



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

DIVERSIDAD GENÉTICA EN UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL DE *Pinus patula*

NORMA BEATRIZ MENDOZA HERNÁNDEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **Diversidad genética en un huerto semillero sexual de *Pinus patula***, realizada por la alumna: **Norma Beatriz Mendoza Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
EN CIENCIAS FORESTALES

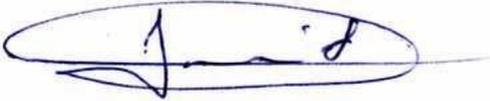
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Carlos Ramírez Herrera

ASESOR



Dr. Javier López Upton

ASESOR



Dr. Valentín José Reyes Hernández

ASESOR



Dr. Pedro Antonio López

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2016

DIVERSIDAD GENÉTICA EN UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL DE *Pinus patula*

Norma Beatriz Mendoza Hernández, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2016

Resumen

La mayoría del germoplasma para las plantaciones en México se recolecta en rodales naturales donde la calidad del arbolado es desconocida. Un programa de establecimiento de huertos semilleros de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. se inició a principios de 2004 en los estados de Hidalgo y Puebla para proveer semilla de calidad a las plantaciones forestales. Los objetivos de la presente investigación fueron estimar la diversidad genética y evaluar la variación en características reproductivas de conos y semillas en un huerto semillero sexual (HSS) de *P. patula* a partir de tres cosechas recolectadas en el 2014. El HSS de 12 años de edad se localiza en Acaxochitlán, estado de Hidalgo. El ADN se obtuvo de una muestra de follaje de cada uno de los 89 árboles en el huerto, seleccionados como superiores de 13 procedencias del centro del país. El genotipo de cada árbol se identificó con nueve microsatélites en el ADN y se calcularon algunos parámetros de diversidad genética. El número promedio de alelos por locus fue 8.4, y el porcentaje de loci polimórficos fue 100%. Las heterocigosidades promedio observada y esperada, fueron de 0.765 y 0.627, respectivamente. Diferencias entre años y entre árboles se encontraron para las características evaluadas de conos y semillas. El promedio para peso seco del cono fue 31.1 g. El potencial de semillas promedio (117 semillas por cono) fue superior en el año 2013. El porcentaje de óvulos abortivos promedio (29 %) fue mayor en el año 2014. El porcentaje de semillas llenas promedio (58 %) fue mayor en los años 2013. El porcentaje promedio máximo de semillas vanas y dañadas por insectos fue 17 % en 2014 y 3 % en 2012. El índice mayor de endogamia promedio (0.25) se encontró en el año 2014. El peso promedio de una semilla fue 9.5 mg. La eficiencia reproductiva promedio (22 mg de semilla por gramo de cono) y la eficiencia de producción de semillas (57 %) fueron mayores en el año 2013. Niveles altos de diversidad genética y de variación en características reproductivas se encontraron en *Pinus patula* en el huerto semillero sexual.

Palabras clave: *Pinus patula*, diversidad genética, microsatélites, huerto semillero sexual, características reproductivas.

GENETIC DIVERSITY IN A SEXUAL SEED ORCHARD OF *Pinus patula*

Norma Beatriz Mendoza Hernández

Colegio de Postgraduados, 2016

Abstract

Most of germplasm for plantations in Mexico is collected in natural stands where the tree quality is unknown. A seed orchard program of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. was started in 2004 in Hidalgo and Puebla States to supply seed quality to the forest-plantation programs. The objectives of the present research were to estimate the genetic diversity in a sexual seed orchard of *Pinus patula*, and evaluate the variation in reproductive traits of cones and seeds of three years of production harvested in 2015. The sexual seed orchard of 12 years old is located in Acaxochitlán, Hidalgo State. The DNA was gotten from a foliage sample of each of 89 trees in the seed orchard, selected as superiors of 13 provenances in the center of the country. Each tree genotype was identified for each of nine DNA microsatellites, and some genetic variation parameters were assessed. The average number of alleles per locus was 8.4, and the percentage of polymorphic loci was 100 %. The average observed and expected heterozygosities were 0.765 and 0.627, respectively. Differences were found among years and trees to the traits evaluated of cones and seeds. The average to dry-cone weight was 31.1 g. The average seed potential (117 seeds per cone) was higher in the year 2013. The average percentage of abortive ovules (29%) was higher than in 2014. The percentage average of filled seeds (58%) was greater in the year 2013. The maximum average percentage of empty seeds and damage insect was 17 and 3%, in 2014 and 2012, respectively. The highest average of inbreeding index (0.25) was found in 2014. The average weight of seed was 9.5 mg. The average reproductive efficiency (22 mg per gram of seed cone) and seed production efficiency (57%) were higher in 2013. High levels of genetic diversity and variation in reproductive traits were found in *Pinus patula* in the seed orchard.

Key words: *Pinus patula*, genetic diversity, microsatellites, sexual seed orchard, reproductive traits.

DEDICATORIA

A mis padres por creer en mí y brindarme su entera confianza y apoyo.

A mis hermanos por amarme y estar conmigo siempre.

A ti amor.

A mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al señor Alfonso Suárez (padre) y al Dr. Alfonso Suárez Islas por apoyar con la autorización de las actividades de recolecta en el huerto semillero de su propiedad.

Al Dr. Carlos Ramírez Herrera, por dirigir el proyecto de investigación y compartir conmigo sus conocimientos, así como brindarme su apoyo y amistad durante mi estancia en la Maestría.

Al Dr. Javier López Upton por su asesoría, confianza, paciencia y apoyo incondicional para la realización de la investigación.

Al Dr. Valentín Reyes Hernández por su asesoría, apoyo y valiosa amistad brindada.

Al Dr. Pedro Antonio López por su apoyo, asesoría y confianza en el proyecto de investigación.

Al Dr. Amalio Santacruz Varela por su importante contribución, orientación y amistad brindada durante la investigación.

A Laura Carrillo Reyes por compartir sus conocimientos y brindarme apoyo incondicional durante la etapa de laboratorio.

Al personal de campo, los Sres. Maximino, Raúl, Manuel, Lauro, Alejandro y Aurelio por su amistad y apoyo brindado durante el beneficio de la semilla.

A mis amigos: Oscar, Verónica, Mario y familia, Josael y Sandy por estar siempre conmigo en los buenos y difíciles momentos.

Al personal académico y administrativo del Posgrado en Ciencias Forestales.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
LITERATURA CITADA	3
CAPÍTULO I. DIVERSIDAD GENÉTICA DE PINUS PATULA EN UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL	5
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Muestreo del follaje.....	8
Extracción de ADN	9
Marcadores moleculares.....	10
Diversidad genética	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES	16
LITERATURA CITADA	16
CAPÍTULO II. VARIACIÓN EN CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE ÁRBOLES DE PINUS PATULA EN UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL	20
RESUMEN	20
ABSTRACT	21
INTRODUCCIÓN.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Localización del huerto semillero	23
Selección de árboles para recolecta de conos y semillas	23
Extracción y manejo de la semilla.....	25
Variables reproductivas evaluadas	26
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	38
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciador y condiciones de alineamiento de los microsátélites utilizados para estimar la diversidad genética de <i>Pinus patula</i> en un huerto semillero sexual.....	11
Cuadro 2. Parámetros de diversidad genética estimados para el huerto semillero sexual de <i>Pinus patula</i> en Acaxochitlán, Hidalgo.	14
Cuadro 3. Número de conos cosechados en árboles de <i>Pinus patula</i> en el huerto semillero sexual.....	24
Cuadro 4. Componentes de varianza para las características reproductivas evaluadas de <i>Pinus patula</i> en el huerto semillero sexual de Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo.....	27
Cuadro 5. Promedios (\pm error estándar) de las características de conos y semillas de árboles de <i>Pinus patula</i> del huerto semillero sexual en Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo en 2012.....	29
Cuadro 6. Promedios (\pm error estándar) de las características de conos y semillas de árboles de <i>Pinus patula</i> del huerto semillero sexual de Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo en 2013.....	30
Cuadro 7. Promedios (\pm error estándar) de las características de conos y semillas de árboles de <i>Pinus patula</i> del huerto semillero sexual de Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo en 2014.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del huerto semillero sexual de <i>Pinus patula</i> en el municipio de Acaxochitlán, estado de Hidalgo, México.	9
--	---

INTRODUCCIÓN GENERAL

México posee una diversidad biológica alta debido a sus condiciones fisiográficas, geológicas y climáticas (Rzedowski, 2006), y es considerado el país con mayor diversidad de especies del género *Pinus* por ser el hábitat de un número mayor de la mitad de las especies de este género en el mundo (Dvorak, 1987; Farjon *et al.*, 1997; Ledig, 2004).

Pinus patula, Schiede ex Schltdl. *et* Cham. es una especie nativa de México, que crece en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Querétaro, Hidalgo, Distrito Federal, México, Tlaxcala, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Veracruz (Perry, 1991). *P. patula* es la especie mexicana con un número alto de hectáreas plantadas fuera de México por su crecimiento rápido, forma del fuste y calidad de la madera (Wormald, 1975; Ladrach, 1985). En México, las plantaciones comerciales de *P. patula* son pocas, y la mayoría del germoplasma para éstas proviene de rodales naturales con arbolado de calidad baja (Vargas, 2003).

Un programa de ensayos de progenies de *P. patula* se inició en 2004 en el norte del estado de Puebla, y este del estado de Hidalgo con la reintroducción de materiales seleccionados en Sudáfrica y Colombia por el Programa Internacional para el Mejoramiento Genético y Conservación de Especies Forestales (CAMCORE), y árboles seleccionados en rodales naturales de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz (Salaya *et al.*, 2012). Esos estudios de progenie se convirtieron en huertos semilleros sexuales de *P. patula* en el norte del estado de Puebla y este del estado de Hidalgo para obtener semilla de calidad para los programas de reforestación (Morales *et al.*, 2013).

Un huerto semillero es una plantación de árboles superiores aislada donde se pretende reducir la polinización del óvulo por polen de árboles que crecen fuera del huerto (White *et al.*, 2007), además, son el enlace entre los programas de mejoramiento y las plantaciones forestales (Fernandes *et al.*, 2008). Estos se establecen a partir de árboles seleccionados por poseer características fenotípicas deseables para ciertos fines (White *et al.*, 2007). Los

niveles de diversidad genética son importantes contemplar en los huertos semilleros, ya que, la variación está relacionada con la habilidad de los individuos para poder adaptarse a cambios ambientales (Fisher, 1930).

La diversidad genética se puede estimar a través de marcadores moleculares diferentes entre los que se encuentran los microsátélites, los cuales generan información sobre los niveles y patrones de variación genética que puede ser utilizada en el establecimiento de estrategias de conservación y el manejo de recursos genéticos (Gupta *et al.*, 1996). También, la variación en características de conos y semillas es importante en la determinación de la cantidad y calidad de la semilla que una unidad productora de semillas puede producir (Bonner, 1993). Lo anterior, valdrá de referencia para los programas de mejoramiento, estrategias de manejo y seguimiento de la producción de semilla de *P. patula* en el este del estado de Hidalgo. Por lo que en la investigación presente se plantearon los objetivos siguientes: a) estimar la diversidad genética de un huerto semillero sexual de *Pinus patula* y, b) evaluar la variación en características reproductivas de conos y semillas en un huerto semillero sexual de *Pinus patula*.

Literatura citada

- Bonner, F. T. 1993. Análisis de Semillas Forestales. Serie de Apoyo Académico No. 47. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 53 p.
- Dvorak, W. S. 1987. The genus *Pinus* in Mexico and Central America: Distribution and gene conservation. Journal series of the North Carolina Agricultural Research Service, Raleigh, North Carolina. 13 p.
- Farjon, A., J. A. Pérez de la Rosa, and B.T. Styles. 1997. Field guide to the Pines of Mexico and Central America.. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. 147 p.
- Fernandes, L., M. Rocheta, J. Cordeiro, S. Pereira, S. Gerber, M. M. Oliveira, and M. M. Ribeiro. 2008. Genetic variation, mating patterns and gene flow in a *Pinus pinaster* Aiton clonal seed orchard. *Annals of Forest Science* 65:706.
- Fisher, R. A. 1930. The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford. 272 p.
- Gupta, P. K., H. S. Balyan, P. C. Sharma, and B. Ramesh. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science* 70:45-54.
- Ladrach, W. E. 1985. Comparisons between provenances and sources of fourteen conifers in the Colombian Andes after five years. Research Report 102. Investigación Forestal. Cartón y Papel de Colombia. Cali, Colombia. 13 p.
- Ledig, F. T. 2004. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. In: J. J. Vargas H., B. Bermejo V. y F. T. Ledig (eds.). 2004. Manejo de Recursos Genéticos Forestales. 2da ed. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco.
- Morales G., E., J. López U., J. J. Vargas H., C. Ramírez H., y A. Gil M. 2013. Parámetros genéticos de *Pinus patula* en un ensayo de progenies establecido en dos altitudes. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 155-162.

- Perry, J. P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231 p.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. 1ra. ed. Digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 505 p.
- Salaya, D., J. M., J. López U., y J. J. Vargas H. 2012. Variación genética y ambiental en dos ensayos de progenie de *Pinus patula*. *Agrociencia* 46: 519-534.
- Vargas H., J. J. 2003. Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en el Norte de México. Documentos de Trabajo: Recursos Genéticos Forestales. FGR/60S. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales, FAO, Roma.
- White, T. L., W. T. Adams, and D. B. Neale. 2007. Forest Genetics. CAB International. London, UK. 682 p.
- Wormald, T. J. 1975. *Pinus patula*. Tropical Forestry 7. Department of Forestry, Commonwealth Forestry Institute. Oxford, UK. 212 p.

CAPÍTULO I. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Pinus patula* EN UN HUERTO

SEMILLERO SEXUAL

RESUMEN

Pinus patula Schiede ex Schltdl. et Cham. es una especie con distribución amplia en México, y es frecuentemente utilizada en el establecimiento de plantaciones comerciales debido a su crecimiento rápido, forma del fuste y calidad de la madera. El objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad genética de un huerto semillero sexual de *P. patula* en Acaxochitlán, estado de Hidalgo compuesto de 89 árboles seleccionados como superiores de 13 procedencias del centro del país. Para lograr lo anterior, acículas jóvenes se recolectaron de todos los 89 árboles del huerto. Nueve marcadores moleculares tipo microsatélites se utilizaron para estimar los parámetros de diversidad genética. Los nueve loci fueron 100% polimórficos. El número promedio de alelos por locus fue de 8.4. El número efectivo de alelos (N_e) promedio fue 4.4. Las heterocigosidades promedio observada y esperada resultaron de 0.765 y 0.627, respectivamente, y el índice de fijación (F_{IS}) promedio fue de -0.254, lo que indica un exceso de individuos heterocigóticos. Estos valores estimados de los parámetros genéticos indican un nivel de diversidad genética alto en *Pinus patula* en el huerto semillero sexual. Por tanto, la semilla que se genere será de alta diversidad genética, además de calidad superior por la selección establecida.

Palabras clave: diversidad, heterocigosidad, huerto semillero sexual, microsatélites, *Pinus patula*.

ABSTRACT

Pinus patula Schiede ex Schltdl. et Cham. has a wide distribution in Mexico. This species is widely used in the establishment of commercial plantations because of its rapid growth, shank form and wood quality. The objective of this study was to estimate the genetic diversity of a sexual seed orchard *P. patula* in Acaxochitlán, Hidalgo state, composed of 89 trees selected for high performance from 13 provenances from the center of the country. To achieve this, young needles were collected from all 89 trees of the orchard. Nine microsatellite molecular markers were used to estimate the parameters of genetic diversity. The nine loci were 100% polymorphic. The average number of alleles per locus was 8.4. The effective number of alleles (N_e) average was 4.4. The observed and expected average heterozygosities were of 0.765 and 0.627, respectively, and the average fixation index (FIS) were of -0.254, indicating an excess of heterozygous individuals. These estimates of genetic parameters indicate a high level of genetic diversity in *Pinus patula* in the sexual seed orchard. Therefore, the seed generated will be of high genetic diversity, also with upper quality for the selection established.

Key words: diversity, heterozygosity, sexual seed orchard, microsatellites, *Pinus patula*.

INTRODUCCIÓN

Pinus patula Schiede ex Schltdl. et Cham. tiene una distribución geográfica amplia en México (Perry, 1991) y es la especie mexicana con la superficie de plantación más extensa fuera del país, debido a su tasa de crecimiento, calidad de madera y adaptación (Wormald, 1975; Ladrach, 1985). Especialmente en Sudáfrica y Colombia se establecieron programas de mejoramiento genético de esta especie para obtener germoplasma de calidad para el establecimiento de plantaciones comerciales (Dvorak *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayor parte del germoplasma de esta especie que se recolecta en México, no contiene registros de la calidad de los árboles ni sobre la localización de éstos en rodales (Vargas, 2003).

Es necesario un Programa de Mejoramiento Genético Forestal para atender esta problemática, y contar con fuentes productoras de germoplasma que aseguren la producción de planta de calidad, la cual debería establecerse en lugares con condiciones ambientales semejantes a las del lugar donde el germoplasma se obtuvo (Flores-Flores *et al.*, 2014). Los huertos semilleros son un componente importante para la producción de semilla de calidad pues se establecen a partir de árboles genéticamente superiores (White *et al.*, 2007).

Los huertos semilleros son el enlace entre los programas de mejoramiento y las plantaciones (Fernandes *et al.*, 2008). Sin embargo, es primordial que el huerto semillero tenga una variación genética amplia, ya que la magnitud de dicha variación ayudará a mantener el potencial adaptativo de una especie a cambios ambientales (White *et al.*, 2007). De hecho, las fuentes de semilla con bases genéticas amplias son imprescindibles para continuar con progresos después de varias generaciones de selección de árboles, y mantener así una calidad alta y variabilidad genética de la semilla que ahí se produce con la capacidad de adaptación a cambios ambientales (Zobel y Talbert, 1988). La diversidad genética también es esencial para mantener la capacidad de los bosques para dar rendimiento de madera y otros productos (White *et al.*, 2007). Debido a que los huertos semilleros se establecen con un

número reducido de progenitores, los cuales inicialmente se seleccionaron en rodales naturales, es importante conocer el nivel de diversidad genética en los árboles que constituyen el huerto. La diversidad genética se puede estimar utilizando marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares (Hartl y Clark, 2007). Los microsatélites son marcadores moleculares que generan información sobre los niveles y patrones de variación genética y son polimórficos, codominantes, específicos y se distribuyen en el genoma como repeticiones de uno a seis pares de bases (Gupta *et al.*, 1996; Zane *et al.*, 2002; Vázquez-Lobo y Morales-García, 2011).

El objetivo principal de esta investigación fue estimar el nivel de diversidad genética de *Pinus patula* en un huerto semillero sexual a través del uso de microsatélites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo del follaje

El follaje se recolectó de 89 árboles de *P. patula* en un huerto semillero sexual (HSS) localizado en Cuaunepantla, municipio de Acaxochitlán, estado de Hidalgo, a 20° 09' 55" de latitud N, 98° 14' 07" de longitud O y a 2200 m de altitud (Figura 1.). Los 89 árboles del huerto provienen de 50 familias de medios hermanos generados a partir de material recolectado en rodales naturales de los estados de Tamaulipas, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Guerrero y Oaxaca donde la especie se distribuye de manera natural, quedando representados en el HSS 45 árboles del estado de Hidalgo, 22 del norte de Veracruz, 17 de Puebla, 2 de Tlaxcala y Querétaro, y uno de Oaxaca. Quince de las familias son selecciones de ensayos de progenies establecidos en Colombia, y 24 familias seleccionadas en estos tipos de ensayos en Sudáfrica. El germoplasma mejorado fue donado por la Cooperativa CAMCORE (International Tree Breeding and Conservation). Los árboles

medios-hermanos de una misma familia se encuentran distantes para evitar la polinización entre estos y evitar endogamia en lo posible en el huerto.



Figura 1. Ubicación del huerto semillero sexual de *Pinus patula* en el municipio de Acaxochitlán, estado de Hidalgo, México.

Extracción de ADN

El kit comercial ChargeSwitch® gDNA Plant (Invitrogen) se utilizó para la extracción del ADN (Ácido Desoxirribonucleico) en una muestra de 100 mg de follaje joven de cada uno de los 89 árboles de *P. patula* en el huerto semillero. El tejido vegetal se colocó en tubos Eppendorf donde se agregaron 500 µl de Lisis (Lysis Buffer (L18) y 100 µl de reactivo A (Lysis Buffer, PBP 10, y cloruro de calcio). Las muestras se trituraron utilizando el equipo TissueLyser II (Qiagen®) para la ruptura de la pared celular y de membranas en las células. A la mezcla se agregaron 400 µl de Lisis (L18) y 2 µl de RNAsa. Los tubos con la mezcla se colocaron en un vortex por 15 segundos. Al finalizar, 100 µl de SDS (Dodecil sulfato de sodio al 10 %) se agregaron a la mezcla. Posteriormente, los tubos con el lisado se colocaron

de nuevo en el vortex por 15 segundos. Después, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos, y 400 μ l de buffer de precipitación (N5) se agregaron a los tubos con la mezcla. Posteriormente, los tubos se colocaron en el vortex por 30 segundos. Después, las mezclas se centrifugaron a 15 000 rpm por cinco minutos. Ochocientos microlitros del sobrenadante se transfirieron a una placa que contenía 80 μ l de detergente D1 (Detergente al 10%) y 40 μ l de perlas magnética (25 mg/ml en 10 mM MES, pH 5.0, 10 mM NaCl, 0.1% Tween 20).

Para eliminar contaminantes se utilizaron tres placas de lavado: una con reactivo buffer (W12), 750 μ l de buffer de precipitado por pozo; y una placa con buffer de elución E6 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5 con 1 mM EDTA). Las tres placas de lavado junto con la placa con el ADN se colocaron en un robot de lavado KingFisher Flex® (ThermoScientific, Waltham, MA).

La concentración en nanogramos (ng) y la calidad del ADN se verificaron colocando un μ l de cada muestra en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000®, ThermoScientific, Waltham, MA) a una absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Finalmente, la dilución de las muestras se realizó para obtener una concentración de 20 ng de ADN μ l⁻¹.

Marcadores moleculares

Nueve microsátélites se analizaron en el secuenciador, de los cuales ocho fueron desarrollados para *P. taeda* L. y uno para *P. radiata* D. Don (Elsik *et al.*, 2000; Elsik y Williams, 2001; Chagné *et al.*, 2004) (Cuadro 1). Los iniciadores se marcaron con fluoróforo 6-FAM, HEX o ROX (Applied Biosystems) para su detección por electroforesis capilar.

Cuadro 1. Iniciador y condiciones de alineamiento de los microsatélites utilizados para estimar la diversidad genética de *Pinus patula* en un huerto semillero sexual.

Locus	Iniciadores 5'-3'/3'-5'	Rango pb [†]	Temp (°C)	Referencia
PtTX2123	gaagaaccacaaacac/ gggcaagaattcaatgataa	216-233	57	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX2146	cctggggattggattgg/ atatttccttggcccttccagaca	163-252	57	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX3011	aattgggtgtattttcttaga/ aaaagttgaaggagttggtgatc	168-233	63	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX3013	gcttctccattaactaattcta/ tcaaaattgttcgtaaacctc	154-188	63	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX3025	caccctgtataataacaatcta/ ttctatattcgcttttagtttc	257-305	59	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX3034	tcaaaatgcaaaagacg/ attaggactggggatgat	219-264	59	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX3107	aaacaagcccacatcgtc/ tcccctggatctgagga	179-206	55	Elsik y Williams, 2001
PtTX3127	accctactttcagaaga/ aattggggttcaactattctatta	190-226	55	Elsik y Williams, 2001
NZPR114	aagatgaccacatgaagtttg/ ggagctttataacatatctcgtatgc	138-196	68	Chagné <i>et al.</i> , 2004

[†] Pares de bases

Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en Inglés, “Polymerase Chain Reaction”) se efectuó en 25 μl de volumen por reacción, la cual contenía 14.1 μl de agua, 5 μl de buffer 5X (Promega, Corporation), 2 μl de mM de MgCl_2 (Promega, Corporation), 0.5 mM de dNTPs, 1 μl del iniciador hacia adelante y 1 μl del iniciador en reversa, ambos a una concentración de 10 $\text{pM } \mu\text{l}^{-1}$, 0.4 μl de Taq ADN polimerasa (Promega, Corporation) y 1 μl de ADN genómico a una concentración de 20 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. La PCR se realizó en un termociclador BIO-RAD (C1000TM Thermal Cycler) con el siguiente protocolo: 15 minutos a 95 °C; tres ciclos de 30 segundos a 94 °C, un minuto bajo la temperatura correspondiente a cada grupo y un minuto a 72 °C; seguido por 15 minutos de extensión final a 72 °C.

El agrupamiento de los iniciadores se realizó de acuerdo a sus temperaturas de amplificación y al color de la fluorescencia que se utilizó para marcarlos. Tres grupos se formaron con los nueve iniciadores. El grupo 1 incluyó a PtTX3011 (verde), PtTX3013 (azul) y PtTX3025 (rojo), los cuales amplificaron a 56.6 °C; el grupo 2 se formó con los iniciadores: PtTX3034 (azul), PtTX3127 (verde) y PtTX2146 (rojo) que amplificaron a 59.1 °C; y el grupo 3 se constituyó con PtTX2123 (azul), PtTX3107 (rojo) y NZPR114 (verde), que amplificaron a 58.3 °C.

Análisis de fragmentos

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis capilar en un secuenciador ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando el polímero POP7TM como soporte de separación. Cada reacción se formó con 2 μl de producto de PCR, 0.25 μl de formamida (HiDiTM Formamide) y 7.75 μl de Size Standard (GeneScanTM-500

LIZ®). Los alelos se identificaron con el programa GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems, SoftGenetics, State College, PA).

Diversidad genética

Los parámetros genéticos estimados fueron: frecuencias alélicas, el porcentaje de loci polimórficos, número de alelos por locus (N_a), el número efectivo de alelos (N_e), heterocigosidad observada (H_o), y esperada (H_e) (Hedrick, 2005). Los cálculos se realizaron con el programa PopGen (Yeh *et al.*, 1999). Además, con base en la ecuación desarrollada por Wright se estimó el índice de fijación (Wright, 1978).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los nueve loci fueron polimórficos en el huerto semillero sexual de *P. patula*. Un total de 76 alelos se registraron con una media de 8.4 alelos por locus (Cuadro 2). Este valor fue mayor al número de alelos (4.6) por locus reportado en individuos de *P. patula* en seis procedencias en la distribución natural de la especie (Dvorak *et al.*, 2009). El número mayor de alelos por locus en el presente estudio se pudo deber a que el germoplasma para establecer el huerto semillero se recolectó en 13 poblaciones naturales de seis estados de México. Esto representó dos veces el número de procedencias con respecto al estudio de *P. patula* reportado por Dvorak *et al.* (2009). Estas diferencias se pudieron deber a la amplitud mayor del muestreo (Hartl y Clark, 2007). También, el número de alelos por locus en *P. patula* en el presente estudio fue mayor que el número promedio de alelos (5.0 y 4.9) por locus encontrado en *P. oocarpa* Schiede ex Schldl, y *P. tecunumanii* Eguiluz & Perry, dos especies de pino que crecen en México y Centroamérica (Dvorak *et al.*, 2009). Con base en lo anterior, el número de alelos por locus indicó un nivel de diversidad alta en el huerto semillero de *P. patula*. Sin embargo, el número de alelos por locus en esta especie fue menor a las cifras

reportadas para *P. pinaster* Aiton en un huerto semillero clonal y una población natural de la misma especie (11 y 14.3 alelos por locus, respectivamente) (Fernandes *et al.*, 2008; González-Martínez *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Parámetros de diversidad genética estimados para el huerto semillero sexual de *Pinus patula* en Acaxochitlán, Hidalgo.

Locus	Amplitud (pb)	Na	Ne	Ho	He	F _{IS}
PtTX3013	130-150	4	2.878	0.910	0.653	-0.394
PtTX3011	140-180	8	2.851	0.708	0.649	-0.090
PtTX3025	250-266	4	1.046	0.045	0.044	-0.016
PtTX3034	200-240	14	7.163	0.809	0.860	-0.059
PtTX3127	170-190	5	2.091	0.989	0.522	-0.895
PtTX2146	150-200	13	7.434	0.966	0.865	-0.116
PtTX2123	180-205	4	2.549	1.000	0.608	-0.645
PtTX3107	155-170	4	2.106	0.579	0.525	-0.104
NZPR114	115-170	20	11.896	0.886	0.916	0.032

Amplitud (pb)= Amplitud del tamaño de alelos encontrados por cada loci para la población (pares de bases), Na= Número de alelos por locus, Ne= Número efectivo de alelos, Ho= Heterocigosidad observada, He= Heterocigosidad esperada, F_{IS}= índice de fijación de Wright.

El número efectivo de alelos (Ne) promedio varió de 1.05 en locus PtTX3025 a 11.89 en NZPR114 con un valor promedio de 4.45 en el presente estudio para *P. patula*. El valor promedio fue mayor a los 3.5, 4.24 y 3.07 reportados en la literatura para poblaciones naturales de *P. caribaea* Morelet y poblaciones de *P. pinaster* en dos distintas procedencias, respectivamente (Rebolledo-Camacho, 2010; Mariette *et al.*, 2001). Además, el valor en este

estudio fue mayor que los valores promedio (4.22) en *P. strobus* L. en dos sitios diferentes en Ontario, Canadá (Rajora *et al.*, 2000).

La heterocigosidad observada (H_o) promedio para *P. patula* en el huerto semillero fue de 0.765, valor similar al reportado (0.706) para 60 clones de *P. pinaster* en un huerto semillero clonal, pero mayor al encontrado también para esta última (0.645) en poblaciones de dos distintas procedencias (Fernandes *et al.*, 2008; Mariette *et al.*, 2001). El valor obtenido para *P. patula* en el huerto semillero también fue mayor que los valores promedio de dos sitios (0.516) en *P. strobus* (Rajora *et al.*, 2000). El valor de heterocigosidad observada indica la existencia de un nivel alto de diversidad genética en los árboles de *P. patula* en el huerto semillero evaluado en el estudio presente.

La heterocigosidad esperada (H_e) tuvo un intervalo entre 0.044 para el locus PtTX3025 y 0.912 para el locus NZPR114, con un valor promedio de 0.627. La H_e promedio fue ligeramente mayor en el presente trabajo que los valores promedios (0.559 y 0.613) encontrados en un estudio similar en *P. patula* y en *P. tecunumanii*, respectivamente (Dvorak *et al.*, 2009). Sin embargo, el valor de la H_e (0.635) reportado para *P. oocarpa* y para *P. caribaea* (0.632) fue ligeramente mayor (Dvorak *et al.*, 2009; Rebolledo-Camacho, 2010). El valor promedio de la H_e (0.789) reportado en *P. pinaster* en un huerto semillero asexual fue superior al encontrado en este estudio (Fernandes *et al.*, 2008). El valor de la H_e mostró un nivel alto de diversidad genética en *P. patula* en el huerto semillero sexual. Lo anterior indica que las plantas de *P. patula* producidas con germoplasma del huerto semillero tendrían una probabilidad alta de adaptación a una diversidad de sitios con base en los parámetros de diversidad genética estimados en esta investigación, sin embargo, es recomendable realizar estudios o ensayos de progenie para corroborar estos resultados y realizar una recomendación más precisa.

La mayoría de los valores del índice de fijación (F_{IS}) fueron negativos, lo que indica un exceso de heterocigotos de *P. patula* en el huerto semillero sexual. En contraste, en seis poblaciones naturales de *P. patula* se encontró un valor promedio del F_{IS} de 0.137, lo que representa un déficit de individuos heterocigóticos (Dvorak *et al.*, 2009). Además, los valores promedios (0.150 y 0.110) de F_{IS} que se encontraron en *P. ocarpa* y *P. tecunumanii*, respectivamente, también indicaron un déficit de heterocigotos (Dvorak *et al.*, 2009). También, valores positivos (0.091 y 0.143) de F_{IS} se obtuvieron en *P. pinaster* en un huerto semillero asexual (Fernandes *et al.*, 2008). De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede suponer que la probabilidad de que exista entrecruzamiento entre dos individuos emparentados es baja para individuos de *P. patula* en el huerto semillero.

CONCLUSIONES

Los valores estimados de los parámetros genéticos y un exceso de individuos heterocigóticos encontrados muestran la existencia de un nivel alto de diversidad genética en *Pinus patula* en el huerto semillero sexual.

LITERATURA CITADA

- Chagné, D., P. Chaumeil, A. Ramboer, C. Collada, A. Guevara, M. T. Cervera, and G. G. Vendramin. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1204–1214.
- Dvorak, W. S., G. R. Hodge, J. E. Kietzka, F. Malán, L. F. Osorio, and T. K. Stanger. 2000. *Pinus patula*. In: Conservation and Testing of Tropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative. College of Natural Resources, NCSU, Raleigh, NC. pp 149-173.

- Dvorak, W. S., K. M. Potter, V. D. Hipkins, and G. R. Hodge. 2009. Genetic diversity and gene exchange in *Pinus oocarpa*, a mesoamerican pine with resistance to the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *International Journal of Plant Science* 170(5):609-626.
- Elsik, C. G., V. T. Minihan, S. E. Hall, A. M. Scarpa, and C. G. Williams. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43:550–555.
- Elsik, C. G and C. G. Williams. 2001. Low-copy microsatellite recovery from a conifer genome. *Theor Appl Genet.* 103:1189-1195.
- Fernandes, L., M. Rocheta, J. Cordeiro, S. Pereira, S. Gerber, M. M. Oliveira, and M. M. Ribeiro. 2008. Genetic variation, mating patterns and gene flow in a *Pinus pinaster* Aiton clonal seed orchard. *Annals of Forest Science* 65:706.
- Flores-Flores C., J. López-Upton y S. Valencia-Manzo. 2014. Manual Técnico para el Establecimiento de Ensayos de Procedencias y Progenies. Comisión Nacional Forestal. México. 152 p.
- González-Martínez, S. C., S. Gerber, M. T. Cervera, J. M. Martínez-Zapater, L. Gil and R. Alía. 2002. Seed gene flow and fine-scale structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.) using nuclear microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1290-1297.
- Gupta, P. K., H. S. Balyan, P. C. Sharma, and B. Ramesh. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science* 70:45-54.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4th ed. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. 652 p.
- Hedrick, P. W. 2005. *Genetics of Populations*. 3rd ed. Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts. 737 p.

- Ladrach, W. E. 1985. Comparisons between provenances and sources of fourteen conifers in the Colombian Andes after five years. Research Report 102. Investigación Forestal. Cartón y Papel de Colombia. Cali, Colombia. 13 p.
- Mariette, S., D. Chagné, C. Lézier, P. Pastuszka, A. Raffin, C. Plomion, and A. Kremer. 2001. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 86:469-479.
- Perry, J. P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231 p.
- Rajora, O. P., M. H. Rahman, G. P. Buchert, and B. P. Dancik. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth Eastern White pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* 9:339-348.
- Rebolledo-Camacho, V. 2010. Variación y estructura genética del complejo de *Pinus caribaea* Morelet (Pinaceae). Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México. 71 p.
- Vargas H., J. J. 2003. Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en el Norte de México. Documentos de Trabajo: Recursos Genéticos Forestales. FGR/60S. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales, FAO, Roma.
- Vázquez-Lobo, A., y A. E. Morales-García. 2011. Microsatélites: *In: Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. Cornejo R., A., A. Serrato D., B. Rendón A., y M. G. Rocha M. (comps.). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático-SEMARNAT. México, D. F. pp: 75-100.
- White, T. L., W. T. Adams, and D. B. Neale. 2007. *Forest Genetics*. CAB International. London, UK. 682 p.

- Wormald, T. J. 1975. *Pinus patula*. Tropical Forestry 7. Department of Forestry, Commonwealth Forestry Institute. Oxford, UK. 212 p.
- Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh, F. C., R. C. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE 32-version 1.31. Population Genetics Software. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh/>.
- Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11:1–16.
- Zobel, B. and J. Talbert. 1988. Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales. Editorial Limusa, S.A. México. 545 p.

CAPÍTULO II. VARIACIÓN EN CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE ÁRBOLES DE *Pinus patula* EN UN HUERTO SEMILLERO SEXUAL

RESUMEN

Los huertos semilleros de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. son importantes para producir germoplasma útil en el establecimiento de plantaciones forestales. El objetivo fue evaluar la variación en características reproductivas de conos y semillas en un huerto semillero sexual de *P. patula*. El huerto se localiza en Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo. Conos de tres años de producción de 19 árboles se recolectaron. Las variables evaluadas fueron peso seco del cono (PSC), número potencial de semillas, porcentaje de óvulos abortivos, porcentajes de semillas llenas, vanas y plagadas, índice de endogamia, peso de la semilla (PSE), eficiencia reproductiva y eficiencia de producción de semilla. Diferencias con $p \leq 0.05$ se encontraron entre años para porcentaje de semillas vanas y dañadas e índice de endogamia. El análisis de varianza mostró diferencias con $p \leq 0.01$ entre años para las demás características evaluadas. Todas las variables mostraron diferencias a una $p \leq 0.01$ entre árboles. El PSC promedio fue 31.1 g. El potencial de semillas promedio (117 semillas por cono) fue superior en el año 2013. El porcentaje de óvulos abortivos promedio (29 %) fue mayor en el año 2014. El porcentaje de semillas llenas promedio (58 %) fue mayor en los años 2013. El porcentaje promedio máximo de semillas vanas y dañadas por insectos fue 17 y 3 %, en los años 2014 y 2012, respectivamente. El índice mayor de endogamia promedio (0.25) se encontró en el año 2014. El peso promedio de una semilla fue 9.5 mg. La eficiencia reproductiva promedio (22 mg de semilla por gramo de cono) y la eficiencia de producción de semillas (57 %) fueron mayores en el año 2013. Niveles altos de variación se encontraron en las características reproductivas de *Pinus patula*.

Palabras clave: *Pinus patula*, huerto semillero, características reproductivas, semillas, conos.

ABSTRACT

Seed orchards of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. are important to produce useful germplasm in forest plantation establishment. The objective was to evaluate the variation in reproductive traits of cones and seeds in a sexual seed orchard of *Pinus patula*. The seed orchard is located in Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo. Cones of three years of production from 19 trees were harvested. The variables evaluated were dry-cone weight (PSC), seed potential, percentage of abortive ovule, percentages of filled seeds, empty seeds and infested seeds, inbreeding index, seed weight (PSE), reproductive efficiency and production seed efficiency. Differences at $p \leq 0.05$ were found among years for percentage of empty and damaged seeds and inbreeding index. The analysis of variance showed differences with $p \leq 0.01$ between years for other traits evaluated. All variables showed differences to $p \leq 0.01$ between trees. The average to PSC was 31.1 g. The average seed potential (117 seeds per cone) was higher in the year 2013. The average percentage of abortive ovules (29%) was higher in 2014. The percentage average of filled seeds (58%) was greater in the year 2013. The maximum average percentage of empty seeds and damage insect was 17 and 3%, in 2014 and 2012, respectively. The highest average of inbreeding index (0.25) was found in 2014. The average weight of seed was 9.5 mg. The average reproductive efficiency (22 mg per gram of seed cone) and seed production efficiency (57%) were higher in 2013. High levels of variation were found in the reproductive traits of *Pinus patula*.

Key words: *Pinus patula*, Seed orchard, reproductive traits, seeds, cones.

INTRODUCCIÓN

Pinus patula Schiede ex Schltdl. et Cham. es una especie nativa de México que crece naturalmente en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Distrito Federal, México, Tlaxcala, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Veracruz (Patiño y Kageyama, 1991; Perry, 1991). *P. patula* es la especie mexicana con la mayor superficie de plantación fuera del país (Wormald, 1975; Ladrach, 1985), debido principalmente a la forma del fuste, crecimiento rápido y calidad de la madera (Vela, 1980; Velázquez *et al.*, 2004). Las plantaciones forestales en México, incluidas las de *P. patula*, se realizan con germoplasma recolectado en rodales naturales donde no se considera la selección de árboles de calidad (Vargas, 2003).

Un programa de ensayos de progenies de *P. patula* se inició en el norte del estado de Puebla y este del estado de Hidalgo en 2004 (Salaya *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2013). Ensayos de progenies se plantaron con semilla de esta especie seleccionada en Sudáfrica y Colombia por CAMCORE (International Tree Breeding and Conservation), así como germoplasma recolectado de árboles seleccionados por el Colegio de Postgraduados en rodales naturales en los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz (Salaya *et al.*, 2012). Varios huertos semilleros sexuales se establecieron una vez determinados los árboles superiores en esos ensayos de progenie (Morales *et al.*, 2013).

Un huerto semillero es una plantación de árboles superiores aislada donde se pretende reducir la polinización del óvulo por polen de árboles que crecen fuera del huerto (White *et al.*, 2007). Los huertos semilleros representan una relación importante entre un programa de mejoramiento y un programa de plantaciones (Fernandes *et al.*, 2008).

El análisis de los conos y semillas en un huerto semillero, permite determinar la cantidad y calidad de semillas que éste puede producir (Bonner, 1993). Esta información puede ser útil en los programas de mejoramiento, estrategias de manejo de unidades productoras de

germoplasma, y seguimiento de la producción de semilla de esta especie en el este del estado de Hidalgo. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la variación en características reproductivas de conos y semillas en un huerto semillero sexual de *Pinus patula*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del huerto semillero

El huerto semillero sexual de *P. patula* se ubica en Cuaunepantla, municipio de Acaxochitlán, estado de Hidalgo, a 20° 09' 55" de latitud N, 98° 14' 07" de longitud O y a 2200 m de altitud. El huerto semillero se originó de un ensayo de progenies que se estableció en el año 2004 con semilla de 792 árboles de 72 familias (Salaya *et al.*, 2012). Los árboles con las tasas menores de crecimiento, tallos torcidos y bifurcados, y copas con ramas abundantes y gruesas se eliminaron del ensayo original en el año 2013, por lo que la floración y polinización de las cosechas 2012, 2013 y 2014 ocurrió cuando el ensayo tenía 713 árboles vivos. Ochenta y nueve árboles de 43 familias de 13 procedencias componen el huerto semillero, actualmente. Los árboles se distribuyen en el huerto semillero en un arreglo de bloques incompletos, donde aquellos que pertenecen a la misma familia se encuentran distantes para evitar en lo posible la polinización entre individuos de la misma familia y disminuir la endogamia.

Selección de árboles para recolecta de conos y semillas

Novecientos nueve conos de 19 árboles se recolectaron de diciembre de 2014 a febrero de 2015. Los números de los árboles en el huerto semillero se mantuvieron para comparar el rendimiento en cosechas posteriores a la investigación presente. Los individuos incluidos en

el estudio se eligieron por su producción mayor de conos en las cosechas 2012, 2013 y 2014 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de conos cosechados en árboles de *Pinus patula* en el huerto semillero sexual.

Árbol	Número de árboles por cosechas			Total
	2012	2013	2014	
1	16	17	8	41
2	10	0	0	10
20	0	21	34	55
21	0	0	28	28
22	6	18	40	64
26	0	17	47	64
29	27	22	55	104
32	0	0	28	28
38	0	7	72	79
39	9	7	20	36
40	11	6	17	34
50	0	21	5	26
55	4	7	5	16
60	21	8	12	41
62	8	0	9	17
66	0	12	35	47
68	20	20	0	40
72	28	31	72	131
74	12	9	27	48

Total	172	223	514	909
-------	-----	-----	-----	-----

Los conos recolectados de cada árbol se contaron y colocaron individualmente en bolsas de papel identificadas con el número de cono, número de árbol y año de producción. Los conos de *P. patula* son serótinicos por lo que permanecen cerrados en el árbol por varios años. Los años de producción se identificaron por la posición del cono y por su color. Así, los conos ubicados en la parte superior de las ramas y de color marrón brillante se clasificaron como de la cosecha 2014. Los conos de la cosecha 2013 se consideraron a los ubicados debajo de los anteriores y de color marrón con manchas grises y, finalmente, conos localizados en el verticilo inferior y con una coloración grisácea (por el desgaste de su capa superior), se identificaron como de la cosecha 2012.

Extracción y manejo de la semilla

Los conos se colocaron bajo sombra en un lugar ventilado para evitar el ataque de hongos. Cada cono se sumergió en agua a una temperatura de 70 °C durante cinco segundos, se secó y se colocó en un invernadero por 24 horas para promover la apertura de las escamas y facilitar la extracción de la semilla. Las semillas se extrajeron golpeando el cono sobre una mesa y con la remoción de las escamas las cuales se clasificaron como infértiles y fértiles. Las escamas fértiles se localizan en la parte central del cono (Bramlett *et al.*, 1977).

Los conos se introdujeron en un horno eléctrico a una temperatura de 70 °C durante 20 h para obtener su peso seco, de acuerdo con la curva de pérdida de humedad realizada con antelación en una muestra de 100 conos durante 30 horas a 70 °C. El peso seco (g) de cada cono se determinó en una balanza electrónica con aproximación a 0.1 g (N08110®, OHAUS Corporation).

VARIABLES REPRODUCTIVAS EVALUADAS

El número potencial de semillas se obtuvo multiplicando el número de escamas fértiles por dos. Esta variable es el número máximo de semillas que un cono puede producir con base en que cada escama fértil tiene dos óvulos que potencialmente darían origen a dos semillas (Lyons, 1956; Bramlett *et al.*, 1977; Mosseler *et al.*, 2000). El número de semillas llenas, vanas y plagadas de cada cono se contó y clasificó de forma manual. El número de óvulos abortivos se obtuvo de la diferencia entre el potencial de semillas y el número de semillas llenas, vanas y plagadas. El porcentaje de óvulos abortivos, semillas llenas, vanas y plagadas se calculó con respecto al número potencial de semillas. El peso total de las semillas llenas por cono se obtuvo con una balanza analítica (SM[®], Chyo Balance Corporation). El peso promedio de una semilla llena se estimó con el peso total de las semillas llenas dividido entre el número de éstas. La eficiencia reproductiva se calculó con la relación del peso (mg) de las semillas llenas entre el peso seco (g) del cono (Mosseler *et al.*, 2000). Además, la eficiencia de producción de semillas se obtuvo como porcentaje del número total de semillas llenas y el potencial de semilla de un cono (Bramlett *et al.*, 1977). Asimismo, el índice de endogamia se calculó como la proporción entre el número de semillas vanas y el total de semillas desarrolladas (Mosseler *et al.*, 2000).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características de conos y semillas se analizaron con el procedimiento GLM-SAS/PC para Windows versión 9.4 (SAS Institute Inc. 2012) con el modelo siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + AR_j + A_i * AR_j + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

Donde: Y_{ijk} es la variable respuesta, μ es la media experimental, A_i es el efecto del i -ésimo año, AR_j es el efecto del j -ésimo árbol, $A_i * AR_j$ es la interacción año \times árbol y ε_{ijk} es el error experimental.

Los componentes de la varianza se estimaron con el procedimiento VARCOMP-SAS/PC (REML) (SAS Institute Inc. 2012). Dónde: $\sigma^2_{\text{año}}$ = varianza entre años; $\sigma^2_{\text{Árbol}}$ = varianza de árboles; $\sigma^2_{\text{años} \times \text{árbol}}$ = varianza de la interacción año \times árbol; σ^2_e = varianza del error.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza mostró diferencias ($p \leq 0.01$) entre años y entre árboles para peso seco del cono (PSC) (Cuadro 4). El error experimental contribuyó con el porcentaje mayor de la varianza total para esta y todas las variables evaluadas. Los conos del árbol 39 tuvieron el peso seco mayor en la cosecha 2012, mientras que los conos de los árboles 60 y 62 fueron los más pesados en la cosecha 2013 y 2014, respectivamente (Cuadros 5, 6 y 7). El árbol 1 tuvo los conos con el peso seco menor en las cosechas 2012 y 2013, y sólo por arriba del peso de los conos del árbol 55 en la cosecha 2014 (Cuadros 5, 6 y 7). La importancia de la estabilidad de variables asociadas con características de conos es importante en la identificación y clasificación de una especie (Perry, 1991).

Cuadro 4. Componentes de varianza para las características reproductivas evaluadas de *Pinus patula* en el huerto semillero sexual de Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo.

Características	$\sigma^{2\ddagger}$ Total	Componentes de la varianza (% de la σ^2 total)			
		$\sigma^2_{\text{Año}}$	$\sigma^2_{\text{Árbol}}$	$\sigma^2_{\text{Año} \times \text{Árbol}}$	σ^2_{Error}
Peso seco del cono	99	1.4**	36.9**	5.0**	56.7
Núm. potencial de semillas	2559	6.7**	23.8**	14.1**	55.4
% óvulos abortivos	127	1.8**	6.8**	7.2*	84.2
% semillas llenas	438	3.4**	27.6**	8.3**	60.7
% semillas vanas	183	0.3*	28.9**	5.4**	65.4
% semillas dañadas	15	1.3*	4.7**	7.7**	86.3

Índice de endogamia	0.04	0.8*	34.4**	5.3**	59.5
Peso de la semilla	13	1.0**	11.3**	22.5**	65.2
Eficiencia reproductiva	148	6.1**	21.0*	23.0**	49.9
Eficiencia de semilla	433	3.6**	27.8**	9.0**	59.6

†Varianza; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$

Cuadro 5. Promedios (\pm error estándar) de las características de conos y semillas de árboles de *Pinus patula* del huerto semillero sexual en Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo en 2012.

Árbol	PSC	NPS	%OA	%SLL	%SV	%SD	IE	PSE	ER	ES
1	19 \pm 1	131 \pm 7	12 \pm 2	82 \pm 2	5 \pm 1	1 \pm 0	0.06 \pm 0.01	7 \pm 0	41 \pm 3	81 \pm 2
2	26 \pm 2	67 \pm 6	50 \pm 7	44 \pm 4	25 \pm 6	5 \pm 3	0.29 \pm 0.05	8 \pm 1	10 \pm 2	43 \pm 4
22	24 \pm 1	39 \pm 8	50 \pm 6	25 \pm 6	23 \pm 5	2 \pm 1	0.46 \pm 0.11	7 \pm 1	2 \pm 1	25 \pm 6
29	35 \pm 2	171 \pm 8	24 \pm 4	62 \pm 4	13 \pm 2	1 \pm 0	0.18 \pm 0.02	8 \pm 0	25 \pm 2	61 \pm 4
39	44 \pm 2	145 \pm 3	28 \pm 3	62 \pm 4	9 \pm 3	1 \pm 0	0.12 \pm 0.03	11 \pm 0	22 \pm 2	60 \pm 4
40	30 \pm 2	87 \pm 13	27 \pm 7	41 \pm 4	25 \pm 4	7 \pm 2	0.33 \pm 0.03	8 \pm 0	9 \pm 2	37 \pm 4
55	19 \pm 2	88 \pm 18	24 \pm 7	66 \pm 7	9 \pm 2	1 \pm 0	0.11 \pm 0.01	8 \pm 1	25 \pm 5	66 \pm 6
60	39 \pm 1	116 \pm 6	33 \pm 3	55 \pm 3	6 \pm 1	7 \pm 2	0.08 \pm 0.01	9 \pm 0	14 \pm 1	54 \pm 3
62	40 \pm 4	132 \pm 11	14 \pm 5	81 \pm 5	4 \pm 1	1 \pm 0	0.04 \pm 0.01	13 \pm 0	35 \pm 3	81 \pm 5
68	26 \pm 2	75 \pm 9	35 \pm 3	38 \pm 3	26 \pm 4	1 \pm 0	0.40 \pm 0.04	7 \pm 0	8 \pm 1	34 \pm 3
72	35 \pm 1	152 \pm 9	16 \pm 3	65 \pm 3	16 \pm 2	2 \pm 1	0.19 \pm 0.01	8 \pm 0	23 \pm 2	63 \pm 2
74	38 \pm 2	82 \pm 9	33 \pm 5	51 \pm 2	15 \pm 2	2 \pm 0	0.23 \pm 0.03	13 \pm 0	14 \pm 2	48 \pm 5

PSC: Peso seco del cono (g), NPS: Número potencial de semilla (#), %OA: Porcentaje de óvulos abortivos, %SLL: Porcentaje de semilla llena, %SV: Porcentaje de semilla vana, %SD: Porcentaje de semilla dañada, IE: Índice de endogamia, PSE: Peso de la semilla (mg), ER: Eficiencia reproductiva (mg g⁻¹), ES: Eficiencia de la semilla.

Cuadro 6. Promedios (\pm error estándar) de las características de conos y semillas de árboles de *Pinus patula* del huerto semillero sexual de Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo en 2013.

Árbol	PSC	NPS	%OA	%SLL	%SV	%SD	IE	PSE	ER	ES
1	20 \pm 1	114 \pm 7	19 \pm 2	77 \pm 3	4 \pm 1	0 \pm 0	0.05 \pm 0.01	7 \pm 0	31 \pm 2	76 \pm 3
20	33 \pm 1	141 \pm 8	18 \pm 3	71 \pm 3	10 \pm 1	1 \pm 0	0.13 \pm 0.02	11 \pm 0	35 \pm 3	70 \pm 3
22	30 \pm 1	92 \pm 10	31 \pm 5	30 \pm 3	36 \pm 1	3 \pm 0	0.53 \pm 0.04	8 \pm 1	9 \pm 1	30 \pm 4
26	28 \pm 1	111 \pm 10	18 \pm 4	62 \pm 6	19 \pm 3	1 \pm 1	0.25 \pm 0.04	9 \pm 0	23 \pm 3	60 \pm 5
29	34 \pm 2	176 \pm 8	21 \pm 3	65 \pm 4	13 \pm 2	1 \pm 1	0.17 \pm 0.02	9 \pm 0	29 \pm 2	64 \pm 4
38	37 \pm 2	139 \pm 10	20 \pm 5	67 \pm 4	11 \pm 3	3 \pm 1	0.13 \pm 0.03	11 \pm 0	27 \pm 3	66 \pm 4
39	34 \pm 2	136 \pm 9	26 \pm 5	55 \pm 7	18 \pm 7	1 \pm 0	0.23 \pm 0.07	9 \pm 1	19 \pm 4	54 \pm 7
40	30 \pm 5	121 \pm 14	23 \pm 6	67 \pm 6	9 \pm 2	1 \pm 1	0.12 \pm 0.02	9 \pm 1	25 \pm 3	67 \pm 6
50	30 \pm 1	50 \pm 6	36 \pm 2	36 \pm 3	24 \pm 3	4 \pm 2	0.38 \pm 0.04	11 \pm 1	7 \pm 1	35 \pm 3

55	26 ± 1	121 ± 11	19±4	74±5	6±1	1±0	0.07 ± 0.01	9 ± 0	32 ± 4	73 ± 4
60	41 ± 3	119 ± 15	30±5	55±6	12±6	3±2	0.15 ± 0.07	10 ± 1	17 ± 3	54 ± 7
66	37 ± 1	151 ± 8	25±3	63±3	11±1	0±0	0.14 ± 0.01	10 ± 0	25 ± 2	63 ± 3
68	33 ± 2	88 ± 6	34±3	50±3	16±1	0±0	0.24 ± 0.02	10 ± 0	13 ± 2	48 ± 3
72	40 ± 2	145 ± 8	20±3	65±3	14±2	1±0	0.18 ± 0.01	9 ± 0	22 ± 2	64 ± 3
74	29 ± 3	55 ± 10	36±7	37±9	26±4	1±1	0.46 ± 0.09	10 ± 1	9 ± 2	36 ± 9

PSC: Peso seco del cono (g), NPS: Número potencial de semilla (#), %OA: Porcentaje de óvulos abortivos, %SLL: Porcentaje de semilla llena, %SV: Porcentaje de semilla vana, %SD: Porcentaje de semilla dañada, IE: Índice de endogamia, PSE: Peso de la semilla (mg), ER: Eficiencia reproductiva (mg g⁻¹), ES: Eficiencia de la semilla.

Cuadro 7. Promedios (± error estándar) de las características de conos y semillas de árboles de *Pinus patula* del huerto semillero sexual de Cuaunepantla, Acaxochitlán, Hidalgo en 2014.

Árbol	PSC	NPS	%OA	%SLL	%SV	%SD	IE	PSE	ER	ES
1	20 ± 3	57 ± 11	32±6	62±6	5±3	0±0	0.07 ± 0.03	7 ± 0	13 ± 3	61 ± 6
20	31 ± 1	101 ± 6	18±3	66±3	13±2	3±1	0.16 ± 0.02	11 ± 0	25 ± 2	63 ± 3
21	28 ± 2	69 ± 7	35±3	36±3	29±3	1±0	0.43 ± 0.04	11 ± 0	10 ± 1	36 ± 2

22	24 ± 1	74 ± 5	29 ± 2	28 ± 2	41 ± 2	2 ± 0	0.56 ± 0.03	8 ± 0	7 ± 1	27 ± 2
26	27 ± 1	90 ± 8	30 ± 2	50 ± 3	19 ± 2	0 ± 0	0.29 ± 0.03	9 ± 0	15 ± 1	49 ± 3
29	32 ± 1	119 ± 6	33 ± 2	48 ± 2	18 ± 2	1 ± 0	0.27 ± 0.02	9 ± 0	15 ± 1	46 ± 2
32	20 ± 1	70 ± 6	27 ± 3	54 ± 3	17 ± 2	2 ± 1	0.22 ± 0.02	8 ± 0	15 ± 1	50 ± 3
38	40 ± 1	138 ± 5	24 ± 2	64 ± 2	9 ± 1	3 ± 0	0.12 ± 0.01	11 ± 0	24 ± 1	61 ± 2
39	35 ± 1	141 ± 8	21 ± 3	62 ± 4	14 ± 2	3 ± 1	0.18 ± 0.03	9 ± 0	23 ± 2	61 ± 4
40	22 ± 1	66 ± 6	27 ± 3	50 ± 3	22 ± 3	1 ± 1	0.30 ± 0.03	9 ± 0	13 ± 2	48 ± 4
50	29 ± 4	115 ± 16	24 ± 5	51 ± 11	22 ± 7	3 ± 1	0.30 ± 0.09	11 ± 0	23 ± 6	50 ± 11
55	18 ± 3	61 ± 14	32 ± 6	50 ± 8	10 ± 3	8 ± 5	0.14 ± 0.04	7 ± 1	18 ± 2	49 ± 8
60	36 ± 2	92 ± 6	41 ± 2	44 ± 4	11 ± 4	4 ± 2	0.18 ± 0.06	9 ± 0	10 ± 1	44 ± 4
62	42 ± 3	79 ± 13	33 ± 4	53 ± 7	12 ± 5	3 ± 1	0.20 ± 0.09	12 ± 0	12 ± 2	51 ± 7
66	23 ± 1	80 ± 6	35 ± 3	46 ± 2	17 ± 2	2 ± 0	0.25 ± 0.01	9 ± 0	11 ± 1	44 ± 2
72	37 ± 1	124 ± 4	25 ± 1	61 ± 2	13 ± 1	1 ± 0	0.17 ± 0.01	9 ± 0	19 ± 1	60 ± 1
74	32 ± 1	64 ± 7	35 ± 3	43 ± 4	19 ± 2	2 ± 1	0.31 ± 0.03	12 ± 0	10 ± 1	42 ± 3

PSC: Peso seco del cono (g), NPS: Número potencial de semilla (#), %OA: Porcentaje de óvulos abortivos, %SLL: Porcentaje de semilla llena, %SV: Porcentaje de semilla vana, %SD: Porcentaje de semilla dañada, IE: Índice de endogamia. PSE: Peso de la semilla (mg), ER: Eficiencia reproductiva (mg g^{-1}), ES: Eficiencia de la semilla.

El número potencial de semillas (NPS) mostró diferencias ($p \leq 0.01$) entre años y entre árboles en el análisis de varianza (Cuadro 4). Los promedios del número potencial de semilla variaron de 91 a 117 semillas por cono de *P. patula* en 2014 y 2013, respectivamente. Estos promedios fueron menores al promedio del número de semillas (125 semillas potenciales por cono) reportado para *P. patula* en otro estudio (Dvorak, 2002). El árbol 29 tuvo el valor máximo del número potencial de semillas, tanto en la cosecha 2012 como en la cosecha 2013, mientras que el árbol 39 fue para la cosecha 2014. Este último árbol tuvo un potencial alto en las tres cosechas evaluadas en la investigación presente. En contraste, el árbol 22 tuvo el valor mínimo del potencial de semilla en la cosecha 2012, y aunque este no fue en las cosechas subsecuentes, el potencial de semillas en esos años fue menor al promedio.

El análisis de varianza registró diferencias ($p \leq 0.01$) entre años y entre árboles para el porcentaje promedio de óvulos abortivos (%OA). Los árboles aportaron un porcentaje bajo a la variación total. Los árboles 60 y 22 tuvieron los valores máximos de esta característica en las cosechas 2014 y 2012, respectivamente, y presentaron muchos óvulos abortados en las otras cosechas. Los árboles 50 y 74 registraron el valor máximo de esta característica en la cosecha 2013. El árbol 1 registró un menor porcentaje de óvulos abortivos en la cosecha 2012, mientras que el árbol 26 tuvo la menor producción de óvulos abortivos en la cosecha 2013. Los árboles 20 y 39 mostraron los valores menores en las cosechas 2014.

El análisis de varianza mostró diferencias ($p \leq 0.01$) entre años y árboles, para porcentaje de semillas llenas (%SLL). Los porcentajes de semillas llenas fueron superiores al 50 y 58 % en las tres cosechas evaluadas (Cuadros 5, 6 y 7). Estos porcentajes representaron 72 y 74 semillas llenas por cono en las cosechas 2012 y 2013, respectivamente, mientras que para la cosecha 2014 correspondió a 55 semillas. El número de semillas llenas por cono obtenido en la cosecha 2014 fue mayor al número de semillas llenas (22 semillas llenas por cono) encontrado en conos recolectados en poblaciones naturales de *P. patula* y al número (45-50

semillas por cono) cosechado en un huerto semillero en Zimbabwe de esta especie (Barrett, 1972; Geary y Pattinson, 1969; Barnes y Mullin, 1974). El número de semillas llenas por cono obtenido en las tres cosechas de la investigación presente se encontraron dentro de los valores (22-93 semillas llenas por cono) reportados para *P. patula* (Patiño y Kageyama, 1991). El número de semillas llenas por cono puede variar considerablemente de un año a otro debido a efectos climáticos, condiciones particulares del sitio y daños a la semilla por insectos (Andersson, 1965; Patiño y Kageyama 1991; De Groot y Schnekenburger, 1996). El porcentaje de semillas llenas entre árboles varió considerablemente en cada uno de los años de cosecha (Cuadros 5, 6 y 7). Los árboles 1 y 62 tuvieron el porcentaje máximo de semillas llenas en la cosecha 2012, mientras que el número 22 registró el porcentaje menor en las tres producciones. El número alto de semillas por cono pudo ser producto de una tasa alta de cruzamiento entre individuos genéticamente diferentes, lo que se logró por dejar en pie a individuos de diferentes procedencias y a través del espaciamiento de los árboles de la misma familia a lo largo del huerto semillero.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre árboles y entre años ($p \leq 0.05$) para el porcentaje de semillas vanas y porcentaje de semillas dañadas (Cuadro 4). Ambas variables significaron un porcentaje bajo con respecto al potencial de semillas en los tres años evaluados y entre árboles (Cuadros 5, 6 y 7). Los árboles contribuyeron con valores altos de varianza para porcentaje de semillas vanas. El porcentaje promedio de semillas vanas fue 15 % en las cosechas 2012 y 2013 mientras que este fue 17 % en la cosecha 2014. El árbol 68 tuvo el valor máximo de esta característica en la cosecha 2012, mientras que en cosechas subsecuentes el árbol 22 presentó los porcentajes mayores, mientras que el árbol 1 registró los valores menores en las dos cosechas subsecuentes (Cuadros 5, 6 y 7).

Diferencias se encontraron entre años ($p \leq 0.05$) y entre árboles ($p \leq 0.01$) para el índice de endogamia. La fuente de variación árbol contribuyó considerablemente a la varianza total, y representó la segunda variación mayor después del error experimental. El índice de endogamia varió de 0.05 para el árbol 1 a 0.53 para el árbol 22 en la cosecha 2013. El índice de endogamia (IE) promedio resultó de 0.24 para este huerto semillero de *P. patula*, valor menor que los reportados para *P. rigida* Mill. (0.35), *P. leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham. (0.50), *Picea rubens* Sarg. (0.61) y *Picea martinezii* T. F. Patterson (0.75) (Mosseler et al., 2004; Gómez-Jiménez et al., 2010; Mosseler et al., 2000; Flores-López et al., 2012). Valores altos del índice de endogamia se deben a una tasa alta de autofecundación, lo que incrementa la presencia de alelos recesivos letales que causan la muerte del embrión (Bramlett, 1977). Sin embargo, la tasa de autofecundación y cruzamiento entre individuos emparentados fue baja en el huerto semillero como resultado, posiblemente, de cruzamiento entre árboles no emparentados.

El análisis de varianza mostró diferencias ($p \leq 0.01$) entre años y entre árboles para peso de la semilla (PSE). La varianza obtenida por el componente árbol fue menor que la obtenida por el componente interacción año \times árbol. El peso promedio de una semilla para los tres años fue de 9.5 mg (Cuadros 5, 6 y 7). Este valor fue mayor al reportado en otro estudio en *P. patula* en el estado de Veracruz, e incluso mayor que los 8.5 mg promedio reportados para 16 procedencias naturales de *P. patula* (Mendizábal et al., 2006; Barret, 1972). El peso de la semilla varió de 7 a 13, 7 a 11 y 7 a 12 mg en las cosechas 2012, 2013 y 2014, respectivamente. Los árboles 62 y 74 tuvieron los valores mayores para esta característica en las cosechas 2012 y 2014 (Cuadro 5, 6 y 7). En contraste, el árbol 1 tuvo los pesos menores en los tres años de producción evaluados. El número de semillas por kg varió de 102 653 a 110 145. Estos valores se encuentran dentro del intervalo promedio de (92 000 a 114 000) semillas por kg reportados para *P. patula* en Sudáfrica y Zimbabwe (Barnes y Mullin, 1974).

El análisis de varianza indicó diferencias ($p \leq 0.01$) entre años y entre árboles ($p \leq 0.05$) para eficiencia reproductiva (ER) la cual es un indicador de la proporción de energía que un árbol destina a la producción de semilla con respecto a la masa del cono (Gómez-Jiménez *et al.*, 2010). El valor menor para eficiencia reproductiva se encontró en la cosecha 2014 (Cuadros 5, 6 y 7). El árbol 62 tuvo el valor máximo de eficiencia reproductiva en la cosecha 2012, mientras que el árbol 22 registró la menor eficiencia en este año. La eficiencia reproductiva varió de 7 a 41 mg de semilla por g de cono en el árbol 50 y árbol 1 en las cosechas 2013 y 2012, respectivamente. El valor promedio para eficiencia reproductiva fue similar al valor (16) encontrado en *P. leiophylla*, pero mayor al valor (3.3) encontrado en *P. rigida* (Gómez-Jiménez *et al.*, 2010; Mosseler *et al.*, 2004). Sin embargo, el valor promedio de *P. patula* en la investigación presente fue menor a los valores (24 y 30) encontrados en *Picea mexicana* Martínez y *Pseudotsuga menziesii* Mirb., respectivamente, que son especies de conos muy ligeros (Flores-López *et al.*, 2005; Mápula-Larreta *et al.*, 2007).

El análisis de varianza de la variable eficiencia de semilla (ES) presentó diferencias ($p \leq 0.01$) entre años y árboles. El valor mayor de eficiencia reproductiva se encontró en la cosecha 2013. Los árboles 1 y 62 registraron los valores máximos de eficiencia de semillas en la cosecha 2012 mientras que el árbol 22 tuvo el mínimo en los tres años (Cuadros 5, 6 y 7). Los resultados para esta variable fueron superiores a los obtenidos en otros estudios para especies como *Picea rubens* (2 %), *Picea martinezii* (7 %), *Pinus sylvestris* L. (18 %) y *Picea mariana* Mill. (24 %) (Mosseler *et al.*, 2000; Flores-López *et al.*, 2012; Sivacioğlu y Ayan, 2008; De Groot y Schnekenburger, 1996). Sin embargo, el valor obtenido para *P. patula* en el estudio presente fue inferior al valor reportado para *Pinus pinea* L. (90 %) en una plantación de 25 años de edad (Ganatsas y Tsakalimi, 2008), pero muy semejante a los valores encontrados en *P. banksiana* Lamb. y *P. greggii* Engelm.ex Parl. (De Groot y Schnekenburger, 1996; López-Upton y Donahue, 1995).

Los valores de la capacidad reproductiva obtenidos para el huerto semillero se consideraron adecuados para una unidad productora de semillas. Los valores menores para capacidad reproductiva se encontraron en el año 2014, lo cual pudo estar asociado a factores ambientales que ocasionaron diferencias en las características reproductivas evaluadas. La variación alta entre árboles para las características reproductivas bajo estudio indicó que la producción de semilla varió de un ciclo de producción a otro. Esto mismo ocurrió para el resto de las variables evaluadas. Las cosechas en los años 2012, 2013 y 2014 fueron producto de la nube de polen de una masa de 713 árboles antes del aclareo genético final. Quizás lo anterior hizo posible reducir la autofecundación y niveles de endogamia y obtener una producción alta de semillas llenas. La evaluación de las características estudiadas en la presente investigación debería continuar en años posteriores al aclareo genético esperando que la producción de semilla llena en el huerto semillero sexual de *P. patula* continúe siendo considerable y genéticamente viable.

CONCLUSIONES

Niveles altos de variación se encontraron en las características reproductivas de *Pinus patula*. El error experimental fue la fuente de variación mayor en las características evaluadas seguida por los árboles. El porcentaje de semillas llenas varió de una cosecha a otra, sin embargo, un número alto de semillas llenas por conos se registraron en las tres cosechas evaluadas. El porcentaje bajo de semilla vana e índice de endogamia indicaron un nivel bajo de autofecundación en el huerto semillero antes de su aclareo definitivo.

LITERATURA CITADA

Andersson, E. 1965. Cone and seed studies in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Stud. For. Suec. 23: 1-278.

- Barnes, R. D., and L. J. Mullin, 1974. Flowering phenology and productivity in clonal seed orchards on *Pinus patula*, *P. elliottii*, *P. taeda*, and *P. kesiya* in Rhodesia. Forest Research Paper No. 3. Rhodesia Forestry Commission. 81 p
- Barrett, W. G. 1972. Variación de características morfológicas en poblaciones naturales de *Pinus patula* Schlttdl. et Cham. en México. Suplemento Forestal 7, Institute for Domestic and Internal Affairs, Argentina. pp: 9-35
- Bonner, F. T. 1993. Análisis de Semillas Forestales. Serie de Apoyo Académico No. 47. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 53 p.
- Bramlett, D. L. 1977. Efficiency of seed production in southern, pine seed orchards, *In*: Proceedings of the Thirteenth Lake States Forest Tree Improvement Conference. Gen. Tech. Rep. NC-50. USDA, Forest Service, St. Paul, MN. pp: 17-25.
- Bramlett, D. L., E. W. Belcher Jr., G. L. DeBarr, G. D. Hertel, R. P. Karrfalt, C. W. Lantz, T. Miller, K. D. Ware, and H. O. Yates III. 1977. Cone analysis of southern pines: a guidebook. Gen. Tech. Rep. SE-13. USDA, Forest Service. Asheville, NC. 28 p.
- De Groot, P., and F. Schnekenburger. 1996. Cone traits of jack pine and black spruce in young seedling seed orchards. *New Forest* 12: 279-291.
- Dvorak, W. S. 2002. *Pinus patula* Schiede & Schlttdl. & Cham. *In*: Vozzo, J. (ed.). Tropical Tree Seed Manual. Agricultural Handbook 721. USDA, Forest Service. pp: 632-635.
- Fernandes, L., M. Rocheta, J. Cordeiro, S. Pereira, S. Gerber, M. M. Oliveira, and M. M. Ribeiro. 2008. Genetic variation, mating patterns and gene flow in a *Pinus pinaster* Aiton clonal seed orchard. *Ann. For. Sci.* 65:706.
- Flores-López, C., J. López-Upton, y J. J. Vargas-Hernández. 2005. Indicadores reproductivos en poblaciones naturales de *Picea mexicana* Martínez. *Agrociencia* 39:117-126.

- Flores-López, C., C. G. Geada-López, J. López-Upton, y E. López-Ramírez. 2012. Producción de semillas e indicadores reproductivos en poblaciones naturales de *Picea martinezii* T. F. Patterson. Rev. For. Baracoa 31: 49-58.
- Ganatsas, P., M. Tsakalidimi, and C. Thanos. 2008. Seed and cone diversity and seed germination of *Pinus pinea* in Strofylia Site of the Natura 2000 Network. Biodivers. Conserv. 17: 2427-2439.
- Geary, T.F., y J. V. Pattinson. 1969. Seed production potential of cones of *Pinus kesiya* and *P. patula* in Central Africa. Rhod. J. Agric. Res. 7: 111-115.
- Gómez-Jiménez, D. M., C. Ramírez-Herrera, J. Jasso-Mata, y J. López-Upton. 2010. Variación en características reproductivas y germinación de semillas de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham. Rev. Fitotec. Mex. 33 (4): 297-304.
- Ladrach, W. E. 1985. Comparisons between provenances and sources of fourteen conifers in the Colombian Andes after five years. Research Report 102, Investigación Forestal. Cartón y Papel de Colombia. Cali, Colombia. 13 p.
- López-Upton, J., and J. K. Donahue. 1995. Seed production of *Pinus greggii* Engelm. in natural stands in México. Tree Planters' Notes 46: 86-92.
- Lyons, L.A. 1956. The seed production capacity and efficiency of red pine cones (*Pinus resinosa*). Can. J. Botany 34: 27-36.
- Mápula-Larreta, M., J. López-Upton, J. J. Vargas-Hernández, and A. Hernández-Livera. 2007. Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. Biodivers. Conserv. 16: 727-742.
- Mendizábal H., L. C., J. Alba L., y M. I. Cabrera C. 2006. Variación de semillas de *Pinus patula* Schl. et Cham. con respecto a su posición en el fruto. Foresta Veracruzana 8: 13-16.

- Morales G., E., J. López U., J. J. Vargas H., C. Ramírez H., y A. Gil M. 2013. Parámetros genéticos de *Pinus patula* en un ensayo de progenies establecido en dos altitudes. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 155-162.
- Mosseler, A., J. E. Major, J. D. Simpson, B. Daigle, K. Lange, Y. S. Park, K. H. Johnsen, and O. P. Rajora. 2000. Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. I. Reproductive traits and fecundity. *Can. J. Botany* 78: 928-940.
- Mosseler, A., O. P. Rajora, J. E. Major, and K. H. Kim. 2004. Reproductive and genetic characteristics of rare, disjunct pitch pine populations at the northern limits of its range in Canada. *Conserv. Genet.* 5: 571–583.
- Patiño V., F., y P. Y. Kageyama. 1991. *Pinus patula*, Schiede & Deppe. Seedleaflet No. 8A. Danida Forest Seed Centre. Humlebaek, Denmark. 24 p.
- Perry, J. P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, Oregon. 231 p.
- Salaya, D., J. M., J. López U., y J. J. Vargas H. 2012. Variación genética y ambiental en dos ensayos de progenie de *Pinus patula*. *Agrociencia* 46: 519-534.
- SAS Institute. 2012. SAS version 9.4 for Windows. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.
- Sivacioğlu, A., and S. Ayan, 2008. Evaluation of seed production of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) clonal seed orchard with cone analysis method. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 4393-4399
- Vargas H., J. J. 2003. Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en el Norte de México. Documentos de Trabajo: Recursos Genéticos Forestales. FGR/60S. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales, FAO, Roma.
- Vela G., L. 1980. Contribución a la ecología de *Pinus patula* Schl. et Cham. Publicación Especial No. 19. INIF/SARH. México, D. F. 109 p.

- Velázquez, M., A., G. Ángeles P., T. Llanderal O., A. Román J., and V. J. Reyes H. 2004. Monografía de *Pinus patula*. CONAFOR/Colegio de Postgraduados. México, D. F. 124 p.
- White, T. L., W. T. Adams, and D. B. Neale. 2007. Forest Genetics. CAB International. London, UK. 682 p.
- Wormald, T. J. 1975. *Pinus patula*. Tropical Forestry 7. Department of Forestry, Commonwealth Forestry Institute. Oxford, UK. 212 p.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES

Un nivel alto de diversidad genética se encontró en los árboles de *P. patula* en el huerto semillero sexual constatado por el número promedio de alelos por locus con un valor de 8.4, los nueve loci fueron polimórficos, el número efectivo de alelos por locus con un valor de 4.4, las heterocigosidades observada y esperada con valores de 0.765 y 0.627, respectivamente. El valor del índice de fijación con un valor negativo (-0.254) indicó un exceso de individuos heterocigóticos por lo que una diversidad alta se esperaría también en el germoplasma cosechado en el huerto.

Así mismo, una variación amplia se encontró en las características reproductivas. El análisis de varianza mostró diferencias ($p \leq 0.01$) entre años y entre árboles para todas las variables evaluadas. El error experimental contribuyó con el porcentaje mayor a la varianza total de todas las variables evaluadas seguido por la varianza entre árboles.

El peso seco de los conos osciló entre 18 y 44 g entre los años de cosecha evaluados. Los promedios del número potencial de semilla (NPS) variaron de 91 a 117 semillas por cono en 2014 y 2013, respectivamente. Los porcentajes de óvulos abortivos variaron de 12 a 50 % en la cosecha 2012, de 18 a 36 % en 2013 y de 18 a 41 % en 2014. Los porcentajes de semillas llenas (%SLL) fueron superiores al 50 y 58 % con respecto al potencial de semillas en las tres cosechas evaluadas. Estos porcentajes representaron 72 y 74 semillas llenas por cono en las cosechas 2012 y 2013, respectivamente, mientras que para la cosecha 2014 correspondió a 55 semillas. El número alto de semillas por cono pudo ser producto de una tasa alta de cruzamiento entre individuos genéticamente diferentes, lo que pudo estar influenciado por el número de procedencias utilizadas y el espaciamiento entre árboles de la misma familia dentro del huerto. Las variables porcentaje de semillas vanas (%SV) y porcentaje de semillas dañadas (%SD) representaron un porcentaje bajo con respecto al potencial de semillas en los

tres años evaluados y entre árboles. El porcentaje promedio de semillas vanas fue 15 % en las cosechas 2012 y 2013, mientras que este fue 17 % en la cosecha 2014.

El índice de endogamia (IE) promedio resultó de 0.24 para este huerto semillero de *P. patula*. Las cosechas en los años 2012, 2013 y 2014 fueron producto de la nube de polen previa al aclareo genético final realizado en 2013, lo que pudo contribuir a reducir la autofecundación, los niveles de endogamia y obtener una producción alta de semillas llenas. El peso promedio de una semilla para los tres años fue de 9.5 mg con valores que variaron de 7 a 13, 7 a 11 y 7 a 12 mg en las cosechas 2012, 2013 y 2014, respectivamente. El valor menor para eficiencia reproductiva se encontró en la cosecha 2014, y el valor mayor de eficiencia reproductiva se encontró en la cosecha 2013.

Los valores de diversidad genética y de variación en características reproductivas obtenidos para el huerto semillero se consideran adecuados para una unidad productora de semillas. El germoplasma producido en el huerto semillero sexual de *P. patula* tendría un nivel alto de diversidad genética lo que sería benéfico para la adaptación de la planta producida al ambiente. La variación entre características reproductivas de un ciclo de producción a otro pudo estar asociada a factores ambientales que ocasionaron estas diferencias, por lo que la realización de ensayos de progenie es ideal para una recomendación acertada. La evaluación de las características estudiadas en esta investigación debería continuar en años posteriores al aclareo genético, esperando que la producción de semilla llena en el huerto semillero sexual de *P. patula* continúe siendo considerable y genéticamente viable.