

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



**VARIABILIDAD MORFOLÓGICA Y MOLECULAR EN TRES ESPECIES  
FORESTALES DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN EL ESTADO DE CHIHUAHUA**

**POR:**

**ING. MINERVA SIQUEIROS CANDIA**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ÁREA MAYOR EN RECURSOS NATURALES**



Variabilidad morfológica y molecular en tres especies forestales de importancia económica en el estado de Chihuahua. Tesis presentada por Minerva Siqueiros Candia como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, ha sido aceptada y aprobada por:

---

Ph. D. Carlos Ortega Ochoa  
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

---

Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo  
Secretario de Investigación y Posgrado

---

D. Ph. Agustín Corral Luna  
Coordinador académico

---

Dr. Carlos Raúl Morales Nieto  
Presidente

02 - Junio - 2017

Fecha

Comité de examen

Dr. Carlos Raúl Morales Nieto  
M. C. Manuel Alarcón Bustamante  
Dr. Eduardo Santellano Estrada  
Dra. Alicia Melgoza Castillo

© Derechos Reservados  
MINERVA SIQUEIROS CANDIA  
CALLE 2 DE ABRIL #3208  
COL. GUADALUP, CHIH., CHIH., MEX.  
JUNIO DEL 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por sus bendiciones y la oportunidad de cursar la Maestría en Ciencias.

A mi madre, por su apoyo y dedicación, para seguir adelante con este escalón en mi vida profesional.

Al Dr. Carlos Raúl Morales Nieto por su paciencia, apoyo, orientación y aprendizaje en la formación de mi maestría y por darme la gran oportunidad de realizar este trabajo.

A Carlos Estrada, por alentarme a realizar la maestría.

A mis amigos Marco, Yesenia, Lucero, Shory por su apoyo y aliento de seguir adelante.

A Karen Mingura por todo, por la ayuda en las clases y por su valiosa amistad.

Al CINVESTAV y a su equipo de trabajo, Dra June Simpson, Katia, Emy, Perla, por facilitar mi proceso de aprendizaje, la estadía y préstamo de las instalaciones.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado a través de la beca de estudios para posgrado.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua por su compromiso en la formación de investigadores.

## **DEDICATORIA**

A mi hijo Arturo, por existir e impulsarme a seguir adelante para ser una mejor persona en lo personal y profesional.

A mi madre Marisela por su maravillosa dedicación, paciencia, apoyo, amor, fortaleza, insistencia y por desvelarse junto conmigo.

A mi padre Francisco, hermana Rebeca, a mi sobrina Valentina por sus palabras de apoyo y amor.

A mi pareja Arturo López, por el apoyo, palabras de aliento y amor

A mi familia y amigos, por su apoyo.

## CURRICULUM VITAE

El autor nació el 3 de junio de 1988 en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México.

- |           |  |
|-----------|--|
| 2003-2006 | Estudios medio superiores en el Instituto Felipe Ángeles.  |
| 2007-2010 | Estudios de licenciatura en la carrera de Ingeniero en Ecología, egresado de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la UACH. Titulado.   |
| 2013-2014 | Estudiante de Maestría en Ciencias con Área Mayor en Recursos Naturales y línea de investigación en Manejo y Mejoramiento de Pastizales. |

## RESUMEN

### VARIABILIDAD MORFOLÓGICA Y MOLECULAR EN TRES ESPECIES FORESTALES DE IMPORTANCIA ECONOMICA EN EL ESTADO DE CHIHUAHUA

POR:

I. E. MINERVA SIQUEIROS CANDIA

Maestría en Ciencias en Recursos Naturales

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dr. Carlos Raúl Morales Nieto

El rescate de recursos genéticos de *Pinus arizonica*, *P. durangensis* y *P. engelmannii* en el macizo forestal de Chihuahua, debe iniciar su recuperación con material genético sobresaliente y para ello es fundamental conocer la variabilidad del recurso en existencia. El objetivo del estudio fue evaluar la variabilidad morfológica y genética de estas tres especies de pino, utilizando marcadores moleculares. El macizo forestal se dividió en zona norte, centro y sur, se muestrearon 20 árboles por especie y zona. Se realizó la extracción del ADN (kit Qiagen®) y análisis AFLP (Kit IRDye® Fluorescent AFLP). Se realizó un análisis multivariado de variables continuas utilizando SAS 9.1.3® y para variables binarias (moleculares) con SAGA®. Se obtuvo la matriz de similitud genética con el índice de Nei y Li y se generó un dendograma mediante el software FreeTree®, UPGMA. Los tres primeros componentes principales explicaron el 97.94, 97.45 y 93.80 % de la variación total observada para *Pinus*

*durangensis*, *P. engelmannii* y *P. arizonica*, respectivamente. La variable que más contribuyó con el CP1 en las tres especies fue altitud y altura de árbol. El análisis de AFLP en las tres especies detectó 132 bandas; 47 polimórficas y 85 monomórficas. El mayor porcentaje de polimorfismo (53.2%) y bandas polimórficas (25) se obtuvo con la combinación de iniciadores MseI + CAC, EcoRI + ACC\_700. Al considerar las tres especies de pinos, se obtuvieron valores de similitud desde 0.914 hasta 1.0. Los recursos genéticos de *Pinus engelmannii*, *P. arizonica* y *P. duranguensis*, presentaron variabilidad morfológica y molecular.

## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR VARIABILITY IN THREE FOREST SPECIES OF ECONOMIC IMPORTANCE IN THE STATE OF CHIHUAHUA

BY:

MINERVA SIQUEIROS CANDIA

The rescue of the genetic resource of *Pinus arizonica*, *P. durangensis* and *P. engelmannii* in Chihuahua's forests, has to start you recovery with outstanding genetic material and for this it is fundamental to know the variability of the resource in existence. The objective of this study was to evaluate the morphological and genetic variability of these species of pine trees. The forest was divided into north, center and south areas, 20 trees of each species and zone were sampled. DNA extraction (Qiagen® kit) and AFLP (IRDye® Fluorescent AFLP Kit) analysis were performed. The data were analyzed with SAGA® Software. The matrix of genetic similarity was obtained with Nei and Li Index. Software FreeTree®, UPGMA was used. The first three principal components explain the 97.94, 97.45 y 93.80 % of the total variation observed in *Pinus durangensis*, *P. engelmannii* y *P. arizonica* respectively. The most contributing variable in the CP1 in the three species was the terrain altitude and the tree's height. The AFLP analysis in the three species detected 132 bands; 47 polymorphic and 85 monomorphic. The highest percentage of polymorphism (53.2%) and polymorphic bands (25) was obtained with the combination of primers MseI + CAC, EcoRI + ACC\_700. When considering the three pine species, similarity values were obtained from 0.914 to 1.0. The genetic resource

of *Pinus engelmannii*, *P. arizonica* y *P. duranguensis*, presented morphological and molecular variability.

## CONTENIDO

|  | Página |
|--|--------|
| RESUMEN.....                             | vi     |
| ABSTRACT.....                            | viii   |
| LISTA DE CUADROS.....                    | xii    |
| LISTA DE FIGURAS.....                    | xiv    |
| INTRODUCCIÓN.....                        | 1      |
| REVISIÓN DE LITERATURA.....              | 3      |
| Importancia de las Coníferas.....        | 3      |
| Especies Importantes en Chihuahua.....   | 5      |
| <i>Pinus durangensis</i> (Martínez)..... | 5      |
| <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.).....    | 5      |
| <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.).....    | 5      |
| Diversidad Genética.....                 | 6      |
| Marcadores Moleculares.....              | 7      |
| Marcadores AFLP.....                     | 8      |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....                | 10     |
| Descripción del Área de Estudio.....     | 10     |
| Análisis de Laboratorio.....             | 10     |
| Extracción de ADN.....                   | 16     |
| Marcadores moleculares.....              | 17     |
| Análisis Estadístico.....                | 19     |

|  |    |
|--|----|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....              | 21 |
| Análisis Morfológico.....                | 21 |
| <i>Pinus durangensis</i> (Martinez)..... | 21 |
| <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.).....    | 26 |
| <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.).....    | 31 |
| Análisis Molecular.....                  | 39 |
| <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.).....    | 45 |
| <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.).....    | 45 |
| <i>Pinus durangensis</i> (Martinez)..... | 47 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....      | 48 |
| LITERATURA CITADA.....                   | 49 |

## LISTA DE CUADROS

| Cuadro |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Área de muestreo en el macizo forestal del estado de Chihuahua, México.....   | 12     |
| 2      | Datos de origen de las especies muestreadas en la zona norte del macizo forestal del estado de Chihuahua, México.....   | 13     |
| 3      | Datos de origen de las especies muestreadas en la zona centro del macizo forestal del estado de Chihuahua, México.....  | 14     |
| 4      | Datos de origen de las especies muestreadas en la zona sur del macizo forestal del estado de Chihuahua, México.....   | 15     |
| 5      | Valores medios de cuatro variables evaluadas en poblaciones de <i>Pinus duranguensis</i> (Martínez) en el macizo forestal de Chihuahua, México.....   | 22     |
| 6      | Valores característicos de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de <i>Pinus duranguensis</i> (Martínez) en el estado de Chihuahua.....                   | 23     |
| 7      | Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de <i>Pinus duranguensis</i> (Martínez) en el estado de Chihuahua..... | 24     |
| 8      | Correlación de variables con componentes principales en poblaciones de <i>Pinus duranguensis</i> (Martínez) en el macizo forestal de Chihuahua, México.....                                   | 25     |
| 9      | Valores medios de cuatro variables evaluadas en poblaciones de <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.) en el macizo forestal de Chihuahua, México.....   | 28     |
| 10     | Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.) en el estado de Chihuahua.....     | 29     |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 11 | Valores característicos de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.) en el estado de Chihuahua.....                   | 30 |
| 12 | Correlación de variables con componentes principales en poblaciones de <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.) en el macizo forestal de Chihuahua, México.....                                   | 32 |
| 13 | Valores medios de cuatro variables evaluadas en poblaciones de <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.) en el macizo forestal de Chihuahua, México.....   | 34 |
| 14 | Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.) en el estado de Chihuahua..... | 36 |
| 15 | Valores característicos de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.) en el estado de Chihuahua.....                   | 37 |
| 16 | Correlación de variables con componentes principales en poblaciones de <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.) en el macizo forestal de Chihuahua, México.....                                   | 38 |
| 17 | Bandas polimórficas detectadas en 52 árboles de tres especies de <i>Pinus</i> , empleados en el análisis de AFLP en el macizo forestal de Chihuahua, México.....                          | 41 |
| 18 | Nivel de polimorfismo detectado en 52 árboles de tres especies de <i>Pinus</i> , empleados en el análisis de AFLP en el macizo forestal de Chihuahua, México.....                         | 43 |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura |  | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Ubicación de las zonas muestreadas en el macizo forestal del estado de Chihuahua, México.....  | 11     |
| 2      | Dendograma del análisis de cinco variables en poblaciones de <i>Pinus durangensis</i> (Martínez) con base en el método de ligamiento Ward.....   | 27     |
| 3      | Dendograma del análisis de cinco variables en poblaciones <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.) con base en el método de ligamiento Ward.....   | 33     |
| 4      | Dendograma del análisis de cinco variables en poblaciones <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.) con base en el método de ligamiento Ward.....   | 40     |
| 5      | Análisis de agrupamiento de 52 árboles de <i>Pinus engelmannii</i> <i>P. arizonica</i> y <i>P. duranguensis</i> , mediante el coeficiente de Nei y Li, utilizando como método de agrupamiento UPGMA, sobre la base de 132 marcadores AFLP, generados con dos combinaciones de iniciadores..... | 46     |

## INTRODUCCIÓN

La conservación y el manejo de los bosques, como cualquier otro recurso natural, deben involucrar su supervivencia, el bienestar humano y la participación de las poblaciones locales. Los bosques son la mayor economía de México al proporcionar más del 80 % de la producción de madera total anual (Caballero, 2012). Además, los bosques ofrecen a la sociedad bienes y servicios como productos no maderables, captación de agua, productos alimenticios, ecoturismo, entre otros servicios ambientales (Ortiz, 1993). Sin embargo, en México se deforestan cerca de 400 000 ha anuales, en las que no sólo se pierde la madera, sino también los recursos asociados como la biodiversidad, el suelo, la capacidad de retención y cosecha de agua, los hábitats para la fauna y principalmente la pérdida de los recursos genéticos del bosque. Además, en México no existe una política nacional para realizar estudios y elaborar un inventario de la variación genética en especies forestales. Tampoco se han establecido mecanismos para dar seguimiento a la pérdida genética y vulnerabilidad de las especies (FAO, 2010). Por lo anterior, es necesario realizar estudios para conocer la diversidad genética de especies forestales con alto potencial productivo.

Los estudios sobre caracterización de poblaciones han adquirido una gran importancia en los últimos años y son utilizados para conocer la identidad genética de especies vegetales. Estos se han logrado con el manejo de herramientas biotecnológicas como es el uso de marcadores moleculares. Una de las primeras técnicas utilizadas fue la “huella genómica de ADN” (DNA fingerprinting), empleada originalmente por Jeffrey *et al.* (1985) en estudios de

genética humana. Posteriormente, fue utilizada para la identificación de cultivares agronómicos como el arroz, entre otros (Dallas, 1988). Estas técnicas consideran una o más características del genoma del individuo y sirven para realizar análisis de identificación de ADN, pruebas de identidad, perfil genético, caracterización genotípica, huella genómica.

Por la importancia de lo anterior, es urgente conocer y utilizar los recursos genéticos, mediante la evaluación sistemática de su diversidad genética y establecer programas de mejoramiento genético forestal. Las tres especies forestales más importantes en el estado de Chihuahua son: *Pinus arizonica* (Engelm.), *Pinus durangensis* (Martínez), *Pinus engelmannii* (Carr.). Estas especies son nativas de México y están distribuidas en la porción norte del país. Sus principales usos son para la elaboración de cajas de empaque, postes, triplay, durmientes, celulosa y leña. Además, se recomiendan para plantaciones comerciales y ocasionalmente como ornamental (CONAFOR, 2013).

El rescate de estos recursos genéticos presentes aun en el macizo forestal del estado de Chihuahua, debe iniciarse cuanto antes y buscar su recuperación a través del uso de material genético sobresaliente. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la variabilidad morfológica y genética de tres especies de pino en el estado de Chihuahua.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Importancia de las Coníferas

Los bosques primarios del mundo han sido destruidos en un 78 % y el otro 22 % restante está amenazado por diversos factores (Santamarta, 2004). Entre estos están: crecimiento demográfico, cambios de uso del suelo, ganadería y minería, incendios forestales, extracción de madera, caminos forestales y cambio climático. Este cambio de los ecosistemas es continuo, ya sea por los propios procesos naturales o por influencia humana, ésta última la principal causa de la modificación directa o indirecta del disturbio de los ecosistemas (González *et al.*, 2007).

La principal causa de pérdida de los hábitats naturales de especies silvestres en el planeta es la deforestación. Las consecuencias a corto y mediano plazo se pueden resumir en: desaparición de recursos genéticos, pérdida de biodiversidad, pérdida de recursos económicos (madera, celulosa, leñas, etc.), degradación de suelos, alteración de ciclos hidrológicos, erosión, desertificación, extinción de especies y de ecosistemas y pérdida de recursos bióticos y servicios ambientales (SEMANAT, 2000).

El manejo sustentable de los bosques requiere del conocimiento de factores ambientales que determinan el crecimiento de las especies forestales (Palahi *et al.*, 2004). Las coníferas son componentes importantes de los ecosistemas terrestres. Los géneros *Pinus*, *Picea* y *Abies*, se encuentran en regiones boreales del este de Asia, el Mediterráneo, los Himalayas, la región Atlántica, el oeste de América del Norte y las Sierras Madres de México (Richardson y Rundel, 1998; Farjon, 2001).

La superficie de bosques de coníferas en el país es de 30.4 millones de hectáreas; 16 millones que representan el 53.3 % está en los estados de Chihuahua, Durango y Michoacán. En estos estados la actividad forestal es de suma importancia, ya que aportan más del 60 % de la producción forestal nacional. Sin embargo, existe un grave deterioro y pérdida de los recursos genéticos forestales, ocasionado por diversas causas (CONAFOR, 2003). Lo anterior, genera la necesidad de iniciar programas de recuperación de dichos recursos, con el propósito de revertir los procesos de deterioro y recuperar el valor genético original de estos bosques, ya que el país presenta las tasas de deforestación más altas del mundo, estimadas en más de un millón de hectáreas por año (CONAFOR, 2013).

Vela *et al.* (2012) aseguran que las coníferas en México están representadas por diez géneros. Desde el punto de vista económico, y por su papel en la vegetación, los más importantes son: *Pinus*, *Abies*, *Cupressus* y *Juniperus*. Además, desde el punto de vista cuantitativo, *Pinus* es mucho más abundante en México. Frecuentemente, es el componente dominante de la vegetación, ya que influye en procesos como ciclos biogeoquímicos, hidrológicos, regímenes de fuego y es hábitat y fuente de alimento para la fauna silvestre. En las superficies arboladas en que interviene el género *Pinus*, constituyen más del 90 % del área de los bosques de coníferas del país. Además, es fuente de madera, leña, pulpa, resinas, semillas comestibles, entre otros (García y González, 2003; Ramírez *et al.*, 2005).

Entre las poblaciones de importancia económica es urgente el evaluar y seleccionar características sobresalientes a través de descriptores morfológicos

(Steiner *et al.*, 1998). Si bien, no existen muchos estudios de este tipo en coníferas, las gramíneas han sido más estudiadas (Morales *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2016).

### **Especies Importantes en Chihuahua**

***Pinus durangensis* (Martínez).** Se conoce como pino blanco y pino real de seis hojas. Es una especie nativa de la Sierra Madre Occidental de México. Alcanza una altura de 30 a 40 m y 50 a 80 cm de diámetro normal. Se distribuye al noreste entre Chihuahua, Sonora y Durango. Se usa para producción de aserrío, triplay, molduras, duelas y en ebanistería. Además, en menor grado para muebles, pulpa para papel, postes y como ornamental. Esta especie se recomienda para plantaciones comerciales (CONAFOR, 2013).

***Pinus engelmannii* (Carr.).** Su nombre común es pino real, pino apache y pino arizona. Es una especie nativa de México, originaria de la Sierra Madre Occidental. El árbol alcanza una talla media de 15 a 25 m y un diámetro de 60 a 80 cm. Su distribución natural se restringe a los estados de Chihuahua, Sonora, Sinaloa, Durango y Zacatecas. Su principal uso es la obtención de madera para muebles y construcción, molduras, pisos, palo de escoba, triplay, pulpa para papel, aserrín, postes y ebanistería.

***Pinus arizonica* (Engelm.).** Se conoce como pino blanco, pino real y pino de Arizona. Es una especie nativa de la Sierra Madre Occidental de México. Tiene una altura de 30 a 35 m y un diámetro normal mayor a 1 m. En árboles maduros la copa es redondeada y en jóvenes es piramidal. Su distribución en México va desde Durango hasta Chihuahua y Sonora. Sus

principales usos son para la realización de cajas de empaque, postes, triplay, durmientes, celulosa y leña (CONAFOR, 2013).

### **Diversidad Genética**

La diversidad genética es el componente básico de la biodiversidad. Esta se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Piñero *et al.*, 2008). El mantenimiento de alto nivel de diversidad genética es esencial para las especies arbóreas, para que se adaptan a los cambios ambientales (Ci *et al.*, 2008). Estudios de niveles y distribución de la variación genética en plantas, sirven para entender la dinámica de población, adaptación y evolución. También, provee información útil para la conservación biológica (Schaal *et al.*, 1991). Además, la función de la diversidad genética es mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio, que permita la adaptación y la supervivencia de una especie (Zamudio, 2005). La variabilidad genética es la carga genética expresado o no de individuos de una especie. Su función es mantener condiciones de variación de respuesta al medio, que permita la adaptación y supervivencia de la especie. Cuando la estructura genética está fuertemente influenciada por la distribución geográfica de la poblaciones, se espera que las poblaciones más cercanas presenten menor variabilidad que las más alejadas geográficamente (Wen y Hsiao, 2001).

La diversidad genética es de gran importancia para la sostenibilidad de las poblaciones (Hamrick *et al.*, 1991). Generalmente, la diversidad genética de una especie se determina por su capacidad de adaptación, capacidad de supervivencia y capacidad de evolución. Una riqueza genética o diversidad

genética significa una alta supervivencia y un gran potencial para realizar mejoramiento genético (Hedrick y Miller, 1992). La mayoría de las investigaciones sobre genética forestal en México, han estado enfocadas al mejoramiento genético de especies de interés comercial, lo cual se ha hecho con base en métodos clásicos de pruebas de progenie y de procedencia (Díaz *et al.*, 2001).

### **Marcadores Moleculares**

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia no típica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula orgánica o inorgánica que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido. Este marcador sirve para monitorear o calibrar la separación de las moléculas, con el uso de electroforesis o cromatografía. Además, un marcador como cualquier gen, cuya expresión permite un efecto fenotípico puede ser detectado fácilmente (Valadez y Kahl, 2000). Además, son útiles para la identificación varietal, ya que son poco influenciados por el ambiente o la fenología de la planta (Beebe *et al.*, 2000).

Para análisis genéticos y programas de mejoramiento se han desarrollado métodos para la identificación y caracterización de especies vegetales, mediante marcadores de ADN por su simplicidad y facilidad de manejo (Tapia *et al.*, 2005). Este tipo de marcadores pueden evaluar estados de desarrollo de plantas de cualquier tipo de material vegetal, sin necesidad de evaluar caracteres morfológicos y moleculares, además, es libres de efectos

epistáticos (Azofeifa, 2006). Diversos marcadores moleculares como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Palomino *et al*, 2014), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Di y Meng, 2013), SSR (Simple Sequence Repeats; Pérez *et al*, 2011) e ISSR (Inte-simple sequence Repeats; Rosales *et al*, 2003), se usan para detectar diversidad genética a nivel intra o inter-especifico en poblaciones de plantas (Valdez *et al.*, 2001).

### **Marcadores AFLP**

La metodología de los AFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) fue desarrollada por Marc Zabeau y publicada por primera vez por Vos *et al.* (1995). El método está basado en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Simpson, 1997). Esta técnica es una combinación de técnicas basadas en digestión y PCR. Al igual que otras técnicas de marcadores, inicia con el aislamiento del ADN genómico y su restricción completa con dos endonucleasas distintas. Una de ellas (*Eco* RI) es una enzima que reconoce 6 pares de base y corta dentro de ellas. La otra (*Mse* I) reconoce y corta dentro de una secuencia de 4 pares de bases. A través de la acción combinada de ambas enzimas, se genera un gran número de fragmentos cuyas frecuencias son en número descendente.

La técnica de AFLP selecciona únicamente a los fragmentos *Mse* I - *Eco* RI. Después son ligadas moléculas de adaptadores específicos a los extremos cohesivos de los sitios de restricción. Subsecuentemente, se llevan a cabo dos reacciones de amplificación por PCR. Los iniciadores empleados para la primera amplificación corresponden a las secuencias de los adaptadores más

un nucleótido extra interno al fragmento. En ésta solo serán amplificados los fragmentos con el nucleótido extra seguido de los sitios de restricción. En la segunda amplificación, son usados tres nucleótidos selectivos, esto significa que solo los fragmentos con esta combinación particular de 6 nucleótidos adyacentes a los sitios de restricción serán amplificados. Uno de los iniciadores en la segunda amplificación es marcado con radiactividad o fluorescencia. Por último, se hace la separación de los fragmentos amplificados (bandas) en un gel de secuenciación de poliacrilamida, donde las bandas pueden ser detectadas por autoradiografía o detección de fluorescencia. Normalmente en el caso de ADN genómico de plantas, bajo estas condiciones de amplificación, son observadas de 50 a 100 bandas por muestra (Simpson, 1997).

Entre los marcadores más utilizados se encuentran los AFLP's. Estos permiten examinar en un solo ensayo, un gran número de fragmentos de ADN y se comportan como marcadores dominantes (Coart *et al*, 2002). Las ventajas de esta técnica incluyen a un gran número de loci, altos niveles de polimorfismos, alta reproducibilidad, no se requiere de conocimiento de la secuencia anterior y la distribución de todo el genoma de los marcadores (Powell *et al.*, 1996).

El uso de marcadores moleculares como los AFLPs, no son afectados por el ambiente, además, con su uso se puede detectar diversidad a nivel del genotipo y estos marcadores han sido empleados con éxitos en otras especies vegetales (Puecher *et al.*, 2001; Renganayaki *et al.* 2001) para evaluar y conocer su variabilidad genética (Meudt y Clarke, 2006).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Descripción del Área de Estudio**

La toma de muestras se realizó en el macizo forestal del estado de Chihuahua (Figura 1). Este se localiza en la parte oeste, entre los 24° 42' 03" y 31° 16' 43" de latitud norte y los 105° 22' 48" y 109° 33' 25" de longitud oeste, con una superficie de 8,168 888 hectáreas en la Sierra Madre Occidental del estado. En su mayoría el clima corresponde a templado con lluvias en verano (Cf) (García, 1973). Está influenciada por la cuenca del río Yaqui, río Mayo, río Fuerte, río Sinaloa y río de San Luis.

Para el desarrollo de este trabajo, la región del macizo forestal se dividió en zona norte, centro y sur (Cuadro 1). Dentro de cada zona se muestrearon 20 árboles por especie. Las muestras consistieron de tejido de hojas de la parte media e inferior del pino. El material recolectado se colocó en bolsas de plástico y se identificó cada bolsa con un código que incluye muestra, número, zona y especie (M- # - N -Spp). Además, se obtuvieron datos de origen de los árboles muestreados como edad, diámetro y altura del pino, coordenadas y altitud en cada sitio (Cuadros 2, 3 y 4). Posteriormente, las muestras se colocaron en hieleras para su traslado al laboratorio.

### **Análisis de Laboratorio**

El análisis se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato. Se recolectaron 180 muestras procedentes del macizo forestal de Chihuahua. En cada zona de muestreo se recolectaron en total 20 muestras de cada una de las tres especies.

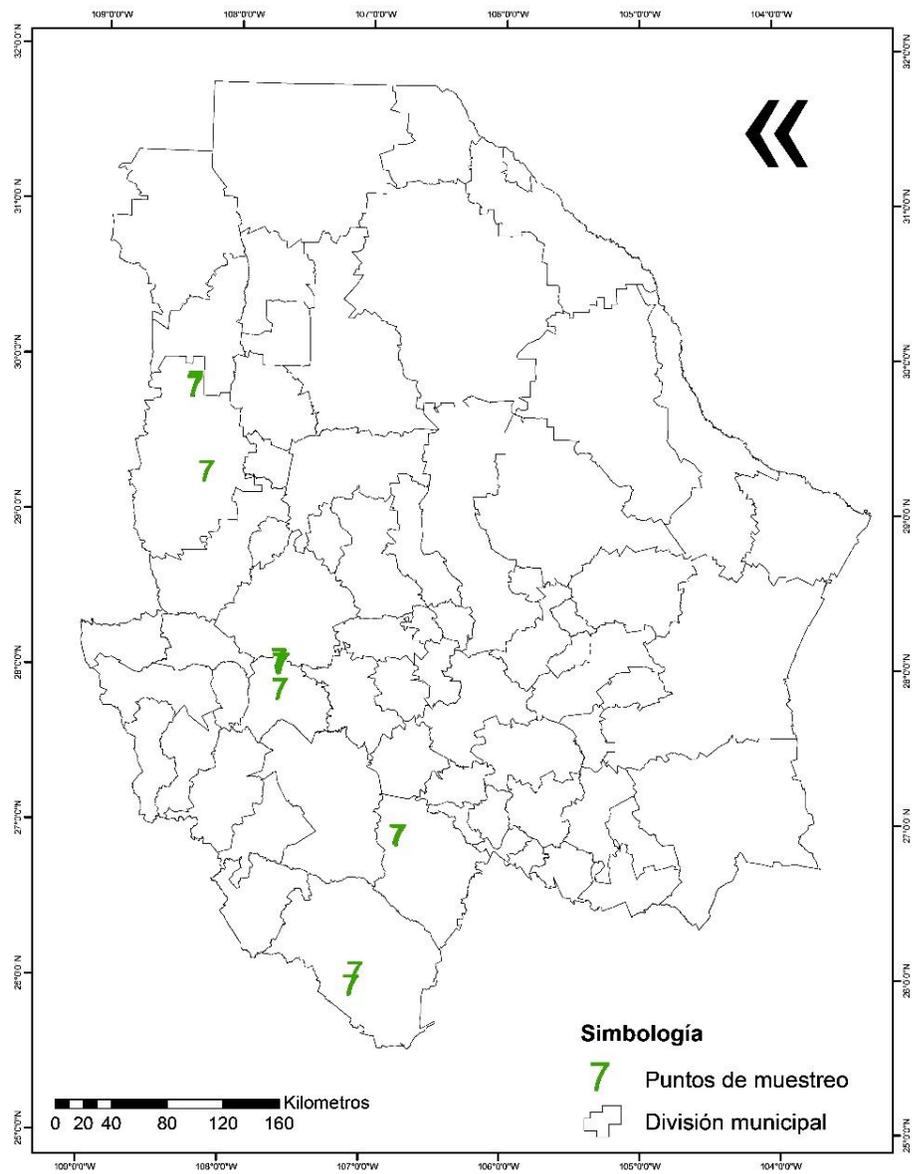


Figura 1. Ubicación de las zonas muestreadas en el macizo forestal del estado de Chihuahua, México.

Cuadro 1. Área de muestreo en el macizo forestal del estado de Chihuahua, México

| Especie                             | Zona Muestreada  |  |  |
|-------------------------------------|--|--|--|
|                                     | Norte  | Centro   | Sur  |
| <i>Pinus durangensis</i> (Martínez) | Predio Socorro Rivera, Madera. Paraje Mesa de La Laguna del 11 | Ejido Shewerachi, Bocoyna. Paraje Ciénega del Táscate    | Ejido el Tule y Portugal. Municipio de Guadalupe y Calvo |
| <i>Pinus engelmannii</i> (Carr.)    | Paraje El Bonito, El Largo Maderal                             | Mesa de Baboreachi, Lote Semillero. Municipio de Bocoyna | Carretera Balleza - Chihuahua                            |
| <i>Pinus arizonica</i> (Engelm.)    | El Bajío del Sol, Ejido El Largo Maderal                       | Ejido San Juanito. Predio Hacienda de Guadalupe. Creel   | Cerro Mohinora. Guadalupe y Calvo                        |

Cuadro 2. Datos de origen de las especies muestreadas en la zona norte del macizo forestal del estado de Chihuahua, México

| Colecta | Circunferencia<br>(cm) | Altura<br>(m) | Latitud<br>(N) | Longitud<br>(O) | Altitud<br>(msnm) | Edad<br>(años) |
|---------|------------------------|---------------|----------------|-----------------|-------------------|----------------|
| E-1-N-D | 25                     | 11            | 29°15'215"     | 108°10'14.7"    | 2310              | 30             |
| E-2-N-D | 35                     | 15            | 29°15'21.7"    | 108°10'13.6"    | 2312              | 50             |
| E-3-N-D | 25                     | 13            | 29°15'19.8"    | 108°10'14.1"    | 2319              | 30             |
| E-4-N-D | 35                     | 14            | 29°15'21.0"    | 108°10'13.5"    | 2330              | 60             |
| E-5-N-D | 50                     | 18            | 29°15'23.7"    | 108°10'15.9"    | 2328              | 70             |
| E-6-N-D | 30                     | 16            | 29°15'25.2"    | 108°10'10.4"    | 2331              | 50             |
| E-1-N-E | 45                     | 17            | 29°38'49"      | 108°17'17.3"    | 2224              | 70             |
| E-2-N-E | 45                     | 18            | 29°15'21.7"    | 108°10'13.6"    | 2217              | 70             |
| E-4-N-E | 35                     | 15            | 29°15'21.0"    | 108°10'13.5"    | 2218              | 60             |
| E-5-N-E | 30                     | 15            | 29°15'23.7"    | 108°10'15.9"    | 2221              | 50             |
| E-6-N-E | 30                     | 14            | 29°15'25.2"    | 108°10'10.4"    | 2186              | 70             |
| E-1-N-A | 40                     | 15            | 25°48'57"      | 108°15'58"      | 2318              | 90             |
| E-2-N-A | 30                     | 18            | 29°49'40.5"    | 108°15'57.8"    | 2324              | 70             |
| E-3-N-A | 35                     | 15            | 29°49'58.4"    | 108°16'01.9"    | 2361              | 50             |
| E-4-N-A | 30                     | 12            | 29°48'59.7"    | 108°15'57.2"    | 2348              | 60             |
| E-5-N-A | 40                     | 18            | 29°48'.96"     | 108°15'.99"     | 2375              | 90             |
| E-6-N-A | 40                     | 19            | 29°48'40.4"    | 108°16'04.3"    | 2455              | 100            |

E=ecotipo; N=norte del macizo forestal; D=*Pinus durangensis* (Martínez); E=*Pinus engelmannii* (Carr.); A=*Pinus arizonica* (Engelm.).

Cuadro 3. Datos de origen de las especies muestreadas en la zona centro del macizo forestal del estado de Chihuahua, México

| Colecta | Circunferencia<br>(cm) | Altura<br>(m) | Latitud<br>N | Longitud<br>W | Altitud<br>(msnm) | Edad<br>(Años) |
|---------|------------------------|---------------|--------------|---------------|-------------------|----------------|
| E-1-C-D | 30                     | 15            | 28°03'23"    | 107°36'34.1"  | 2550              | 50             |
| E-2-C-D | 30                     | 15            | 28°03'22.2"  | 107°36'32.1"  | 2547              | 60             |
| E-4-C-D | 25                     | 13            | 28°03'21.9"  | 107°36'34"    | 2555              | 50             |
| E-5-C-D | 45                     | 17            | 28°03'21.5"  | 107°36'34"    | 2555              | 60             |
| E-6-C-D | 40                     | 18            | 28°03'27.0"  | 107°36'34.2"  | 2558              | 70             |
| E-1-C-E | 55                     | 20            | 27°51'51.5"  | 107°35'36.5"  | 2418              | 90             |
| E-2-C-E | 30                     | 17            | 27°51'54.6"  | 107°35'40.5"  | 2418              | 70             |
| E-3-C-E | 30                     | 15            | 27°51'53.3"  | 107°35'42.7"  | 2407              | 60             |
| E-4-C-E | 40                     | 17            | 27°51'51.7"  | 107°35'43.4"  | 2406              | 70             |
| E-5-C-E | 40                     | 18            | 27°51'50.3"  | 107°35'45.5"  | 2395              | 70             |
| E-6-C-E | 35                     | 17            | 27°51'48.2"  | 107°35'43.9"  | 2399              | 70             |
| E-1-C-A | 50                     | 20            | 28°01'42.6"  | 107°36'00"    | 2452              | 80             |
| E-2-C-A | 35                     | 15            | 28°01'44.4"  | 107°35'59.8"  | 2453              | 70             |
| E-3-C-A | 35                     | 15            | 28°01'44.2"  | 107°35'57.4"  | 2447              | 70             |
| E-4-C-A | 45                     | 15            | 28°01'44.5"  | 107°35'54.5"  | 2445              | 80             |
| E-5-C-A | 45                     | 18            | 28°01'44.4"  | 107°35'52.3"  | 2442              | 90             |
| E-6-C-A | 30                     | 15            | 28°01'40.9"  | 107°35'58.3"  | 2453              | 60             |

E=ecotipo; C=centro del macizo forestal; D=*Pinus durangensis* (Martínez); E=*Pinus engelmannii* (Carr.); A=*Pinus arizonica* (Engelm.).

Cuadro 4. Datos de origen de las especies muestreadas en la zona sur del macizo forestal del estado de Chihuahua, México

| Colecta | Circunferencia<br>(Cm) | Altura<br>(Metros) | Latitud<br>N | Longitud<br>W | Altitud<br>(msnm) | Edad<br>(Años) |
|---------|------------------------|--------------------|--------------|---------------|-------------------|----------------|
| E-1-S-D | 30                     | 15                 | 26°02'26.5"  | 107°01'10.3"  | 2789              | 50             |
| E-2-S-D | 25                     | 15                 | 26°02'24.8"  | 107°01'09.1"  | 2787              | 70             |
| E-3-S-D | 40                     | 20                 | 26°02'24.0"  | 107°01'10.8"  | 2783              | 80             |
| E-4-S-D | 35                     | 18                 | 26°02'25.2"  | 07°01'06.8"   | 2780              | 30             |
| E-5-S-D | 40                     | 20                 | 26°02'27.1"  | 107°01'07.0"  | 2778              | 60             |
| E-6-S-D | 20                     | 15                 | 26°02'30.8"  | 107°01'03.0"  | 2788              | 60             |
| E-1-S-E | 30                     | 15                 | 26°02'26.5"  | 107°01'10.3"  | 2789              | 50             |
| E-2-S-E | 30                     | 15                 | 26°55'52.3"  | 106°43'13.0"  | 2240              | 60             |
| E-3-S-E | 45                     | 15                 | 26°55'50.1"  | 106°43'10.3"  | 2250              | 60             |
| E-4-S-E | 30                     | 15                 | 26°55'47.6"  | 106°43'10.7"  | 2252              | 60             |
| E-5-S-E | 30                     | 15                 | 26°55'47.6"  | 106°43'13.2"  | 2253              | 70             |
| E-6-S-E | 30                     | 15                 | 26°55'47.5"  | 106°43'16.3"  | 2256              | 70             |
| E-1-S-A | 50                     | 8                  | 25°27'21.7"  | 107°02'48.7"  | 3322              | 100            |
| E-2-S-A | 70                     | 13                 | 25°57'19.8"  | 107°02'49.8"  | 3308              | 90             |
| E-3-S-A | 40                     | 13                 | 25°57'17.8"  | 107°02'50.9"  | 3311              | 100            |
| E-4-S-A | 45                     | 14                 | 25°57'25.2"  | 107°02'51.8"  | 3313              | 100            |
| E-5-S-A | 60                     | 18                 | 25°57'24.4"  | 107°02'49.9"  | 3303              | 90             |
| E-6-S-A | 70                     | 18                 | 25°57'20.5"  | 107°02'47.0"  | 3300              | 70             |

E=ecotipo; S=sur del macizo forestal; D=*Pinus durangensis* (Martínez); E=*Pinus engelmannii* (Carr.); A=*Pinus arizonica* (Engelm.).

**Extracción de ADN.** El ADN de las muestras fue extraído con el kit Qiagen DNeasy® 96 Plant Kit (6) Catálogo No. 69181. Se trabajó por placa de 96 y las reacciones fueron para muestras individuales. Se colocaron 50 mg (3 hojas) de muestra en cada tubo de recolección (muestra congelada) y se agregaron 400 µl de Buffer AP1, 1 µl de RNase A, 1 µl de Reagent DX y se agregó un balín de Qiagen (Stainless Steel Beads 5 mm (200) Catálogo No. 69989). Las muestras se colocaron en el TissueLyser Qiagen (Catálogo No.85300) dos veces por 30 s a 30 Hz. En el intervalo se colocaron en nitrógeno líquido para que las muestras no se descongelaran. Se centrifugó la muestra a 3000 rpm y se agregaron 130 µl de Buffer P3. Se agitó durante 15 s, las muestras se incubaron a -20°C durante 10 min y se centrifugó a 3750 rpm por 5 min. Posteriormente, 400 µl de la muestra se transfirió a un tubo de recolección nuevo, se agregó 600 µl de Buffer AW1 y se agitó durante 15 s. Para recolectar la solución se centrifugó la muestra a 3000 rpm. Se colocaron las placas DNeasy 96 Plate arriba de otro tipo de placas S-Blocks y se transfirió 1 ml de la muestra a las placas de DNeasy 96 Plate, se selló con AirPre Tape Sheet (una película para cubrir las placas de 96) y se centrifugó por 4 min a 3750 rpm. Se agregaron 800 µl de Buffer AW2 y se centrifugó a 3750 rpm durante 15 min. Las placas de DNeasy 96 Plate se colocaron sobre placas de elusión y se le agregaron 100 µl de Buffer AE a las placas DNeasy 96 Plate. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente (15-25 °C), después se centrifugó 2 min a 3750 rpm. Finalmente, se repitió el paso anterior.

Las muestras se cuantificaron en Nanodrop (Thermo Catálogo No. 2000), un espectrofotómetro de amplio espectro (220-270 nm) que mide muestras de 1

µl con alta precisión y reproducibilidad, mediante métodos de tensión superficial. Se ocupó un volumen mínimo de 1 a 2 µl, se realizó por aplicación directa de la muestra. Finalmente, se colocaron 2 µl de la muestra en el Nanodrop y se realizaron las lecturas correspondientes.

**Marcadores moleculares.** La técnica de AFLP no requiere gran cantidad de ADN genómico pero la calidad del ADN es muy importante. Por lo que se diluyeron a 50 ng/µl del ADN extraído con agua. Para ello se utilizó el Kit IRDye® Fluorescent AFLP® Kit for Large Plant Genome Analysis (Licor Catálogo No. 830-06198). En la digestión del DNA genómico se utilizó enzimas de restricción. En placa de 96 de PCR de 200 µl en hielo se agregaron 2.5 µl Buffer 5X RL, 1 µl Mix de Enzimas *EcoR1 / Mse1*, 7 µl de Agua desionizada y 2 µl de ADN diluido. Todo se mezcló, se colocó en un termociclador (Verity Applied Biosystems Catálogo No. 4375786) y se incubó la mezcla a 37 °C por 2 hr y a 70 °C por 15 min para inactivar las enzimas de restricción. Se verificó en gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio (Br+et). Posteriormente, se mezclaron 2 µl del amortiguador de carga 6X ADN Loading Dye Blue más 12.5 µl de ADN digerido. Para la ligación de adaptadores se agregaron en la misma placa de 96 de PCR de 200 µl en hielo, 12 µl de Adapter mix, 0.5 µl de T4 ADN Ligasa (y todo el producto de paso anterior, 12.5 µl de ADN digerido). Se agitó y mezcló pipeteando hacia arriba y abajo. Se incubó la muestra a 20 °C por 2 hr. Se diluyeron las muestras a 1:10 agregando 225 µl de agua desionizada.

Pre-amplificación. En una nueva placa de 96 de PCR de 200 µl en hielo, se agregaron 20 µl AFLP Pre-Amp Primer Mix, que contiene los oligonucleótidos E+A y M+C y también dNTPs, 2.5 µl de Buffer *Taq* PCR 10X +

KCl, 1.3  $\mu$ l de 25 mM  $MgCl_2$  fermentas, 0.2  $\mu$ l *Taq DNA* Polimerasa y 2.5  $\mu$ l DNA digerido, ligado y diluido. Se mezcló y se colocó en un termociclador, corriendo el siguiente programa: 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 1 min, 72 °C por 1 min. Las muestras se diluyeron en 230  $\mu$ l de agua desionizada. Se verificó en gel de agarosa al 1 % con Br+et. Se mezclaron 2  $\mu$ l de amortiguador de carga 6X ADN Loading Dye Blue más 18  $\mu$ l de ADN pre-amplificado.

Amplificación Selectiva. Se realizaron dos PCR con dos combinaciones de oligonucleótidos: en 2 placas de 96 de PCR en hielo. En la primera placa se colocaron 4.6  $\mu$ l de  $H_2O$  desionizada, 1.1  $\mu$ l Buffer de amplificación 10X + KCl, 0.6  $\mu$ l de 25 mM  $MgCl_2$ , 0.2  $\mu$ l de *Taq* Polimerasa, 2  $\mu$ l del oligonucleótido *MseI* CAC (contiene dNTPs), 0.5  $\mu$ l del iniciador marcado *EcoR1* ACC\_700, y 2  $\mu$ l de ADN pre-amplificado y diluido. Se colocaron en un termociclador con el siguiente programa: 1 ciclo de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, 12 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, 23 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 min. Se checaron todas las muestras, se preparó el gel de acrilamida al 6.5%, una vez solidificado el gel. Se cargaron 1 litro de Buffer TBE en el secuenciador Licor, se colocó el gel y se cargaron 0.8  $\mu$ l de muestra, en los extremos del gel se cargó con el marcador de peso molecular Eco 700. En la segunda placa se colocaron 4.6  $\mu$ l de  $H_2O$  desionizada, 1.1  $\mu$ l Buffer de amplificación 10X + KCl, 0.6  $\mu$ l de 25 mM  $MgCl_2$ , 0.2  $\mu$ l de *Taq* Polimerasa, 2  $\mu$ l del iniciador *MseI* CAG (contiene dNTPs), 0.5  $\mu$ l del Primer marcado *EcoR1* ACC\_700, y 2  $\mu$ l de ADN pre-amplificado y diluido. Se colocaron en un termociclador con el programa ya descrito en la combinación anterior: 1 ciclo de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 min,

12 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, 23 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 min. Se checaron todas las muestras, se preparó el gel de acrilamida al 6.5%, una vez solidificado el gel. Se cargaron 1 litro de Buffer TBE en el secuenciador Licor, se colocó el gel y se cargaron 0.8 µl de muestra, en los extremos del gel se cargó con el marcador de peso molecular Eco 700.

### **Análisis Estadístico**

A las variables continuas (altitud msnm, diámetro, altura y edad de la planta) se les realizó un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de conglomerados (AC), mediante el método de Ward (1963), con el programa SAS 9.1.3® (2006). El dendrograma se obtuvo con el programa MINITAB 16®.

Los datos moleculares de ausencia (0) y presencia (1) de bandas se codificaron en Excel® y posteriormente se analizaron con el programa SAGA®. La matriz de similitud genética y el dendrograma para el análisis de conglomerados se obtuvieron mediante el programa FreeTree®, UPGMA (promedio aritmético de grupos de pares no ponderados). El análisis de conglomerados realizado se fundamenta en el método de Nei y Li (1979) para generar las matrices de distancia (o similitudes).

Además, se realizó un análisis para evaluar la robustez y confiabilidad en la topología del árbol, mediante el procedimiento de simulación Bootstrap con 5000 remuestreos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis Morfológico

***Pinus durangensis* (Martínez).** Los rangos de los valores obtenidos de las variables evaluadas se observan en el Cuadro 5. La circunferencia del tallo varió desde los 20 hasta los 50 cm. La altura del árbol fluctuó desde 11 hasta 20 m. La altitud de la zona varió desde los 2310 hasta los 2789 msnm. Finalmente, la edad de las poblaciones se presentó desde los 30 hasta los 80 años.

El análisis de componentes principales (ACP) mostró que los tres primeros componentes principales (CP), explican el 97.94 % de la variación total observada (Cuadro 6). La variable morfológica que más contribuyó con el CP1 fue la altura. Para el CP2 la variable de circunferencia de tallos fue la de mayor contribución. Para el CP3 la variable que más contribuyó fue la edad (Cuadro 7).

Al correlacionar las cinco variables con los tres primeros componentes principales, todas presentaron correlaciones significativas ( $P \leq 0.0001$ ). El CP1 presentó una correlación significativa ( $P \leq 0.0001$ ) con la zona (0.79), altura de árbol (0.86) y altitud (0.80). El CP2 presentó una correlación significativa ( $P \leq 0.0001$ ) con la circunferencia del tallo (0.82). Por último, el CP3 sólo presentó correlación significativa ( $P \leq 0.0067$ ) con la edad (Cuadro 8).

Al efectuar el análisis de conglomerados jerárquicos, se obtuvieron tres grupos basados en el método de ligamiento Ward (1963) a una distancia euclidiana de 7.19. El grupo I (G-I) integró a cinco ecotipos de la región norte

Cuadro 5. Valores medios de cuatro variables evaluadas en poblaciones de *Pinus duranguensis* (Martínez) en el macizo forestal de Chihuahua, México

| Variable            | Media | Mínimo | Máximo |
|---------------------|-------|--------|--------|
| Circunferencia (cm) | 32.94 | 20     | 50     |
| Altura (m)          | 15.76 | 11     | 20     |
| Altitud (msnm)      | 2553  | 2310   | 2789   |
| Edad (años)         | 54.70 | 30     | 80     |

Cuadro 6. Valores característicos de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de *Pinus durangensis* (Martínez) en el estado de Chihuahua

| Variable                                | CP1   | CP2   | CP3   |
|---|-------|-------|-------|
| Valor Característico                    | 2.71  | 1.64  | 0.53  |
| Proporción de la varianza (%)           | 54.40 | 32.92 | 10.62 |
| Proporción de la varianza acumulada (%) | 54.40 | 87.32 | 97.94 |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres.

Cuadro 7. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de *Pinus durangensis* (Martínez) en el estado de Chihuahua

| Variable                  | Valor Característico |        |        |
|---------------------------|----------------------|--------|--------|
|                           | CP1                  | CP2    | CP3    |
| Zona (Norte, Centro, Sur) | 0.482                | -0.465 | -0.969 |
| Circunferencia (cm)       | 0.282                | 0.642  | -0.343 |
| Altura (m)                | 0.523                | 0.289  | -0.342 |
| Altitud (msnm)            | 0.486                | -0.460 | -0.080 |
| Edad (Años)               | 0.419                | 0.274  | 0.865  |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres.

Cuadro 8. Correlación de variables con componentes principales en poblaciones de *Pinus duranguensis* (Martínez) en el macizo forestal de Chihuahua, México

|     | Z                   | CI                  | AA                  | AD                  | E                  |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| CP1 | 0.79<br>(P≤0.001)   | 0.45<br>(P≤0.0590)  | -0.86<br>(P≤0.0001) | 0.80<br>(P≤0.0001)  | 0.69<br>(P≤0.0021) |
| CP2 | -0.59<br>(P≤0.0115) | 0.82<br>(P≤0.0001)  | 0.37<br>(P≤0.1428)  | -0.59<br>(P≤0.0126) | 0.35<br>(P≤0.1653) |
| CP3 | -0.07<br>(P≤0.7876) | -0.25<br>(P≤0.3319) | -0.24<br>(P≤0.3340) | -0.05<br>(P≤0.8224) | 0.63<br>(P≤0.0067) |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres. Z= zona; CI= circunferencia del tallo; AA= altura de árbol; AD= altitud; E= edad.

Predio Socorro Rivera, Madera, Paraje Mesa de La Laguna del 11 del municipio de Madera, Chihuahua. El grupo II (G-II) agrupó a seis árboles: tres del sur, originarios del ejido el Tule y Portugal, municipio de Guadalupe y Calvo, dos del centro, originarios del ejido Shewerachi, Bocoyna y Paraje Ciénega del Tásate. Finalmente, el grupo III (G-III) integró a seis árboles: tres de centro, originarios del ejido Shewerachi, Bocoyna y Paraje Ciénega del Tásate y tres de sur, originarios del ejido el Tule y Portugal, municipio de Guadalupe y Calvo (Figura 2). La variación morfológica observada en las poblaciones de coníferas, probablemente es el resultado de la adaptación de la diversidad de factores ambientales en el área muestreada, tales como precipitación, temperatura y altitud.

***Pinus engelmannii* (Carr.)**. Los rangos de los valores obtenidos de las variables evaluadas se observan en el Cuadro 9. La circunferencia del tallo varió desde los 30 hasta los 55 cm. La altura del árbol fluctuó desde 14 hasta 20 m. La altitud de la zona varió desde los 2186 hasta los 2789 msnm. Finalmente, la edad de los árboles se presentó desde los 50 hasta los 90 años.

La variable morfológica que más contribuyó con el CP1 fue la altura. Para el CP2 la variable altitud fue la de mayor contribución. Para el CP3 la variable que más contribuyó fue la zona (Cuadro 10). El análisis de componentes principales (ACP) mostró que los tres primeros componentes principales (CP), explican el 97.45 % de la variación total observada (Cuadro 11).

El Cuadro 12 muestra la correlación de las cinco variables con los tres primeros componentes principales, donde todas presentaron correlaciones significativas ( $P \leq 0.0001$ ). En el CP1 presento una correlación significativa

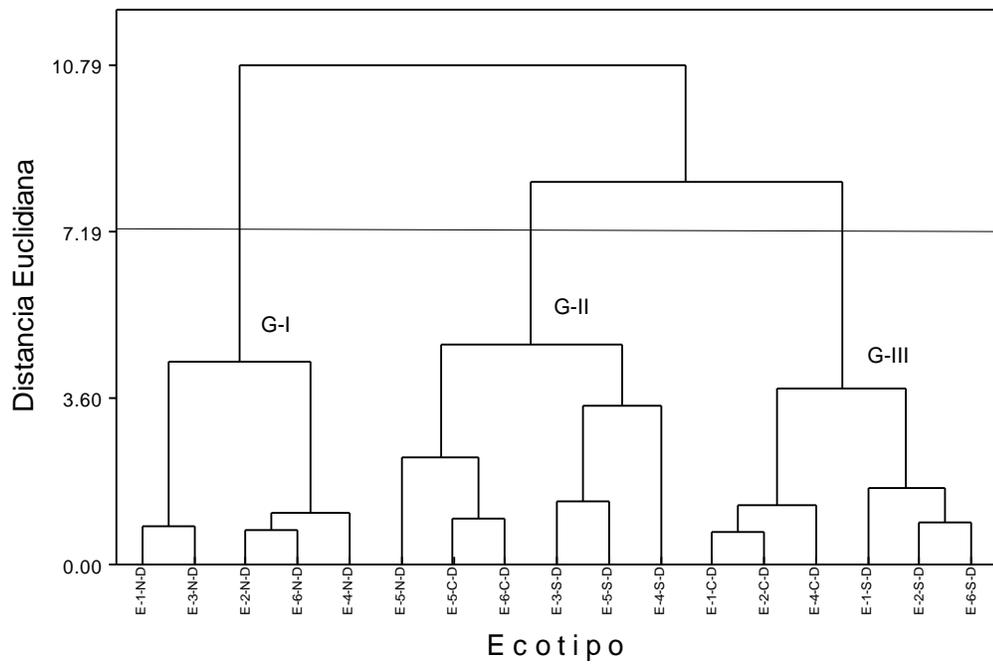


Figura 2. Dendrograma del análisis de cinco variables en poblaciones de *Pinus durangensis* (Martínez) con base en el método de ligamiento Ward.

Cuadro 9. Valores medios de cuatro variables evaluadas en poblaciones de *Pinus engelmannii* (Carr.) en el macizo forestal de Chihuahua, México

| Variable            | Media | Mínimo | Máximo |
|---------------------|-------|--------|--------|
| Circunferencia (cm) | 35.88 | 30     | 55     |
| Altura (m)          | 16.05 | 14     | 20     |
| Altitud (msnm)      | 2326  | 2186   | 2789   |
| Edad (años)         | 65.88 | 50     | 90     |

Cuadro 10. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de *Pinus engelmannii* (Carr.) en el estado de Chihuahua

| Variable                  | Valor Característico |       |        |
|---------------------------|----------------------|-------|--------|
|                           | CP1                  | CP2   | CP3    |
| Zona (Norte, Centro, Sur) | -0.371               | 0.435 | 0.764  |
| Circunferencia (cm)       | 0.539                | 0.061 | 0.042  |
| Altura (m)                | 0.556                | 0.279 | -0.024 |
| Altitud (msnm)            | -0.043               | 0.852 | -0.397 |
| Edad (Años)               | 0.509                | 0.018 | 0.505  |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres.

Cuadro 11. Valores característicos de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de *Pinus engelmannii* (Carr.) en el estado de Chihuahua

| Variable                                | CP1   | CP2   | CP3   |
|---|-------|-------|-------|
| Valor Característico                    | 2.67  | 1.19  | 0.64  |
| Proporción de la varianza (%)           | 53.42 | 32.99 | 12.91 |
| Proporción de la varianza acumulada (%) | 53.42 | 77.41 | 97.45 |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres.

( $P \leq 0.0001$ ) con la circunferencia (0.88), altura de árbol (0.90) y edad (0.83). El CP2 presentó una correlación significativa ( $p \leq 0.0001$ ) con la altitud (0.93). Por último, el CP3 sólo presentó correlación significativa ( $P \leq 0.0087$ ) con la edad (0.61).

Al efectuar el análisis de conglomerados jerárquicos, se obtuvieron dos grupos basados en el método de ligamiento Ward (1963) a una distancia euclidiana de 7.27. El grupo I (G-I) integró a dos subgrupos (AI y AII) y el grupo II (GII) integró dos subgrupos más (BI y BII). En el subgrupo AI se agruparon dos árboles del norte procedentes del Paraje El Bonito, El Largo Maderal y uno del centro, procedente de la Mesa de Baboreachi, Lote Semillero, municipio de Bocoyna; en el subgrupo AII se agruparon cuatro árboles del centro, originarios de la Mesa de Baboreachi, Lote Semillero, municipio de Bocoyna. El subgrupo BI integró tres árboles del norte, procedentes de Paraje El Bonito, El Largo Maderal y un ecotipo del centro, originario de la Mesa de Baboreachi, Lote Semillero, municipio de Bocoyna; finalmente, en el subgrupo BII se agruparon seis árboles del sur, procedentes de la carretera Balleza-Chihuahua (Figura 3). La variación morfológica observada en los árboles de coníferas, probablemente es el resultado de la adaptación de la diversidad de factores ambientales en el área muestreada, tales como precipitación, temperatura y altitud.

***Pinus arizonica* (Engelm.)**. Los rangos de los valores obtenidos de las variables evaluadas se observan en el Cuadro 13. La circunferencia del tallo varió desde los 30 hasta los 70 cm. La altura del árbol fluctuó desde 8 hasta 20 m. La altitud de la zona varió desde los 2318 hasta los 3322 msnm. Finalmente, la edad de los árboles se presentó desde los 50 hasta los 100 años.

Cuadro 12. Correlación de variables con componentes principales en poblaciones de *Pinus engelmannii* (Carr.) en el macizo forestal de Chihuahua, México

|     | Z                   | CI                 | AA                  | AD                  | E                  |
|-----|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| CP1 | -0.60<br>(P≤0.0098) | 0.88<br>(P≤0.0001) | 0.90<br>(P≤0.0001)  | -0.07<br>(P≤0.7885) | 0.83<br>(P≤0.0001) |
| CP2 | 0.477<br>(P≤0.0526) | 0.06<br>(P≤0.7977) | 0.30<br>(P≤0.2314)  | 0.93<br>(P≤0.0001)  | 0.20<br>(P≤0.9370) |
| CP3 | 0.61<br>(P≤0.0087)  | 0.03<br>(P≤0.8955) | -0.01<br>(P≤0.9395) | -0.31<br>(P≤0.2121) | 0.40<br>(P≤0.1061) |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres. Z= Zona; CI= Circunferencia del Tallo; AA= Altura de Árbol; AD= Altitud; E= Edad.

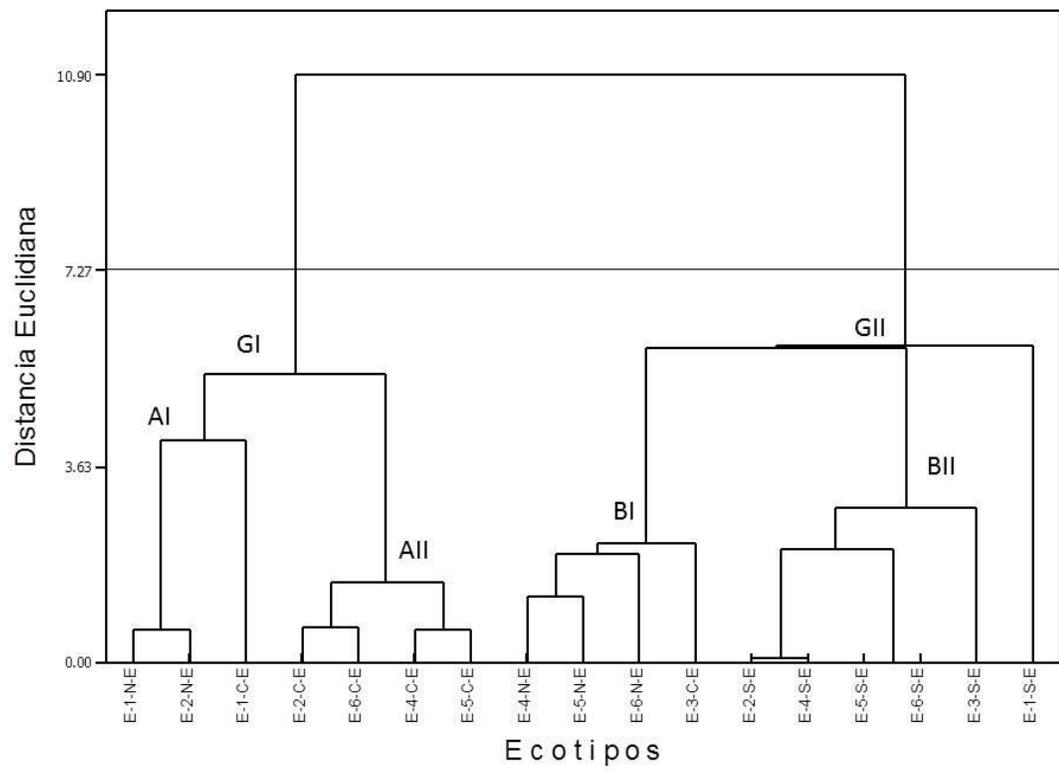


Figura 3. Dendrograma del análisis de cinco variables en poblaciones *Pinus engelmannii* (Carr.) con base en el método de ligamiento Ward.

Cuadro 13. Valores medios de cuatro variables evaluadas en poblaciones de *Pinus arizonica* (Engelm.) en el macizo forestal de Chihuahua, México

| Variable            | Media | Mínimo | Máximo |
|---------------------|-------|--------|--------|
| Circunferencia (cm) | 43.88 | 30     | 70     |
| Altura (m)          | 15.50 | 8      | 20     |
| Altitud (msnm)      | 2707  | 2318   | 3322   |
| Edad (años)         | 81.11 | 50     | 100    |

La variable morfológica que más contribuyó con el CP1 fue la altitud. Para el CP2 la variable de altura, fue la de mayor contribución. Para el CP3 la variable que más contribuyó fue la edad (Cuadro 14). El análisis de componentes principales (ACP) mostró que los tres primeros componentes principales (CP), explican el 93.80 % de la variación total observada (Cuadro 15).

En el Cuadro 16 se presentan la correlación de las cinco variables con los tres primeros componentes principales se presentaron correlaciones significativas ( $P \leq 0.0001$ ). En el CP1 presentó una correlación significativa ( $P \leq 0.0001$ ) con la zona (0.91), la circunferencia (0.85), altitud (0.95) y edad (0.80). El CP2 presentó una correlación significativa ( $P \leq 0.0001$ ) con la altura (0.94). Por último, el CP3 sólo presentó correlación significativa ( $P \leq 0.0569$ ) con la edad (0.45).

Al efectuar el análisis de conglomerados jerárquicos, se obtuvieron tres grupos basados en el método de ligamiento Ward (1963) a una distancia euclidiana de 5.67. El grupo I (G-I) integró a cuatro árboles de la región norte del macizo forestal del estado de Chihuahua, El bajío del Sol, Ejido El Largo Maderal y tres árboles del centro, originarios del Ejido San Juanito, Predio Hacienda de Guadalupe y Calvo. El grupo II (G-II) agrupó a cinco árboles: dos del norte, procedentes de El bajío del Sol, Ejido El Largo Maderal, tres del centro, originarios del ejido San Juanito, Predio Hacienda de Guadalupe y Calvo. Finalmente, el grupo III (G-III) integró a seis árboles, todos del sur, originarios del cerro de Mohinora, Guadalupe y Calvo (Figura 4). También, la variación morfológica observada en los árboles de esta especie, probablemente

Cuadro 14. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de *Pinus arizonica* (Engelm.) en el estado de Chihuahua

| Variable                  | Valor Característico |        |        |
|---------------------------|----------------------|--------|--------|
|                           | CP1                  | CP2    | CP3    |
| Zona (Norte, Centro, Sur) | 0.514                | -0.174 | 0.324  |
| Circunferencia (cm)       | 0.480                | 0.276  | 0.441  |
| Altura (m)                | -0.121               | 0.862  | 0.248  |
| Altitud (msnm)            | 0.534                | -0.176 | 0.022  |
| Edad (Años)               | 0.451                | 0.345  | -0.798 |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres.

Cuadro 15. Valores característicos de mayor valor descriptor, respecto a su componente principal en poblaciones de *Pinus arizonica* (Engelm.) en el estado de Chihuahua

| Variable                                | CP1   | CP2   | CP3   |
|---|-------|-------|-------|
| Valor Característico                    | 3.15  | 1.20  | 0.32  |
| Proporción de la varianza (%)           | 63.17 | 24.09 | 87.26 |
| Proporción de la varianza acumulada (%) | 63.17 | 87.26 | 93.80 |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres.

Cuadro 16. Correlación de variables con componentes principales en poblaciones de *Pinus arizonica* (Engelm.) en el macizo forestal de Chihuahua, México

|     | Z                   | CI                 | AA                  | AD                  | E                   |
|-----|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| CP1 | 0.91<br>(P≤0.0001)  | 0.85<br>(P≤0.0001) | -0.21<br>(P≤0.3889) | 0.95<br>(P≤0.0001)  | 0.80<br>(P≤0.0001)  |
| CP2 | -0.19<br>(P≤0.4470) | 0.30<br>(P≤0.2211) | 0.94<br>(P≤0.0001)  | -0.19<br>(P≤0.4417) | 0.37<br>(P≤0.1213)  |
| CP3 | 0.18<br>(P≤0.4610)  | 0.25<br>(P≤0.3127) | 0.14<br>(P≤0.5740)  | 0.01<br>(P≤0.9590)  | -0.45<br>(P≤0.0569) |

CP1= Componente Principal uno; CP2= Componente Principal dos; CP3= Componente Principal tres. Z= Zona; CI= Circunferencia del Tallo; AA= Altura de Árbol; AD= Altitud; E= Edad.

es el resultado de la adaptación de la diversidad de factores ambientales en el área.

### **Análisis Molecular**

En general y con los dos pares de iniciadores, el análisis de AFLP en las tres especies forestales detectó 132 bandas; 47 presentaron polimorfismo y 85 fueron bandas monomórficas. El número de bandas polimórficas fue de 25 y 22 para las combinaciones de iniciadores *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700 y *MseI* + CAG, *EcoRI* + ACC\_700, respectivamente. El mayor porcentaje de polimorfismo (53.2%) y bandas polimórficas (25) se obtuvo con la combinación de iniciadores *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700 (Cuadro 17). Estos resultados son congruentes en el número de bandas obtenidas con otras investigaciones en relación al número de polimorfismo (Orozco *et al.*, 2010). Además, en trabajos realizados con *Pinus sylvestris* utilizaron cuatro combinaciones de iniciadores para comparar 19 poblaciones. Los resultados arrojaron un total de 309 bandas, de las cuales 208 fueron bandas polimórficas, encontraron el mayor número de bandas polimórficas con 64 en la combinación *EcoI* + ACC and *MseI*+ CTG (Androsiuk, 2015). Otro estudio realizado por Ávila-Flores *et al.* (2016) en *Pinus engelmannii*, *P. arizonica* var. *cooperi* y *P. durangensis* utilizaron una sola combinación de iniciadores (*EcoRI*-ACA, *MseI*-GAAC) y obtuvieron 204 bandas polimórficas.

Para estudios futuros de diversidad genética en poblaciones de estas tres especies de pinos, se recomienda utilizar la combinación *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700, ya que fue la que detectó la mayor variabilidad en las poblaciones (Cuadro 17). Sin embargo, Val Díaz *et al.* (2010) en una prueba de

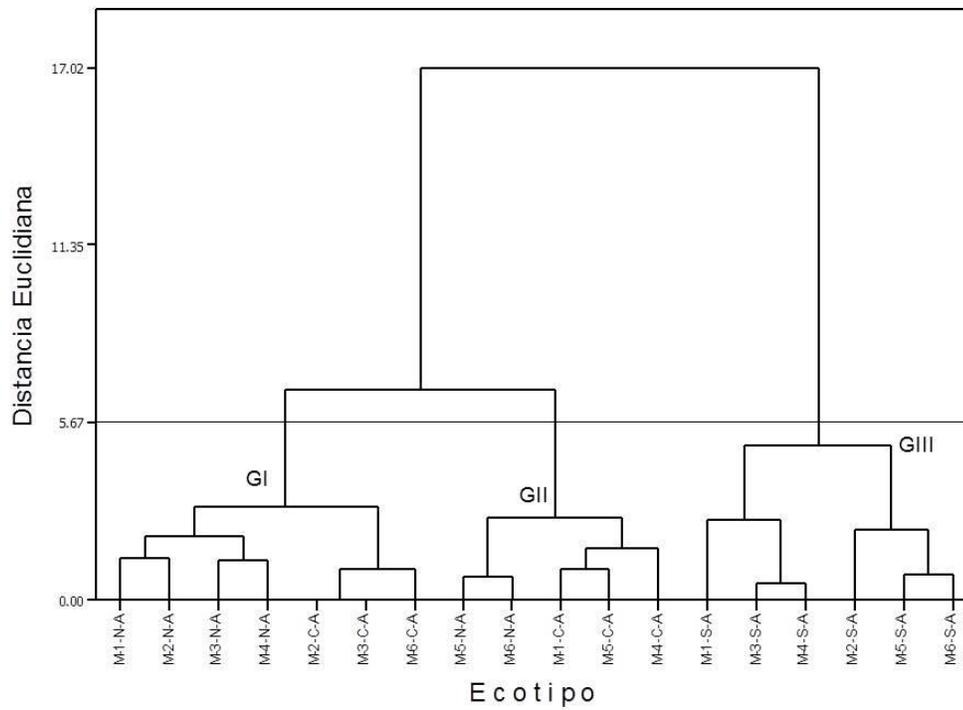


Figura 4. Dendrograma del análisis de cinco variables en poblaciones *Pinus arizonica* (Engelm.) con base en el método de ligamiento Ward.

Cuadro 17. Bandas polimórficas detectadas en 52 árboles de tres especies de *Pinus*, empleados en el análisis de AFLP en el macizo forestal de Chihuahua, México

| Combinación de iniciadores                | Total de bandas | Total de bandas polimórficas | Porcentaje de polimorfismo (%) | Total de bandas monomórficas |
|---|-----------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>MseI</i> + CAC, <i>EcoRI</i> + ACC_700 | 70              | 25                           | 53.2                           | 45                           |
| <i>MseI</i> +CAG, <i>EcoRI</i> + ACC_700  | 62              | 22                           | 46.8                           | 40                           |
| Total                                     | 132             | 47                           | 100                            | 85                           |

24 iniciadores en *Pinus pseudostrobus* para marcadores AFLP, 8 del tipo *MseI* y 16 del tipo *EcoRI*, encontraron que las enzimas de restricción con *EcoRI* y *MseI* lograron una completa digestión. Además, en este trabajo se concluyó que se tienen identificados los iniciadores para la amplificación selectiva para determinar las relaciones filogenéticas de esta especie y poder realizar análisis de diversidad genética.

El nivel de polimorfismo detectado en *Pinus durangensis* con el análisis de AFLP fue de 38.09 % y 61.09 % para las combinaciones de iniciadores *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700 y *MseI* +CAG, *EcoRI* + ACC\_700, respectivamente. El nivel de polimorfismo detectado en *Pinus engelmannii* con el análisis de AFLP fue de 40 % y 60 % para las combinaciones de iniciadores *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700 y *MseI* +CAG, *EcoRI* + ACC\_700, respectivamente. Sin embargo, el nivel de polimorfismo detectado en *Pinus arizonica* con el análisis de AFLP fue de 63.8 % y 36.1 % para las combinaciones de iniciadores *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700 y *MseI* +CAG, *EcoRI* + ACC\_700, respectivamente (Cuadro 18).

Para estudios futuros de diversidad genética en *Pinus durangensis* y *Pinus engelmannii* se recomienda utilizar la combinación *MseI* +CAG, *EcoRI* + ACC\_700, ya que fue la que detectó la mayor variabilidad. Sin embargo, para el caso de *Pinus arizonica* se recomienda utilizar la combinación *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700 (Cuadro 18).

El nivel de polimorfismo detectado en *Pinus durangensis*, al utilizar el análisis de AFLP fue de 38.09 % y 61.09 % para las combinaciones de iniciadores *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700 y *MseI* +CAG, *EcoRI* + ACC\_700,

Cuadro 18. Nivel de polimorfismo detectado en 52 árboles de tres especies de *Pinus*, empleados en el análisis de AFLP en el macizo forestal de Chihuahua, México

| Combinación de iniciadores                  | <i>Pinus durangensis</i> | <i>Pinus engelmannii</i> | <i>Pinus arizonica</i> |
|---|--------------------------|--------------------------|------------------------|
|   | Polimorfismo (%)         |                          |                        |
| <i>Mse</i> I + CAC, <i>Eco</i> RI + ACC_700 | 38.09                    | 40                       | 63.8                   |
| <i>Mse</i> I +CAG, <i>Eco</i> RI + ACC_700  | 61.9                     | 60                       | 36.1                   |

18 árboles de *Pinus arizonica*; 17 árboles de *Pinus durangensis*; 17 árboles *Pinus engelmannii*.

respectivamente. El nivel de polimorfismo detectado en *Pinus engelmannii*, utilizando el análisis de AFLP fue de 40 % y 60 % para las combinaciones de iniciadores *Msel* + *CAC*, *EcoRI* + *ACC\_700* y *Msel* + *CAG*, *EcoRI* + *ACC\_700*, respectivamente. Sin embargo, el nivel de polimorfismo detectado en *Pinus arizonica*, al utilizar el análisis de AFLP fue de 63.8 % y 36.1 % para las combinaciones de iniciadores *Msel* + *CAC*, *EcoRI* + *ACC\_700* y *Msel* + *CAG*, *EcoRI* + *ACC\_700*, respectivamente (Cuadro 18). Para estudios futuros de diversidad genética en *Pinus durangensis* y *Pinus engelmannii*, se recomienda utilizar la combinación *Msel* + *CAG*, *EcoRI* + *ACC\_700*, ya que fue la que detectó la mayor variabilidad en sus poblaciones, sin embargo, para el caso de *Pinus arizonica* se recomienda utilizar la combinación *Msel* + *CAC*, *EcoRI* + *ACC\_700* (Cuadro 18).

Al considerar las tres especies de pinos se obtuvieron valores de similitud desde 0.914 hasta 1.0, al utilizar el coeficiente de Nei y Li en las comparaciones pareadas de los 52 árboles de Pinos en el macizo forestal del estado de Chihuahua. Sin embargo, cuando se analizan las tres especies de pinos en forma independiente, se presentaron los siguientes valores de similitud: para *Pinus arizonica* 0.914 y 0.987 valor mínimo y máximo, respectivamente; *Pinus engelmannii* 0.932 y 0.992 como valor mínimo y máximo, respectivamente; y finalmente para *Pinus durangensis* tuvo un valor de similitud que fluctuó desde 0.936 hasta 1.0 valor mínimo y máximo, respectivamente (Figura 5). Sin embargo, en un estudio realizado en *Pinus engelmannii*, *P. arizonica* var. *cooperi* and *P. durangensis* obtuvieron valores de similitud genética oscilaron desde 0,696 hasta 0,858 (Androsiuk, 2015). Considerando estos valores de

similitud, los resultados indican que existe alta diversidad genética en estas especies, requisito indispensable para iniciar programas de mejoramiento genético. Finalmente, la Figura 5 muestra el análisis de agrupamiento de las poblaciones de las tres especies de pinos, con el coeficiente de Nei y UPGMA como método de agrupamiento, basado en 132 marcadores AFLP.

***Pinus arizonica* (Engelm.).** Al analizar el dendograma de abajo hacia arriba se observa que el grupo A1 de *Pinus Arizonica* integro a ocho árboles procedentes del macizo forestal de Chihuahua; dos del norte cuya procedencia es El Bajío del Sol y Ejido El Largo Maderal; uno originario del centro del macizo forestal de Chihuahua, procedente del Ejido San Juanito, predio Hacienda de Guadalupe y por ultimo del sur del macizo forestal de Chihuahua, procedentes del Cerro Mohinora, Guadalupe y Calvo con cinco árboles recolectados en esa zona. El grupo A2 integro a cinco árboles originarios del centro y sur del macizo forestal de Chihuahua; para el centro se agruparon cuatro árboles originarios del Ejido San Juanito, predio Hacienda de Guadalupe y uno solo ecotipo del sur originario del Cerro de Mohinora, Guadalupe y Calvo. Además, el grupo A3 integro cinco árboles originarios del norte y centro del macizo forestal de Chihuahua; agrupando a cuatro árboles del norte procedentes de El Bajío del Sol, Ejido El Largo Maderal y un solo ecotipo del centro originario del Ejido San Juanito, predio Hacienda de Guadalupe (Figura 5).

***Pinus engelmannii* (Carr.).** El grupo B1 agrupo a cuatro árboles originarios de sur del macizo forestal de Chihuahua, recolectados en Balleza, Chihuahua. Otro grupo que formó esta especie fue el B2, el cual integro a 13 árboles originarios del norte, centro y sur del macizo forestal de chihuahua;

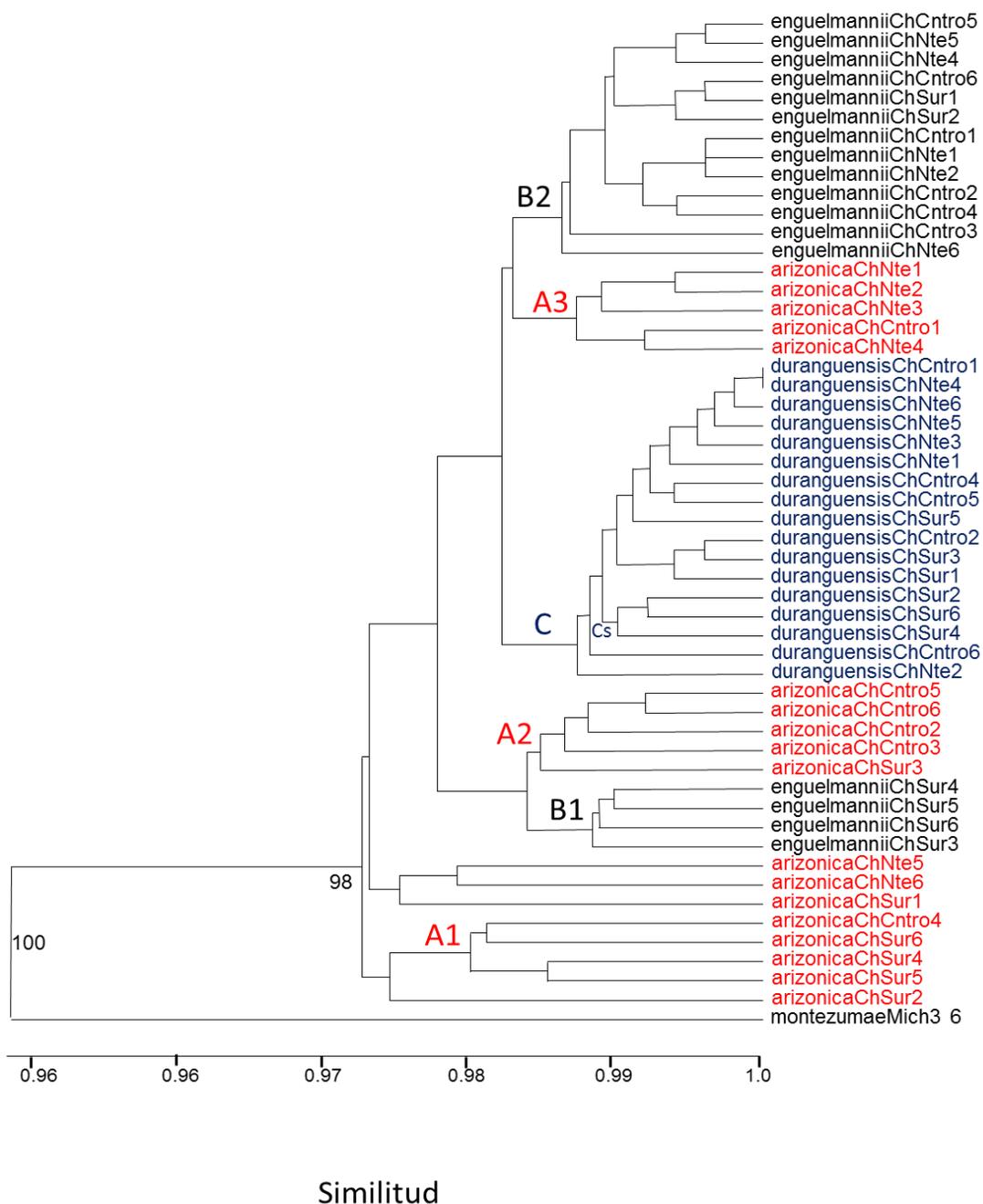


Figura 5. Análisis de agrupamiento de 52 árboles de *Pinus engelmannii*, *P. arizonica* y *P. duranguensis*, mediante el coeficiente de Nei y Li, utilizando como método de agrupamiento UPGMA, sobre la base de 132 marcadores AFLP, generados con dos combinaciones de iniciadores.

agrupo a cinco árboles del norte, procedentes del Paraje El Bonito, El Largo Maderal; seis árboles del centro recolectados en la mesa de Baboreachi, lote semillero, municipio de Bocoyna y finalmente dos árboles del sur originarios de la Balleza, Chihuahua (Figura 5).

***Pinus durangensis* (Martínez).** El grupo C integro a 17 árboles originarios del norte, centro y sur del macizo forestal de Chihuahua; seis árboles del norte procedentes del predio Socorro Rivera, Madera, paraje mesa de La Laguna del 11; cinco árboles originarios del centro Ejido Shewerachi, Bocoyna. Paraje Ciénega del Tásate; seis árboles del sur procedentes del Ejido el Tule y Portugal, municipio de Guadalupe y Calvo (Figura 5).

El uso de marcadores AFLP han resultado ser eficientes para realizar y esclarecer estudios de diversidad genética en poblaciones de pino. Además, estos marcadores permiten realizar muestreos en un mayor número de poblaciones e incluir un mayor número de individuos por población (Androsiuk, 2015).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los recursos genéticos de *Pinus engelmannii*, *P. arizonica* y *P. duranguensis* recolectados en el macizo forestal del estado de Chihuahua, presentaron variabilidad morfológica, altitudinal y molecular.

Las variables continuas que más contribuyeron, independientemente de la especie, fueron la altitud y altura de planta.

La combinación de iniciadores *MseI* + CAC, *EcoRI* + ACC\_700 fue la que detectó el mayor polimorfismo y reveló los niveles de variación genética más elevados.

Las muestras recolectadas sugieren una agrupación morfológica y/o molecular donde se considere un patrón regional y altitudinal.

Los resultados aquí vertidos permitirán a los técnicos e investigadores conocer la estructura y variabilidad de las poblaciones de estas especies para realizar programas de mejoramiento y esquemas de manejo diferenciado.

## LITERATURA CITADA

- Androsiuk, P., L. Urbaniak. 2014 Genetic variability of *Pinus sylvestris* populations from IUFRO 1982 provenance trial. *Dendrobiology*. 71: 23–33
- Ávila, F. I. J., J. C. Hernández, M. S. González, R. Á. Prieto, C. Wehenkel. 2016. Degree of Hybridization in Seed Stands of *Pinus engelmannii* Carr. in the Sierra Madre Occidental, Durango, Mexico. *PLoS ONE*. 11:1-13.
- Azofeita, D. A. 2006. Uso de los marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. *Agron. Mesoamericana*. 17:221-242.
- Beebe, S. S., P. W. Tohme, J. Duque, M. C. Pedraza y J. Nienhuis. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle american origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Sci*. 40:264-273.
- Caballero, D. M. 2012. Parcelas de muestra permanente para i.f.c en México. *Rev. Mex. Cienc. Fores*. 4:56-64.
- Ci, X. Q., J. Q. Chen, Q. M. Li, J. Li. 2008. AFLP and ISSR analysis reveals high genetic variation and inter-population differentiation in fragmented populations of the endangered *Litsea szemaois* (Lauraceae) from Southwest China. *Plant Sys. Evol*. 273:237-246.
- Coart, E., V. Lamote, M. De Loose, V. Bockstaele y I. Roldán. 2002. AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea*) in Flemish population. *Theor. Appl. Genet*. 105:431-439.
- CONAFOR. 2003. Comisión Nacional Forestal. Programa Estratégico Forestal para México 2025. Publicación Especial de la Comisión Nacional Forestal. México, D. F. 84p.
- CONAFOR. 2013. Comisión Nacional Forestal. Lineamiento de Operación para Proyectos Especiales de Conservación y Restauración Forestal. En <http://www.conafor.gob.mx>. Consultado 01 Abril 2014.
- Dallas, J. F. 1988. Detection of DNA “Fingerprints” of Cultivated Rice by Hybridization with a Human Minisatellite DNA Probe. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*. 85:6831-6835.
- Di, X. y W. Meng. 2013. Genetic structure of natural *Pinus tabulaeformis* population in North China using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochemical. Systematics and Ecology*. 51:269-275.

- Díaz, V., L. M. Muñiz y E. Ferrer. 2001. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Mol. Ecol.* 10:2503-2603.
- FAO. 2010. Evaluación de los recursos Forestales mundiales 2010. Informe Nacional México. En: <http://www.fao.org/>. Consultado 01 Abril 2013.
- Farjon, A. 2001. World checklist and bibliography of conifers. 2nd edition. Royal Botanic Gardens. Chicago. Estados Unidos de América
- García A. A. y M. S. González. 2003. Pináceas de Durango. Instituto de Ecología, A.C. Comisión Nacional Forestal. México. 187 p.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía, UNAM. México. 243 p.
- González, E. S., M. González y M. A. Márquez. 2007. Vegetación y Ecorregiones de Durango. Plaza y Valdés, México, DF. 219 pp.
- Hamrick, J. L., J. W. Godt, D. A. Murawski y M. D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk, D. A., Holsinger, K.E. (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Oxford, pp. 75–86.
- Hedrick, P. W. y P. S. Miller. 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecol. Appl.* 2:30-46.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson y S. L. Thein. 1985. Individual Specific Fingerprints of Human DNA. *Nature*. 316:76-79.
- Meudt, H. M. y A. C. Clarke. 2006. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Tren Plant Sci.* 12:1360-1385.
- Morales, N. C., A. R. Quero, O. LeBlanc, A. Hernández, J. Pérez y S. González. 2006. Caracterización de la diversidad del pasto nativo *Bouteloua curtipendula* (Michx) Torr., mediante marcadores de AFLP. *Agrociencia*. 40:711-720.
- Morales, N. C. R., C. Avendaño, A. Melgoza, K. Gil, A. Quero, P. Jurado y M. Martínez. 2016. Caracterización morfológica y molecular de poblaciones de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) en Chihuahua, México. *Rev Mex. Cienc. Pecu.* 7:455-469.
- Ortiz, E. 1993. Técnicas para la estimación del crecimiento y rendimiento de árboles individuales y bosques. Serie de apoyo académico N° 16. Taller

de Publicaciones. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal. Cartago, CR. 78 p.

- Orozco G. G., R. Val Díaz, M. Ch. González, H. J. F. Muñoz, V. M. C. Avalos, J. J. M. García .2010. Extracción de ADN y una prueba inicial de primers en *Pinus pseudostrobus* Lindl. Para marcadores AFLP. Foresta Veracruzana, Septiembre-Febrero, 15-20.
- Palahí, M., M. Tome, T. Pukkala, A. Trasobares y G. Montero. 2004. Site index model for *Pinus sylvestris* in north east Spain. Forest Ecology and Management.187:35-47.
- Palomino, A. C., C. B. López, R. J. Espejo, R. S. Mansilla y J. V. Quispe. 2014. Evaluación de la diversidad genética del café (*Coffea arabica* L.) en Villa Rica (Perú). Ecología Aplicada. 13:129-134.
- Pérez, A. I., E. Torres, L. Angulo y M. Acevedo. 2011. Diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela con base a la estimación del coeficiente de parentesco y análisis con marcadores moleculares microsatélites (SSR). Interciencia. 36(7). 545-551p.
- Piñero, D., et al. 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, México, pp. 437-494.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey y A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breeding. 2:225.
- Puecher, D. I., C. G. Robredo, R. Ríos y P. Rimieri. 2001. Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. Populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. Euphytica. 121:229-236.
- Ramírez H., C., H. J. J. Vargas y U. J. López. 2005. Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. Acta Botánica Mexicana 72: 1-16.
- Renganayaki, K., J. C. Read y A. K. Fritz. 2001. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. Theor Appl Gen. 102:1037-1045.
- Richardson, D. y P. W. Rundel. 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*: An introduction. Pag. 3-68. En: Richardson, D. M. (ed.). Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rosales, S. R., J. A. Gallegos, R. P. Durán, H. G. Andrade, P. P. Herrera, G. E. Esquivel y J. S. Martínez. 2003. Diversidad genética del germoplasma

- mejorado del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Agrociencia*. 29:11-24.
- Santamarta, J. 2004. La situación actual de los bosques del mundo. En: [www.nodo50.worldwatch/ww/portadas/capítulo%20mundo%20jose.pdf](http://www.nodo50.worldwatch/ww/portadas/capítulo%20mundo%20jose.pdf). Consultado 01 Abril 2013.
- SEMANAT. 2000. Recursos forestales y desarrollo sustentable en México. México. 107 p.
- Schaal, B. A., W. J. Leverich y S. H. Rogstad. 1991. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press Inc. New York. Estados Unidos de America.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60:73-76.
- Steiner, J. J., E. Piccioni, M. Falcinelli y A. Liston. 1998. Germplasm diversity among cultivars and the NPGS crimson clover collection. *Crop Sci.* 8: 263-271.
- Tapia, C. E., A. H. Gullen y M. A. Gutiérrez. 2005. Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas* spp.) mediante RAPD e ISSR. *Fitotec. Mex.* 28:187-194.
- Valdez, E., G. Kalh, J. Ramser, B. Huntel y A. Rubluo. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (Garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Rev. Fitotec. Mex.* 24:103-120.
- Vela, G., J. Rzedowski y S. Madrigal. 2012. Algunas consideraciones acerca de la dinámica de los bosques de coníferas en México. *Rev. Mex. Cien. Fore.* En: <<http://revistapecuaria.inifap.gob.mx/index.php/Forestales/article/view/894/892>>. Consultado 24 junio 2014.
- Kahl, G. y E. Valadez. 2000. *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Universidad Autónoma de Chapingo. Editorial: MUNDI-PRENSA. México 149p.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23:4407-4414.
- Ward, J.H. (1963), "Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function," *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236 -244.
- Wen, C. S. y J. Y. Hsiao. 2001. Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan Lily (*Lilium longiflorum* var. *formosanum*; liliaceae) using RAPD markers and morphological characters. *Int. J. Plant Sci.* 162:287-295.

Zamudio, T. 2005. Diversidad genética. En:  
<http://www.biotech.bioetica.org/clase3-7.htm>. Consultado 02 Junio 2014.