991; González, 1999; Cibrián e Íñiguez, 2001).
Royas. Se trata de hongos patógenos obligados.	Existen diversas especies que pueden afectar al arbolado: <i>Cronartium quercuum quercuum</i> (roya esférica), suele atacar árboles de pino, causa agallas en ramas y troncos que provoca la muerte de los árboles. <i>Cronartium conigenum</i> (roya agalladora de los conos), suele causar mortalidad severa en los pinos, ataca conos y follaje. <i>Coleosporium</i> spp. (roya de las acículas del pino), su presencia hace susceptibles a los árboles del ataque de insectos descortezadores (Hawksworth, 1987; Reséndiz, 1991; Kubisiak <i>et al.</i> , 2004). <i>Melampsorella caryophyllacearum</i> (roya de la escoba del oyamel), afecta a <i>Abies religiosa</i> , ocasiona reducción del crecimiento, hipertrofias y muerte de las ramas (Hawksworth y Cibrián, 1985).

continúa...

<i>Tipo de hongo parásito</i>	<i>Especies de hongos parásitos y sus hospederos</i>
<p>Hongos que ocasionan enfermedades de la raíz. Las enfermedades de la raíz suelen afectar a individuos adultos y su diagnóstico es difícil, por lo que una vez infectado el árbol generalmente está cerca de la muerte. El manejo de estas enfermedades se basa en la poda de las raíces infectadas (Martínez y Sánchez, 1980; Chio <i>et al.</i>, 1989; Alvarado y Bauer, 1991; Rolando, 2000; Jonhk <i>et al.</i>, 2005).</p>	<p>Entre los parásitos importantes destacan: <i>Armillaria gallica</i> y <i>Heterobasidium annosum</i>, cuya evidencia de daño en las poblaciones de oyamel es conocida como “círculo de la muerte”, ya que origina el deceso acelerado del arbolado joven y la reducción en el crecimiento de árboles adultos, facilitando con ello la infestación por <i>Scolytus mundus</i> (Cibrián e Íñiguez, 2001).</p>
<p>Hongos que ocasionan la pudrición de árboles vivos. Los hongos que causan la pudrición de árboles vivos, atacan con alta incidencia individuos viejos o con severos daños ocasionados por los incendios del bosque (Cibrián e Íñiguez, 2001).</p>	<p>Dentro de esta categoría es posible mencionar: <i>Porodaedalea pini</i>, <i>Phellinus coronadensis</i>, <i>P. hartwegii</i>, <i>P. rimosus</i>, <i>Inonotus fulomelleus</i>, <i>I. tomentosus</i> (Valenzuela <i>et al.</i>, 2013) son hongos que producen la pudrición del corazón de la madera de diversas especies de pino. <i>Fomitopsis pinicola</i> es de los más extendidos, produce la pudrición de los abetos (<i>Abies religiosa</i>) que estuvieron sujetos a lesiones severas, así como en tocones y troncos de árboles derribados.</p>

Fuente: elaboración propia con base en los autores citados.

INSECTOS

Los organismos más perjudiciales para los ecosistemas forestales de coníferas son los insectos (pertenecientes a los taxa Coleoptera, principalmente y Lepidoptera de manera secundaria) que se alimentan del floema y del cambium, debido a las grandes fluctuaciones poblacionales tan comunes en los insectos, en comparación con otros organismos parásitos que son poco móviles (Zobel y Talbert, 1998; Salle *et al.*, 2008). En el Cuadro 3.2 se describen los más importantes para pinos y oyameles en el Estado de México.

Cuadro 3.2
Insectos que parasitan pino y oyamel en el Estado de México

<i>Tipo de insecto parásito</i>	<i>Especies de insectos parásitos y sus hospederos</i>
Insectos que afectan conos y semillas. Limitan la cantidad de semillas viables, pero no afectan el crecimiento de los árboles. Las larvas de algunos lepidópteros llegan a causar muerte o deformación en conos y semillas.	En este grupo se encuentran: <i>Leptoglossus occidentalis</i> , <i>Dioryctria erythropasa</i> , <i>Cydia</i> spp., <i>Apolychrosis synchysis</i> que mata los conos en <i>A. religiosa</i> (Cibrián, 1975; Cibrián <i>et al.</i> , 1986).
Insectos que se alimentan de brotes y yemas. Estos insectos causan la muerte de yemas, deformación del fuste y/o reducción de crecimiento con respecto a la altura de los árboles.	Los pinos son los más afectados por larvas de lepidópteros. Pertenecen a este grupo: <i>Phityophthorus aztecus</i> , <i>Eucosoma sonomana</i> , <i>Rhyacionia cibriani</i> (este lepidóptero sólo ha sido registrado para <i>P. hartwegii</i>), <i>Retinia edemoidana</i> , varios tortricídios (Tortricidae), y <i>Contarinia</i> spp. (Wood, 1982; Miller, 1988).
Insectos defoliadores. Son conocidos como esqueletonizadores debido a que se alimentan de las partes blandas del follaje, dejando las venas de las hojas.	Entre los defoliadores se encuentran: <i>Eusattodera rugosa</i> , <i>Pandeleteius viridiventrís</i> parasita a <i>P. hartwegii</i> , <i>Evita hyalinaria blandaria</i> provoca disminución en el vigor de los oyameles (Cibrián <i>et al.</i> , 1980; O'Brien, 1989; Hernández, 1990).
Insectos chupadores de savia. Causan daños severos a los árboles al alimentarse directamente de su savia. Los daños son considerables, dependiendo del estadio y la especie.	Destacan en este grupo: <i>Cinara curvipes</i> , que causa problemas graves al oyamel. <i>Pineus</i> sp.y <i>Chionaspis pinifoliae</i> que causan severos daños a los pinos (Ferris, 1954; Furniss y Carolin, 1977; Johnson y Lyon, 1991).
Insectos formadores de agallas. La mayoría de los insectos que entran en este grupo son avispas y mosquitos, cuya alimentación causa el desarrollo de formaciones tumorales (agallas).	<i>Thecodiplosis</i> sp. ataca árboles jóvenes de <i>P. hartwegii</i> (Gagné, 1989; Bugbee, 1981).
Insectos que se alimentan de floema y corteza. Los insectos que se alimentan de floema y cambium constituyen el grupo de mayor impacto negativo en sanidad forestal. Entre ellos destacan, por los severos daños que ocasionan, los descortezadores (Alatorre, 1977).	A. Descortezadores en pinos El género <i>Dendroctonus</i> , del cual se tienen reportados: <i>D. mexicanus</i> , <i>D. adjunctus</i> , <i>D. approximatus</i> , y <i>D. valens</i> . Todos ellos atacan, principalmente, a especies forestales de alta montaña como <i>P. hartwegii</i> , <i>P. montezumae</i> , <i>P. seudostrobus</i> , y <i>P. ayacahuite</i> (Cibrián <i>et al.</i> , 2000).

continúa...

<i>Tipo de insecto parásito</i>	<i>Especies de insectos parásitos y sus hospederos</i>
	Algunas especies como <i>D. mexicanus</i> y <i>D. adjunctus</i> suelen beneficiarse de la relación simbiote que establecen con hongos de los géneros <i>Ceratocystosy</i> y <i>Ophiostoma</i> , respectivamente. El género <i>Ips</i> se encuentra distribuido en diferentes ecosistemas del país y suele competir con las especies de <i>Dendroctonus</i> (Barras y Perry, 1971; Salle <i>et al.</i> , 2008).
B. Lepidópteros en pinos	Destaca la especie <i>Synanthedon cardinalis</i> , cuyas poblaciones son abundantes en el centro del país, en arbolado maduro, denso y con poblaciones de muérdago enano. Generalmente no causa la muerte de los pinos ya que no tiene simbiosis con algún hongo, pero sí conduce al debilitamiento de los árboles atacados debido a los hábitos alimenticios de las larvas (Beutelspacher, 2012 Hernández, 1983; De la Meza, 1987).
C. Descortezadores en abetos	Para el caso de <i>Abies religiosa</i> destaca la especie <i>Pseudohylesinus variegatus</i> , que infesta árboles jóvenes o sobremaduros, se asocia con otros insectos secundarios como <i>Scolytus mundus</i> y <i>Pityophthorus blackmani</i> y <i>P. elatinus</i> (Hernández y Cibrián, 1981).

Fuente: elaboración propia con base en los autores citados.

De manera general, las especies forestales pueden presentar tres tipos de resistencia a los insectos: 1) No preferencial, en el cual el insecto no es atraído para alimentarse y ovipositar en el árbol; 2) Antibiosis, en la cual el insecto es destruido, dañado o se evita que complete su ciclo vital y 3) Tolerancia, en la cual el hospedero se recupera del ataque del insecto. En el ámbito forestal, los insectos se clasifican por la estructura del árbol que dañan o por los daños causados sobre la madera (Cibrián *et al.*, 2000).

Como se ha señalado, los insectos que se alimentan de floema y cambium, particularmente los descortezadores, son los de mayor impacto negativo en sanidad forestal (Alatorre, 1977).

Estos parásitos traen graves consecuencias para los bosques, la principal es la pérdida de macizos forestales, en el APFFNT se han presentado fuertes infestaciones, sobre todo en el bosque de pino, entre 1985 y 1990 se registraron 7 846 ha infestadas,

de las cuales se extrajeron más de 50 000 m³ de maderas muertas por el descortezador. De 1982 a 1996 fue extraída 200 000 m³ de madera de *P. hartwegii* en el Parque Nacional Nevado de Colima (Carranza, 1999). En el 2010 la delegación de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales en el Estado de México reportó un total de 1 245 m³ de madera de pino y oyamel infestados en cinco predios de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca (Garduño, 2011). Endara *et al.* (2012) determinaron 106 puntos de muestreo donde hay presencia de descortezador en la zona cercana al cráter con vegetación principal de pino fragmentado.

Descortezadores y sus hongos simbiosntes en pinos

El orden coleoptera es el más grande de los insectos y su característica más distintiva es la estructura de las alas, el par anterior de éstas, los élitros, están engrosados, coriáceos o duros y se unen para formar una línea recta en el abdomen y cubrir a las alas posteriores, las cuales se encuentran dobladas. La familia Scolytidae es la más importante, ya que los organismos pertenecientes al taxa hacen sus galerías debajo de la corteza, los adultos son cilíndricos de color oscuro, con estrías en los élitros y frecuentemente una depresión en el área posterior. Las larvas son blancas y ápodas. Esta familia contiene a los descortezadores (Atkinson y Equihua, 1988; Cibrián *et al.*, 2000).

El género más importante que tiene afectación en pinos es *Dendroctonus*, del cual se han reportado 11 especies para México. En cuanto a sus características físicas, el género es reconocido por una tonalidad café oscuro a negro, aunque en algunas excepciones se presenta un tono rojizo. Los ojos son ovales y enteros. Las antenas tienen un funículo formado por cinco segmentos, que dan base a una clave aplanada y subcircular que lleva tres suturas marcadas por setas. La cabeza es visible desde la vista dorsal. El cuerpo es cilíndrico con un pronoto más ancho que largo. Los élitros tienen estrías e interestrías con granulaciones y terminan en un declive elitral convexo y cubierto con setas que según su tamaño y abundancia, permiten identificar a las especies (Cibrián *et al.*, 2000).

De manera general, las hembras de este género seleccionan a los árboles que van a infestar basados en claves genéticas. Estas hembras pioneras perforan la corteza hasta llegar al floema, donde liberan feromonas y hormonas de agregación que atraen a

los machos y a más hembras. El árbol infestado de manera inicial secreta grumos de resina para ahogar a las hembras y su emisión de hormonas. Si esto no sucede, los machos alcanzarán a las hembras para la cópula. Las hembras ovipositarán y las larvas emergerán y sufrirán metamorfosis a pupa y posteriormente a adultos (Chansler, 1967; Vargas *et al.*, 2002).

El número de ciclos de vida varía según la especie; y algunas como *D. mexicanus* y *D. adjunctus* se ven beneficiadas por la simbiosis que tienen con hongos de los géneros *Ceratocystis* y *Ophiostoma*, respectivamente. Estos hongos germinan con rapidez y producen hifas que se desarrollan de manera acelerada y crecen en el interior de la albura de la madera y en el floema. El micelio de estos hongos bloquean los conductos de resina y las traqueidas transportadoras de agua, lo cual genera óptimas condiciones de vida para los descortezadores en todas sus etapas (Barras y Perry, 1971; Salle *et al.*, 2008).

Los daños que originan los descortezadores se ven reflejados en el amarillamiento de las hojas, la disminución en la calidad de la madera y la muerte del árbol. Los ataques son generalmente en manchones de árboles de edad avanzada, con baja densidad principalmente por deforestación, sometidos a incendios y debilitados por el exceso de gases oxidantes. El *D. adjunctus*, *D. mexicanus* y *D. parallelocollis* causan la muerte de los árboles, contribuyendo a la deforestación de regiones completas en el centro del país. *D. adjunctus* es la especie que provoca mayor mortalidad de coníferas a altitudes mayores a 2 800 msnm. *D. approximatus* y *D. valens* son insectos secundarios que no tienen tales efectos (Ascencio y Serrato, 1984). El manejo que se da a los bosques infestados por descortezador se limita al corte y la aplicación de pesticidas.

El género *Ips* también se encuentra distribuido en diferentes ecosistemas del país. Algunas de sus especies son plagas que causan considerables muertes de árboles y merman la calidad de la madera; por lo que es un género competidor de las especies de *Dendroctonus*. A diferencia de estos últimos, en el género *Ips* son los machos los que colonizan los árboles y cavan una galería donde llegarán las hembras para copular y ovipositar. Este género tiene importancia media, ya que está involucrado en la muerte de los árboles, el manchado de la madera, la transmisión de patógenos y en ocasiones la disminución de las poblaciones de *Dendroctonus* (Atkinson, 1982).

En el APFFNT el descortezador *D. adjunctus* es la principal plaga de insectos en bosque de pino semidenso, se observó que el ataque del descortezador es posterior al ataque del muérdago enano (Endara *et al.*, 2013).

Descortezadores en abetos

Para el caso de *Abies religiosa* se encuentran los insectos *Pseudohylesinus variegatus* cuya colonización comienza con las hembras que son alcanzadas por los machos para realizar la cópula y ovipositar. Los árboles que son infestados pueden ser jóvenes o sobremaduros, estos insectos pueden causar la muerte de su hospedero y generalmente se asocian con otros insectos secundarios como *Scolytus mundus* y *Pityophthorus blackmani*. Los árboles susceptibles pertenecen a poblaciones con declinaciones de oyamel y aumento en la contaminación aérea (Aguirre y Bernal, 1988). *P. blackmani* y *P. elatinus* originan la muerte de árboles jóvenes de oyamel que han sufrido daño por incendios o se han debilitado como consecuencia de sequías y competencia con otros árboles (Hernández y Cibrián, 1981).

El insecto *S. mundus* coloniza a su hospedero mediante las hembras, las cuales cavan las cámaras nupciales para ovipositar. La importancia de esta especie radica en su asociación simbiótica con un número vasto de organismos como los cléridos *Enocleru sarachnodes*, los ostómidos *Temnochila*, los parasitoides *Ecphyllus*, *Coeloides* y *Cecidostiba*, así como los ácaros *Pyemotes*. *S. mundus* es una plaga de afectación importante para los oyameles del centro del país; causa daños de carácter estético en los parques nacionales, aumenta el riesgo de lesión a personas por la muerte de las ramas y origina la disminución de semillas, con lo cual afecta la regeneración natural (Hernández y Cibrián, 1981; Cibrián *et al.*, 1993).

En el APFFNT fue identificada la presencia de *P. variegatus* en la ladera norte del Nevado (datos no editados).

PLANTAS PARÁSITAS

Las plantas son comúnmente conocidas por ser autótrofas, esto hace que por lo general se ignore que muchas de ellas reemplazan este tipo de nutrición por la heterotrofia: algunas son carnívoras, otras fijan nitrógeno y otras son parásitas. Estas últimas establecen una conexión directa con el xilema o el floema (o ambos) del hospedero por medio de raíces modificadas llamadas haustorios. Las plantas que utilizan haustorios se consideran holoparásitas (no fotosintetizan) y hemiparásitas (fotosintetizan) (Vidal y Nickrent, 2008).

Los muérdagos son plantas con flor (angiospermas) que pertenecen al orden Santalales dentro del cual se encuentran tres familias que destacan por ser parásitos aéreos de especies forestales: Misodendraceae (cuyos miembros parasitan árboles del género *Nothofagus* spp. o hayas del sur), Loranthaceae (la familia más diversa y que contiene a los llamados muérdagos verdaderos) y Viscaceae que incluye a los organismos llamados comúnmente muérdagos enanos y se distribuye en América del Norte y Central, a esta última familia pertenece el género *Arceuthobium* spp. (Nickrent y Musselman, 2004; Wilson y Calvin, 2006; Vidal y Nickrent, 2008).

En México, las plantas parásitas se presentan en casi todos los ecosistemas naturales, constituyen el tercer agente de destrucción de bosques templados después de los incendios e insectos descortezadores. Por efecto del parasitismo de estos muérdagos se pierde un volumen promedio maderable de 1.04m³/ha.año, lo que representa una pérdida anual a nivel nacional de cerca de 2 millones de m³ de madera en rollo (Vázquez *et al.*, 2006).

Esta sección se enfocará en la familia Viscaceae que incluye a las plantas hemiparásitas conocidas como muérdagos enanos.

Los muérdagos enanos (Cuadro 3.3) son un grupo muy diverso, usualmente utilizan el parasitismo aéreo y poseen frutos cubiertos por una capa. Su distribución geográfica es muy amplia y tienen como hospederos a un grupo extenso de coníferas y otras plantas maderables. Los muérdagos, en algunos lugares son considerados seriamente como plaga ya que ocasionan grandes pérdidas forestales (Geils *et al.*, 2002).

Cuadro 3.3
Plantas que parasitan pino y oyamel en el Estado de México

<i>Tipo de planta parásita</i>	<i>Especies de plantas parásitas y sus hospederos</i>
Muérdagos enanos (familia Viscaceae)	La familia Viscaceae incluye a las plantas hemiparásitas conocidas como muérdagos enanos que corresponden a especies del género <i>Arceuthobium</i> y afectan a pinos (<i>A. globosum</i> y <i>A. vaginatum</i>) y oyameles (<i>A. abietis-religiosae</i>) (Cibrián <i>et al.</i> , 2007).
Muérdagos verdaderos (familia Loranthaceae)	En los bosques de pino el muérdago verdadero (<i>Psittacanthus macrantherus</i>) representa un gran problema de tipo económico por los daños que causa a la madera, sus infecciones son severas y a menudo rebasan la importancia de las causadas por los muérdagos enanos (Cibrián <i>et al.</i> , 2007).

Fuente: elaboración propia con base en los autores citados.

Los muérdagos enanos afectan a las familias Pinaceae y Cupresaceae. En México, 21 especies son parásitos de *Abies*, *Pinus* y *Pseudotsuga* (18 en pinos, 2 en oyamel y 1 en abeto de Douglas). Cabe mencionar a dos de las especies que afectan a pinos con extendida incidencia en bosques de alta montaña: *A. globosum* y *A. vaginatum*, que tienen dos subespecies cada una. Por lo general, son plantas pequeñas, de menos de 30 cm, aunque hay algunas que rebasan los 100 cm de altura; tienen hojas reducidas a pequeñas escamas y sus tallos son quebradizos con nudos gruesos y presentan coloraciones que varían de verde a amarillo, café, rojo o negro; las inflorescencias femeninas son opuestas formadas por dos flores, las masculinas son trímeras. Los frutos son de dos colores y tienen un mecanismo único de dispersión explosiva de semilla, de gran velocidad que permite a la semilla viajar a una distancia máxima de 17 m, son ovoides y la mayoría con un pedicelo que a la madurez del fruto se curva para liberar la semilla (Geils *et al.*, 2002).

Los muérdagos enanos tienen un sistema endofítico altamente desarrollado compuesto por dos partes: una ubicada en el floema del hospedante, donde se encuentra el sistema cortical y está formado por tejido conectado al sistema conductor de savia elaborada, otra, en el xilema, donde se encuentran los haustorios insertados en la madera, los cuales absorben agua y minerales (Cibrián *et al.*, 2007).

Estas plantas constituyen componentes naturales importantes de los bosques, sin embargo, al clareo de los mismos propicia su propagación excesiva, originando que los daños provocados a los árboles sean mucho más serios. Así, la competencia por nutrientes y agua entre parásito y hospedero es lo que puede ocasionar la muerte de un árbol, ya que sus altas tasas de transpiración reducen los potenciales de retención y transporte de agua del xilema (promovido por la acumulación de solutos osmóticamente activos en los tejidos del muérdago) de las ramas, lo cual reduce las tasas netas de fotosíntesis.

Los efectos más comunes de los muérdagos sobre sus hospederos son reducción del crecimiento, pérdida de vigor y, consecuentemente, una disminución en la producción de semillas y frutos, dejando al hospedero susceptible a ataques secundarios por descortezadores. Además, han sido asociados con sitios pobres y rodales muy viejos, pero en ocasiones son abundantes en rodales jóvenes (Zobel y Talbert, 1998; Mathiasen *et al.*, 2008).

El ciclo de vida de los muérdagos enanos se distingue por el parasitismo obligado y una dispersión hidrostáticamente controlada en el fruto que ocurre en forma de explosión; aves y mamíferos también son importantes para la dispersión aunque en

menor grado, sobre todo a grandes distancias. Las características morfológicas que facilitan la dispersión del fruto son la presencia de células viscosas y el pedicelo del fruto, cuando éste madura el pedicelo se elonga y crece la presión hidrostática, con la separación del fruto del pedicelo la semilla puede ser expulsada a una velocidad de 24 m/s y cae en un vuelo balístico hasta que la semilla se pega en una superficie, que logra alcanzar una distancia de hasta 15 m. La dispersión empieza cuando el fruto maduro descarga su semilla en forma explosiva, posteriormente el establecimiento incluye la germinación de la semilla hasta que se inician las relaciones parasíticas. La incubación puede llevar muchos años durante los cuales se desarrolla, bajo la madera del hospedero, el sistema endofítico. El endospermo posee clorofila que ayuda a mantener vivo al embrión. Con el establecimiento del sistema endofítico comienza el parasitismo, expandiéndose por el córtex y penetrando al xilema. El periodo de incubación puede durar de 2 a 12 años dependiendo de la especie. Aun cuando los brotes aéreos ya estén presentes, el sistema endofítico sigue desarrollándose, los efectos patológicos de una infección se hacen evidentes por la presencia de “escobas de bruja”. Transcurridos de 1 a 2 años inicia la producción de flores, la maduración de frutos requiere un año más (Geils *et al.*, 2002; Cibrián *et al.*, 2007).

Dentro del APFFNT los bosques de coníferas están seriamente amenazados por el aumento de las poblaciones de muérdago enano (aproximadamente un 20%), tal infestación se ha visto favorecida por las actividades antrópicas realizadas en el área, especialmente por la extracción de madera. Hasta el momento se encuentran descritas tres especies que parasitan a pinos y oyameles en el APFFNT (Candean y Franco, 2007), a saber:

Arceuthobium globosum

Es uno de los muérdagos con distribución más amplia en México. Sus infecciones son de gran importancia puesto que afectan cientos de hectáreas de bosques. Muchas de las ANP que se encuentran a altitudes mayores a 2 500 msnm mantienen infecciones severas por esta especie (Figura 3.1). Como resultado más común de la infección se observa una inhibición en el crecimiento de los árboles, dependiendo de la intensidad; aunque a veces no resulta evidente. Este muérdago puede producir la muerte de los árboles, sin embargo, la situación más común es la reducción del vigor en forma

tan marcada que los árboles caen presa de los descortezadores, en particular de los géneros *Dendroctonus* y *Synanthedon*. La madera infectada tiene traqueidas más cortas y distorsionadas, así como una proporción mucho mayor de tejido radial de madera en la que la resistencia y las características de la pulpa se reducen. Otro efecto marcado aunque no cuantificado es el incremento del tamaño de los nudos de los árboles infectados (Cibrián *et al.*, 2007).

Los muérdagos de esta especie son plantas con tamaño promedio de 18-50 cm, pero algunas alcanzan hasta 70 cm de altura, salen de ramas o fustes con el diámetro de los brotes dominantes de 10-48 mm. Los brotes pueden ser verdes o amarillos, su ramificación es flabelada. Las flores masculinas y femeninas son de pequeña dimensión y no conspicuas; las primeras están divididas en tres o cuatro secciones y cada una tiene una antera sécil que contiene polen amarillo, en la base existe un órgano similar a nectario. Las flores femeninas son más pequeñas y también contienen un nectario. El fruto es globoso de 6-7 mm de longitud y 3.5 mm de diámetro, éste puede ser de color verde claro o grisáceo. Son plantas dioicas aunque generalmente los ejemplares masculinos y femeninos ocurren en el mismo árbol (Geils *et al.*, 2002; Cibrián *et al.*, 2007).

Figura 3.1

Arceuthobium globosum sobre tronco de *Pinus hartwegii* en el APFFNT



Fotografía de Amaury Martín Arzate Fernández.

Arceuthobium vaginatum

Se le considera el muérdago más importante de México, las infecciones que produce impactan áreas forestales bajo cualquier régimen de manejo como parques nacionales o las reservas protegidas (Figura 3.2). Los daños que provoca van desde la alteración de la forma, reducción de crecimiento, vigor y calidad de madera, hasta la muerte. Las estructuras aéreas son de color café muy oscuro a veces verdoso o rojizo-oscuro, presentan 20 cm como altura media de brotes, máximo 55 cm y 4-20 mm de diámetro. Los frutos maduros miden 5.5 mm de largo y 3.5 mm de diámetro. Los brotes tienen ramificación dicotómica, tallos delgados, filiformes, glabros; hojas reducidas a escamas y sin clorofila. Las flores masculinas están desnudas con perigonio tripartido, anteras sésiles y dehiscencia transversal; las flores femeninas, también desnudas, tienen el perigonio bipartido cuyos nectarios son de colores atractivos. La semilla es mucilaginosa lo que le permite adherirse a cualquier superficie. Las plantas femeninas y masculinas generalmente se encuentran en el mismo hospedante. Las infecciones se presentan en árboles de diferentes edades, desde regeneración de pocos años hasta árboles sobremaduros. Es común que estos muérdagos infecten ramas de árboles jóvenes por efecto de las fitohormonas que liberan las plantas parásitas (Cibrián *et al.*, 2007).

Ambas especies *A. globosum* var. *grandicaule* y *A. vaginatum* var. *vaginatum* se encuentran en el APFFNT, con un aumento de 2010 a 2014 de 3 410 ha a 9 308 ha de infestación. Estos muérdagos se localizan en las laderas oeste, noroeste, suroeste y este del APFFNT con una predominancia en bosque semidenso del 20.3% total de sus poblaciones (3 586 ha) debido a que son zonas donde hay mayor captación de luz (CONANP, 2014, Endara *et al.*, 2012).

Figura 3.2

Arceuthobium vaginatum sobre ramas de *Pinus hartwegii* en el APFFNT



Fotografía de Amaury Martín Arzate Fernández.

Arceuthobium abietis-religiosae

Es el muérdago de mayor importancia en los bosques de oyamel del centro de México. Afecta severamente árboles de gran tamaño que sirven como sitio de hibernación de la mariposa monarca (*Danaus plexippus* L.) en Michoacán y Estado de México. En el APFFNT parasita a *Abies religiosa* (Figura 3.3) (Urquhart y Urquhart, 1976).

La planta madura alcanza una altura promedio de 10 cm, aunque algunas llegan a medir hasta 16 cm, son de color verde olivo con tonalidades oscuras, algunas plantas pueden tomar una coloración café o verde oscuro. Los frutos son pequeños de 3.5 mm de largo y 2 mm de ancho con los mismos colores de los brotes aéreos pero con tonos más oscuros. Las flores masculinas se encuentran de dos a cuatro por nudo, tienen 2 mm de largo y 2.4 mm de diámetro, con tres segmentos en el perianto. Las flores femeninas miden 1 mm de largo y 0.5 mm de ancho (Cibrián *et al.*, 2007).

Figura 3.3

Arceuthobium abietis-religiosae sobre ramas de *Abies religiosa* en el APFFNT



Fotografía de Amaury Martín Arzate Fernández.

Las infestaciones por este muérdago pueden ser de carácter sistémico, éstas no presentan dilataciones de las ramas o fuste en la parte donde salen los brotes vegetativos, más bien el sistema endofítico se encuentra distribuido a lo largo de una parte o de toda la planta y estará emitiendo en los nodos de los nuevos brotes de crecimiento del oyamel, brotes que formarán otras plantas de muérdago. En el caso de las no sistémicas, el sistema endofítico está restringido a una pequeña parte del floema y la albura, el área infectada de la rama se dilata y forma un tumor. Las infestaciones se presentan en árboles de todas las edades desde brinzales hasta árboles sobremaduros. Las consecuencias de la infección en rodales sobremaduros se presenta la muerte de puntas, deformaciones de las ramas y troncos y pérdida de vigor, con el consecuente incremento en la susceptibilidad al ataque por insectos descortezadores, principalmente *Scolytus mundus* (Geils *et al.*, 2002; Cibrián *et al.*, 2007). En el APFFNT se distribuye en las laderas noroeste y suroeste, afectando un promedio de 1 466 ha en bosques de oyamel denso (Endara *et al.*, 2012).

4. DIVERSIDAD GENÉTICA PARA LA CONSERVACIÓN DE CONÍFERAS

INTRODUCCIÓN

Debido en gran parte a los efectos de las actividades antrópicas, la diversidad de los seres vivos ha ido en un detrimento paulatino, ya que muchas especies se encuentran amenazadas o en peligro y, en el peor de los casos, ya se han extinguido. Muchos han sido los estudios destinados a comprender los procesos ecológicos y evolutivos por los que atraviesan las especies, y así tratar de proponer estrategias de conservación que sean exitosas (Solomon *et al.*, 2001).

La Convención de la Diversidad Biológica (CBD) reconoce tres niveles de diversidad biológica: ecosistemas, especies y genes, en este último es donde se abordan los temas de diversidad genética, la cual es fundamental para el entendimiento de la diversidad biológica, la persistencia y el potencial evolutivo de las especies (adaptación, adecuación y especiación). Es preciso acotar que la pérdida de diversidad genética puede llevar a un proceso de desequilibrio entre las especies para luego colapsar un sistema completo, pese a ello, las naciones tienen una deficiente capacidad de organización para realizar acciones tendientes a proteger dicha diversidad (Solomon *et al.*, 2001; Rocha y Gasca, 2007; Laikre *et al.*, 2009).

Se pueden mencionar dos estudios en poblaciones de *P. hartwegii*, una en el Cofre de Perote, Veracruz (Andreu y Rodríguez, 2007) y otra en Michoacán (Viveros *et al.*, 2010), en las que se realizaron estudios con isoenzimas; en el estudio de Cofre de Perote se detectaron 29 isoformas que aportaron 86.2% de diversidad genética intrapoblacional. En el trabajo de Viveros *et al.* (2010) se encontró una heterocigosidad de 0.12, flujo génico bajo ($Nm = 2.0$), concluyendo la separación genética de una de las tres poblaciones muestreadas, la cual se sugiere debe ser una unidad de conservación de recursos genéticos forestales con un tamaño mínimo de población de 4 157 individuos para mantener la población y sus recursos genéticos.

Es importante mencionar que la mayoría de especies prioritarias se han propuesto a partir de un concepto tipológico, lo cual ha provocado que no se considere la diversidad real dentro de las especies, ni la variación geográfica, ni la posibilidad

de mantener su potencial evolutivo (Rojas, 1992), por lo tanto, la estructura poblacional ha tenido una repercusión más importante que la de especie en los modelos de biología y genética de poblaciones. En la actualidad se trabaja a nivel de metapoblación que se refiere casi a cualquier población estructurada espacialmente, aunque según Levins (1969) se refiere al conjunto de poblaciones inestables, que ocupan parches o segmentos de hábitats discretos, que varían en área, grado de aislamiento y calidad y cantidad de los recursos que requiere dicha especie, es decir, un mosaico cambiante de poblaciones temporales interconectadas por algún grado de migración. Es así como persiste por un balance entre las “muertes” (extinciones locales) y los “nacimientos” (establecimiento de nuevas poblaciones en sitios desocupados previamente) (Hanski, 1998). En las metapoblaciones los eventos de extinción son recurrentes, y no eventos únicos y aislados, lo que permite comprender mejor este complejo fenómeno.

Tomando en cuenta lo anterior se infiere que para medir, interpretar y comprender los niveles y eventos de variación genética se requiere un entendimiento de las fuerzas evolutivas (mutación, selección) en la genética de poblaciones. La mutación, en primer término, porque toda variación genética se origina en gran parte por ésta (Ledig, 1998), y en segundo término, la selección (que consiste en la reproducción y sobrevivencia diferencial de genotipos diferentes, en donde los genotipos con mayor adecuación son los que producen más progenie, pasando más copias de sus genes a las generaciones posteriores), puesto que es un mecanismo evolutivo que genera un cambio en las frecuencias relativas de los fenotipos/genotipos, de acuerdo con su adaptación relativa dentro de la población (Furnier y Eguiarte, 1997; Castillo, 2007).

En términos generales se puede decir que la conservación es un proceso de reducción de la presión sobre los recursos, y una de sus líneas de acción es mediante el manejo genético (Furnier y Eguiarte, 1997).

La genética puede contribuir a la biología de la conservación forestal, al menos por tres razones (Groom *et al.*, 1997; Zobel y Talbert, 1998; Iglesias *et al.*, 1997):

- a) La teoría de la selección natural refiere que el intervalo de evolución en las poblaciones es proporcional a la cantidad de diversidad genética disponible.
- b) Existe una regla de que entre las poblaciones heterocigóticas hay una relación positiva con respecto a su adecuación, es decir, poblaciones con mayor diversidad genética se adaptan mejor a cambios.
- c) La diversidad de la poza genética global es la responsable de todos los procesos biológicos del planeta.

La pérdida de variabilidad genética conduce a los individuos a decrecer su respuesta de adecuación (supervivencia de los individuos y su éxito reproductivo) al ser responsable de la presencia de características diferenciales en cada individuo, únicas e irrepetibles; conjuntamente es necesaria para contrarrestar el riesgo de la vulnerabilidad a plagas y factores ambientales adversos y para preservar los complejos de genes adaptados (Groom *et al.*, 1997; Zobel y Talbert, 1998; Iglesias *et al.*, 1997).

Si hay pocas diferencias en los niveles de diversidad genética entre poblaciones la pérdida de cualquier población no es tan grave debido a que no se pierde una unidad genéticamente única, por otra parte, si las poblaciones son muy diferenciadas cada una representa un recurso único y se deben mantener más poblaciones en programas de conservación (Furnier y Eguiarte, 1997).

Así, el conocimiento de la diversidad genética fundamenta de manera más adecuada las estrategias que pueden utilizarse para la conservación de los recursos forestales, y establecer, por tanto, las estrategias *in situ* y *ex situ* para cada población con base en la poza genética (Molina *et al.*, 2001). En años recientes el problema de definir las prioridades de conservación ha recaído un poco más en el área de la sistemática para tratar de entender las “unidades evolutivas” que deben ser conservadas.

Las unidades evolutivamente significativas (ESU, por sus siglas en inglés), según la conceptualización de Ryder (1986), se refieren a las unidades poblacionales que merecen manejo propio y que tienen una alta prioridad de conservación. Estas unidades proporcionan una idea sobre los procesos evolutivos y la distribución de la diversidad genética (Fraser y Bernatchez, 2001).

De mucha utilidad ha sido la categoría de unidad de manejo (MU, por sus siglas en inglés), ya que ha servido para reconocer poblaciones demográficamente distintas que deben ser manejadas para asegurar la viabilidad de las ESU que son más grandes. Las ESU se han utilizado principalmente cuando se conoce la estructura poblacional actual y no la estructura histórica (Moritz, 1994).

Actualmente, una de las estrategias para proteger al menos parte de la riqueza de la diversidad genética entre y dentro de las especies mexicanas de pinos *in situ* es el establecimiento de redes de Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (UCRGF). Al respecto, se pretende que éstas contengan material genético que sea representativo de los rodales que permita mantener la diversidad genética y que se moldeen las poblaciones bajo las fuerzas evolutivas de manera natural (Sáenz *et al.*, 2003).

Como esa base, Albertos y González (2000) consideraron la importancia de la genética en la biología de la conservación en España, con especies vegetales de los géneros *Pinus*, *Abies*, *Juniperus*, *Tetraclinis* y *Taxus*. En ese estudio, analizaron aspectos ecológicos y moleculares para elaborar un inventario de los recursos genéticos de la zona de procedencia, fuentes semilleros, huertos semilleros, bancos clonales y bancos de semillas con miras a una conservación que considera las características ecofisiográficas y genéticas de las especies.

PARÁMETROS DE CUANTIFICACIÓN GENÉTICA

La diversidad genética es debida a variaciones en las secuencias del genoma, y en sentido amplio hace referencia al polimorfismo. Conceptualizando, se entiende por polimorfismo genético a la presencia en una población de dos o más alelos (formas alternativas de un gen) para un locus (lugar que ocupa un gen) dado. El grado de polimorfismo de una población es mayor en cuanto más individuos contenga, y está determinado por el número de alelos distintos existentes para un locus concreto y se refleja en el grado de heterocigosis de la población (Luque y Herráez, 2001).

El componente genético de la biodiversidad posee elementos estructurales, composicionales y funcionales. Dentro de los *elementos funcionales* se pueden mencionar el tamaño efectivo de la población, la heterocigocidad, polimorfismos, la heredabilidad y la existencia de generaciones sobrepuestas o que se traslapan. Los *elementos composicionales* están determinados por la diversidad alélica, la presencia de alelos raros y la frecuencia de alelos deletéreos. Por su parte, los *elementos funcionales* abarcan aspectos como el flujo génico, la depresión por endogamia, la deriva génica, mutación, la intensidad de selección y selección disgénica (Putz *et al.*, 2001).

Para el análisis de genética de poblaciones en coníferas, los parámetros que se consideran, de acuerdo con Berg y Hamrick (1997) y Furnier y Eguiarte (1997), son:

- **Ley de Hardy-Weinberg:** establece que en equilibrio, las frecuencias genotípicas y alélicas no se modifican en las generaciones sucesivas, es decir, la población no experimenta evolución.

- **Número de alelos (na):** es el cálculo de alelos por locus, considerados para loci monomórficos y polimórficos (1-3.0).*
- **Número de alelos efectivos (ne):** estima el recíproco de la suma de cuadrados de las frecuencias alélicas ($ne = \frac{1}{\sum p_i^2}$). Si los valores son similares a na, se puede asumir que son poblaciones con poca diferenciación en frecuencias alélicas (dos alelos), o bien que son más de dos alelos con frecuencias distintas (1-1.5).*
- **Diversidad genética (h):** es la sustracción de la unidad menos la suma de cuadrados de las frecuencias alélicas de todos los loci. Se correlaciona positivamente con ne (0.05-0.25).*
- **Índice de Shannon (I):** es la estimación del índice de información de Shannon como medida de diversidad genética.
- **Número y porcentaje de loci polimórficos [LP (%)]:** es el porcentaje de todos los loci que son polimórficos. Se deriva de las frecuencias alélicas y frecuentemente depende del tamaño de la población (23-79%).*
- **Heterocigosidad (H):** es la medida de variabilidad genética más simple y es ampliamente utilizada en genética poblacional. Su importancia radica en que cada heterocigoto lleva diferentes alelos, denotando la variabilidad existente.
 - * **Diversidad genética total (H_T):** es la suma de las medias de diversidad genética dentro de las poblaciones (H_S) y la diversidad genética entre poblaciones (G_{ST}).
 - * **Diversidad genética dentro de las poblaciones (H_S):** mide la diferenciación genética que hay entre los individuos de cada población, con respecto a H_T .
 - * **Diversidad genética entre poblaciones (G_{ST}):** calcula la diferenciación genética que hay entre las poblaciones estudiadas, con respecto a H_t .
- **Flujo génico (Nm):** se basa en la estructura espacial de las poblaciones naturales y es una medida indirecta del número de migrantes por generación. Determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Los valores de $Nm \leq 1$ indican una fuerte diferenciación entre las subpoblaciones (deriva génica actuando independientemente en cada subpoblación) y aumentando la diversidad genética dentro de cada subpoblación; si $Nm \geq 1$ se infiere que las subpoblaciones se comportan como una sola población panmítica

* Valores típicos de estadística de diversidad genética medidos en especies de plantas.

y el flujo génico restringe el efecto de la deriva génica, incrementándose la diversidad genética. De acuerdo con Wright (1984), un buen flujo genético lo componen 10 migrantes por generación.

- **Deriva génica:** es un proceso aleatorio particularmente importante en poblaciones pequeñas que consta de cambios al azar en las frecuencias alélicas y causa diferenciación entre poblaciones (Furnier y Eguiarte, 1997). Un alelo puede eliminarse de una población al azar, independientemente si el alelo es benéfico o perjudicial, de modo que la deriva génica reduce la variación genética dentro de una población, aunque tiende a incrementar las diferencias genéticas entre las distintas poblaciones (Solomon, 2001).
- **Distancia genética (DG):** es una medida que indica la diferencia del material genético entre distintas especies o individuos de la misma especie. Al comparar el porcentaje de la diferencia entre los mismos genes de diferentes especies, una figura puede ser obtenida, la cual es una medida de la “distancia genética”. Dependiendo de la diferencia, la distancia genética puede ser usada como una herramienta para construir cladogramas que muestran el árbol genealógico de todos los seres vivos, suponiendo el algoritmo más elemental de la matriz de distancia genética de Nei (Nei, 1972), o UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic average, adoptado del procedimiento NEIGHBOR de la versión 3.5 de PHYLIP), basado en la matriz de distancia a partir de la cual se construye el dendrograma. Así, se considera que es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar de una población X sean idénticos (0-1). Así, cuando los individuos analizados presentan valores cercanos a cero se infiere mayor cercanía genética.
- **Heterogeneidad poblacional:** es una medida para analizar la estructura genotípica de una población, mediante la utilización de estadísticos F de Wright, que describen la estructura genética poblacional de organismos diploides. Ésta fue considerada para las isoenzimas, tomando en cuenta las siguientes medidas:
 - F_{IS} : es el coeficiente de consanguinidad, cuyos valores explican las variaciones de la heterocigosidad debido a apareamientos no aleatorios en la subpoblación y a posibles efectos selectivos. Su valor indica el grado de panmixia ($F_{IS} = 0$) o el grado de consanguinidad ($F_{IS} = 1$). Asimismo, indica los excesos o déficit de heterocigotos en la población de acuerdo con el signo que presenta su valor: si el valor es negativo da cuenta de un exceso de heterocigotos, y si es positivo, de un déficit de heterocigotos (Berg y Hamrick, 1997).

- F_{IT} : mide el grado de reducción de heterocigosis en un individuo en relación con la población total. Indica el grado de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas observadas con respecto a las esperadas, el grado de consanguinidad de un individuo en relación con la población total.
- F_{ST} : indica la diferenciación genética entre las poblaciones y su resultante siempre será un valor positivo. Explica los cambios en la heterocigosis debido a una subdivisión poblacional y deriva genética, estimando el grado de diferenciación existente entre las poblaciones.

MARCADORES GENÉTICOS

Para cuantificar la diversidad genética con los parámetros anteriores, se obtiene la información a través de marcadores genéticos. Un marcador genético es un carácter o un gen que debido al ligamiento puede usarse para indicar la presencia de otro gen; la importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de forestales y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés para fines de conservación (Simpson, 1997).

Dada la heterogeneidad de procesos, es común observar incongruencias entre los análisis basados en datos morfológicos y los basados en datos moleculares (Hillis y Wiens, 2000), lo que ha originado polémicas respecto a qué tipo de datos pueden proveer información adecuada para sustentar y probar hipótesis evolutivas.

Para los fines de este trabajo, los marcadores genéticos se dividen en morfológicos y moleculares, estos últimos a su vez se dividen en bioquímicos y los marcadores que se basan en DNA que permiten realizar estudios con diferentes genomas: mitocondrial, cloroplasto o núcleo (Simpson, 1997; USDA Forest Service, 2006).

Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos son los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que se identifican con un objetivo determinado, fueron los primeros utilizados por el hombre. La principal limitación de estos marcadores

es que la variación morfológica es fuertemente influenciada por el ambiente en que se desarrollan, además de que generalmente sólo se pueden identificar y medir en individuos completos o adultos (Nuez y Carrillo, 2000; Valadez y Günter, 2000).

Por ejemplo, en los árboles de pino se pueden usar como marcadores morfológicos el peso o tamaño de las semillas, pues se ha visto que dicha característica se asocia en la mayoría de las poblaciones con la supervivencia, el crecimiento y la reproducción (Azofeifa, 2006; Nuez y Carrillo, 2000).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier parte de material genético cuya presencia y/o ausencia permite un efecto cuantificable, pueden evaluarse en los individuos desde sus primeros estadios de desarrollo, en todo el individuo o sólo parte de él (Azofeifa, 2006). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997).

Marcadores bioquímicos o isoenzimáticos

Las isoenzimas son formas múltiples de una enzima presente en una especie, a causa de múltiples loci genéticos que codifican para distintas versiones de la enzima o por la presencia de múltiples alelos en un locus, como lo explican Harris y Hopkinson (1977):

- **Loci múltiples que determinan las isoenzimas:** en ocasiones dos, tres o cuatro loci génicos participan en la determinación de la estructura primaria. Estos loci codifican para cadenas polipeptídicas similares, pero estructuralmente distintas, lo cual se atribuye a la ocurrencia de la duplicación de genes, los cuales se presentan a lo largo de la evolución debido a la mutación de genes.
- **La ocurrencia de alelos múltiples en un locus particular:** en este caso cada alelo codifica una versión estructural distinta de una cadena polipeptídica. Consecuentemente la estructura cuaternaria de las isoenzimas implicadas será diferente de un individuo a otro.

De esta manera, el estudio de isoenzimas en las de plantas tienen las siguientes ventajas:

- a) Presentan herencia mendeliana y expresión codominante, por lo que los genotipos homocigotos y heterocigotos pueden ser distinguidos con mucha precisión.
- b) Muchos de sus loci son polimórficos, y casi cualquier especie presenta al menos uno o dos.
- c) Probablemente no están sujetas a fuerzas selectivas.
- d) La técnica es rápida y barata en comparación con otras (Dixon *et al.*, 1979; Pérez y Piñero, 1997; Becerra y Paredes, 2000; Lee *et al.*, 2002).

Marcadores de DNA

Los marcadores de DNA tienen como principales ventajas el que no son afectados por el ambiente, están presentes en cualquier estadio del individuo, permiten una detección temprana, son universales, son muy abundantes, se requiere poca cantidad de DNA para los análisis y estos son específicos para cada individuo. Las técnicas para identificar marcadores de DNA se pueden agrupar en tres categorías: las de hibridación tipo Southern, las de reacción de polimerización en cadena (PCR) y las que combinan PCR con la hibridación tipo Southern.

Amplificación de DNA al azar (RAPDs)

Los RAPDs son un ensayo de polimorfismo basado en la amplificación de segmentos aleatorios de DNA, utilizando varios oligonucleótidos (10 pares de bases). La técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido a lo largo del genoma (Otero *et al.*, 1997). Los polimorfismos detectados, que amplifican a partir de un progenitor, pero no de otro, son heredados de forma mendeliana (de dominancia) en 90% de los casos. Para realizarlo se necesitan pocas cantidades de DNA, no se utilizan sondas, ni hibridaciones y no es necesario conocer las secuencias. Producen un gran número de loci, por lo que son más representativos del genoma que las isoenzimas, y tienen mayor polimorfismo que los RFLP (Lee *et al.*, 2002; Kapteyn y Simon, 2002). Se han utilizado como marcadores MAS (Selección Asistida por Marcador) como una herramienta en programas de mejoramiento (Devey *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2006).

Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)

Son secuencias repetidas en tandem de 2 a 10 bases, representadas en muchos loci (Becerra y Paredes, 2000; Li *et al.*, 2002; Spooner *et al.*, 2005). El desplazamiento de la polimerasa durante la replicación de DNA o el deslizamiento de las cadenas, es la causa principal de la variación en el número de unidades repetidas de un microsatélite, dando como resultado el polimorfismo en el tamaño. Entre las ventajas de trabajar con microsatélites están la codominancia de alelos, su abundancia en el genoma en eucariotas, su distribución azarosa, la alta reproducibilidad y el hecho de que se pueden utilizar múltiples cebadores. Entre las desventajas se encuentra que no se pueden utilizar en grupos no estudiados y pueden originar alelos nulos por mutaciones, sin embargo, han sido detectados en el genoma de casi todos los organismos que se han estudiado, entre ellos numerosas especies de plantas (Arroyo *et al.*, 2002). Así, la información proporcionada será diferente dependiendo de si el genoma es nuclear, de mitocondria o de cloroplasto (Powell *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 2002; Navascués y Emerson, 2005; Azofeifa, 2006).

Secuencias simples repetidas ancladas (ASSR)

Son oligonucleótidos que se utilizan para obtener marcadores de tipo ISSR (inter-secuencias simples repetidas), es decir, secuencias localizadas entre dos microsatélites. La técnica tiene ventajas similares a las de los RAPDs (utilización de un solo iniciador específico) y además es posible encontrar altos niveles de polimorfismo (Fisher *et al.*, 1996; Yamagishi *et al.*, 2002; Sarla *et al.*, 2005).

Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

El término SNP designa el sitio de un nucleótido de una secuencia dada que presenta sustituciones de manera significativa entre individuos, tienen amplia distribución en el genoma, los polimorfismos que incluyen inserción-delección no pertenecen a esta técnica (Tanksley *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2015).

Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Es una técnica muy sofisticada que consiste en tres pasos: 1) en la digestión de DNA por dos enzimas de restricción con sitios de reconocimiento cada 4 a 6 bases y una unión cohesiva con los extremos y la agregación de una secuencia conocida de 20 bases en los extremos de los fragmentos; 2) la amplificación selectiva de combinaciones de los fragmentos de restricción; 3) el análisis electroforético de los fragmentos amplificados (Tanksley *et al.*, 1989; Azofeifa, 2006).

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La técnica consiste en amplificar DNA mediante la PCR y digerir los fragmentos con una o varias enzimas de restricción, teniendo sitios de reconocimiento de cuatro bases y revelando dichos polimorfismos mediante electroforesis (Tanksley *et al.*, 1989).

PCR de tiempo real (qPCR)

Es una técnica utilizada para cuantificar pequeñas cantidades de DNA a partir de RNA mensajero (mRNA), el objetivo es conocer si un gen se está expresando y cómo lo hace en un punto específico de tiempo, estos métodos se utilizan en forestales para cuantificar genes que se relacionan con resistencia a plagas o factores ambientales como la desecación (Wong y Medrano, 2005).

En conjunto, estos resultados han desempeñado un papel importante en los criterios de conservación para las especies de distribución restringida, en el rubro de la conservación se han hecho planteamientos *ex situ* e *in situ* que son sustentados sumando los análisis genéticos y filogenéticos a los demográficos y de distribución geográfica (Loveless y Hamrick, 1984; Piñero *et al.*, 2008).

DNA NUCLEAR Y DE ORGANELOS EN CONÍFERAS

Como es sabido, los pinos son organismos diploides ($2n= 24$) con un número cromosómico haploide de 12. La poliploidia (espontánea o inducida) es rara en estos organismos y no excede del 1%, siendo que la mayoría de casos con cromosomas múltiples se debe a aneuploidías. En general, los cromosomas son uniformes y altamente conservados, son grandes, la mayoría metacéntricos a submetacéntricos a excepción de uno que es corto. El genoma más largo que se ha reportado para la familia Pinaceae ha sido el de *Pinus lambertiana* de 63.5 pg. El DNA de los pinos es altamente repetido, pero la mayoría es DNA no codificante, probablemente sólo el 0.1% es expresado en mRNA (Ledig, 1998).

DNA nuclear

El DNA nuclear (ncDNA) de las coníferas es el resultado de una herencia biparental. Su genoma nuclear es grande en tamaño y complejo en organización y los genes usualmente existen en grandes familias. Esta complejidad es debida a dinámicas de duplicación y delección (Murray, 1998; Wang *et al.*, 2000). La más grande contribución de los marcadores de ncDNA a la genética de poblaciones de forestales es el amplio número de polimorfismos que pueden ser estudiados (Wagner, 1992).

DNA del megagametofito

Como inicio, es importante definir al megagametofito como un tejido originado por múltiples divisiones mitóticas de una megaspora sin la formación de pared celular de las células hijas, es decir, núcleos libres cercanos en número de 1 024 a 2 048 núcleos haploides. Durante la embriogénesis el megagametofito continúa su crecimiento y provee tejido nutritivo para el embrión y la germinación de la semilla. Este tejido es proveniente, a diferencia de las angiospermas, sólo de la madre, por lo que contiene exactamente el mismo genotipo del núcleo del huevo (Ledig, 1998).

En las coníferas, a través del tejido del megagametofito se pueden realizar análisis de isoenzimas y DNA, y de esta manera obtener información específica de filogenia,

herencia y segregación, mediante la identificación de alelos de loci codominantes, la determinación del genotipo paterno mediante la sustracción del haplotipo del megagametofito y el genotipo diploide del embrión, sin necesidad de realizar pruebas confirmatorias (Cheliak y Pitel, 1984; Ledig, 1998). El megagametofito no presenta metabolitos secundarios (fenoles, quinones, taninos) que desnaturalizan y disminuyen la actividad enzimática de algunos marcadores (Cheliak y Pitel, 1984).

DNA de mitocondria y cloroplasto

Diferente al genoma nuclear, la herencia de los genomas de organelos no sigue las leyes de Mendel, ya que la transferencia del material genético es unidireccional de los organelos al núcleo, el genoma de los organelos es dependiente de ciertas proteínas y de otras biomoléculas para replicarse, transcribirse y traducirse. El genoma de los organelos se replica segregando durante la división mitótica y el crecimiento somático (Wagner, 1992; Birky, 1995; Xu, 2005).

Las plantas tienen dos tipos de organelos que contienen su propio material genético: la mitocondria (mtDNA) y el cloroplasto (cpDNA); el mtDNA se transmite vía materna y el cpDNA vía paterna, a diferencia de las angiospermas en la que ambos genomas se transmiten a través de las progenitoras (Mohanty *et al.*, 2003; Xu, 2005).

Como consecuencia de que el genoma de cloroplasto tiene herencia paterna en coníferas, las variantes de marcadores moleculares de este genoma se acumulan en el linaje del organelo y así proveen información sobre la historia de las poblaciones, a través del modelo de mutación de paso a paso (*stepwise*) por adición o delección de unidades únicas repetidas, donde las variantes más pequeñas de secuencias permiten establecer relaciones cercanas entre los individuos (Anzidei *et al.*, 1999; Cuenca *et al.*, 2003).

Este tipo de transmisión en gimnospermas se debe a mecanismos de posfertilización como se ha observado en *Larix*, donde el citoplasma del cigoto se divide en regiones especiales que almacenan exclusivamente mitocondrias maternas y cloroplastos paternos, mientras que las mitocondrias paternas y los cloroplastos maternos son excluidos del citoplasma del cigoto (Ledig, 1998; Birky, 1995; Xu, 2005).

Los marcadores de DNA para genomas haploides uniparentales son los indicadores más sensitivos de la subdivisión genética de las poblaciones (Cuenca *et al.*, 2003).

APLICACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN PINOS Y ABETOS

Cuantificación de la diversidad genética

Los géneros *Pinus* y *Abies* se encuentran entre los más diversos genéticamente por su longevidad, amplia distribución, reproducción exclusivamente sexual, polinización anemófila y a su gran tamaño poblacional (Conkle, 1979; Hamrick, 1982; Zobel y Talbert, 1998).

Entre los estudios elaborados al respecto, Meng *et al.* (1995) trabajaron con tejido haploide y diploide en ocho padres y tejido diploide en 80 individuos de la F1 de *Pinus sylvestris*, encontrando que los fragmentos de DNA localizados en el tejido diploide también estaban en el megagametofito en el caso de los padres y, a la vez, estos fragmentos se encontraron en la progenie. Con estos resultados se corroboró el uso de RAPDs como marcadores moleculares que proporcionan rasgos mendelianos dominantes.

Powell *et al.* (1995) utilizaron mono, di, tri y tetra secuencias repetidas para amplificar microsatélites en tres especies de pinos (*P. contorta*, *P. sylvestris* y *P. thunbergii*), analizando un total de 305 individuos y comparándolos con estudios de isoenzimas, encontrando que se obtiene mayor información de diversidad genética a través de microsatélites que de isoenzimas ($G_{ST}= 0.22$ y 0.05 , respectivamente) y que esta información es útil en la aplicación a la genética de poblaciones de pinos.

Yang *et al.* (1996) analizaron la variación genética de cinco poblaciones de *P. contorta* y *P. latifolia* con 19 isoenzimas. El estudio demostró que sus poblaciones no se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, posiblemente por el efecto materno y la no agregación de efectos aditivos.

Wu *et al.* (1999) estudiaron la diversidad genética nuclear y la diferenciación entre poblaciones, utilizaron 98 marcadores de tipo RAPD en tres especies de pino de California: *P. attenuata*, *P. muricata* y *P. radiata*. Para 12 de 13 poblaciones el análisis realizado fue mediante isoenzimas, encontrando resultados similares entre ambos marcadores. Por otra parte, Lee *et al.* (2002) trabajaron con *P. longaeva*, 36 isoenzimas polimórficas ($p= 63.0\%$) y RAPD, resultando que más de la mitad fueron monomórficos. Díaz *et al.* (2001) hallaron a través de los marcadores RAPDs y AFLP, que las 10 poblaciones analizadas de *P. oocarpa* tuvieron altos niveles de diversidad

intrapoblacional, pero poca interpoblacional de una misma región geográfica lo que sugiere deriva génica en las poblaciones.

En sistemas de reproducción y de apareamiento

El sistema de reproducción de pinos es exclusivamente sexual, aunque se han presentado brotes a partir de estocones después de periodos de cosecha. No se tiene registro de apomixis. El tiempo entre el inicio de los estróbilos y la maduración de las semillas es de dos años generalmente. Tiene un profundo efecto en la composición genética de sus poblaciones. La competencia entre embriones y la ausencia de autoincompatibilidad en los pinos son las principales causas de los altos niveles del sistema de reproducción cruzada (Ledig, 1998; Hamrick, 1982).

El sistema de apareamiento hace referencia a los niveles de endogamia (autoapareamiento y apareamiento consanguíneo) y polinización cruzada, los cuales son afectados por autoincompatibilidad, autoesterilidad, estructura de la población (densidad) y la distribución temporal (dicogamia, la liberación de polen ocurre antes de que las regiones femeninas estén receptivas) y espacial (estróbilos femeninos en la corona sobre los estróbilos masculinos) (Morgante *et al.*, 1991; Ledig, 1998).

Otro aspecto importante en el sistema de apareamiento es la hibridación, definida como la capacidad de una especie para tener descendencia con individuos de otra especie como resultado de la baja frecuencia de rearreglos en la meiosis. Esta hibridación ocurre regularmente debido a la perturbación del hábitat entre especies simpátricas (Chapman, 1922; Namkoong, 1966; Ledig, 1998).

Ledig *et al.* (2001) analizaron la diversidad genética y la relación con el sistema de apareamiento de los piñones mexicanos (*Pinus pinceana*), cuyos rangos de distribución fueron restringidos por la fragmentación del hábitat. Utilizaron 27 isoenzimas y la diversidad genética nunca fue alta (heterocigosidad de 0.174), lo cual indicó que la reproducción estaba limitada dentro de las poblaciones que tendían a ser endogámicas.

En evolución

Cuando se requiere comparar linajes con divergencia temprana, es imposible establecer hipótesis de homología morfológica; en cambio, existen genes presentes en todos los genomas celulares –como los ribosomales– que pueden proveer de información para reconstrucciones filogenéticas (Sanderson y Donoghue, 1989; Avise, 1994; Hillis, 1994).

En el trabajo de Delgado *et al.* (1998) se analizaron 9 poblaciones a través de 14 sistemas isoenzimáticos, de *P. rzedowskii* de la región central de México (Michoacán), se estimó que tales poblaciones tienen niveles de diversidad genética altos (46.8%), con una marcada diferenciación entre poblaciones, las cuales son significativamente endogámicas ($F_{IS} = 0.247$). A pesar de estos resultados, las poblaciones no mostraron aislamiento por distancia pero sí una relación convexa entre el número de linajes de estas poblaciones y sus distancias genéticas, es decir, que aunque son poblaciones pequeñas y fragmentadas, sus altos niveles de diversidad genética establecen que no están en riesgo.

Por su parte, Cuenca *et al.* (2003) determinaron aislamiento por distancia y la demografía histórica del pino relictual, *P. nelsonii* con microsatélites de cloroplasto (cpSSR), con lo cual evidenciaron la existencia de una expansión poblacional débil debido a eventos de coalescencia en los últimos 146 000 años.

Zhang *et al.* (2005) investigaron a través del uso de ISSR y RAPD, la diversidad genética de *P. squamata*, catalogada como la especie más amenazada en todo el mundo con sólo 32 individuos. A través de estos marcadores se reveló una variación genética muy baja, con un índice de Shannon (I_S) de 0.030, la media del número efectivo de alelos por locus (A_e) de 1.032, el porcentaje de loci polimórficos (P) de 6.45 y la heterocigosidad esperada (H_e) de 0.019 para RAPD. Para ISSR los resultados fueron ligeramente más altos ($I = 0.048$, $A_e = 1.042$, $P = 12.3$, $H_e = 0.029$). Aunque no se cuenta con registro fósil de esta especie, se concluyó que probablemente esta especie pasó por un cuello de botella, lo que explicaría su baja diversidad genética. Actualmente, la endogamia y deriva génica son las fuerzas que modelan la estructura de esta población debido a la influencia de las actividades humanas.

Shea y Furnier (2002) realizaron un estudio con marcadores isoenzimáticos para analizar la variación genética y la estructura de dos poblaciones, una central y dos aisladas de *A. balsamea*. Como resultado se encontró que los niveles de variación

fueron muy bajos ($H_e = 0.005-0.025$), lo que es atribuible a procesos de endogamia, y a que las poblaciones se encuentran distribuidas en parches, a consecuencia de la fragmentación del hábitat.

Por su parte, Parducci *et al.* (2001) trabajaron con *Abies neobrodensis*, una especie catalogada en peligro de extinción representada únicamente por una población de 29 individuos al norte de Sicilia, Italia. Para ello utilizaron microsatélites de cloroplasto para determinar la estructura genética de la población, y la variación haplotípica entre *A. neobrodensis* y tres especies hermanas: *A. alba*, *A. numidica* y *A. cephalonica*. Se encontró que 122 de 169 individuos tuvieron un alto porcentaje de haplotipos únicos, y se concluyó que *A. neobrodensis* difiere en alto grado de las otras especies de *Abies*, evidencia con la cual se colocó en un taxón diferente. Adicionalmente se observó que *A. neobrodensis* tuvo un nivel de variación muy bajo atribuyéndolo a un cuello de botella genético, por una drástica reducción de sus poblaciones.

En conservación

Son varios los estudios de variabilidad genética con fines de conservación para el género *Pinus*, como el de Hernández (1990), quien trabajó con *P. ayacahuite*, típico y con las variedades *veitchii* y *brachyptera*. Probó siete isoenzimas, de las cuales se obtuvieron 14 loci. Con la información genética obtenida se observó que los tres taxa tuvieron niveles de variación media (0.22) con una disminución en la heterocigosidad en un gradiente de norte a sur a través del transecto Oaxaca-Honduras. En las poblaciones se encontró un equilibrio Hardy-Weinberg para los loci mencionados y una mayor diferenciación en el pino típico con respecto a las dos variedades. Con los valores genéticos obtenidos se seleccionaron cuatro regiones (las de mayor valor de heterocigosidad) para priorizarlas como zonas de conservación.

Tolun *et al.* (2000) determinaron el patrón de la diversidad genética de cuatro poblaciones (Camhyayla, Ulukisla, Cehennemdere y Gülekdere) de *P. nigra* en las montañas de Bolkar en Turquía. En esta investigación se trabajó con 14 sistemas isoenzimáticos, utilizando megagametofitos. Bajo esta metodología se resolvieron 24 loci, encontrando 41% de polimorfismo, la media de alelos por locus fue de 1.6 y la heterocigosidad esperada de 21%. Por otra parte, la diversidad genética entre poblaciones (G_{st}) fue de 0.070 y la distancia genética varió en un rango de 0.007 a

0.032, lo cual confirma que la diversidad genética de esta especie es muy baja, y de acuerdo con los valores cuantificados en cada población, se propone la conservación de los recursos genéticos de la especie, preservando el área con los individuos de las poblaciones de Ulukisla y Gülekdere por sus características ecológicas.

Molina *et al.* (2001) trabajaron tres especies de pino (*Pinus pinceana*, *P. lagunae* y *P. muricata*), consideradas como especies raras por sus poblaciones pequeñas y su distribución limitada en México. A pesar de este factor, las especies mostraron altos niveles de diversidad genética ($H_e = 0.36$), pero también valores significativos de endogamia. Se observó que estos valores son altos en comparación con otras especies de coníferas, pero por su limitada distribución es necesario conservar *in situ* individuos de casi todas las poblaciones, especialmente para *P. lagunae*. Para *P. pinceana* y *P. muricata*, los planes de conservación que se lleven a cabo deben hacerse bajo una perspectiva *ex situ*. Como resultado del trabajo, se establecieron estrategias de conservación propias de su rango de distribución.

Clark *et al.* (2000) utilizaron microsatélites de cloroplasto para analizar la variación genética de tres especies de *Abies* distribuidos en el este de Norteamérica (Montes Apalaches): *A. fraseri*, *A. balsamea* y *A. balsamea* var. *Phanerolepsis*. El estudio determinó un alto grado de diferenciación entre los taxa estudiados, por lo que se propuso que la especie *A. fraseri* sea una unidad de manejo (agrupación de árboles dispuesta para la conservación de la diversidad genética, permitiendo la acción natural de las fuerzas evolutivas) sin importar su clasificación taxonómica.

En resistencia a enfermedades y plagas

El trabajo de Devey *et al.* (1995) reafirmaron la relación de genes que le confieren a los árboles hospederos características de resistencia. Se trabajó con el hongo *Cronatium ribicola* que infesta al pino (*P. lambertiana*), en el cual se sabe que la resistencia está ligada a un único gen dominante.

En su investigación, Kondo *et al.* (2000) usaron 1 160 oligonucleótidos para RAPDs en acículas de 35 individuos resistentes y 27 individuos susceptibles; así como 18 megagametofitos. Se encontró que tres segmentos de DNA están ligados a la resistencia del pino negro (*P. thunbergii*) contra el díptero *Tecodiplosis japonensis*, siendo que una secuencia participa en la fase de resistencia y los otros dos marcadores

en la fase de repulsión del insecto. Cabe mencionar que todos los árboles resistentes eran dominantes heterocigotos.

En relación con la resistencia a plagas que disminuyen la calidad morfológica de los individuos, es preciso citar estudios como el de Vargas *et al.* (2002), donde se indagó sobre si los descortezadores *Dendroctonus adjunctus* Blandford y *D. valens* Le Conte exhibían un patrón no azaroso para seleccionar a sus hospederos (*P. lawsonii* Rozel y *P. montezumae* Lamb.), por las características genéticas de los árboles. Las muestras fueron obtenidas de las acículas para posteriormente realizar mediciones de variabilidad genética y distancias genéticas. Se encontró que existían diferencias entre los árboles infestados y los no infestados, concluyéndose que la elección de los descortezadores está relacionada con las propiedades genéticas de los árboles.

En la distribución geográfica

El uso de la filogeografía (filogenias en las que se examina la distribución geográfica de la variación genética) ha permitido dilucidar cómo la historia evolutiva (expansiones del rango de distribución, la fragmentación y los cuellos de botella) y los cambios en el ambiente reciente han moldeado los patrones geográficos de diversidad genética dentro de las especies para obtener elementos y planear estrategias de conservación (Avice, 1994; Bermingham y Moritz, 1998).

Al respecto, el impacto de las glaciaciones en diferentes especies de coníferas, en especial que hacen referencia al género *Pinus*, ha sido evaluado con métodos filogeográficos en diferentes estudios, con lo cual se ha podido explicar su estructura genética actual (Marshall *et al.*, 2002; Burban y Petit, 2003; Hwang *et al.*, 2003; Bucci *et al.*, 2007).

Dentro de los estudios de patrones geográficos de diversidad genética, Hernández (1995) observó con *P. engelmanni* que la variación fenotípica era muy grande entre los especímenes colectados de diferentes estados de la república mexicana, es decir, que la diversidad genética se relaciona con la zona geográfica de los individuos.

Por otra parte, Jorgensen *et al.* (2002) elaboraron una investigación para *P. flexilis*, un pino con un rango geográfico amplio, pero restringido altitudinalmente en Norteamérica. En este estudio fueron ensayados 12 sistemas isoenzimáticos en acículas y yemas de 30 poblaciones a lo largo del rango de distribución. De estos sistemas se

resolvieron 21 isoenzimas con una $H_e = 0.186$, la cual representa una heterocigocidad alta en comparación con otras especies de pinos cuya distribución es muy similar. La misma tendencia apareció con el valor de $G_{ST} = 0.101$. Adicionalmente se observó que las diferencias se marcaron entre poblaciones cuando el análisis se realizó agrupando a éstas por regiones, se encontró que las localizadas en las regiones de Basin y Range son menos variables y con un grado mayor de endogamia que las poblaciones que se encuentran en la región de las Montañas Rocallosas. Estos patrones de diversidad genética se atribuyeron al flujo genético a causa de la dispersión de semilla y el polen desde el Pleistoceno.

Navascués *et al.* (2006) utilizaron en las Islas Canarias marcadores microsatélites en *P. canariensis* para estudiar la expansión de las poblaciones, analizaron simulaciones de coalescencia de diferentes escenarios geográficos de manera teórica y experimental. Así, se observó que los resultados con microsatélites de cloroplasto varían con el crecimiento de la población y se infirió que esta expansión pudo ocurrir en la colonización del archipiélago por el pino a diferentes edades, lo cual puede atribuirse a la dinámica de recolonización y extinción local.

P. oocarpa, con la distribución geográfica más amplia en México y América Central, fue estudiada por Díaz *et al.* (2001) en Nicaragua, debido a que sus poblaciones han sido perturbadas por las actividades humanas, principalmente la extracción; analizaron la diversidad genética a través de los marcadores RAPDs y AFLP, encontrando que las 10 poblaciones examinadas tienen altos niveles de diversidad intrapoblacional, y una marcada diferenciación entre poblaciones, por lo que no son una población panmítica.

Los estudios sobre diversidad genética de coníferas son abundantes, sin embargo, no existe un estudio como tal para los bosques del área natural protegida Parque Nevado de Toluca, a continuación se presentan dos estudios de caso sobre la diversidad genética de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*.

5. ESTUDIOS DE CASO: DIVERSIDAD GENÉTICA DE *PINUS HARTWEGII* Y *ABIES RELIGIOSA* INFESTADOS POR DESCORTEZADOR Y MUÉRDAGO

CASO I: *PINUS HARTWEGII*

INTRODUCCIÓN

Según Sáenz y Tapia (2003), la conservación de la diversidad genética de coníferas en México, especialmente para pino, debe estudiarse a fondo debido a que: a) *Pinus* es el género más importante ecológica y económicamente en México, b) estos bosques pueden ser considerados como un centro de diversificación de género y, 3) las poblaciones están localmente adaptadas.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, en el APFFNT se encuentran tres especies de pino (*Pinus hartwegii*, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*), las cuales están sujetas a una intensa presión antrópica por su cercanía con la ciudad de Toluca y con las comunidades que están dentro del área, ligadas total o parcialmente a actividades que conllevan a una sobreexplotación de recursos naturales, pese a ser un área natural protegida.

En el APFFNT, el *P. hartwegii* alcanza su máxima altitud a nivel mundial sobre cualquier especie de pino (Candean y Franco, 2007), sin embargo, la adecuación de estas poblaciones están en riesgo debido a problemas de contaminación, déficit hídrico, erosión de los suelos e infestación por organismos parásitos y la tala clandestina (Earle, 2005).

En 2001, Solís e Iglesias, mediante el uso de isoenzimas en individuos de *P. hartwegii*, en el Cofre de Perote y Pico de Orizaba, Veracruz, encontraron ocho bandas con actividad esterasa y un 100% de polimorfismo isoenzimático en los individuos examinados, es decir, una alta variación en los megagametofitos y una frecuencia genotípica de 0.06 a 0.50. Los resultados indicaron bajos porcentajes de germinación (menos de 10%) y más del 50% de las semillas vacías, probablemente por depresión consanguínea (muy común en especies de coníferas) con un impacto significativo en las tasas reproductivas de la especie.

Por otro lado, López (2003) realizó estudios en el Parque Nacional de Cofre de Perote y obtuvo niveles de polimorfismo isoenzimático más altos ($H= 0.3$) que los reportados en otros trabajos (primordialmente con la esterasa EST), sin embargo, con marcadores RAPDs obtuvo valores bajos, lo cual es atribuible a la depresión endogámica y deriva génica que presenta la población a causa de que su tamaño es pequeño y los individuos se encuentran restringidos espacialmente. La mayor diversidad genética la encontró intrapoblacionalmente.

Ante la escasa información genética para *P. hartwegii*, se planteó la necesidad de realizar un estudio mediante el uso de marcadores genéticos, con la finalidad de obtener información sobre la diversidad genética de esta especie, y la identificación de patrones genéticos que confieran a los pinos resistencia al descortezador (*Dendroctonus* sp.) y al muérdago enano (*Arceuthobium* sp.), principales plagas del género a nivel mundial (Vargas *et al.*, 2002). Por otra parte, se evaluó la distribución de la diversidad genética en las zonas de muestreo para así sustentar propuestas de uso y conservación en el ANP. Con respecto al APFFNT, este trabajo es el primero en su clase, pues no se han reportado datos de diversidad genética para ninguna de las especies de coníferas consideradas en el área de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

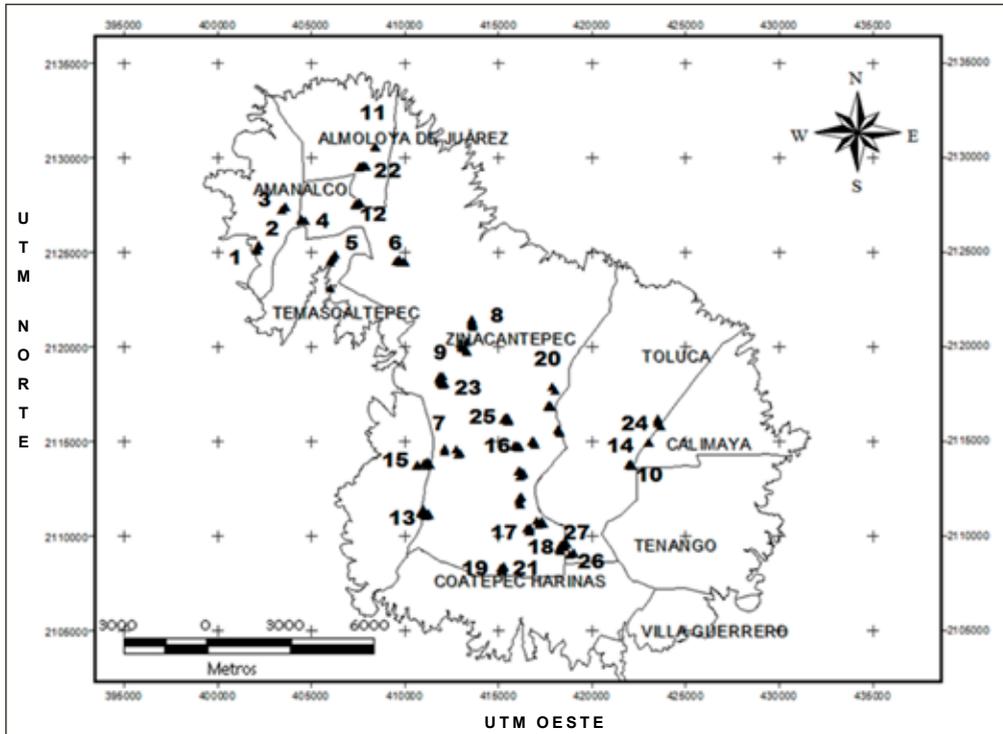
Selección de los puntos de muestreo y colecta del material vegetal

Se colectó material vegetal (acículas) en 27 puntos de muestreo de *Pinus hartwegii* en el APFFNT, mediante un muestreo aleatorio sistemático, el cual consistió en hacer un reconocimiento de los árboles maduros, se eligió el primero al azar, y a partir de éste, se recorrieron 50 m en dirección norte, hasta llegar al siguiente individuo de la especie por muestrear. Se tomaron muestras de árboles que presentaban muérdago (*Arceuthobium* spp.) y rastros de presencia de descortezadores (*Dendroctonus adjunctus*) (Figura 5.9), tales como heridas en la corteza o incluso galerías. También se tomaron muestras de árboles aparentemente sanos o control.

Para los propósitos del presente estudio las zonas de muestreo de pino se agruparon de acuerdo con su distribución en determinado tipo de vegetación y uso de suelo, es decir, se consideró que si un grupo de 10 individuos se encontraba en un sitio con el

mismo tipo de vegetación y tipo de ocupación de suelo, entonces conformaba parte de una población. Los tipos de vegetación y uso de suelo (Regil, 2005) en los que se encontraron las áreas de muestreo de pino estudiadas fueron diecisiete, localizadas en 24 sitios en 5 municipios que abarca el APFFNT (Figura 5.1, Cuadro 5.1).

Figura 5.1
Distribución geográfica de las zonas muestreadas de *P. hartwegii* en el APFFNT



Los números al interior del mapa indican el número del punto de muestreo.

Fuente: elaboración propia.

Se colectaron en total muestras de 180 individuos, se tomaron 100 g de acículas de cada árbol, se procuró que estuvieran frescas y sin presencia aparente de hongos o quemaduras por heladas, posteriormente fueron transportadas en bolsas de polietileno con cierre, y se introdujeron en hielo para su traslado al laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en

Fitomejoramiento (CIEAF), donde se almacenaron a -70°C para su posterior uso, de cada árbol se tomó la altura, estimada con un clinómetro, el diámetro a la altura del pecho (DAP) aproximadamente a 1.5 m del suelo, y su posición geográfica mediante un GPS (Global Position System) (Figura 5.10).

Todos los árboles muestreados se clasificaron en cuatro categorías: (C) correspondió a los individuos control sin evidencia de muérdago o descortezador, (D) abarcó a los individuos infestados por el descortezador (*Dendroctonus* sp.), (M) se relacionó a los individuos atacados por muérdago (*Arceuthobium* sp.) y (M y D) comprendió a los individuos infestados por muérdago y descortezador. Para cada árbol se midió el diámetro a la altura del pecho (DAP), la altura total (AT) y cada punto fue georreferenciado y ubicado en altitud. Cada árbol muestreado se marcó con una etiqueta de polipropileno. Los datos obtenidos fueron registrados en una base.

Análisis isoenzimático

Para la extracción de proteínas se utilizaron aproximadamente 100 mg de tejido de acículas, las cuales se homogeneizaron en un 1 μL de buffer de solución extractora (Mitton *et al.*, 1979); los extractos fueron conservados a -70°C hasta su uso.

En la tinción de isoenzimas se empleó la técnica de electroforesis en geles de almidón hidrolizado (GAH) al 11% w/v. El sistema electroforético fue morfolina-citrato (Conkle *et al.*, 1982). La corriente aplicada fue de 60 mA a 133 v, por 80 minutos. Los protocolos de tinción utilizados fueron para ácido fosfatasa (ACP Ec. 3.1.3.2), peroxidasa (POX Ec. 1.11.1.7), shikimato deshidrogenasa (SKDH Ec. 1.1.1.44), fosfoglucomutasa (PGM Ec. 2.7.5.1), esterasa (EST Ec. 3.1.1.1), deshidrogenasa málica (MDH Ec. 1.1.1.37), fosfoglucosa isomerasa (PGI Ec. 5.3.1.9), alcohol deshidrogenasa (ADH Ec. 1.1.1.1), leucino aminopeptidasa (LAP Ec. 3.4.11.1), deshidrogenasa málica (MAL Ec. 1.1.1.37) (Pasteur *et al.*, 1988).

Cuadro 5.1
Localidades en donde se muestreó *P. hartwegii*

<i>N</i>	<i>Nombre de la localidad</i>	<i>Mpio.</i>	<i>n</i>	<i>Condiciones y nivel de infestación de M y D</i>
1	Corral de Piedra, Llanos	AB	9	Zona abierta, muérdago amarillo.
2	Desviación de la Puerta	Zi	3	Zona de agricultura, no hay muérdago.
3	Llanos	AB	3	Zona abierta.
4	Llano La Lagunita	AB	4	I.I. por descortezador.
5	San Francisco Oxtotilpan	Te	5	I.I. por descortezador.
6	Desviación de la Puerta	Zi	8	Muérdago verde y amarillo.
7	Ejido San Juan de las Huertas	Zi	5	Muérdago se presentó conforme aumentó la altitud, sin <i>Abies</i> .
8	Desviación de la Puerta	Zi	8	Zona agricultora, sin muérdago.
9	Loma Alta	Zi	8	Zona fragmentada, árboles en saneamiento, sin muérdago.
10	Cráter del Nevado	To	8	Árboles pequeños, sin muérdago.
11	Rosa Morada Segunda Sección	AJ	2	<i>Abies</i> abundante, sin muérdago.
12	El Capulín	Zi	4	I.I. por descortezador, incendios.
13	Santa María del Monte	Zi	8	Minas, ocoteo, sin muérdago.
14	La Antena	Tol	2	I.I. por descortezador.
15	Cerro Gordo	CH	7	I.I. por descortezador, sin muérdago, mariposa monarca
16	Ejido San Juan de las Huertas y Contadero (P. de los Venados)	Zi	19	I.I. por muérdago negro y verde, disminuye con el aumento de altitud, sin <i>Abies</i> .
17	Ladera Sur (camino a C. Harinas)	Zi	8	Muérdago negro y amarillo, presencia de ganado.
18	Rancho Agua Limpia	Zi	5	Incendio, muérdago amarillo, anaranjado, verde y rojo.
19	Los Venados	CH	5	I.B. por muérdago y descortezador.
20	Ejido San Juan de las Huertas y Contadero (P. de los Venados)	Zi	20	Muérdago negro, disminuye con el aumento de altitud, sin <i>Abies</i> .

continúa...

<i>N</i>	<i>Nombre de la localidad</i>	<i>Mpio.</i>	<i>n</i>	<i>Condiciones y nivel de infestación de M y D</i>
21	Los Venados	CH	3	I.B. por muérdago y descortezador.
22	El Capulín y Rosa Morada	Zi/AJ	11	I.I. por muérdago (rojo) y descortezador, incendios.
23	Ejido San Juan de las Huertas y La Ciénega	Zi	10	I.I. por muérdago negro (<i>Pinus</i>) y amarillo (<i>Abies</i>), monarca.
24	Subida por Tlacotepec	Ca	5	Sin muérdago.
25	Ejido San Juan de las Huertas	Zi	3	I.I. por muérdago e I.B. por descortezador, sin <i>Abies</i> .
26	Tercera sección debajo de Agua Limpia	To	4	Árboles ocoteados, muérdago amarillo, negro y anaranjado.
27	Rancho de Agua Limpia	To	6	Incendio, muérdago negro y amarillo.

Abreviaturas: N, puntos de muestreo. Mpio., municipio. AB, Amanalco de Becerra. AJ, Almoloya de Juárez. Ca, Calimaya. CH, Coatepec Harinas. Te, Temascaltepec. To, Toluca. Zi, Zinacantepec. n, tamaño de la muestra, I.I. Infestación intensa. I.B. Infestación baja.

Fuente: elaboración propia.

Análisis de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó usando el método CTAB (bromuro hexadeciltrimetilamonio) de Zhou *et al.* (1999), con una modificación que consistió en lavar el tejido tres veces para eliminar lo mejor posible sustancias como taninos, fenoles, quinonas que se encuentran de forma abundante en el tejido acicular maduro y pueden dificultar la extracción de DNA (Puchooa, 2004). El DNA se diluyó en una solución buffer Tris-EDTA (TE) hasta 70 μl y se conservó a -20°C para su evaluación cualitativa (electroforesis) y cuantitativa (biofotómetro).

Para la amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la reacción contenía la siguiente concentración final: PCR buffer amonio 1x, MgCl_2 (2.5mm), dNTPs (800 μM mix), Primer (0.2 μM por primer), Taq DNA polimerasa (0.5 U), DNA genómico (10 ng/ μL), para un volumen final de la reacción de 10 μL . Para la amplificación de DNA, se probaron cebadores para marcadores tipo RAPDs, ISSR, ASSR y genes homeóticos; distribuidos en núcleo, mitocondria y cloroplasto (Cuadro 5.2).

Los productos obtenidos del PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1.5%, en una solución tampón TAE durante 90 minutos. Los corrimientos se visualizaron con bromuro de etidio en un transiluminador UVP.

Cuadro 5.2
Cebadores utilizados para amplificar DNA de núcleo

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia (5'→3')</i>
UBC 254	CGC CCC CAT T
ASSR-15	CTC TCT CTC TCT CTA TG
ASSR-29	CTC TCT CTC TCT CTG TA
Cox 3in	<i>For</i> (GTA GAT CCA AGT CCA TGG CCT) <i>Rev</i> (GCA GCT GCT TCA AAG CC)
10 FF/RR	<i>For</i> (CAG AAG CCC AAG CTT ATG GC) <i>Rev</i> (CGG ATT GAT CCT AAC CAT AC)

Marcadores reportados en Yamagishi *et al.*, 2012 (UBC 254, ASSR-15 y ASSR-29), Cox, Wang *et al.*, 2000 (mitocondria). Utilizados en *P. hartwegii* para amplificación.

Fuente: elaboración propia.

Los datos obtenidos de los corrimientos electroforéticos, tanto para las isoenzimas como para los marcadores moleculares, fueron registrados con evidencia fotográfica. Para los marcadores isoenzimáticos se consideró la presencia de bandas como zonas activas, es decir, la presencia de una banda se tomó como dominancia y la ausencia como recesividad. Para los marcadores de DNA, la presencia de la banda significó un alelo dominante y la ausencia indicó el alelo recesivo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los corrimientos electroforéticos, tanto para los marcadores de DNA como para las isoenzimas, fueron ordenados para construir una matriz binaria en la cual la presencia de una banda se registró como (1) y la ausencia como (0). Al usar

el programa POPGENE 32 (Yeh *et al.*, 1999) se obtuvieron los siguientes parámetros estadísticos para el estudio de genética poblacional: *flujo génico* (Nm), *número observado de alelos por locus* (n_a), *número efectivo de alelos por locus* (n_e), *diversidad genética de Nei* (h), *heterocigosidad* (H), *heterogeneidad poblacional (estadísticos de Wright)*, y *distancias genéticas* (D). Se estimó también la *distribución geográfica de la variabilidad genética* con pruebas de correlación lineal entre la variabilidad genética de cada marcador utilizado y la altitud de los puntos de muestreo para verificar la existencia de algún tipo de relación entre estas variables; para estas pruebas se utilizó el programa Stathgraphics 4.1.

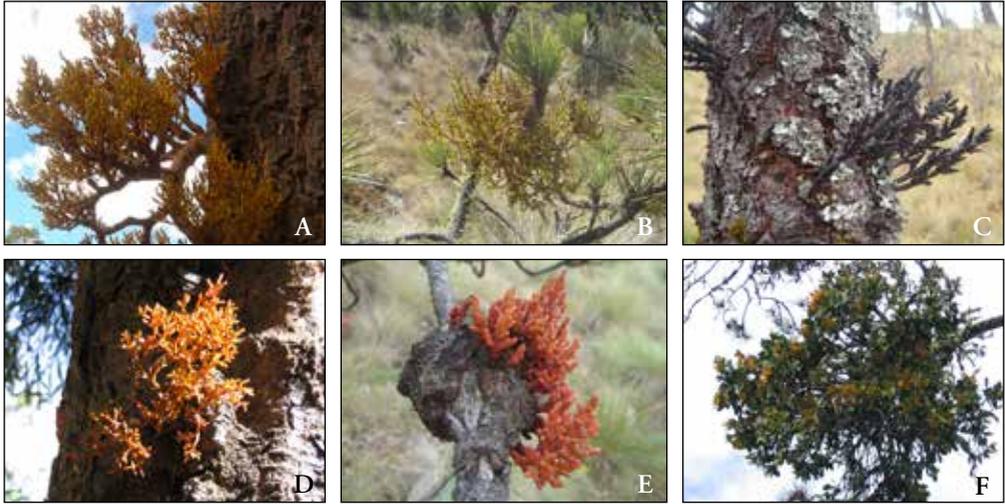
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Frecuencia de descortezador y muérdago

De los 180 árboles muestreados, se encontraron 39 (C), 78 (D), 31 (M) y 32 (M y D). Las 27 zonas de muestreo tuvieron presencia de descortezador; las zonas de muestreo en donde no se encontraron árboles sanos (C) eran zonas con una ocupación de suelo de pastizal inducido o vegetación secundaria, que son coberturas que, como lo refiere Endara (2010), son susceptibles a infestación por la disminución de masa arbórea y en las cuales son comunes prácticas de presión antrópicas como el ocoteo.

En las zonas estudiadas se registraron cinco tipos de *Arceuthobium* diferenciados por el color (amarillo, verde, negro, anaranjado y rojo), y una especie del género *Psittacanthus* (Figura 5.2). En el APFFNT sólo se tiene el reporte de *A. globosum* subsp. *grandicaule* (muérdago amarillo) (Figura 5.2A) y *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* (muérdago negro) (Figura 5.2C) para *P. hartwegii* (Endara, 2010). El muérdago amarillo fue el predominante.

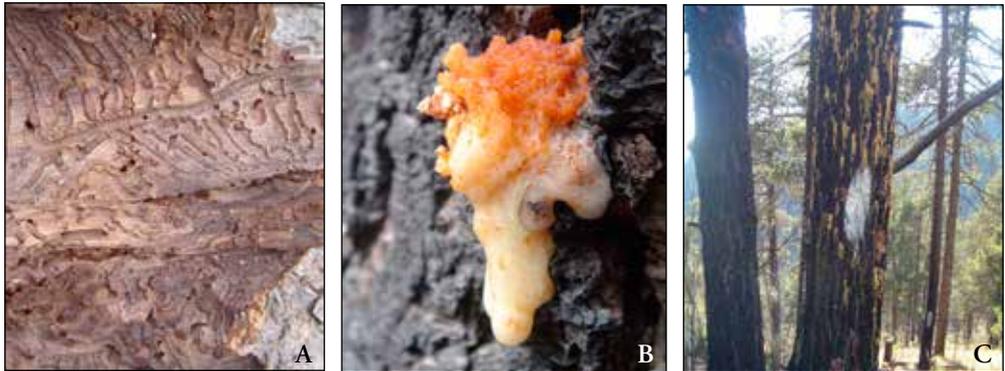
Figura 5.2
Muérdago enano (*Arceuthobium*) encontrado en el APFFNT



Tipos de muérdago: A. amarillo, B. verde, C. negro, D. anaranjado y E. rojo. F. género *Psittacanthus*.
Fotografía de Amaury Martín Arzate Fernández.

Se confirmó la presencia de *D. adjunctus*, como el principal insecto descortezador que infesta a *P. hartwegii* en el APFFNT (Figura 5.3).

Figura 5.3
Descortezador en *P. hartwegii*



A. Galerías, B. grumo de resina, C. árbol con gran número de grumos de resina.
Fotografía de Amaury Arzate Fernández.

Los resultados de diversidad genética para *P. hartwegii* se analizaron de dos maneras: 1) para relacionarlos con una posible resistencia genética y 2) para relacionarlo con la distribución geográfica.

Diversidad genética y resistencia a descortezador y muérdago

Análisis de bandeo: en comparación con otros estudios en el género *Pinus* (Hernández, 1990; Tolun *et al.*, 2000; Ledig 1998; Sáenz y Tapia, 2003), de los sistemas electroforéticos ensayados, sólo se presentó actividad con POX (Cheliak y Pitel, 1984). Con los marcadores de DNA se obtuvieron amplificaciones para: RAPD (UBC 254), ASSR (ASSR-15, ASSR-29), gen homeótico de mitocondria (Cox3in) y un cpSSR (10FF/RR), siendo más eficaces éstos con respecto a los marcadores bioquímicos.

Los patrones de bandeo (PB) (Cuadro 5.3, Figura 5.4) se consideraron por el número de combinaciones distintas, las cuales originaron el número de bandas totales en los 180 individuos: bandas monomórficas, si estaban presentes en todos los individuos, bandas polimórficas, si tenían una frecuencia menor que 95% (o 99%), bandas específicas, si sólo pertenecen a una población y bandas raras, si su frecuencia era menor a 5.

Los marcadores de cloroplasto y mitocondria presentaron una banda monomórfica, la cual sugiere que las zonas de muestreo del APFFNT se originaron de una misma población inicial, que se ha aislado de otras zonas de muestreo localizadas en el eje transversal, principalmente por la eliminación de los corredores biológicos a causa de la fragmentación del hábitat (Iglesias *et al.*, 1997; Musálem y Solís, 2000).

Cuadro 5.3
Bandas encontradas con los marcadores utilizados, de acuerdo con su frecuencia de aparición en los 180 árboles de *P. hartwegii* muestreados

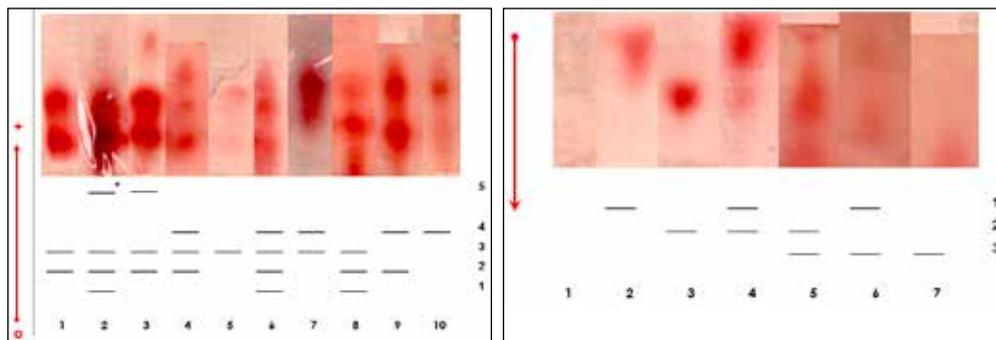
<i>Tipo de marcador</i>	<i>Bandas totales (PB)</i>	<i>Bandas monomórficas</i>	<i>Bandas polimórficas</i>	<i>Bandas específicas</i>	<i>Bandas raras</i>
POXcat	5 (10)	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
POXan	3 (6)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
UBC 254	11 (44)	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)	1 (9.9%)
ASSR-15	7 (17)	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
ASSR -29	11(40)	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)	1 (9.9%)
mtDNA Cox3in	8(10)	1 (12.5%)	7 (87.5%)	0 (0%)	4 (50.0%)
cpDNA 10FF/RR	7 (9)	1 (14.3%)	6 (85.7%)	1 (14.3%)	3 (42.8%)

Fuente: elaboración propia.

Análisis de patrones de bandeo: los patrones de bandeo (PB) generados con POX y los marcadores de DNA, sugieren una posible resistencia a muérdago y/o descortezador.

En el caso de POX, el PB 2 de la región del cátodo (Figura 5.4) se encontró únicamente en los árboles sanos, se sabe que POX participa en muchos procesos celulares y cambios metabólicos debido a que catalizan la oxidación de diversos sustratos. Contribuyen al control de la fotorrespiración, a la respuesta a diversos tipos de estrés, en la biosíntesis y depósito de lignina (lignificación) de paredes celulares, en la formación de flavonoides, en el catabolismo oxidativo del ácido indolacético. Al fortalecer la pared celular, favorecen la resistencia a patógenos, la respuesta defensiva a heridas y previenen el ataque de insectos (Domínguez *et al.*, 2008).

Figura 5.4
Enzimograma esquemático y representación fenotípica de la isoenzima POX



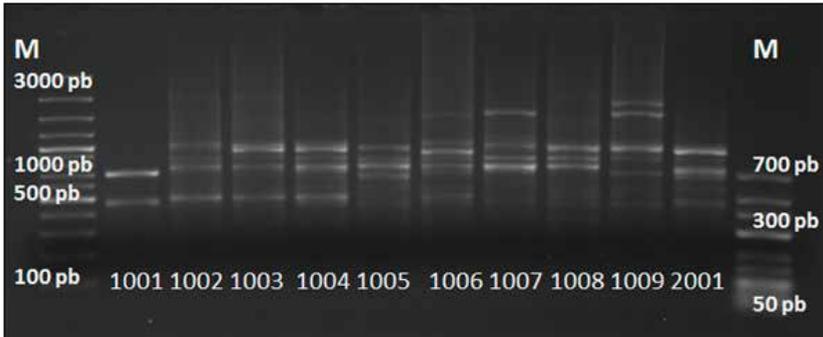
Los números en el margen derecho de cada imagen representa el número de bandas totales encontradas, y los números en la parte inferior representan los patrones de bandeo (PB) que se obtuvieron de la combinación de las bandas totales obtenidas. o: origen del corrimiento.

Fuente: elaboración propia.

Con el iniciador UBC 254, los PB de árboles control presentaron siempre una banda de 1 700 pb. Asimismo, con el iniciador ASSR-15, los árboles control o sanos (C) no presentaron una banda de 500 pb. El iniciador ASSR-29, produjo 42 PB, dos de ellos exclusivos para los árboles sanos (C). En el caso de Cox3in los árboles sanos no presentaron algunas bandas (Figura 5.5). El iniciador 10FF/RR presentó una banda de aproximadamente 400 pb en árboles infestados. Se conoce que los árboles que han presentado resistencia genética a alguna plaga deben ser heterocigóticos, hasta ahora, ni los homocigóticos dominantes ni los recesivos han resultado ser resistentes a las plagas.

Figura 5.5

Productos de PCR en muestras de *P. hartwegii*, usando los cebadores para mtDNA Cox3in



M, marcadores escalera (de 100 a 3000 pb y de 50 a 700 pb) del individuo 1001 al 2001, donde los primeros dos dígitos indican el número de población, y los dos últimos dígitos indican el número de individuo.

Fuente: elaboración propia.

Con una prueba de Kruskal Wallis, los iniciadores UBC 254 ($t= 11.02$, $p= 0.0115$) y 10FF/RR ($t= 7.62$, $p= 0.05$) se rechazó H_0 , encontrando diferencias significativas entre los PB de árboles sanos y árboles infestados. Es decir, los segmentos encontrados en árboles sanos, posiblemente estén ligados a la resistencia de *P. hartwegii* ante el muérdago y el descortezador.

Estos resultados coinciden con los de Devey *et al.* (1995), Kondo *et al.* (2000) y Liu *et al.* (2006); ellos encontraron segmentos de DNA ligados a genes de resistencia a diversas plagas en pinos a través de marcadores RAPD, en este estudio se obtuvo mayor número de PB exclusivos para árboles sanos con el iniciador UBC 254 (una banda de 1 700 pb). Este alelo, posiblemente esté relacionado con un gen de resistencia, de los miles contenidos en el genoma de las coníferas que aún no han sido estudiados.

Los marcadores RAPD no son los únicos que han sido relacionados con genes de resistencia a plagas (Devey *et al.*, 1995), sino igualmente con marcadores RFLP y SSR. En este estudio el marcador SSR de cloroplasto presentó una banda para los árboles sanos. Las bandas que posiblemente estén ligadas a resistencia, en el caso de cada marcador utilizado, puede mostrar resistencia al muérdago o al descortezador, pero de manera general se ha descrito que producen resistencia a más de una plaga. Estos fragmentos pueden relacionarse con la expresión de producción de los compuestos primarios y

secundarios de defensa, como la producción de resina, oleorresinas y terpenos de los sistemas resiníferos de las coníferas, ya que están bajo un control genético estrecho y son indicadores muy valiosos de la diversidad genética (Vargas *et al.*, 2002).

Análisis de diversidad genética: la diversidad genética (h) fue mayor para el marcador POX, especialmente en los árboles parasitados por M y D ($h_{\text{POX}} = 0.2746$) y menor para el marcador de mitocondria ($h = 0.0439$), valores menores a los reportados por Vargas *et al.*, 2002. POX con los mayores niveles de heterocigocidad incluso que los marcadores nCDNA sugiere que las condiciones del ambiente están aportando un papel importante sobre la diversidad genética de estos grupos (Burdon y Marshall, 1983).

Número de alelos observado y efectivo por locus (n_a , n_e): el número de alelos por locus (n_a) fue de 1.7586, lo que implica que el número de alelos tiende a 2, es decir, son heterocigos, y el número de alelos efectivos (n_e) fue cercano a 1.3, es decir, es bajo el número de alelos que se están transfiriendo de una generación a la siguiente.

Estos valores bajos de n_a y n_e , por consecuencia actúan sobre los valores de diversidad genética de Nei ($h = 0.2746$), los cuales también fueron menores con respecto a otros estudios ($h > 0.35$), pero mayores en árboles infestados sobre los control o sanos; como resultado de la selección natural entre los pinos y sus hospederos, pues se ha demostrado que deben mantener una mayor diversidad genética como consecuencia del gran número de parásitos que los atacan (Sánchez *et al.*, 2005). Para los pinos infestados, el hecho de tener mayor diversidad genética no presenta una desventaja biológica ante sus hospederos (pues son individuos más propensos a ser infestados por su “buena carga genética”), ya que como establece la teoría de coevolución parásito-hospedero, en donde se propone que son los genes los que se seleccionan y no las características fenotípicas, se puede corroborar con este estudio que los parásitos son los responsables de la gran diversidad genética que se encuentra en las plantas.

Estos resultados se reafirman con la teoría de la coevolución “gen por gen”, la cual está basada en el hecho de que por cada gen causante de resistencia en el hospedero hay un gen correspondiente a la virulencia del parásito, el cual puede infestar a su hospedero cuando éste aún no ha desarrollado una estrategia para reconocer al inductor del parásito (como algún compuesto genético particular emitido por el parásito). Si los genes con mayor diversidad son los que se están seleccionando y pasando de una generación a otra, la especie parásita debe evolucionar de igual manera para que ambas sigan coexistiendo. Esta vía de la defensa y la contradefensa manejada

por genes dominantes, como se mencionó anteriormente, es la que mantiene muchos polimorfismos en especies vegetales.

Esta hipótesis ha sido válida por estudios como el de Stock *et al.* (1992), quienes en un análisis de genética de zonas de muestreo del descortezador (*Dendroctonus ponderosa*), determinaron que éstos presentaban mayor polimorfismo, dependiendo de la región geográfica y de la especie a la que parasitan. Asimismo, los descortezadores que habían parasitado a pinos con un floema delgado eran más polimórficos con respecto a los descortezadores que parasitaban pinos con un floema más grueso, debido a que los descortezadores son muy susceptibles a las presiones de selección.

Esta resistencia también se ha medido por la producción de resina bajo condiciones de estrés ambiental, lo cual es un mecanismo de defensa que presentan las plantas determinado por los componentes genéticos (Lombardero *et al.*, 2000; Vargas *et al.*, 2002).

Igualmente, Krabel y Petercord (2000), con pinos y otras especies de coníferas demostraron que la susceptibilidad de infestación no es al azar sino que el parásito reconoce ciertas condiciones que le permiten infestar a un individuo y no a otro; como la producción de ciertos compuestos a manera de alcoholes, carbohidratos y proteínas, metanol (compuestos más comunes, que al parecer sirven de guía para la infestación). La producción de estos compuestos está determinada por las características genéticas encontradas en los individuos hospederos.

Por otra parte, la resistencia genética del hospedero hacia el muérdago ha sido reportada para varias especies de pinos (Roth, 1978; Scharpf, 1984; Scharpf, 1987). Dicha resistencia, en el caso del muérdago como plaga, puede explicarse por el grosor de la corteza del pino, ya que es en ésta donde llegan sus semillas, dependiendo del grosor de la corteza se hace más o menos lenta su inserción, por lo que un pino con una carga genética de más calidad (mejores genes) puede producir una corteza de mayor grosor y así evitar o retardar el tiempo de infestación por muérdago.

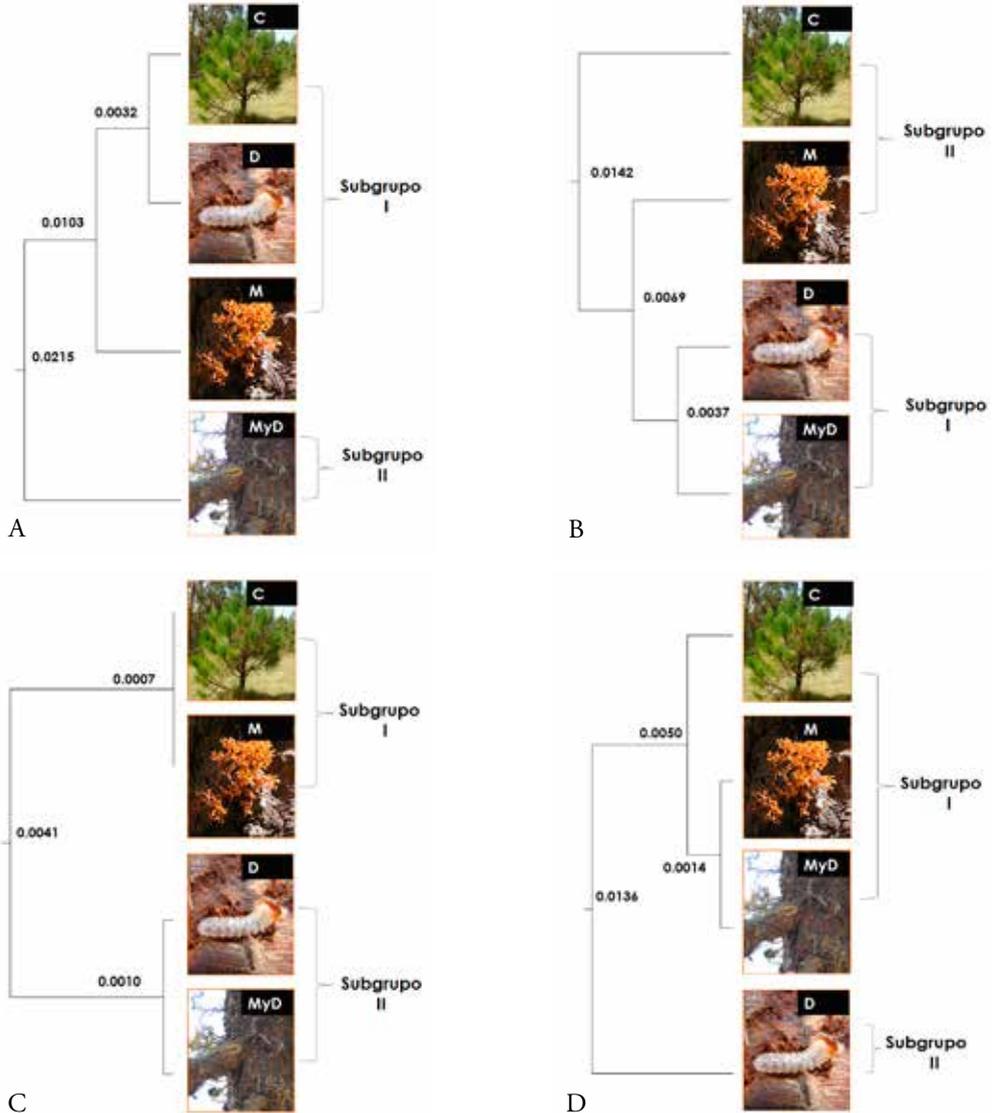
Flujo génico (Nm): fue alto con todos los marcadores ($Nm_{POX} = 17.41$ y $Nm_{10FF/RR} = 5.7224$) entre todas las categorías de árboles, lo que hace que estén poco diferenciadas genéticamente y al mismo tiempo presenten niveles de diversidad intrapoblacional ($H_s = 0.2344$) mayores respecto a la diversidad genética interpoblacional ($G_{ST} = 0.0279$), posiblemente por la estructura de cada categoría (edad, densidad, movimiento), estos factores sugieren que la infestación de árboles es genética, pero depende en gran medida de las características intrínsecas de cada árbol (Pastorino *et al.*, 2006). Estos

factores a largo plazo van disminuyendo la diversidad genética, ya que homogeneizan las zonas de muestreo y facilitan la infestación por muérdago y descortezador al mantener poca diferenciación entre los grupos de muestreo (Ledig, 1998).

Distancia genética: de acuerdo con los datos obtenidos se generaron cuatro dendrogramas, en los cuales se agrupaban, aunque de manera diferente, los árboles infestados, dejando de lado a los árboles control.

Con la isoenzima POX, el grupo más distante fue MyD, el cual mostró mayor diversidad genética ($h = 0.2746$). El dendrograma generado por los marcadores de núcleo relaciona a las tres categorías de árboles infestados (M y D, D y M), especialmente porque los alelos (n_a y n_e) para las tres categorías son muy cercanos, a diferencia de los árboles C que tienen el valor de n_a más bajo (1.7586). Con el marcador de mitocondria se obtuvo la menor DG (0.0007). Este marcador de mitocondria agrupa a los árboles de las categorías C y M, cuyos valores de $h = 0.04$ son los más pequeños (Figura 5.6).

Figura 5.6
Dendrograma de distancias genéticas
entre los grupos de árboles por presencia/ausencia de infestación



Generados por los iniciadores utilizados en este estudio para los marcadores: a) isoenzima POX, b) iniciador de núcleo (UBC254, ASSR-15 y ASSR-29), c) de mitocondria y d) de cloroplasto.

Fuente: elaboración propia.

Diversidad genética y distribución geográfica

Patrones de bandeo: se realizó una prueba de Kruskal Wallis para descartar que los PB son similares entre las 27 zonas muestreadas ($t= 106.37$, $p= 0.0000$).

Los PB se relacionaron con el hábitat (uso de suelo, las coordenadas UTM (X, Y), la altitud) de los árboles muestreados. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($r^2= 21.30\%$ $p<0.05$) con todos los marcadores. Específicamente con los iniciadores ASSR-15 y 10 FF/RR se observó que conforme aumenta la altitud a la que se encuentra una población disminuye la diversidad genética ya que el factor altitudinal ha determinado la formación de razas geográficas con variación regional y aislamiento genético total entre ellas, además del pequeño tamaño de los puntos de muestreo y la disminución de recursos ambientales conforme aumenta la altitud. Esto es común en especies como los pinos con polinización cruzada, lo cual se facilita enormemente con la fragmentación del bosque de pino presente en el APFFNT y la disminución del tamaño efectivo de la población (Hernández, 1990; Oshakawa e Ide, 2007).

Número de alelos observados y efectivos por locus: el número de alelos observados fue de 1.0 a 1.75, mientras que el número de alelos efectivos fue de 1.0 a 1.533, valores bajos con respecto a otras especies de coníferas ($N_a= 2.29$) (Hamrick *et al.*, 1981), lo que indica que se mantienen las frecuencias alélicas entre las zonas de muestreo, pero el número de alelos efectivos es reducido por lo que la heterocigocidad fue baja para este marcador (0.0 a 0.2907). De manera general, hubo una disminución del número de alelos por locus, es decir una disminución de individuos heterocigos y en consecuencia el decremento de diversidad genética entre las zonas de muestreo. De acuerdo con Ricklefs y Miller (2000), la variación genética decrece más rápido en zonas de muestreo pequeñas por la pérdida de alelos y ésta se debe a que hay pocos individuos, generalmente estos puntos de muestreo están aislados geográficamente en relación con otros (Cuadro 5.4).

Diversidad genética de Nei: son pocas las especies de pinos con niveles isoenzimáticos bajos de diversidad genética como *P. resinosa* (Mitton, 1983) y *P. pinceana* (Ledig *et al.*; 2001), especies en proceso de cuello de botella y distribución geográfica limitada, respectivamente, pero con una diversidad genética mayor a la reportada para coníferas ($h= 0.207$). Como se observa en el Cuadro 5.4 hay zonas de muestreo completamente homogéneas, con ausencia de individuos heterocigos para los loci de POX ($h= 0.2327$). De acuerdo con Adams (1983), los niveles de

heterocigocidad en marcadores isoenzimáticos se correlacionan positivamente con la velocidad de crecimiento de los árboles y con genes que controlan características cualitativas de importancia económica. Es decir, que esta disminución de heterocigocidad posiblemente traiga consigo una baja en la calidad de los árboles para la economía estatal. Estas estimaciones conllevaron a la ausencia de loci polimórficos en algunas zonas de muestreo.

Cuadro 5.4
Estadísticos evaluados de diversidad genética de *P. hartwegii*

<i>Parámetro</i>	<i>Isoenzima</i> <i>POX</i>	<i>Núcleo</i> <i>UBC254, ASSR-15, ASSR-29</i>	<i>Mitocondria</i> <i>COX 3in</i>	<i>Cloroplasto</i> <i>10FF/RR</i>
Na	2.0	2.0	1.83	1.85
Ne	1.36	1.32	1.03	1.09
H	0.2307	0.2127	0.0331	0.0764
PL (%PL)	8 (100)	9 (31)	5 (81.3)	6 (85.71)
H _T	0.2286	0.2463	0.0260	0.0876
H _S	0.1263	0.1059	0.0212	0.0474
G _{ST}	0.4476	0.5699	0.1848	0.4567
Nm	0.6172	0.3774	2.2054	0.5948

Na: número de alelos por locus, Ne: número efectivo de alelos, h: diversidad genética de Nei, heterocigocidad, PL: loci polimórficos (%): porcentaje de loci polimórficos, H_T: diversidad genética total de un locus, H_S: diversidad genética dentro de las poblaciones, G_{ST}: diversidad genética entre poblaciones y Nm: flujo genético, el tamaño de muestra para cada marcador fue de 180 árboles.

Fuente: elaboración propia.

Flujo génico: indica que no hay un solo migrante por generación, a excepción de la semilla (mitocondria), que son dos migrantes por generación con los valores más bajos con el marcador de núcleo debido al bajo porcentaje de loci polimórficos (31%). De acuerdo con Wright (1965), se requiere un mínimo de cuatro migrantes por generación para mantener un balance que evite poco flujo genético y consecuentemente deriva génica. Por lo tanto, la polinización cruzada no está siendo eficiente, pues no hay un

transporte adecuado de polen entre las zonas, además son zonas pequeñas, con pocos individuos reproductivos, con demasiados árboles viejos y fragmentación del hábitat y por tanto asilamiento geográfico, lo que conlleva a endogamia.

En el caso de especies leñosas, un aumento en la endogamia reduce la tasa de crecimiento, ocasiona pérdida de vigor y una menor producción de semilla (Squillace, 1970; Ledig, 1998). Como está sucediendo en las zonas de muestreo de *P. hartwegii*, en el Cofre de Perote y Pico de Orizaba, Veracruz (Solís e Iglesias, 2001; López, 2003), donde las zonas de muestreo de esta especie tienen bajos porcentajes de germinación (menos de 10%) y más del 50% de las semillas están vacías, con un impacto significativo en las tasas reproductivas de la especie; además, su tamaño poblacional es pequeño y los individuos se encuentran restringidos espacialmente.

Como se mencionó anteriormente, la diversidad genética total ($H_T = 0.2463$) de *P. hartwegii* fue baja con respecto a otros estudios de coníferas. La diversidad genética dentro de las zonas de muestreo (H_S) fue de 2 a 12%, estos valores tan bajos de ($H_S = 0.12$) permiten inferir que el cruzamiento de la especie está bajo un modelo de panmixia (todos los individuos tienen las mismas posibilidades de aparearse con todos los individuos). Estos resultados indican que las zonas de muestreo se han originado a partir de pocos progenitores femeninos y el polen se distribuye de manera azarosa para la reproducción entre todos los individuos que componen las zonas muestreadas.

La diversidad genética dentro de las zonas de muestreo fue más baja ($H_S = 0.1263$) que entre las zonas de muestreo ($G_{ST} = 0.4476$). Es decir, que los árboles son más parecidos dentro de una zona de muestreo, posiblemente como una respuesta adaptativa a la homogeneidad espacial y temporal del hábitat (altitud, posición geográfica, vegetación, pH, humedad, dirección de los vientos, fisiografía, etc.) donde se encuentra cada población. Esto sugiere también, que estas características del hábitat son diferentes entre cada población, lo que hace que 44.76% de la diversidad genética total esté entre cada una de las zonas de muestreo. Esto coincide con lo que han reportado otros autores en plantas leñosas con entrecruzamiento, referente a que hay mayor variación genética dentro de las zonas de muestreo que entre zonas de muestreo (Hamrick y Godt 1996; Yeh *et al.*, 1999; Schierenbeck *et al.*, 1997; Heaton *et al.*, 1999).

Otra probable causa de la gran diferenciación entre zonas de muestreo es el hecho de estar siendo de mayor impacto la autofertilización para moldear la estructura genética de las zonas de muestreo de *P. hartwegii* en el APFFNT y, por tanto, los

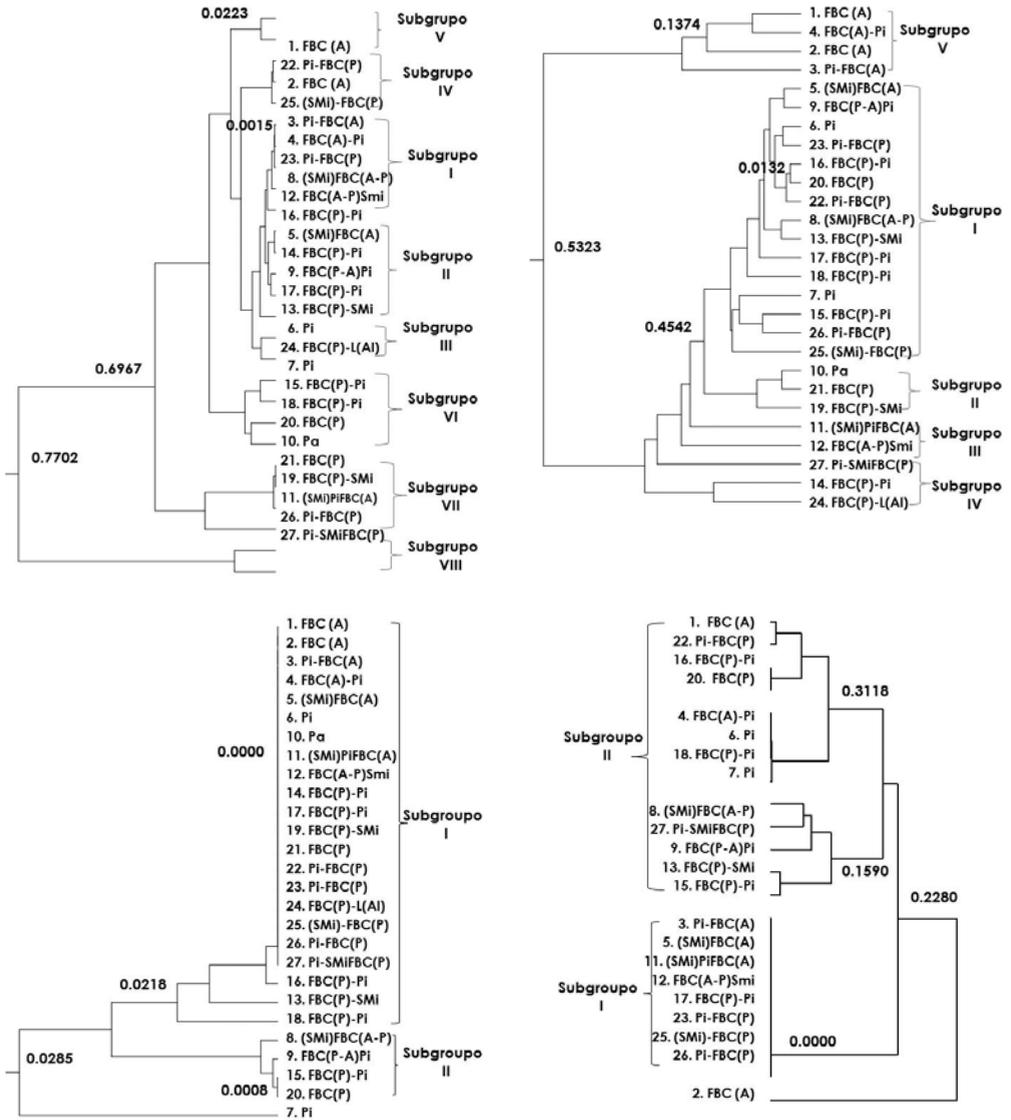
individuos dentro de cada población son muy similares y a su vez diferentes con los árboles de otras zonas de muestreo, lo que las ha diferenciado. La autofertilización de las zonas de muestreo de *P. hartwegii* potencialmente es efecto de que el mayor número de árboles que compone cada población son adultos viejos, por lo que son pocos los adultos reproductores (30%), algunos puntos de muestreo están muy fragmentados lo que disminuye el porcentaje de polinización cruzada (Parraguirre, 2002).

Distancia genética: hubo una notable diferencia entre las DG de las zonas de muestreo más cercanas y las más alejadas (0.0015 a 0.7702), las zonas de muestreo de la zona noroeste (1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 22) son muy homogéneas en su diversidad genética, la mayoría de estas zonas de muestreo estuvieron siempre agrupadas en los dendrogramas (Figura 5.7). Esta zona, además de pinos, está conformada por abetos (*Abies religiosa*), son zonas de muestreo con menor altitud (3 400 msnm). El 42.85% de las zonas de muestreo con árboles sanos (6/14) se encontraron en esta zona.

Asimismo, las zonas de muestreo localizadas en los límites del APFFNT (7, 10, 14, 15, 19, 21, 23, 24) y a una altitud mayor a los 3 400 msnm hasta llegar a los 4 200 msnm son las que presentaron menor diversidad genética. Mitton (1983) muestra que las zonas de muestreo de algunas coníferas localizadas en la periferia presentan bajos niveles de diversidad genética. La poca diversidad genética a mayor altitud posiblemente se debe a que son las zonas más cercanas al límite del parque, lo que conlleva a un contacto con una mayor presión del hombre. Según INEGI (2005), la población vinculada al APFFNT rebasa los 80 000 habitantes, es considerada una zona vulnerable alta, sujeta a tala, ganado, extracción de recursos naturales y agricultura.

Con el marcador de mitocondria (herencia materna) se observó una menor DG entre varias zonas de muestreo lo que indica que son pocos los progenitores femeninos que se han mantenido en estas zonas, en contraste, el polen tiene una mayor dinámica en el agrupamiento de las zonas de muestreo, aunque algunas de éstas tuvieron una DG= 0.0 (Figura 5.7).

Figura 5.7
Dendrograma de los 27 puntos de muestreo, localizados con los marcadores estudiados



Parte superior A. POX, B. ncdNA (RAPD; ASSR), parte inferior: A. mitocondria COX3in, B. cloroplasto SSR.

Fuente: elaboración propia.

El dendrograma para el gen mitocondrial COX3in muestra que se formaron tres subgrupos, para este caso se asume que todas las zonas de muestreo de *P. hartwegii* localizadas en el APFFNT se originaron de una misma población ancestral, con pocos progenitores lo cual se confirma con la presencia de una banda monomórfica. Este dendrograma no aporta coancestría pero sí similitud en una herencia materna y relacionada con los tipos de uso de suelo en los que se muestrearon los pinos.

Los resultados son similares a los de Parraguirre (2002) con *P. gregii*, donde tampoco hubo un patrón de relación entre la diversidad genética de las zonas de muestreo y las regiones geográficas, debido, tal vez, a que son especies endémicas. Además, la diferenciación de las zonas de muestreo depende más del movimiento de los individuos entre las zonas de muestreo que de las fuerzas de selección y mutación.

Los valores de diversidad genética observados en este estudio fueron menores en las zonas de muestreo ubicadas al noroeste del APFFNT, con respecto a las zonas de muestreo en la zona centro del APFFNT. Estas condiciones están llevando a las zonas de muestreo de *P. hartwegii* en el APFFNT a la deriva génica. Ya que se están formando subpoblaciones aisladas por distancia, que a su vez forman una metapoblación (conjunto de subpoblaciones locales interconectadas por flujo génico) en el APFFNT aislada de otras poblaciones de la faja neovolcánica principalmente, estos factores aumentan la posibilidad de deriva génica en la especie.

Como lo demuestra el trabajo de Candeau y Franco (2007), el cambio de uso de suelo es dañino para especies del género *Pinus*, en particular; los individuos que se localizan en la zona del cráter con una pérdida de 8 000 hectáreas de bosque, además, no se ha tenido mejora a pesar de los intentos realizados para la recuperación de estas zonas. En un contexto global del APFFNT, en el 2000 tuvo una disminución del 40% de bosque de pino, específicamente por la extracción intensiva y semiintensiva de la madera con fines comerciales. Pues, contradictoriamente a lo que se presentaba tres décadas atrás, el uso de suelo para actividades de agricultura se ha visto disminuido. Por una parte, porque los suelos del área no son para uso agrícola, sino son de vocación forestal (INEGI 2001) y, por otra, porque los labriegos han encontrado más redituables las actividades maderables.

Además de la fragmentación del hábitat, ocurre la extracción de otros recursos. El musgo, por ejemplo, es removido del suelo en grandes cantidades (toneladas) para uso ornamental, especialmente en las épocas navideñas, su papel es básico dentro de la dinámica de los bosques para mantener la humedad, detener la erosión, interceptar

la lluvia, absorber los contaminantes del aire y favorecer el desarrollo de plantas y animales. Asimismo, se realizan actividades como la ganadería, el cultivo de peces (trucha) y la extracción de recursos minerales.

Estos resultados suponen una preocupación mayor, debido a que cada población tiene un pool genético importante para la adecuación de las demás zonas de muestreo, por lo que debe conservarse al menos un porcentaje de cada población para mantener la especie en el APFFNT. Algunos rasgos dependen de la distribución espacial (latitud y altitud) de la especie, en este caso de la distribución altitudinal (Mitton, 1983).

CONCLUSIONES

P. hartwegii tiene bajos niveles de diversidad genética ($h = 0.20$) en el APFFNT, y en comparación con otras especies de pinos ($h = 0.35$).

Los pinos con muérdago o descortezador tuvieron mayor diversidad genética en comparación con otros del APFFNT, posiblemente como un mecanismo de evolución.

A través de los marcadores RAPDS se encontraron alelos importantes para seleccionar árboles resistentes a las plagas de muérdago y descortezador.

Con el marcador microsatélite de cloroplasto (10FF/RR) se encontraron alelos relevantes que se relacionan con la distribución geográfica de la especie en el APFFNT.

La mayor diversidad genética se encontró entre puntos de muestreo debido a que el sistema de entrecruzamiento no está siendo efectivo en cuanto al transporte de polen, posiblemente por:

- a) La fragmentación del hábitat, tala y poblaciones con pocos árboles reproductivos.
- b) Los árboles dentro de cada población se están autofecundando lo que conlleva a la pérdida de alelos que no son frecuentes y la fijación de los más frecuentes.

La fijación de los alelos más frecuentes aumenta el número de homocigos y disminuye el número de heterocigos, por lo que la diversidad genética es baja con respecto a otras especies, causando deriva génica en las poblaciones de *P. hartwegii* en el APFFNT.

Así, las zonas de muestreo conforman poblaciones genéticas, que a su vez constituyen una metapoblación de *P. hartwegii* en el APFFNT.

A través de estos resultados se pueden sentar las bases para proponer un programa de conservación de *P. hartwegii* en el APFFNT basado en estrategias *in situ* y *ex situ*.

A continuación se presentan algunas recomendaciones para el manejo y la conservación de *P. hartwegii* en el APFFNT.

RECOMENDACIONES

Ante la problemática y los resultados expuestos en el presente estudio se justifica que se tomen en cuenta las propuestas de conservación, basadas en los recursos genéticos de los pinos, de lo contrario algunas zonas de distribución de esta especie podrían desaparecer; originando el aumento de temperatura, la disminución de lluvia y con ello de los cuerpos de agua que abastecen el occidente del Estado de México, así como la alteración de las redes tróficas, la desaparición de especies endémicas y la reducción de ingresos económicos para ciertos sectores de la sociedad.

Hernández (1995) apunta que cuando hay poca diversidad genética es conveniente utilizar técnicas silvícolas en lugar de métodos genéticos. Los métodos genéticos son útiles para seleccionar caracteres de valor económico. La diversidad genética de *P. hartwegii* fue baja ($h = 0.2$) con respecto a la mayoría de las coníferas ($h = 0.35$), pero similar a otras especies de *Pinus* que de igual manera a esta especie han sido clasificadas como raras o endémicas.

De acuerdo con la información derivada del presente estudio se sugiere implementar las siguientes estrategias de conservación *in situ*:

- Formación de barreras entre áreas sanas y enfermas con semillas de individuos con diferentes niveles de resistencia a plagas y enfermedades.
- Permitir el corte gradual de individuos altamente infestados, especialmente en las zonas con árboles viejos.
- Crear unidades genéticas de estricta conservación con los individuos de mayor diversidad genética, en ellas se puede permitir la tala de un máximo del 15% de acuerdo con el número de migrantes por generación.
- Crear unidades genéticas de semiconservación con los individuos de menor diversidad genética, en donde puede talarse hasta un 30% de la población.
- Formar corredores de vegetación con la especie respectiva en las zonas altamente fragmentadas para estimular la dispersión de semilla y polen (flujo genético).

Y como una medida de conservación *ex situ* se sugiere:

Clonar individuos de poblaciones con alta diversidad genética y reintroducirlos en áreas de baja diversidad genética.

La reforestación no debe incluir especies exóticas (que no pertenecen a este ecosistema) como cedro blanco (*Cupressus* sp.) que compiten con las especies nativas y causan daños a las condiciones fisiográficas del lugar. Este estudio debe complementarse con aspectos fisiográficos para mantener los sistemas de cruzamiento, dispersión de polen y semillas. Considerar cuántos individuos debe de conservarse, para el caso de coníferas se recomienda proteger de 1 500 a 20 000 individuos para asegurar un tamaño efectivo de la población (árboles reproductores). Finalmente, es preciso promover la cultura ambiental para la protección del APFFNT, ya que depende de la sociedad el cuidado de los ecosistemas, pues son vanos los esfuerzos científicos y tecnológicos si no hay una concientización ecológica de nuestro ambiente por parte del ser humano.

CASO II: *ABIES RELIGIOSA*

INTRODUCCIÓN

El oyamel (*Abies religiosa* (HBK) Schltdl. et Cham.) forma bosques cuyas áreas de mayor extensión se encuentran en la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM), donde domina el estrato arbóreo superior y es además una especie sombrilla, es decir, sus poblaciones son indicadoras de la salud del ecosistema, y su existencia asegura la permanencia de muchas especies, por lo tanto, los bosques de oyamel albergan una gran riqueza de especies (Sánchez *et al.*, 2005).

Los bosques de *Abies religiosa* pueden encontrarse naturalmente en sistemas montañosos, dentro de un gradiente altitudinal lo que conduce a su vez a la diferenciación de las poblaciones a mayores altitudes, las condiciones ambientales son mucho más drásticas y las plantas dependen de microclimas y condiciones topográficas específicas que crean una marcada diferencia fenológica (Rzedowski, 1981).

Las comunidades de oyamel presentan una mayor abundancia de especies de plantas y animales, así como mayor densidad de sus poblaciones, porque forman una comunidad más densa, con mayor volumen de germoplasma y con estratos arbustivos, herbáceos y rastreros que contienen mayor diversidad biológica, por

ejemplo, conforman el hábitat de hibernación de la mariposa monarca (*Danaus plexippus* L.); el gran follaje de los oyameles provoca además un ambiente de sombra y humedad que permite la proliferación de hongos, musgos, helechos y hepáticas. Esta condición de humedad interna del bosque se vuelve negativa cuando se derriban los árboles y se dejan restos o desperdicios de madera dentro del bosque, ya que esto ocasiona la infestación de árboles en pie por hongos u otros organismos que pueden causar enfermedades (Sánchez *et al.*, 2005; Villers *et al.*, 1998).

El APFFNT se encuentra bajo una constante presión por parte de los múltiples asentamientos humanos con los cuales interactúa, lo que ha provocado la fragmentación del hábitat a causa de la tala ilegal y desmedida de árboles, facilitando así la dispersión de parásitos descortezadores y muérdagos. Como lo ha reportado Endara (2010), en especial el oyamel está seriamente amenazado por dos parásitos: el muérdago enano (*Arceuthobium abietis-religiosae*) y el escarabajo descortezador (*Pseudohylesinus variegatus*).

Resulta evidente que a pesar de estar en un ANP, los bosques del APFFNT se encuentran en un estado de deterioro preocupante, por un lado, las actividades antrópicas, principalmente la tala ilegal que conlleva el clareo de la masa forestal y ésta a su vez facilita la invasión de parásitos y enfermedades en el arbolado; y, por otro, el escaso o nulo manejo que se le ha proporcionado al bosque hacen necesario implementar estrategias de manejo y conservación efectivas que contrarresten el deterioro del bosque.

La biología de la conservación intenta proporcionar una base para el manejo inteligente de los ecosistemas altamente perturbados y ayuda a entender los procesos funcionales de los ecosistemas para mantener su diversidad. La genética es una disciplina muy importante en la biología de la conservación, los principios genéticos son aplicados a la conservación y tal ha sido su impacto que ha surgido una disciplina llamada genética de la conservación, por supuesto, su fin es la conservación de los recursos genéticos con base en la diversidad genética (Sáenz *et al.*, 2003; Frankham, 2003).

Los programas de conservación frecuentemente ignoran la diversidad genética, misma que es responsable de eventos biológicos como la adecuación y adaptación de las especies.

Por estos motivos se analizó la diversidad genética del oyamel (*Abies religiosa* (HBK) Schltdl. *et* Cham.) en el APFFNT con cuatro tipos de marcadores moleculares: DNA de cloroplasto (cpDNA), mitocondria (mtDNA), nuclear (ncDNA), y con una isoenzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

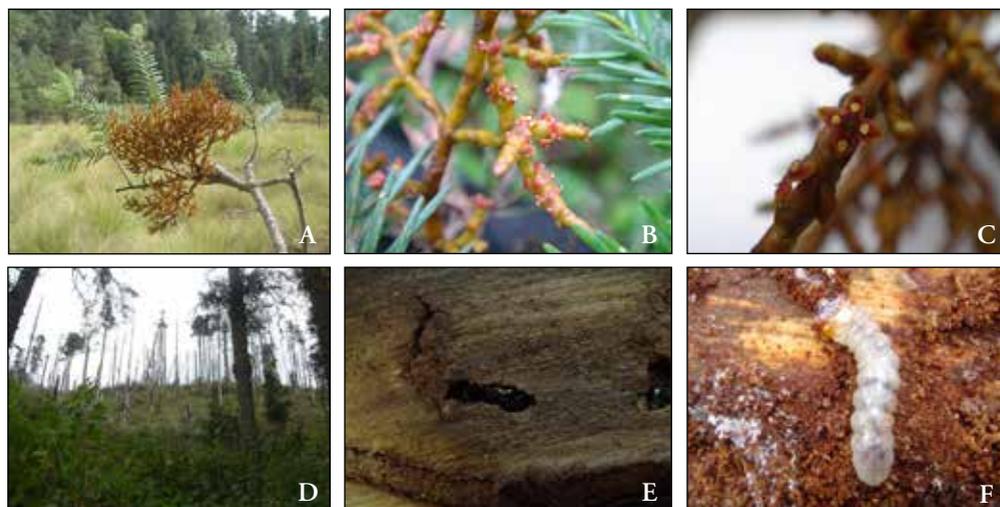
La metodología fue la misma que se utilizó para *P. hartwegii*, con algunas modificaciones para *Abies religiosa*, las cuales se describen a continuación.

Selección de los puntos de muestreo y colecta del material vegetal

Se colectó material vegetal (acículas) de 17 puntos de muestreo de *Abies religiosa* en el APFFNT. Se tomaron muestras de árboles que presentaban muérdago (*Arceuthobium* spp.) y rastros de presencia de descortezadores (*Pseudohylesinus variegatus*) (Figura 5.8), además se colectó muestra de árboles aparentemente sanos o control.

Figura 5.8

Muestras de árboles que presentan muérdago y rastros de presencia de descortezadores



A: *Arceuthobium abietis-religiosae* en ramas de *Abies religiosa* se observa el tumor en el sistema endofítico, brote nuevo; B: ramas de muérdago enano de oyamel; C: se observa la flor tetrámera de muérdago. D: efectos del descortezador en un bosque de oyamel del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, se observan individuos muertos, E: individuo adulto de descortezador de oyamel *Pseudohylesinus variegatus*, F: larva de *P. variegatus*.

Fotografías de Amaury Martín Arzate Fernández.

Se colectaron en total muestras de 128 individuos, se tomaron 100 g de acículas y se conservaron como las muestras de pino (Figura 5.9).

Figura 5.9
Colecta de muestras de *Abies religiosa* en el APFFNT



A: toma de acículas, B: cálculo de diámetro a la altura del pecho (DAP), C: cálculo de la altura, D: marcaje del árbol muestreado, E: acículas de oyamel colectadas en bolsa de polietileno, F: toma de georreferencia con un GPS. Fotografías de Amaury Martín Arzate Fernández.

Se localizó en un mapa del área cada uno de los puntos muestreados (Figura 5.10), distribuidos en 14 localidades y 5 municipios que forman parte del ANP (Cuadro 5.5).

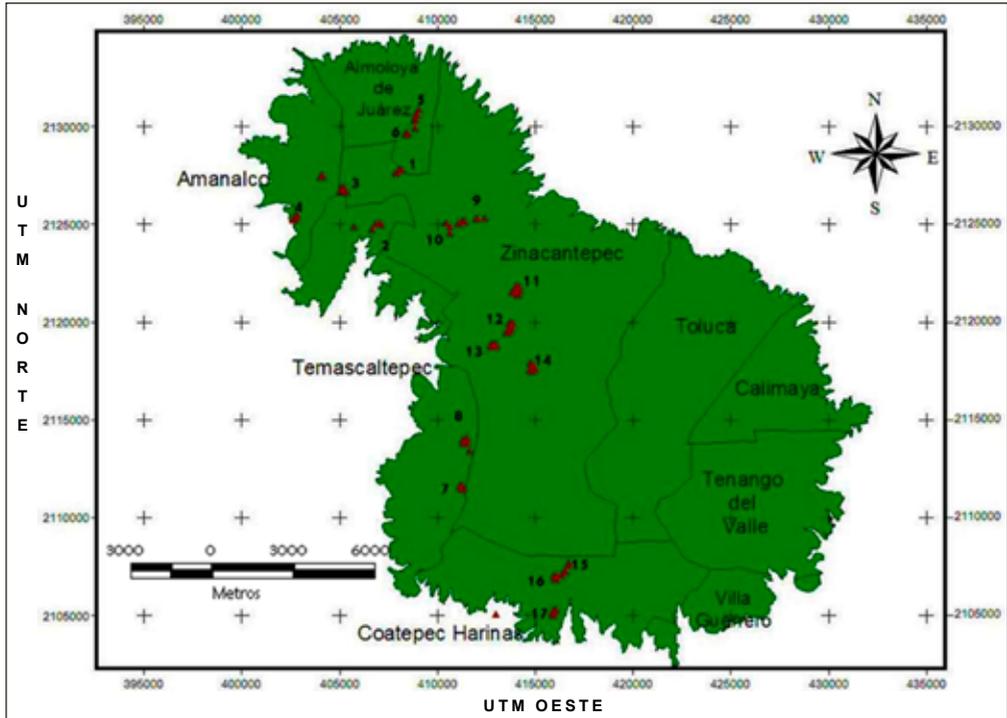
Cuadro 5.5
Localidades y municipios donde se encuentran los puntos de muestreo analizados
de *Abies religiosa* (Ar), en algunas se asocia con *Pinus hartwegii* (Ph)

<i>Localidad o punto de referencia</i>	<i>Municipio</i>	<i>Presencia de la especie (Ar/Ph)</i>
El Capulín	Zinacantepec	Ar/Ph
San Francisco Oxtotilpan	Temascaltepec	Ar/Ph
Llano La Lagunita	Amanalco de Becerra	Ar/Ph
Cerca de Llanos	Amanalco de Becerra	Ar/Ph
Corral de Piedra	Amanalco de Becerra	Ar/Ph
Rosa Morada	Almoloya de Juárez	Ar/Ph
Rosa Morada Segunda Sección	Almoloya de Juárez	Ar/Ph
Cerro Gordo	Coatepec Harinas y Zinacantepec	Ar/Ph
Oeste de Loma Alta	Zinacantepec	Ar/Ph
La Ciénega	Zinacantepec	Ar/Ph
Buenavista I	Zinacantepec	Ar/Ph
Jara (entrada por Ejido Agua Bendita)	Coatepec Harinas	Ar
Puente Caído (camino a Tlacotepec)	Coatepec Harinas	Ar
Entrada a la Tinaja	Coatepec Harinas	Ar

Fuente: elaboración propia.

Figura 5.10

Ubicación de los puntos de muestreo en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, se muestran los municipios que conforman el área, y el número de población



Fuente: elaboración propia.

Análisis isoenzimático

Se hicieron pruebas con las enzimas peroxidasa POX (1.11.17), málica MAL (1.11.40) y malato deshidrogenasa MDH (1.11.37).

Análisis de DNA

Se utilizaron dos iniciadores para cpDNA, dos para mtDNA, y dos iniciadores para ncdDNA (ASSR) para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Cuadro 5.6).

Cuadro 5.6

Iniciadores utilizados para amplificar DNA de cloroplasto (cpDNA) (Parducci y Szmidt, 1999), DNA mitocondrial (mt DNA) (Weng-Qing *et al.*, 1999 y Wang *et al.*, 2000) y DNA nuclear (ncDNA) (Yamagishi *et al.*, 2002), con sus respectivas secuencias y nombres

<i>Tipo de marcador</i>	<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>
Cloroplasto	trn-K	5'-GGGTTGCCCGGGACTCGAAC-3' (Fw) 5'-CAACGGTAGAGTACTCGGCTTTTA-3' (Rv)
	trnQ-trnG	5'-TCGAACCTCCGAATAACAGG-3' (Fw) 5'-CGCATCGTTAGCTTGAAG-3' (Rv)
Mitocondria	nad-5	5'-GGAAATGTTTGATGCTTCTTGGG-3' (Fw) 5'-CTGATCCAAAATCACCTACTCG-3' (Rv)
	cox 3 in	5'-GTA GAT CCA AGT CCA TGG CCT-3' (Fw) 5'-GCA GCT GCT TCA AAG CC-3' (Rv)
Núcleo	ASSR-20	5'-(CT) ₇ ATG-3'
	ASSR-15	5'-(CT) ₇ GCA-3'

Fuente: elaboración propia.

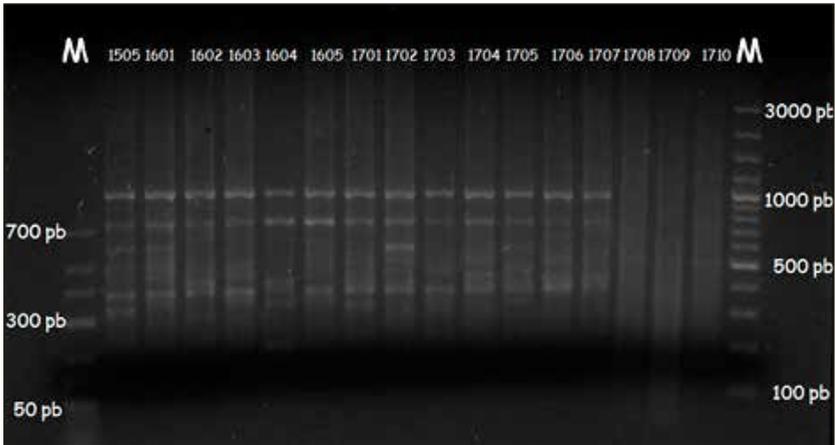
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de DNA

Los valores de variabilidad genética con los iniciadores de cloroplasto, mitocondria y núcleo para *A. religiosa* fueron altos comparados con los valores que se reportan para coníferas y otras especies de *Abies*, los más altos fueron para DNA de cloroplasto ($h= 0.02-0.3822$), intermedios con DNA mitocondrial ($h= 0-0.3462$), y bajos para DNA nuclear (Figura 5.11) e isoenzimas ($h= 0-0.3362$) (Figura 5.12). A continuación se detalla el porqué de estos resultados.

Flujo génico: fue muy bajo con todos los marcadores ($N_m = 0.17-0.58$), esto es importante porque implica que se reduce el intercambio genético, es decir, provoca que las poblaciones estén diferenciadas genéticamente y al mismo tiempo presenten niveles de variabilidad genética intrapoblacionales (G_{ST} y F_{ST}) más altos que los interpoblacionales (H_s y H) (Cuadros 5.7 y 5.8). Todos los iniciadores utilizados para amplificar DNA y la isoenzima POX presentaron niveles altos de polimorfismo (90 y 100%) (Cuadro 5.7).

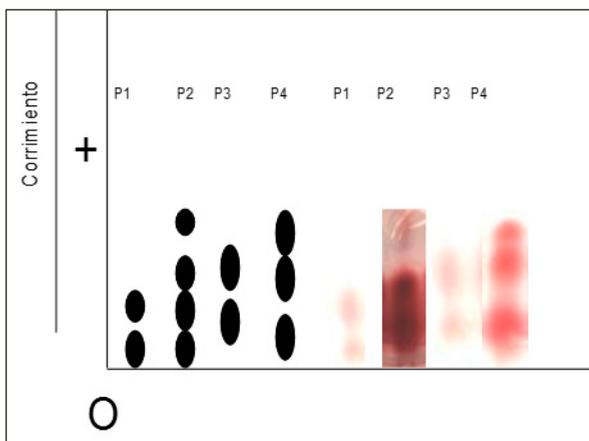
Figura 5.11
Polimorfismo en el genoma nuclear de *A. religiosa*



Bandas amplificadas con el iniciador de ncdNA ASSR15 del individuo 1505 al 1710, donde los primeros dos dígitos indican el número de población, y los dos últimos dígitos indican el número de individuo. En los extremos se encuentra el marcador de peso molecular (M) con sus respectivos pesos expresados en pares de bases (pb).

Fuente: elaboración propia.

Figura 5.12
Enzimograma esquemático y representación
fenotípica de la isoenzima POX para *Abies religiosa*



Los números en la parte superior indican los patrones de bandeo (PB) que se obtuvieron de la combinación de las bandas totales obtenidas. o: origen del corrimiento.

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 5.7
Número de bandas amplificadas con iniciadores de DNA de cloroplasto (cpDNA),
mitocondria (mtDNA), núcleo (ncDNA) y con la isoenzima POX,
para diecisiete puntos de muestreo de *A. religiosa* del APFFENT, ND: dato no disponible

Parámetro	Marcador molecular						
	cpDNA		mtDNA		ncDNA		Isoenzima
	<i>cptrnK</i>	<i>cptrnQ-trnG</i>	<i>cox-III</i>	<i>nad-5</i>	<i>ASSR15</i>	<i>ASSR20</i>	<i>POX</i>
Número de bandas	10	8	8	5	7	10	4
Bandas polimórficas	9	8	8	5	7	10	3
Rango de pares de bases amplificadas de los fragmentos amplificados	2900-2700	3000-300	700-50	900-300	1200-200	1700-400	ND
Porcentaje de polimorfismo	90%	100%	100%	100%	100%	100%	90%

Fuente: elaboración propia.

Número observado y efectivo de alelos por locus (Na, Ne): el número efectivo de alelos por locus más alto se obtuvo con cpDNA (Ne= 1.7127), mientras que para mtDNA y ncdDNA fue de 1.4931 y 1.4870, respectivamente. Esto implica que el número de alelos variables tienden a ser 2, es decir, los loci analizados son en su mayoría heterocígos. Esto queda muy claro si se analizan las medidas de diversidad genética restantes.

Cuadro 5.8
Valores de diversidad genética para cpDNA, mtDNA y ncdDNA en puntos de muestreo de *A. religiosa* del APFENT, ND: dato no disponible

<i>Parámetro de genética poblacional</i>	<i>Marcador molecular</i>			
	<i>cpDNA</i>	<i>mtDNA</i>	<i>ncDNA</i>	<i>POX</i>
Número observado de alelos (Na)	2.000	2.000	2.000	ND
Número efectivo de alelos (Ne)	1.7127	1.4931	1.4870	ND
Diversidad genética de Nei (h)	0.4021	0.2982	0.2964	0.2295
Diversidad genética total por locus (H _T)	0.3955	0.3190	0.2973	ND
Diversidad genética interpoblacional (H _S)	0.1870	0.1571	0.1589	ND
Diversidad genética intrapoblacional (G _{ST} /F _{ST})	0.5273	0.5077	0.4589	0.5874
Flujo génico (Nm)	0.4483	0.4849	0.5895	0.1756
Endogamia interpoblacional (F _{IS})	ND	ND	ND	-0.3413
Reducción de la heterocigidad (F _{IT})	ND	ND	ND	0.4466

Fuente: elaboración propia.

Diversidad genética de Nei (h) y heterocigidad (H): la variabilidad genética de cpDNA, mtDNA y ncdDNA mostró niveles bajos de h (h= 0.2982-0.4021). La diversidad genética total por locus fue alta para cpDNA y mtDNA (H_T 0.2973-0.3955). La diversidad genética interpoblacional fue baja en todos los casos (H_S= 0.1); de manera que la variabilidad genética intrapoblacional (G_{ST}, F_{ST}= 0.5) fue la más alta (tal como se indicó por los niveles de flujo génico) (Cuadros 5.7 y 5.8). Los valores de h bajos para los marcadores de cpDNA y mtDNA pueden deberse a la manera en que se heredan ambos genomas; a saber, el cpDNA se hereda vía paterna (polen) mientras

que el mtDNA se hereda vía materna (semillas), esto implica que ambos genomas pasan directamente a la descendencia sin recombinarse, por tanto, la diversidad se reduce.

El polen se dispersa por el viento, pero si las poblaciones, como es el caso del APFFNT, son fragmentadas el polen no tiene oportunidad de combinarse con todos los individuos, así, la diversidad de este genoma se ve reducida. Es importante mencionar que el flujo génico por polen es suficiente para prevenir el aislamiento de las poblaciones, ya que éste es dispersado por el viento, pero si está limitado provoca diferenciación poblacional que aunque puede causar también mayor diversidad genética, implica que un mayor número de puntos de muestreo deban conservarse, pues cada uno representa un valor genético único (Aguirre *et al.*, 2000).

Las semillas tienen oportunidades aún más bajas de viajar grandes distancias para incrementar la variabilidad, por esta razón es que la diversidad de este genoma tiende a ser la más baja para algunos parámetros (H , H_S y H_T), nuevamente es muy probable que la fragmentación del bosque impida la transmisión de semillas entre zonas, a esto se le puede sumar el hecho de que la fauna que normalmente consume las semillas y las transporta a grandes distancias, es muy poca en los sitios de muestreo.

Estadísticos de Wright: con el marcador POX se pudieron obtener parámetros de estructura poblacional, llamados estadísticos de Wright. Según los resultados obtenidos existe un exceso de heterocigotos ($F_{IS} = -0.3413$), el grado de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg respecto a las frecuencias observadas y las esperadas fue de $F_{IT} = 0.4466$, mientras que la diferenciación poblacional fue de $F_{ST} = 0.5874$ (Cuadro 5.8), estos valores son muy similares a los reportados para las coníferas (Ledig, 1997; Parducci y Szmidt, 1999; Aguirre *et al.*, 2000; Ettl y Peterson, 2001; Shea y Furnier, 2002; Jaramillo y Bousquet, 2005). Estos resultados son congruentes con las medidas de variabilidad antes mencionadas ya que el parámetro F_{IT} indica que existe endogamia entre los puntos de muestreo estudiados, lo cual explicaría también los valores bajos de h , H_S y de Nm , lo cual a su vez implica que exista un alto grado de diferenciación poblacional, esto puede utilizarse a la hora de realizar propuestas de manejo, pues mientras más diferentes sean las zonas, más áreas se deberán conservar ya que cada una constituye un recurso único.

Distancia genética: con los datos obtenidos mediante los cuatro marcadores usados se generaron cuatro dendrogramas con base en las distancias y variabilidad genéticas, en dichos dendrogramas se formaron dos grupos principales, y se observó

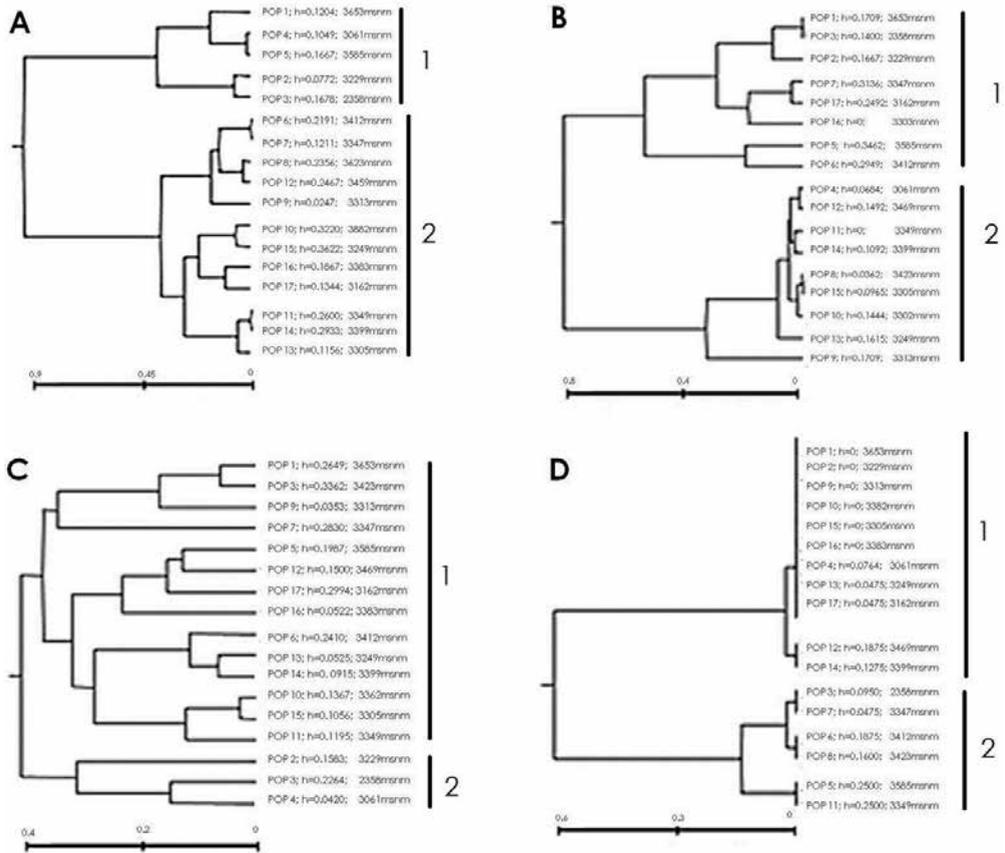
que además de su similitud genética, se agruparon los organismos analizados por similitudes ecológicas y ambientales (Figura 5.13).

La distancia genética es otra forma de estimar en qué grado se diferencian los puntos de muestreo. En los dendrogramas se formaron dos grupos, por una parte, todos los puntos de muestreo que forman los grupos 1 en cada dendrograma son genéticamente parecidos, lo mismo para los grupos 2 de cada dendrograma, estos grupos se conformaron según el grado de similitud genética entre ellos, y no por su cercanía geográfica.

En el caso de los dendrogramas de cloroplasto (cpDNA) y peroxidasa (POX) los grupos 1 contienen baja variabilidad y los 2 tienen alta variabilidad genética. Para los dendrogramas de mitocondria (mtDNA) y de núcleo (ncDNA) los grupos 1 tienen alta variabilidad y los del 2 alta (Figura 5.13).

El dendrograma de cloroplasto indica cómo puede estarse llevando a cabo el flujo de polen. Este genoma fue el de mayor diversidad genética, los puntos de muestreo del norte están separados genéticamente de los del sur y tuvieron menor diversidad genética; posiblemente esto se deba a que en esa zona el bosque está menos fragmentado, e implica que haya mayor flujo de polen y los puntos de muestreo sean más parecidos; en cambio, en los puntos de muestreo del sur el bosque de *Abies* está más fragmentado por lo que el flujo de polen se interrumpe en las zonas donde no hay oyameles y esto provoca diferenciación entre los puntos de muestreo.

Figura 5.13
Dendrogramas para 17 puntos de muestreos de oyamel



(A) cloroplasto, (B) mitocondria, (C) núcleo, (D) POX. Variabilidad genética (h) y altitud (msnm) de cada población se muestran a la derecha, debajo la distancia genética (DG), y los números 1 y 2 indican el grupo formado según su diversidad genética.

Fuente: elaboración propia.

El dendrograma de mitocondria indica cómo es el flujo de semillas en las poblaciones del APFFNT. Se observa un agrupamiento de los puntos de muestreo del norte y en otros del sur, sin embargo, dos de los puntos de muestreo del sur (16 y 17) probablemente, entraron en el grupo 1 (del norte), ya que el flujo de semillas por sí solo es muy difícil

que se lleve a grandes distancias, la similitud en variabilidad genética de estos puntos de muestreo pudiera ser por la retención de polimorfismos ancestrales.

En cuanto a los dendrogramas de DNA nuclear y POX, no se observó un agrupamiento que siguiera el mismo patrón (ubicación geográfica), más bien se advierte que los puntos de muestreo del norte se agrupan con algunos del sur, en ambos casos, cabe recordar que tratamos con un genoma que pasa por procesos de recombinación, tanto el DNA del núcleo como la enzima peroxidasa contienen DNA de progenitores femeninos y masculinos, por lo que no es de extrañar este agrupamiento.

Esto tiene implicaciones para la conservación, en primera instancia, los grupos con alta variabilidad genética deberían ser sujetos a medidas de conservación *in situ*, y los de baja variabilidad a medidas de conservación *ex situ*.

Distribución geográfica de la variabilidad genética

Según los análisis de correlación lineal existe una diferenciación altitudinal en los puntos de muestreo estudiados, siendo a mayores altitudes donde existen organismos con mayor variabilidad genética. Esto es, se encontró una correlación positiva entre las variables altitud y variabilidad genética con los cuatro marcadores utilizados (cpDNA y altitud: $r^2 = 2.87$, $F = 3.73$, $p = 0.0557$; mtDNA y altitud: $r^2 = 0.42$, $F = 0.54$, $p = 0.46$; ncdDNA y altitud $r^2 = 12.7$, $F = 18.33$, $p = 0.0000$; POX y altitud $r^2 = 11.2$, $F = 15.91$, $p = 0.0001$).

La variabilidad de cpDNA, además de ser alta, presentó diferenciación altitudinal. De esta manera, probablemente el flujo de polen es mayor a mayores altitudes, puesto que los puntos de muestreo que se encuentran a mayor altitud suelen estar menos perturbados, por lo tanto, es posible que el tamaño efectivo poblacional sea también mayor, y un mayor número de individuos participen en la transmisión de polen. Los marcadores de herencia biparental (isoenzimas y ncdDNA) también mostraron diferenciación altitudinal, observándose que a mayor elevación hubo mayor variabilidad genética, lo cual es común en poblaciones que deben adaptarse a condiciones extremas, como ocurre en grandes altitudes, donde las temperaturas son muy bajas, la humedad disminuye y el suelo es más delgado; comúnmente en estos sitios se encuentran los mejores fenotipos (Bidwell, 1979). Asimismo, ocurre que estos puntos de muestreo son los menos perturbados y la pérdida de individuos

por tala es menor de manera que se conservan alelos diferentes a los de los puntos de muestreo que se encuentran a menores altitudes. Estos puntos de muestreo pueden ser propuestos como unidades de conservación (Sáenz y Tapia, 2003).

*La diversidad genética en coníferas y consideraciones para *Abies religiosa**

Considerando el valor de $G_{ST} = 0.188$ reportado para coníferas (Yoshihiko *et al.*, 2000) y comparándolo con nuestro resultado ($G_{ST} = 0.5273$), este último fue un valor alto probablemente debido a las altas tasas de variación interespecífica que posee este genoma, el cual es el más polimórfico en las coníferas debido a la presencia de múltiples regiones variables (Parducci y Szmidt, 1999). Clark *et al.* (2000) reportaron un promedio de $h = 0.76$ para tres especies de coníferas, mientras que Parducci *et al.* (2001) encontraron un $h = 0.964$ para tres especies de oyamel; por otra parte, en el presente estudio se encontró un $h = 0.4021$ (Cuadro 5.8).

Los niveles de variabilidad genética de cpDNA obtenidos pueden considerarse altos para los puntos de muestreo estudiados, pues hay que recordar que este tipo de genoma se hereda del progenitor paterno y no existe recombinación y pasa linealmente a lo largo de las generaciones, por otra parte, debe considerarse que la tala excesiva provoca pérdida de individuos en los puntos de muestreo del APFFNT, y esta eliminación de individuos trae como consecuencia la eliminación de alelos, por lo tanto, las áreas de *Abies* del APFFNT se encuentran estables.

El genoma mitocondrial es heredado del progenitor materno en coníferas (Liepelt *et al.*, 2002); en el presente estudio, los valores de variabilidad genética obtenidos con mtDNA fueron más bajos ($h = 0.2982$) que los de cloroplasto ($h = 0.4021$); ha sido ampliamente reportado que el genoma mitocondrial posee las tasas más bajas de evolución en las plantas (Zhang y Hewitt, 2003); la semilla (donde se encuentra este DNA) tiene menor capacidad de dispersión en comparación con el polen; de manera que, si aunado a esto se consideran los problemas que atraviesan las poblaciones en el APFFNT (tala, parásitos), la variabilidad genética mitocondrial disminuye mucho más. Estos resultados son más altos que los reportados por Jaramillo y Bousquet (2005), quienes estudiaron la variabilidad genética mitocondrial de dos coníferas (*Picea* spp.) ($h = 0.3242$), atribuyendo los resultados a que las coníferas de dicho estudio presentaron indicios de hibridización a nivel de mtDNA. En el APFFNT los

bosques de oyamel son monoespecíficos, por lo que las probabilidades de que existiera hibridización son muy pocas.

La variabilidad genética a nivel de mtDNA en *A. religiosa* no ha sido reportada, así, para este caso, la variabilidad puede considerarse alta en el APFFNT, debido a que el flujo génico fue muy bajo ($N_m = 0.1756-0.5895$). Esto indica la posibilidad de que los puntos de muestreo puedan estar pasando por un proceso de aislamiento y cada población representa un valor único para la preservación de la adaptación y adecuación de la especie.

En este estudio la diversidad genética a nivel de DNA nuclear (herencia biparental) fue de $h = 0.2937$ (Cuadro 5.8). Existen pocos estudios en donde se utilizó nCDNA en el género *Abies*, por ejemplo, para *A. guatemalensis* y *A. nordmanniana* de $G_{ST} = 0.137$, y para *A. nordmanniana*, $G_{ST} = 0.007$ (Petit *et al.*, 2005), ambas especies en peligro, pues sus poblaciones están severamente perturbadas. El *Abies religiosa* del APFFNT presentó valor de $G_{ST} = 0.4589$, el cual se atribuye al flujo génico tan bajo ($N_m = 0.5895$) (Cuadro 5.8).

El polen posee la mayor capacidad de dispersión, por lo que aparentemente el flujo génico por polen debería ser más importante en el oyamel, de hecho, la mayoría de las plantas dependen de éste para el intercambio genético (Petit *et al.*, 2005), sin embargo, los valores de N_m más altos fueron los de nCDNA, por tanto, el flujo génico depende principalmente de la semilla para los puntos de muestreo de *A. religiosa* estudiados (Latta y Mitton, 1997).

Para el marcador peroxidasa se obtuvo un valor de $H = 0.0868$ y para flujo génico de $N_m = 0.1756$. Esto fue muy similar a lo que se ha reportado a nivel de isoenzimas para *Abies* mexicanos de $H = 0.082$ (Furnier y Eguiarte, 1997, Aguirre *et al.*, 2000). Esto contrasta con lo reportado para otras especies, donde se encontraron bajos niveles de variabilidad genética para *Abies* mediterráneos y norteamericanos ($H = 0.040$, $H = 0.015$, respectivamente) (Fady y Conckle, 1993; Shea y Furnier, 2002; Ettl y Peterson, 2001); estas diferencias entre niveles de polimorfismo pueden deberse a diferencias ambientales y al tipo de isoenzimas evaluadas.

En el presente estudio se evaluó la enzima POX la cual está relacionada con procesos de defensa y mecanismos de respuesta ante otros tipos de estrés (Tarragó *et al.*, 2003). En un estudio sobre resistencia a la herbivoría de *Pinus edulis*, se encontró un exceso de heterocígos a nivel peroxidasa y fue atribuido al papel de ésta en la resistencia del pino a la presencia de patógenos (Mopper *et al.*, 1991). Los resultados sugieren

un alto nivel de variabilidad genética, lo cual podría ser indicador de que el oyamel presenta una buena respuesta de defensa frente a parásitos.

De manera general, se espera que el genoma nuclear, por heredarse biparentalmente y por poseer recombinación, sea el que presente niveles más altos de variabilidad genética; en este estudio los niveles más altos de variabilidad se obtuvieron para el cloroplasto. Es posible que el tamaño efectivo poblacional esté reducido para nCDNA; el que un genoma sea heredado paternalmente no implica que sólo se transmita por polen, pues estos genes se transmiten sólo en los ciclos reproductivos, mientras que de los genes nucleares sólo 50% pasa a la siguiente generación, lo que significa que en una población diploide sólo la mitad de los alelos originales están presentes en los nuevos individuos (Moreno *et al.*, 2007).

Así, los puntos de muestreo pequeños persisten con altos niveles de variabilidad y los grandes con bajos niveles. Los valores altos de G_{ST} para los cuatro marcadores podrían estar indicando un comportamiento metapoblacional, y si esto estuviera ocurriendo, un efecto fundador podría reducir la variabilidad encontrada. Niveles altos de variabilidad genética y bajos de flujo génico revelan una estructura especial definida y sugieren que fuerzas evolutivas como la selección natural o la deriva génica pueden estar moldeando los puntos de muestreo (Aguirre *et al.*, 2000); en el caso del oyamel, estas fuerzas tenderían a disminuir la variabilidad genética, de modo que no se puede asumir que niveles altos de variabilidad significan un buen estado evolutivo (Rocha y Gasca, 2007). La presencia de parásitos como el muérdago y el descortezador de oyamel en el APFFNT, así como la tala excesiva, eliminan alelos de las poblaciones, y la fragmentación del bosque puede estar creando metapoblaciones, lo cual puede llevar a las mismas a un cuello de botella genético que invariablemente las llevaría a la deriva génica (Rocha y Gasca, 2007), lo que pudiera significar que la variabilidad del oyamel está disminuyendo y que los altos valores considerados en este estudio pudieran ser resultado de una variabilidad transitoria, ocurriendo esto especialmente cuando las poblaciones experimentan pérdida de individuos (Jump y Peñuelas, 2006), lo que indica que es urgente aplicar medidas de conservación y manejo de esta especie en el APFFNT.

Por otro lado, se ha reportado que en coníferas (*Pinus* spp., *Picea* spp.) la mayor parte de la variabilidad genética se encuentra dentro de las poblaciones, es decir, que la variabilidad genética interpoblacional (H_s) es mayor en estos organismos que la intrapoblacional (G_{ST}) (Ledig, 1997; Berg y Hamrick, 1997), sin embargo, en el

caso de *A. religiosa* es diferente, Aguirre *et al.* (2000) reportan en sus estudios con el género *Abies* niveles de variabilidad interpoblacional bajos y niveles de variabilidad intrapoblacionales altos, tal como ocurrió en el presente estudio, por lo que puede ser que el género *Abies* presente este comportamiento particular, ya que en todas las especies de *Abies* mexicanos (*A. concolor*, *A. durangensis*, *A. hickeli*, *A. guatemalensis*, *A. religiosa* y *A. vejari*) la variabilidad genética más alta fue la intrapoblacional. Los niveles de variabilidad genéticos más altos reportados para *Abies* de México han sido para *A. religiosa*, y en realidad son raros los casos de especies de árboles con niveles bajos de variabilidad genética (Aguirre *et al.*, 2000).

Los dendrogramas de los marcadores cpDNA y POX mostraron dos grupos principales (Figura 5.13), el primer grupo (superior) incluyó los puntos de muestreo con menor variabilidad genética, éstos se encontraban cercanos entre sí y es muy probable que el flujo génico ocurra entre ellos con mayor frecuencia y por tanto se encuentren más emparentados, es decir, hay poca distancia genética entre ellos (Delgado *et al.*, 1998). En el segundo grupo fue donde se agruparon las poblaciones con mayor variabilidad genética, además, agrupó mayor número. Éstas probablemente estuvieron sujetas a un alto grado de perturbación, y la fragmentación del bosque las llevó a aislarse de sus vecinas, incrementando así la diferenciación genética.

En los dendrogramas obtenidos con los marcadores mtDNA y ncdDNA (Figura 5.13), se observa un agrupamiento similar, en donde existen dos grupos principales, el primero contiene los puntos de muestreo con mayor variabilidad genética y el segundo con menor variabilidad. El dendrograma para los marcadores de núcleo hace evidente también que los puntos de muestreo de mayor variabilidad genética son las de mayor altitud, y las de menor altitud las de menor variabilidad. A mayores altitudes los puntos de muestreo suelen ser menos perturbados, lo que explicaría una mayor variabilidad genética. La fragmentación del bosque ha provocado que se aislen los puntos de muestreo, en algún momento todos compartieron semejanzas genéticas lo cual puede explicar que algunos hayan sido agrupados aunque geográficamente estén distanciados.

CONCLUSIONES

La variabilidad genética de los puntos de muestreo de *A. religiosa* del APFFNT no se encuentran disminuidos por las diversas presiones ambientales y antrópicas a las que están sometidos actualmente.

Con respecto a la variabilidad genética de cpDNA y mtDNA, no se han reportado estudios de estos genomas en *A. religiosa*, por lo que se considera que los niveles de variabilidad genética intrapoblacional obtenidos en este estudio ($G_{ST}= 0.5273$ para cloroplasto y $G_{ST}= 0.5077$ para mitocondria) son altos en comparación con otras especies de *Abies* ($G_{ST}= 0.188$).

La variabilidad genética intrapoblacional del genoma de núcleo, analizada con ASSR, fue alta para la especie ($G_{ST}= 0.4589$).

La variabilidad genética analizada con isoenzimas fue alta ($H= 0.0868$), considerando los niveles de variabilidad reportados para la misma especie ($H= 0.087$) en otros trabajos y de otras especies del género *Abies* ($H= 0.04$).

El flujo génico fue bajo (<1 ; 0.4483 para cloroplasto; 0.4849 para mitocondria; 0.5895 para núcleo; 0.1756 para POX), debido probablemente a la fragmentación del bosque. El más alto fue de mitocondria, por lo cual es probable que el flujo génico de *A. religiosa* en el APFFNT dependa principalmente del flujo de semillas.

Los dendrogramas obtenidos confirmaron el aislamiento de los puntos de muestreo, una consecuencia del bajo flujo génico. Como existen diferencias genéticas entre los puntos de muestreo hay que conservar la mayoría.

La deriva génica puede estar moldeando las poblaciones de oyamel por lo que es necesario aplicar nuevas estrategias de conservación. Altos índices de variabilidad genética pueden ser resultado de una variación transitoria, si bien la variabilidad genética de *A. religiosa* en el APFFNT fue alta se deben de tomar medidas para conservar y promover dicha variabilidad.

La variabilidad genética de *A. religiosa* del APFFNT es mayor a mayores altitudes, por lo cual los puntos de muestreo de estas zonas constituyen un recurso genético muy valioso por ello es importante establecerlas como unidades de conservación.

IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

Se sugiere la conformación de Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (UCRGF) según sus niveles de diversidad genética. Para determinar estas zonas se consideró el promedio de la diversidad genética de Nei (h) y se determinaron como zonas con promedios altos que se identifican con el número 3, medios, identificadas con el número 2 y bajo con el número 1.

En las UCRGF las poblaciones con alta diversidad genética deberán ser sometidas a conservación estricta, donde no se permita el manejo, y las poblaciones puedan evolucionar de manera natural (zonas con h promedio 1, Cuadro 5.9 y Figura 5.14), en estas zonas, sólo en casos de infestaciones muy fuertes por muérdago y descortezador, se recomienda como medida de saneamiento formar barreras naturales entre los árboles altamente infestados con semillas de árboles sanos, que con el tiempo impidan en lo posible que se dispersen más los parásitos.

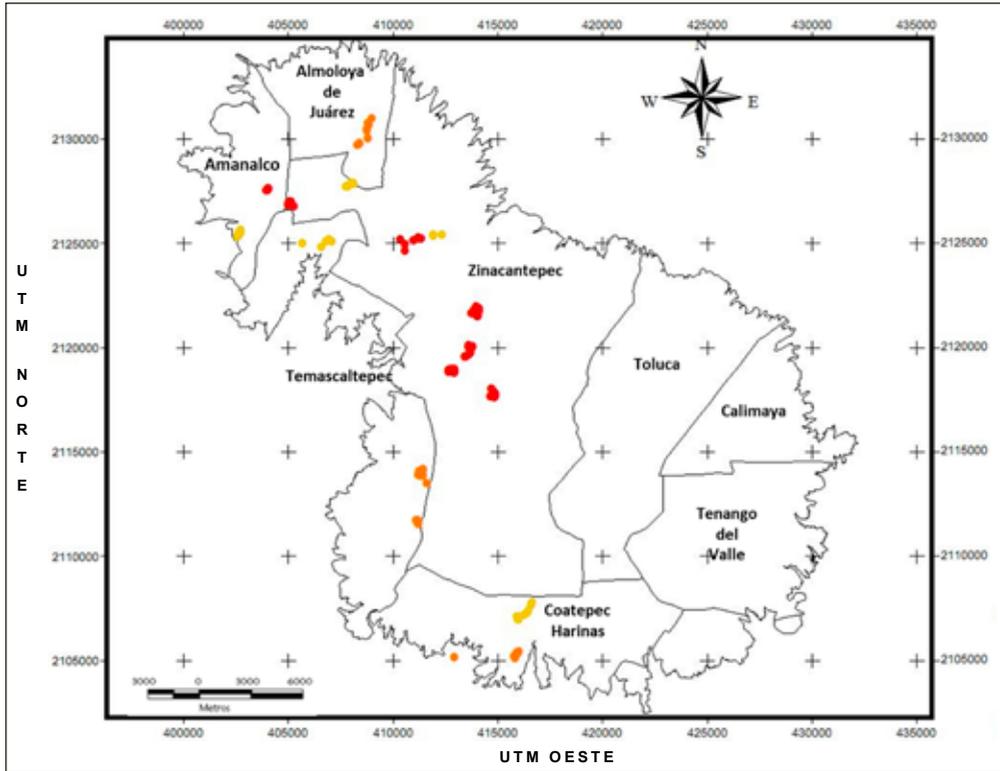
Cuadro 5.9
Resumen de la variabilidad genética de *Abies religiosa*

Población (número de individuos)	Variabilidad genética					Altitud		Presencia (%)		
	<i>cpADN</i> (h)	<i>mtADN</i> (h)	<i>ncADN</i> (h)	<i>POX</i> (h)	Promedio de <i>h</i>	(<i>mnm</i>)	<i>D</i>	<i>M</i>	<i>C</i>	<i>A</i>
1	0.1204	0.1709	0.2649	0	0.13905 (2)	3653	50	-	50	-
2	0.0772	0.1667	0.1583	0	0.10055 (2)	3229	50	50	-	-
3	0.1678	0.1400	0.2284	0.0950	0.1578 (1)	2358	50	-	50	-
4	0.1049	0.0684	0.0420	0.0764	0.07292 (3)	3081	16.6	33.3	16.6	33.3
5	0.1667	0.3462	0.1987	0.2500	0.2404 (1)	3585	50	-	50	-
6	0.2191	0.2949	0.2410	0.1875	0.235625 (1)	3412	33.3	16.6	-	50
7	0.1211	0.3138	0.2830	0.0475	0.19135 (1)	3347	40	20	-	40
8	0.2356	0.0862	0.3362	0.1600	0.2045 (1)	3423	100	-	-	-
9	0.0247	0.1709	0.0353	0	0.057725 (3)	3313	66.6	-	33.3	-
10	0.3220	0.1444	0.1387	0	0.151275 (2)	3382	85.7	14.3	-	-
11	0.2600	0	0.1195	0.2500	0.157375 (1)	3349	50	40	10	-
12	0.2467	0.1492	0.1500	0.1875	0.18335 (1)	3469	70	-	30	-
13	0.3822	0.1615	0.0525	0.0475	0.160925 (1)	3249	90	-	10	-
14	0.2933	0.1092	0.0915	0.1275	0.155375 (2)	3399	100	-	-	-
15	0.1156	0.0985	0.1086	0	0.080675 (3)	3305	40	60	-	-
16	0.1867	0	0.0522	0	0.059725 (3)	3383	40	-	60	-
17	0.1344	0.2492	0.2004	0.0475	0.157875 (1)	3162	50	10	10	30

Se observa el número de población, el índice de variabilidad genética de Nei (h), el promedio de h alto (3), medio (2) y bajo (1), la altitud de cada población, así como la presencia (%) de descortezador (D), muérdago (M), control o libres de parásitos (C), y presencia de ambos parásitos (A).

Fuente: elaboración propia.

Figura 5.14
Puntos de muestreo de *Abies religiosa* con distintos niveles de diversidad genética



Se propone la formación de Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales, los puntos amarillos indican las zonas de muestreo con diversidad genética baja (promedio 3), puntos rojos los lugares de muestreo con diversidad genética media (promedio 2), y los puntos anaranjados señalan los sitios de muestreo con diversidad genética alta (promedio 1).

Fuente: elaboración propia.

Se sugiere que las poblaciones con niveles de diversidad genética media y baja puedan ser manejadas (zonas con promedios h 2 y 3, Cuadro 5.9 y Figura 5.12), en éstas se recomienda el saneamiento tradicional, y la reforestación con árboles de la misma especie que pudieran provenir de diferentes zonas geográficas, ecológicamente similares, para aumentar la diversidad genética.

Para todos los puntos de muestreo se recomienda crear bancos de semillas (dependiendo del manejo, la semilla del oyamel se puede almacenar desde 8 meses

hasta 1.5 años) y hacer estudios de zonificación y ensayos de procedencias para realizar intercambios de semillas de una manera que asegure su supervivencia (por ejemplo, intercambiar semillas entre zonas altitudinales semejantes ecológicamente).

REFERENCIAS

- Adams, W. (1983). Application of isozymes in tree breeding. En Tanksley, S. y Orton, T. (ed.) *Isozymes in plant genetics and breeding* (382-400). Amsterdam: Elsevier.
- Aguirre, H. y Bernal, A. (1988). *Influencia del descortezador Pseudohylesinus variegatus (Blandford) en la muerte del oyamel Abies religiosa (H.B.K.) Schl. et Cham., en el Parque recreativo y cultural "Desierto de los Leones, D.F."*. Tesis profesional. México: División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Aguirre-Planter, E., Furnier, G. R. y Eguiarte, L. E. (2000). Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany*, 87(3), 362-371.
- Alatorre-Rosas, R. (1977). El barrenador de los brotes de pinos. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(6).
- Albertos, A. y González, S. (2000). Conservación de recursos genéticos de coníferas en España. *Investigación Agrícola: Sistemas de Recursos Forestales*, 2, 151-183.
- Alvarado-Rosales, D. y de Bauer, L. I. (1991). Ataque de *Lophodermium* sp. en poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* del Ajusco, Mexico, bajo el efecto de gases oxidantes. *Micol. Neotrop. Apl.*, 4, 99-109.
- Andreu, L. I. y Rodríguez, M. L. (2007). Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México. *Revista Ecosistemas*, 17(1).
- Anzidei, M., Madaghiele, A., Sperisen, C., Ziegenhagen, B., Vendramin, G. G. y Gillet, E. M. (1999). Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of diversity in conifer species. En Which DNA marker for which purpose?: Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FWIV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.
- Arroyo-García, R., Lefort, F., de Andrés, M. T., Ibáñez, J., Borrego, J., Jouve, N. y Martínez-Zapater, J. M. (2002). Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species. *Genome*, 45(6), 1142-1149.
- Ascencio, V. y Serrato, B. (1984). Evaluación de cinco insecticidas organofosforados para el combate de *Dendroctonus mexicanus* Hopk. en el área de explotación forestal de Atenquique, Jalisco. *Boletín Técnico INIF*, 49, 42-64.

- Atkinson, E. y Quihua A. (1988). Notas sobre la biología de Scolytidae y Platypodidae (Coleoptera) de México y Centroamérica. *Folia Entomológica Mexicana*, 76, 83-105.
- Atkinson, T. (1982). Sinopsis del género *Ips* De Geer en México. Resúmenes del III Simposio Nacional de Parasitología Forestal, Saltillo, Coahuila.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Springer Science & Business Media.
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Barras, S. J. y Perry, T. (1971). Gland cells and fungi associated with prothoracic mycangium of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 64(1), 123-126.
- Becerra, V. y Paredes, M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, 60 (3), 270-281.
- Berg, E. E. y Hamrick, J. L. (1997). Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research*, 27(3), 415-424.
- Bermingham, E. y Moritz, C. (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7(4), 367-369.
- Beutelspacher, B. C. R. (2012). Redefinición taxonómica de *Montezumia cardinalis* Dampf (Lepidoptera: Sesiidae). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(43).
- Bidwell, R. (1979). *Plant physiology*. 2ª ed. Macmillan. New York. USA.
- Birky, C. W. (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), 11331-11338.
- Brown, G. E. (1971). Pycnidial release and survival of *Diplodia natalensis* spores. *Phytopathology*.
- Bucci, G., González-Martínez, S. C., Le Provost, G., Plomion, C., Ribeiro, M. M., Sebastiani, F., Alía, R. y Vendramin, G. G. (2007). Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 16(10), 2137-2153.
- Bugbee, R. E. (1981). A new species of the genus *Eurytoma* (Hymenoptera, Eurytomidae) phytophagous in the xylem of young pines (*Pinus hartwegii*) from Mexico. *Folia Entomológica Mexicana*, 50, 77-79.
- Burban, C. y Petit, R. J. (2003). Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology*, 12(6), 1487-1495.
- Burdon, J. y Marshall, D. (1983). The use of isozymes in plant disease research. En Tanksley, S. y Orton, T. (eds.) *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam: Elsevier.

- Candeau, D. R. y Franco M. S. (2007). Dinámica y condiciones de vida de la población del Parque Nacional Nevado de Toluca (PNNT) en la generación de presión a los ecosistemas circundantes y de impactos ambientales a través de un sistema de información geográfica. *Investigaciones Geográficas*, (62), 44-68.
- Carranza, O. (1999). *Abundancia poblacional de los descortezadores Dendroctonus adjunctus Blandford y D. appoximatus Dietz en Pinus hartwegii Lindley, en el Parque Nacional Nevado de Colima*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Castillo, C. A. (2007). La selección natural a nivel molecular. En Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (eds.). *Ecología Molecular*. México: Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, 11-48.
- Ceballos, G. (2011). Propuesta de Recategorización y Edecreto del Parque Nacional Nevado de Toluca, Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México.
- Chansler, J. F. (1967). Biology and life history of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 60(4), 760-767.
- Chapman, H. H. (1922). A new hybrid pine (*Pinus palustris x Pinus taeda*). *Journal of Forestry*, 20(7), 729-734a.
- Cheliak, W. M. y Pitel, J. A. (1984). Genetic control of allozyme variants in mature tissues of white spruce trees. *Journal of Heredity*, 75(1), 34-40.
- Chen, J., Chen, B., Yang, X., Tian, J., Du, Q. y Zhang, D. (2015). Association genetics in *Populus* reveals the interactions between Pt-miR397a and its target genes. *Scientific Reports*, 5.
- Cibrián, D., Alvarado, D. y García, S. (2007). *Enfermedades forestales en México*. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Cibrián, D., Campos, R., Guerrero, A. y Pineda, C. (1980). Dispersión de *Dendroctonus adjunctus* Blandf. (Coleoptera: Scolytidae) en la estación Zoquiapan, México. En Memoria del Primer Simposio Nacional de Parasitología Forestal. Sociedad Mexicana de Entomología: 154-167.
- Cibrián, D., Méndez, J., Campos, R., Yates, H. y Flores, J. (2000). *Insectos forestales de México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Cibrián, G. M. S., Bernard, H. E., Hardy, O. Y. y Méndez, M. J. (1986). *Insectos de conos y semillas de las coníferas de México*/cone and seed insects of the mexican conifers. Southeastern Forest Experiment Station. Ashville, North Carolina. USA.
- Cibrián, T. D. e Íñiguez, G. H. (2001). *Manual para la identificación y manejo de las plagas y*

- enfermedades forestales del estado de Jalisco*. Documento Técnico, 32, 23.
- Cibrián-Tovar, D. (1975). Plagas que afectan a frutos y semillas. En Memoria III Simp. Nal. de Parasit. Agrícola. Guanajuato: IAP, 247-253.
- Cibrián-Tovar, D., Guerra-Santos, J. J. y Méndez-Montiel, J. T. (1993). El género *Scolytus* (Coleoptera: Scolytidae) como plaga de árboles de importancia urbana y forestal. En Memoria del XXVIII Congreso Nacional de Entomología (pp. 96-97).
- Cibrián-Tovar, D., Lagunes-Tejeda, Á., Bravo-Mojica, H., Vera-Graziano, J., Carrillo-Sánchez, J. L. y Sosa-Moss, C. (1995). *Insectos forestales de México*. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Especialidad en Entomología.
- Clark, C. M., Wentworth, T. R. y O'Malley, D. M. (2000). Genetic Discontinuity Revealed by Chloroplast Microsatellites in Eastern North American *Abies* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 87(6), 774-782.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (en línea). www.conanp.gob.mx Julio 3, 2007.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (en línea). www.conanp.gob.mx Noviembre 15, 2013.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (en línea). www.conanp.gob.mx Agosto 15, 2014. Borrador del programa de manejo del APFF Nevado de Toluca, para consulta pública en cumplimiento a lo previsto por los artículos 65 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al ambiente y 73 de su reglamento en materia de Áreas Naturales Protegidas.
- Comisión Nacional Forestal (en línea). www.conafor.gob.mx Junio 20, 2012.
- Comisión Nacional para la Conservación de la Biodiversidad (en línea). www.conabio.gob.mx Agosto 29, 2012.
- Conkle, M. T. (1979). Amount and distribution of isozyme variation in various conifer species. En Proceedings of the meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Comptes rendus de la conference de l'Association canadienne pour l'amélioration des arbres.
- Conkle, M. T., Hodgskiss, P. D., Nunnally, L. B. y Hunter, S. C. (1982). *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. General Technical Report, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, USDA Forest Service (PSW-64).
- Correll, J., Gordon, T., McCain, A., Fox, J., Koethler, C., Word, D., Schultz, M. (1991). Pitch canker disease in California: Pathogenicity, distribution and canker development on Monterrey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease*, 75, 676-681.

- Cuenca, A., Escalante, A. E. y Piñero, D. (2003). Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology*, 12(8), 2087-2097.
- De la Meza, R. (1987). *Mariposas mexicanas*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Delgado, P., Piñero, D., Chaos, A., Pérez-Nasser, N. y Álvarez-Buylla, E. R. (1998). High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 86(5), 669-676.
- Devey, M. E., Delfino-Mix, A., Kinloch, B. B. y Neale, D. B. (1995). Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(6), 2066-2070.
- Díaz, V. y Ferrer, E. (2003). Genetic variation of populations of *Pinus oocarpa* revealed by resistance gene analog polymorphism (RGAP). *Genome*, 46(3), 404-410.
- Díaz, V., Muñiz, L. M. y Ferrer, E. (2001). Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology*, 10(11), 2593-2603.
- Dixon, M., Webb, E., Thorne, C. y Tipton, K. (1979). *Enzymes*. 3ª ed. Gran Bretaña: Academic Press.
- Domínguez, V., Cruz, J. y Atzin, J. (2008). Enzimas peroxidasa de frutales. Marcadores fisiológicos y de variación alélica. En Castillo, C. (comp.). *Enfoques tecnológicos en la fruticultura. Un tributo a Raúl Mosqueda*. 1ª ed. México: Universidad Autónoma de Chapingo/Universidad Autónoma Metropolitana.
- Domínguez-Tejeda, E. M., Flores, O. P., Muciño, A. M. E. y Sierra-Domínguez, G. (2010). El Parque Nacional Nevado de Toluca y la falta de investigación para la toma de decisiones, caso específico: Fauna. *Ciencias Agrícolas Informa*, 19, 42-52.
- Donoso, D., Premoli, A., Gallo, L. y Ipinza, R. (2004). *Variación intraespecífica de los bosques templados de Chile y Argentina*. Chile: Editorial Universitaria.
- Earle C. (2005). *Pinus hartwegii* Lindley 1839 Gymnosperm database (en línea) Disponible en: <http://www.conifers.org/pi/pin/hartwegii.htm>.
- Eguiluz-Piedra, T. (1982). Clima y distribución del género *Pinus* en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(38).
- Endara, A. (2010). *Análisis de los procesos de recuperación en el bosque templado del Parque Nacional Nevado de Toluca*. Tesis de doctorado. México: Universidad Autónoma del Estado de México.

- Endara, A. A. R. E., Maass, S. F., Bernal, G. N., Hernández, J. I. V. y Fredericksen, T. S. (2012). Effect of human disturbance on the structure and regeneration of forests in the Nevado de Toluca National Park, Mexico. *Journal of Forestry Research*, 23(1), 39-44.
- Endara-Agramont, A. R., Calderón-Contreras, R., Nava-Bernal, G. y Franco-Maass, S. (2013). Analysis of Fragmentation Processes in High-Mountain Forests of the Centre of Mexico. *American Journal of Plant Sciences*, 04(03), 697-704.
- Ettl, G. J. y Peterson, D. L. (2001). Genetic variation of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) in the Olympic Mountains, WA, USA. *Silvae Genetica*, 50(3-4), 145-153.
- Fady, B. y Conkle, M. T. (1993). Allozyme variation and possible phylogenetic implications in *Abies cephalonica* Loudon and some related eastern Mediterranean firs. *Silvae Genetica*, 42, 351-359.
- Ferris, G. F. (1954). Atlas of the scale insects of North America. The Dispididae (Part 1) Stanford University Press.
- Fisher, P. J., Gardner, R. C. y Richardson, T. E. (1996). Single Locus Microsatellites Isolated Using 5 Anchored PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(21), 4369-4371.
- Franco, S., Endara, A., Regil, H. y Nava, A. (2009). Estudio fitosanitario forestal del Parque Nacional Nevado de Toluca. Reporte Técnico. México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Frankham, R. (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 22-29.
- Fraser, D. J. y Bernatchez, L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10(12), 2741-2752.
- Furnier, G. R. y Eguiarte, F. L. E. (1997). Niveles y patrones de variación genética en el género *Abies* en México. CONABIO, 138, 50.
- Furniss, R. L. y Carolin, V. M. (1977). *Western forest insects*. US Department of Agriculture, Forest Service.
- Futuyma, D. J. y Agrawal, A. A. (2009). Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43), 18054-18061.
- Gagné, R. J. (1989). *The plant-feeding gall midges of North America*. Comstock Pub. Associates.
- García-Mendoza, A. J., Ordóñez-Díaz, M. de J. y Briones-Salas, M. (2004). *Biodiversidad de Oaxaca*. UNAM.
- Garduño-Bernal, N. (2011). *Reserva de la biósfera mariposa monarca en el Estado de México*. México: Gobierno de Estado de México.

- Geils, B. W., Cibrián-Tovar, J. y Moody, B. (2002). *Mistletoes of North American conifers*. General Technical Report-Rocky Mountain Research Station, USDA Forest Service (RMRS-GTR-98).
- Gómez, G. (2003). *Estado del conocimiento de Abies religiosa (HBK) Schl. et Cham.* Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales.
- González, G. (1999). *Revisión y análisis bibliográfico del cancro resinoso de los pinos (Fusarium subglutinans f. sp. pini).* Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Groom, M. J., Meffe, G. K. y Carroll, C. R. (1997). *Principles of Conservation Biology*. USA: Sinauer Associates Inc.
- Haldane, J. (1997). Disease and Evolution. En Ridley, M. *Evolution*. Gran Bretaña: Oxford Readers.
- Hamrick, J. L. (1982). Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany*, 1685-1693.
- Hamrick, J. L. y Godt, M. J. W. (1996). Conservation genetics of endemic plant species. En Avise, J. C. y Hamrick, J. L. (eds.), *Conservation genetics: Case Studies from Nature*. New York: Chapman and Hall (pp. 281-304). Springer.
- Hamrick, J. L., Mitton, J. B. y Linhart, Y. B. (1981). Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. En Conkle, M. T. (ed.). *Isozymes of North American forest trees and forest insects*. General Technical Report PSW-48, 35-41.
- Hanski, I. (1998). Metapopulation dynamics. *Nature*, 396, 41-49.
- Harris, H. y Hopkinson, D. A. (1977). *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. USA: Elsevier Science Publishers.
- Hawksworth, F. (1987). Observation on conifer diseases in Mexico. Memorias del IV Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal. 28-30 de octubre. Durango: 559-591.
- Hawksworth, F. G. y Cibrián, T. D. (1985). Observaciones sobre las enfermedades de árboles forestales en el norte de México y el sur de Estados Unidos. En Memoria de los Simposios Nacionales de Parasitología Forestal II y III. SARH-INIFAP. México. Pub. Esp., 46, 57-65.
- Hawksworth, F. G. y Wiens, D. (1996). *Dwarf mistletoes: biology, pathology, and systematics*. DIANE Publishing.
- Heaton, H. J., Whitkus, R. y Gómez-Pompa, A. (1999). Extreme ecological and phenotypic differences in the tropical tree chicozapote (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) are not matched by genetic divergence: a random amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *Molecular Ecology*, 8(4), 627-632.

- Hernández J. (1990). *Variación genética isoenzimática en Pinus ayacahuite y sus dos variedades de México y Centroamérica*. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Hernández, C. (1995). *Variación geográfica y genética en el crecimiento inicial de Pinus engelmannii Carr. en condiciones de invernadero*. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Hernández, E. y Cibrián, D. (1981). Observaciones sobre la biología de *Scolytus mundus* Wood un descortezador de *Abies religiosa* (HBK) Schl. et Cham. en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo. *Chapingo* (31-32):14-20.
- Hernández, M. (1983). Biología de *Synanthedon cardinalis* Dampf (Lepidoptera: Sesiidae). *Ciencia Forestal*, 8(43): 39-64.
- Hillis, D. M. (1994). Homology in molecular biology. En Hall, B. K. (ed.). *Homology: The hierarchical basis of comparative biology*. San Diego: Academic Press. 339-368.
- Hillis, D. y Wiens, J. (2000). Molecules versus morphology in systematics. En Wiens J. (ed.). *Phylogenetic analysis of morphological data*. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Hwang, S. Y., Lin, T. P., Ma, C. S., Lin, C. L., Chung, J. D. y Yang, J. C. (2003). Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology*, 12(10), 2689-2695.
- Iglesias, L., Alba, J. y Enríquez, J. (1997). Estrategias para la conservación de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. en la Región del Perote Veracruz. *Cuadernos de Biodiversidad*, 1, 4-8.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) (2001). *Síntesis de información geográfica del Estado de México*, México, 139 pp.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) (2005). *Síntesis de información geográfica del Estado de México*. INEGI. México, 139 pp.
- Jaramillo-Correa, J. P. y Bousquet, J. (2005). Mitochondrial genome recombination in the zone of contact between two hybridizing conifers. *Genetics*, 171(4), 1951-1962.
- Jason, A. R., Blanchette, T., Burnes, J., Jacobs, J., Higgins, L., Witthunn, B., David, A. y Gillman, J. (2006). Proteomic comparison of needles from blister rust-resistant and susceptible *Pinus strobus* seedlings reveals up-regulation of putative disease resistance proteins. *The American Phytopathological Society*, 19(29), 150-160.
- Johnson, W. T. y Lyon, H. H. (1991). *Insects that feed on trees and shrubs*. Comstock Publishing Associates.

- Jorgensen, S., Hamrick, J. y Wells, P. (2002). Regional patterns of genetic diversity in *Pinus flexilis* (Pinaceae) reveal complex species history. *American Journal of Botany*, 89, 792-800.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. y Donoghue, M. J. (2002). Plant systematics: a phylogenetic approach. *Ecologia Mediterranea*, 25(2), 215.
- Jump, A. S. y Peñuelas, J. (2006). Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8096-8100.
- Kapteyn, J. y Simon, J. E. (2002). The use of RAPDs for assessment of identity, diversity, and quality of *Echinacea*. En Janick, J. y Whipkey, A. (eds.). *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, 509-513.
- Kondo, T., Terada, K., Hayashi, E., Kuramoto, N., Okamura, M. y Kawasaki, H. (2000). RAPD markers linked to a gene for resistance to pine needle gall midge in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3-4), 391-395.
- Krabel, D. y Petercord, R. (2000). Genetic diversity and bark physiology of the European beech (*Fagus sylvatica*): a coevolutionary relationship with the beech scale (*Cryptococcus fagisuga*). *Tree Physiology*, 20(7), 485-491.
- Kubisiak, T. L., Roberds, J. H., Spaine, P. C. y Doudrick, R. L. (2004). Microsatellite DNA suggests regional structure in the fusiform rust fungus *Cronartium quercuum* f. sp. fusiforme. *Heredity*, 92(1), 41-50.
- Laikre, L., Allendorf, F., Aroner, L., Baker, C., Gregovich, D., Hansen, M., Jackson, J., Kendall, K., Mckelvey, K., Neel, M., Olivieri, I., Ryman, N., Schwartz, M., Bull, R., Stetz, J., Tallmon, D., Taylor, B., Vojta, C., Waller, D. y Waples, R. (2009). Neglect of genetic diversity in implementation of the Convention on Biological Diversity. *Conservation Biology* 24, 86-88.
- Latta, R. G. y Mitton, J. B. (1997). A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics*, 146(3), 1153-1163.
- Ledig, F. T. (1997). Conservación y manejo de los recursos genéticos forestales. En Vargas, H., Bermejo, V. B. y Ledig, F. T. (eds.). *Manejo de recursos genéticos forestales*, México: Colegio de Postgraduados y Universidad Autónoma Chapingo, 1-21.
- Ledig, F. T. (1998). Genetic variation in *Pinus*. En Richardson, D. M. (ed.). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 251, 280.
- Ledig, T., Capo, P., Hodgskis, P., Sbay, H., Flores, C., Conkle, T. y Bermejo, B. (2001). Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii*. *American Journal of Botany* 88 (11): 1977-1988.

- Lee, S. W., Ledig, F. T. y Johnson, D. R. (2002). Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California. *American Journal of Botany*, 89(4), 566-577.
- Lehmann, P. (2002). Structure and evolution of plant disease resistance genes. *Journal of Applied Genetics*, 43(4), 403-414.
- Leister, D. (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends in Genetics*, 20, 116-122.
- Levins, R. (1969). Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 15(3), 237-240.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A. y Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11(12), 2453-2465.
- Liepelt, S., Bialozyt, R. y Ziegenhagen, B. (2002). Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14590-14594.
- Liu, J. J., Ekramoddoullah, A. K., Hunt, R. S. y Zamani, A. (2006). Identification and characterization of random amplified polymorphic DNA markers linked to a major gene (Cr2) for resistance to *Cronartium ribicola* in *Pinus monticola*. *Phytopathology*, 96(4), 395-399.
- Lombardero, M. J., Ayres, M. P., Lorio, Jr., P. L. y Ruel, J. J. (2000). Environmental effects on constitutive and inducible resin defences of *Pinus taeda*. *Ecology Letters*, 3(4), 329-339.
- López, R. (2003). *Estudio metodológico para la detección de marcadores isoenzimáticos y RAPD en megagametófitos de Pinus hartwegii Lindl. de la población del Cofre de Perote, Veracruz*. México: Universidad Veracruzana.
- Loveless, M. D. y Hamrick, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 65-95.
- Luque, J. y Herráez, A. (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud*. Madrid: Harcourt.
- Marshall, H. D., Newton, C. y Ritland, K. (2002). Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2-3), 367-378.
- Mathiasen, R. L., Nickrent, D. L., Shaw, D. C. y Watson, D. M. (2008). Mistletoes: pathology, systematics, ecology, and management. *Publications*, 1.

- McCutcheon, J. y Moran, N. (2007). Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *The National Academy of Sciences of the USA* 1:19392-19397.
- Meng, L., Szmidt, A. y Wang, X. (1995). Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris*. *Heredity* 74: 582-589.
- Miller, W. E. (1988). Two new species of *Rhyacionia* pine moths from Mexico (Tortricidae: Olethreutinae). *Journal of the Lepidopterists' Society*, 42(3), 236-239.
- Mitton, J. (1983). Conifers. En Tanksley, S. y Orton, T. (eds.) *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part B, 443-465. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Mitton, J. B., Linhart, Y. B., Sturgeon, K. B. y Hamrick, J. L. (1979). Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *Journal of Heredity*, 70(2), 86-89.
- Mohanty, A., Martín, J. P., González, L. M. y Aguinagalde, I. (2003). Association between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Prunus spinosa* L. (Rosaceae) populations across Europe. *Annals of Botany*, 92(6), 749-755.
- Molina, F. F., Delgado, P., Piñero, D., Pérez-Nasser, N. y Álvarez-Buylla, E. (2001). Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican rare species. *Canadian Journal of Botany*, 79(2), 131-138.
- Mopper, S., Mitton, J. B., Whitham, T. G., Cobb, N. S. y Christensen, K. M. (1991). Genetic differentiation and heterozygosity in pinyon pine associated with resistance to herbivory and environmental stress. *Evolution*, 45(4), 989-999.
- Moreno, S., Esqueda, M., Martínez, J. y Palomino, G. (2007). Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Fitotecnica Mexicana*, 30, 13-23
- Morgante, M., Vendramin, G. G. y Olivieri, A. M. (1991). Mating system analysis in *Pinus leucodermis* Ant.: detection of self-fertilization in natural populations. *Heredity*, 67, 197-203.
- Moritz, C. (1994). Defining "evolutionary significant units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.
- Murray, B. G. (1998). Nuclear DNA amounts in gymnosperms. *Annals of Botany*, 82(suppl 1), 3-15.
- Musálem, S. y Solís, P. M. A. (2000). *Monografía de Pinus hartwegii*. México: INIFAP.
- Namkoong, G. (1966). Nonoptimally of local races. En Proceedings of the tenth Southern Conference on Forest Tree Improvement. Houston, Texas: Texas A&M University, College Station: 149-153.

- Nava, C. Y., Espinoza, G. F. J. y Furnier, G. R. (2006). Niveles y patrones de variación química en resinas de las hojas del género *Abies* del Norte de México. *Agrociencia*, 40, 229-238.
- Nava, G., Endara, A., Regil, H., Estrada, C., Arriaga, C. y Franco, S. (2010). *Los bosques y selvas del Estado de México*. México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Navascués, M. y Emerson, B. C. (2005). Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Molecular Ecology*, 14(5), 1333-1341.
- Navascués, M., Vaxevanidou, Z., González-Martínez, S. C., Climent, J., Gil, L. y Emerson, B. C. (2006). Chloroplast microsatellites reveal colonization and metapopulation dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology*, 15(10), 2691-2698.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American naturalist*, 283-292.
- Nickrent, D. L. y Musselman, L. J. (2004). Introduction to parasitic flowering plants. *The Plant Health Instructor*, 13, 300-315.
- Nieto de Pascual Pola, C. (2013). Depredación de las semillas de *Abies religiosa* (Kunth) Schlttdl. et Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(15), 87-102.
- Nuez, F. y Carrillo, J. (2000). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. España: Universidad Politécnica de Valencia.
- O'Brien, C. W. (1989). Revision of the weevil genus *Pissodes* in Mexico with notes on Neotropical *Pissodini* (Coleoptera, Curculionidae). *Transactions of the American Entomological Society*, 415-432.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (en línea). www.fao.org Julio10, 2015.
- Oshakawa, T. e Ide, J. (2007). Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography*, 17 (2), 152-163.
- Otero, A., de la Cruz, M. y Oyama, K. (1997). El uso de los RAPD' s como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. Mex.*, 60, 85-117.
- Parducci, L. y Szmidt, A. E. (1999). PCR-RFLP analysis of cpDNA in the genus *Abies*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(5), 802-808.
- Parducci, L., Szmidt, A. E., Madaghiele, A., Anzidei, M. y Vendramin, G. G. (2001). Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(5), 733-740.
- Parraguirre, J. (2002). *Diversidad genética y patrón de cruzamiento en poblaciones naturales de Pinus gregii Engelm.* Tesis de posgrado. México: Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco.

- Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J. y Britton-Davidian, J. (1988). *Practical isozyme genetics*. Estados Unidos: John Willey and Sons.
- Pastorino, M. J., Fariña, M. M., Bran, D. y Gallo, L. A. (2006). Extremos geográficos de la distribución natural de *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41(3-4), 307-311.
- Percy, D. M., Page, R. D. y Cronk, Q. C. (2004). Plant-insect interactions: double-dating associated insect and plant lineages reveals asynchronous radiations. *Systematic Biology*, 53(1), 120-127.
- Pérez, N. y Piñero, D. (1997). Isoenzimas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60:77-84
- Perry, J. (1991). *The pines of Mexico and Central America*. Portland, OR: Timber Press.
- Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. y Vendramin, G. G. (2005). Invited review: comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14(3), 689-701.
- Piñero, D., Caballero, J., Cabrera, D., Canteros, C., Casas, A., Castañeda, A., Castillo, A., Cerritos, R., Chassin, O., Colunga, N., Delgado, P., Díaz, P., Eguiarte L., Escalante, A., Espinoza, B., Fleury, A., Flores, S., Fragoso, G., González, J., Islas, V., Martínez, E., Martínez, F., Martínez, J., Mastretta, A., Medellín, R., Medrano, L., Molina, F., Morales, B., Murguía, A., Vega, A., Payró, E., Reyes, M., Robles, M., Rodríguez, G., Rojas, L., Romero, R., Sahaza, J., Salas, R., Scitutto, E., Scott, C., Schramm, Y., Silva, C., Souza, V., Taylor, M., Urbán, J., Uribe, M., Vázquez, M., Vázquez, E., Vovides, A., Wegier, A., Zaldívar, A. y Zúñiga, G. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En *Capital natural de México*. Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO: 437-494.
- Powell, W., Morgante, M., McDevitt, R., Vendramin, G. G. y Rafalski, J. A. (1995). Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7759-7763.
- Puchooa, D. (2004). A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology*, 3(4), 253-255.
- Putz, F. E., Blate, G. M., Redford, K. H., Fimbel, R. y Robinson, J. (2001). Tropical forest management and conservation of biodiversity: an overview. *Conservation Biology*, 7-20.
- Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (1998) *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*, México: Instituto de Biología, UNAM.

- Raven, P. H., Evert, R. F. y Eichhorn, S. E. (1991). *Biología de las plantas*. Vol. II. Barcelona: Reverté.
- Regil, H. (2005). *Análisis del cambio de uso de suelo y vegetación para la obtención de la dinámica de perturbación-recuperación de las zonas forestales en el Parque Nacional Nevado de Toluca 1972-2000*. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Reséndiz, M. (1991). Distribución e impacto de la roya en pinos en el Desierto de los Leones. En VI Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal. 8-9 de octubre. Montecillo, México: 50-52.
- Ricklefs, R. E. y Miller, G. L. (2000). *Ecology*, 4^o ed., New York: W. H. Freeman and Company.
- Rocha, M. y Gasca, J. (2007). Ecología molecular de la conservación. *Ecología Molecular*, 251-272.
- Rojas, M. (1992). The species problem and conservation: what are we protecting? *Conservation Biology*, 6(2), 170-178.
- Roth, L. F. (1978). Genetic control of dwarf mistletoe. En Proceedings of the symposium on dwarf mistletoe control through forest management. Technical Coordinators: Scharpf, R. F. y Parmeter, Jr. J. R. USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-31 (pp. 69-72).
- Ryder, O. A. (1986). Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, 1(1), 9-10.
- Rzedowski, J. (1981). *Vegetación de México*. México: Limusa.
- Rzedowski, J. (1998). Diversidad y orígenes de la flora fanerógama de México. En Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. México: Instituto de Biología, UNAM, pp. 129-145.
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México*. 1ra. edición digital. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sáenz-Romero, C. y Tapia-Olivares, B. L. (2003). Pinus oocarpa Isoenzymatic Variation Along an Altitudinal Gradient in Michoacán, México. *Silvae Genetica*, 52(5-6), 237-240.
- Sáenz-Romero, C., Snively, A. E. y Lindig-Cisneros, R. (2003). Conservation and Restoration of Pine Forest Genetic Resources in Mexico. *Silvae Genetica*, 52(5-6), 233-236.
- Salisbury, F. B. y Cleon, W. R. (1994). *Fisiología vegetal*. México: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Salle, A., Ye, H., Yart, A. y Lieutier, F. (2008). Seasonal water stress and the resistance of *Pinus yunnanensis* to a bark-beetle-associated fungus. *Tree Physiology*, 28(5), 679-687.
- Sánchez-González, A., López-Mata, L. y Granados-Sánchez, D. (2005). Semejanza florística entre los bosques de *Abies religiosa* (HBK) Cham. y Schltdl. de la Faja Volcánica Transmexicana. *Investigaciones Geográficas*, (56), 62-76.

- Sánchez-Jasso, J. M., Aguilar-Miguel, X., Medina-Castro, J. P. y Sierra-Domínguez, G. (2013). Riqueza específica de vertebrados en un bosque reforestado del Parque Nacional Nevado de Toluca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1), 360-373
- Sanderson, M. J. y Donoghue, M. J. (1989). Patterns of variation in levels of homoplasy. *Evolution*, 1781-1795.
- Sarla, N., Neraja, C. y Siddiq, A. (2005). Use of anchored (AG)_n and (GA)_n cebadors to asses genetic diversity of Indian landraces and Varieties of Rice. *Current Science*, 89(8), 1371-1381.
- Scagel, R., Bandoni, R., Rouse, G., Schofield, W., Stein, J. y Taylor, T. (1993). *El reino vegetal*. España: Omega.
- Scharpf, R. F. (1984). Host resistance to dwarf mistletoe. *American Journal of Botany*, 71(5, Part 2).
- Scharpf, R. F. (1987). Resistance of Jeffrey pine to dwarf mistletoe. En Proceedings of the 4th International Symposium on Parasitic Flowering Plants (pp. 745-753).
- Schierenbeck, K. A., Skupski, M., Lieberman, D. y Lieberman, M. (1997). Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology*, 6(2), 137-144.
- Shea, K. L. y Furnier, G. R. (2002). Genetic variation and population structure in central and isolated populations of balsam fir, *Abies balsamea* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 89(5), 783-791.
- Sierra-Domínguez, G. (2008). Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional Nevado de Toluca. México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Simpson, J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60:73-76.
- Solís, L. e Iglesias, L. (2001). Variación en la composición isoenzimática en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Pico de Orizaba, Veracruz. *Cuadernos de Biodiversidad*. CIBIO. Publicación cuatrimestral del Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. Universidad de Alicante, España, 4-7.
- Solomon, E., Berg, L. y Martin, D. (2001). *Biología*. 5ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Spooner, D., Van Treuren, R. y de Vicente, M. (2005). Molecular markers for Genebank Managment Internacional Plant Genetic Resources. Institute IPGRI. Technical bulletin. No. 10. Washington, 136 pp.
- Squillace, A. (1970). Genotype enviroment interaction in forest tree. 2nd Meeting of Working

- Group on Quant. Raleigh. North Carolina. Estados Unidos de América: 49-61.
- Stock, M. W., Amman, G. D., Bentz, B. J. (1992). Isozyme studies of bark beetle population genetics and systematics. En Proceedings of a workshop on bark beetle genetics: current status of research. USDA Forest Service, Albany, CA (pp. 7-9).
- Styles, B. T. (1998). El género *Pinus*: su panorama en México. En Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (eds.). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 285-408.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. y Bonierbale, M. W. (1989). RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. *Nature Biotechnology*, 7, 257-264.
- Tarragó, J., Faloci, M., Luna, C., Sansberro, P. y Mroginski, L. (2003). Determinación de enzimas peroxidasas en tejidos caulinares de *Ilex dumosa* R. e *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 42.
- Thomsen, P. F. y Willersley, E. (2015). Environmental DNA-an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18.
- Tolun, A. A., Velioglu, E., Cengel, B. y Kaya, Z. (2000). Genetic structure of black pine (*Pinus nigra* Arnold subspecies pallasiana) populations sampled from the Bolkar Mountains. *Silvae Genetica*, 49(3), 113-118.
- Urquhart, F. A. y Urquhart, N. R. (1976). The overwintering site of the eastern population of the monarch butterfly (*Danaus p. plexippus*; Danaidae) in southern Mexico. *J. Lepid. Soc.*, 30, 153-158.
- USDA (2006). What is a genetic marker? National Forest Genetics Laboratory.
- Valadez, E. y Günter, K. (2000). *Huellas de DNA en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio)*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Valenzuela, R., Raymundo, T. y Cifuentes, J. (2013). El género *Inonotus* s.I. (Hymenochaetales: Agaricomycetes) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80, 70-90.
- Vargas, C. F., López, A., Sánchez, H. y Rodríguez, B. (2002). Allozyme analysis of host selection by bark beetles in central Mexico. *Canadian Journal of Forest Research*, 32(1), 24-30.
- Vargas, J., Bermejo, V. y Ledig, T. (1997). *Manejo de recursos genéticos forestales*. México: Colegio de Postgraduados.
- Vázquez, C. I., Villa, R. A. y Madrigal, H. S. (2006). Los muérdagos (Loranthaceae) en Michoacán. Libro Técnico, (2), 17-24.
- Vidal-Russell, R. y Nickrent, D. L. (2008). Evolutionary relationships in the showy mistletoe

- family (Loranthaceae). *American Journal of Botany*, 95(8), 1015-1029.
- Villers, R. L., García del Valle, L. y López-Blanco, J. (1998). Evaluación de los bosques templados en México: una aplicación en el Parque Nacional Nevado de Toluca. *Investigaciones Geográficas*, 36, 7-21.
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J. y López-Upton, J. (2006). Variación entre procedencias de *Pinus pseudostrabus* establecidas en dos sitios en Michoacán, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(2), 121-126.
- Viveros-Viveros, H., Tapia-Olivares, B. L., Sáenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., Santacruz-Varela, A. y Ramírez-Valverde, G. (2010). Variación isoenzimática de *Pinus hartwegii* Lindl. en un gradiente altitudinal en Michoacán, México. *Agrociencia*, 44(6), 723-733.
- Wagner, D. B. (1992). Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forests*, 6(1-4), 373-390.
- Wang, X.Q., Tank, D. C. y Sang, T. (2000). Phylogeny and divergence times in Pinaceae: evidence from three genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17(5), 773-781.
- Wen-Qing, Q., Yang, H. J., Xue, Y. B. y Hu, S. Y. (1999). Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in Chinese fir *Cunninghamia lanceolata*, *Acta Botánica Sinica*, 41 (7):695-699.
- Wiens, J. J. (2000). *Phylogenetic Analysis of Morphological Data*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1, 233-235.
- Wilson, C. A. y Calvin, C. L. (2006). An origin of aerial branch parasitism in the mistletoe family, Loranthaceae. *American Journal of Botany*, 93(5), 787-796.
- Wong, M. L. y Medrano, J. R. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 1-11.
- Wood, S. (1982). The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. *Great Basin Naturalist Memoirs*, 6, 1311-1326.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3), 395-420.
- Wright, S. (1984). *Evolution and the genetics of populations*. Estados Unidos: University of Chicago Press.
- Wu, J., Krutovskii, K. V. y Strauss, S. H. (1999). Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome*, 42(5), 893-908.

- Xu, J. (2005). The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome*, 48(6), 951-958.
- Yamagishi, M., Abe, H., Nakano, M. y Nakatsuka, A. (2002). PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. *Scientia Horticulturae*, 96(1), 225-234.
- Yang, R. C., Yeh, F. C. y Yanchuk, A. D. (1996). A comparison of isozyme and quantitative genetic variation in *Pinus contorta* ssp. *latifolia* by EST. *Genetics*, 142(3), 1045-1052.
- Yeh, F. C., Yang, R. C. y Boyle, T. (1999). Popgene version 1.31: Microsoft Windows – based freeware for population genetic analysis, quick user guide. Canada. Centre for International Forestry Research, University of Alberta.
- Yoshihiko, T., Yoshihisa, S. y Yoshimura, K. (2000). Chloroplast DNA Inversion Polymorphism in Populations of *Abies* and *Tsuga*. *Molecular Biology and Evolution*, 19 (9), 1302-1312.
- Zhang, D. X. y Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3), 563-584.
- Zhang, Z. Y., Chen, Y. Y. y Li, D. Z. (2005). Detection of low genetic variation in a critically endangered Chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers. *Biochemical Genetics*, 43(5-6), 239-249.
- Zhou, Z., Miwa, M. y Hogetsu, T. (1999). Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytologist*, 144(1), 55-63.
- Zobel, B. y Talbert, J. (1988). *Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales*. México: Limusa.

Diversidad genética de dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca: Una alternativa de conservación de Amaury Martín Arzate-Fernández / Guadalupe Gutiérrez-González / Rosa Laura Heredia-Bobadilla. Se terminó de editar en febrero de 2016.

Amaury Martín Arzate-Fernández. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista, cursó sus estudios de maestría y doctorado en Kyoto, Japón. Profesor-investigador de la UAEM desde 1987, miembro del Sistema Nacional de Investigadores, México. Presea Arturo Ronsenblueth 1990. Autor de tres libros y de más de 40 artículos en revistas especializadas.

Guadalupe Gutiérrez-González. Bióloga, maestra en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Ha participado como ponente en congresos nacionales e internacionales. Ha colaborado como coautora en la publicación de artículos científicos.

Rosa Laura Heredia-Bobadilla. Bióloga, maestra en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Se ha especializado en conservación de la riqueza y diversidad biológica de México. Autora de varios artículos científicos publicados en revistas en México y en el extranjero.

Fotografía de portada: Alfredo García Trejo

Desde 2000 es integrante de la Asociación de Reporteros Gráficos del Valle de Toluca; fotógrafo especializado en Protectora e Industrializadora de Bosques (Protimbos) y en la Secretaría de Desarrollo Agropecuario (Sedagro). Reportero gráfico del Mundial Juvenil "México 86" y colaborador en la publicación *El guardián del valle. Hacia la sustentabilidad del Nevado de Toluca*, de Ignacio Pichardo Pagaza.



Dr. en D. Jorge Olvera García
Rector

Dr. en Ed. Alfredo Barrera Baca
Secretario de Docencia

**Dra. en Est. Lat. Ángeles
Ma. del Rosario Pérez Bernal**
Secretaria de Investigación
y Estudios Avanzados

Dr. en D. Hiram Raúl Piña Libien
Secretario de Rectoría

M. en E. P. y D. Ivett Tinoco García
Secretaría de Difusión Cultural

**M. en C. Ed. Fam. María de los Ángeles
Bernal García**
Secretaria de Extensión y Vinculación

M. en E. Javier González Martínez
Secretario de Administración

Dr. en C. Pol. Manuel Hernández Luna
Secretario de Planeación y Desarrollo
Institucional

**M. en A. Ed. Yolanda E.
Ballesteros Senties**
Secretaria de Cooperación Internacional

Dr. en D. José Benjamín Bernal Suárez
Abogado General

Lic. en Com. Juan Portilla Estrada
Director General de Comunicación
Universitaria

Lic. Jorge Bernaldez García
Secretario Técnico de la Rectoría

M. en A. Emilio Tovar Pérez
Director General de Centros Universitarios
y Unidades Académicas Profesionales

M. en A. Ignacio Gutiérrez Padilla
Contralor Universitario