



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

DIVERSIDAD GENÉTICA Y SISTEMA DE CRUZAMIENTO EN POBLACIONES DE *Pinus patula* CON DIFERENTES DENSIDADES

MÓNICA MÉNDEZ NERI

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: DIVERSIDAD GENÉTICA Y SISTEMA DE CRUZAMIENTO EN POBLACIONES DE *Pinus patula* CON DIFERENTES DENSIDADES, realizada por la alumna: MÓNICA MÉNDEZ NERI, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

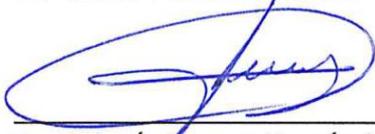
EN CIENCIAS FORESTALES

CONSEJO PARTICULAR

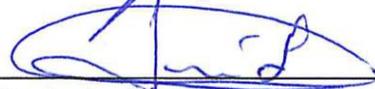
CONSEJERO


Dr. Carlos Ramírez Herrera

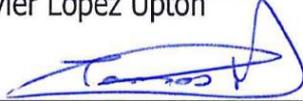
ASESOR


Dr. J. Jesús Vargas Hernández

ASESOR


Dr. Javier López Upton

ASESOR


Dr. Tomás Martínez Trinidad

ASESOR


Dr. Pedro Antonio López

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero 2017

DIVERSIDAD GENÉTICA Y SISTEMA DE CRUZAMIENTO EN POBLACIONES DE *Pinus patula* CON DIFERENTES DENSIDADES

**Mónica Méndez Neri, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017.**

RESUMEN

Las estimaciones de la diversidad genética, patrones del sistema de cruzamiento y características reproductivas proporcionan evidencia de los procesos genéticos en una población, y son indicadores para conocer la viabilidad de poblaciones. Aunque el sistema de polinización cruzada predomina en la mayoría de las especies forestales con polinización anemófila, factores como la densidad de plantas pueden afectar y modificar el patrón de cruzamiento entre árboles en las poblaciones. El sistema de cruzamiento determina la estructura genética de la población e influye en la calidad de las semillas que se recolecta para los programas de conservación de recursos genéticos y plantaciones forestales. Bajo este contexto, los objetivos en el presente estudio fueron: a) analizar la variación en características reproductivas de los árboles de *Pinus patula* en densidades arbóreas diferentes en dos poblaciones; b) evaluar la calidad germinativa de las semillas de árboles *P. patula* en densidades arbóreas diferentes en dos poblaciones; c) estimar la diversidad y estructura genética de *Pinus patula* en dos poblaciones naturales; d) conocer la tasa de cruzamiento y autofecundación de árboles de *P. patula* en dos densidad arbórea. La densidad poblacional varió de 50 a un número mayor de 500 árboles ha⁻¹. El peso seco de cono, potencial productivo, porcentaje de óvulos abortados, porcentaje de semillas llenas, vanas y dañadas, índice de endogamia, peso de semillas y eficiencia reproductiva se evaluaron para 40 árboles en cada una las dos poblaciones. Doscientas semillas de cada uno de 20 y 40 árboles de Villa Cuauhtémoc y La Selva, respectivamente, se colocaron en un

diseño de bloques al azar. La germinación se registraron diariamente por 30 días para calcular capacidad germinativa, valor pico y valor germinativo. El número promedio de alelos por locus (A), la heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o), el índice de fijación (F), los estadísticos F de Wright y el número de migrantes por generación (Nm) se estimaron para ambas poblaciones. La tasa de cruzamiento multilocus (t_m), la tasa de un locus simple (t_s) y la correlación de paternidad (r_p) se calcularon para 12 árboles de La Selva. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se encontraron entre poblaciones, densidades e interacción densidad x población para indicadores reproductivos. El porcentaje mayor (37.6 %) de semillas llenas se encontró en la densidad arbórea mayor en La Selva. El índice menor de endogamia se registró en la densidad arbórea mayor en ambas poblaciones. La capacidad germinativa mayor y el valor germinativo mayor se encontraron en las densidades arbóreas menores en ambas poblaciones. En general, las dos poblaciones de *P. patula* tuvieron un nivel alto de diversidad genética ($A = 8.5$; $H_e = 0.693$) y un índice de fijación moderado ($F = 0.137$). Un déficit de heterocigotos se encontró cuando ambas poblaciones se analizaron en conjunto ($F_{IT} = 0.239$) y separadas cada una ($F_{IS} = 0.124$). La diferenciación ($F_{ST} = 0.131$) entre poblaciones fue moderada. El número de migrantes ($Nm = 1.7$) por generación fue mayor a 1. La tasa multilocus de cruzamiento ($t_m = 0.596$) fue baja en rodales con la densidad poblacional mayor. La tasa single locus de cruzamiento fue 1.0 en rodales con densidad poblacional menor. La endogamia biparental fue cero en rodales con la densidad poblacional menor. La correlación mayor de paternidad se encontró en la densidad poblacional mayor.

Palabras clave: calidad de semilla, densidad de árboles, diversidad genética, endogamia, producción de semillas, sistema de cruzamiento.

**GENETIC DIVERSITY AND MATING SYSTEM IN *Pinus patula* POPULATIONS
UNDER DIFFERENT DENSITIES**

**Mónica Méndez Neri, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017.**

ABSTRACT

The estimation of genetic diversity, mating system and reproductive indicators give evidences of the genetic process in a population and are indicators to know the population viability. However, the mating system is common in most of conifers, factors like plant density can affect and modify the pattern of mating among trees in populations. The mating system determines the genetic structure in a population e influence in the quality of the seeds that are collected for the programs of genetic conservation and forest plantations. In this context, the objectives of the present study were: a) to analyze the variation in reproductive traits of *Pinus patula* trees in different-tree density in two populations; b) to evaluate the germinative quality of seeds of *P. patula* trees in different-tree density in two population; c) To estimate the genetic diversity and genetic structure of *P. patula* in two natural populations; to know the crossing rate and autofecundity rate of *P. patula* trees in two tree density. The tree density varied from 50 to > 500 tree ha⁻¹. The dry weight of the cone, productive potential, percentage of abortive ovules, percentage of filled seeds, percentage of empty seeds, percentage of damaged seeds, endogamy index, seed weight and seed efficiency were evaluated for 40 trees in each of both populations. Two hundred seeds from each of 20 and 40 trees from Villa Cuauhtémoc and La Selva, respectively were set in a randomized block design. The germination was recorded daily for 30 days to calculate germinative capacity, pick value and germinative value. The average number of alleles per locus (A), expected heterocigosity (He), observe heterocigozity (Ho), fix index

(F), Wright F statistics and number of migrants per generation were estimated for both populations. The multilocus crossing rate, the singlelocus crossing rate and the paternal correlation were calculated for 12 trees from La Selva. Significant differences ($p < 0.05$) were found between populations, among density and density x population interaction for reproductive indicators. The highest percentage (36 %) of filled seeds was found in the highest tree density in La Selva. The lowest endogamy index was recorded in the highest tree density in both populations. The highest germinative capacity and the highest peak value were found in the lowest tree density in both populations. In general, both populations had a high level of genetic diversity ($A = 8.5$ and $H_e = 0.693$) and a moderate fixed index ($F = 0.137$). A heterocigotes deficit was found when both populations were analyzed together ($F_{IT} = 0.239$) and each other ($F_{IS} = 0.124$). The differentiation ($F_{ST} = 0.131$) was moderate between populations. The number of migrants ($Nm = 1.7$) per generation was higher than one. The multilocus crossing rate ($t_m = 0.596$) was low in stands with the highest tree density. The singlelocus crossing rate was 1.0 in stand with the lowest tree density. The biparental crossing was zero in stands with the lowest tree density. The highest paternal correlation was found in the highest tree density.

Key words: endogamy, genetic diversity, mating system, seed production, seed quality, tree density.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, por permitirme realizar mis estudios de doctorado, en especial al Postgrado en Ciencias Forestales, por contribuir en mi formación personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de doctorado.

A la Línea Prioritaria de Investigación 1 “Manejo Sustentable de Recursos Naturales” y al FIDEICOMISO No. 167304 de Investigación del Colegio de Postgraduados por el presupuesto asignado para el desarrollo de la presente investigación.

A los ejidatarios de los Ejidos La Selva en Huayacocotla, Veracruz y Villa Cuauhtémoc en Chignahuapan, Puebla por las facilidades brindadas durante el trabajo de campo.

Al personal técnico del vivero forestal: C. Maximino, Raúl, Lauro, Manuel y Alejandro por su colaboración durante el registro de datos y producción de planta.

A Laura Carrillo Reyes por la asistencia técnica brindada en laboratorio y al Dr. Amalio Santacruz Varela por las facilidades brindadas.

A la Dra. Hilda Silva Rojas del Postgrado en Producción de Semillas del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por el apoyo otorgado para la realización del análisis molecular.

Al Dr. Moisés Alberto Cortes Cruz, por los recursos asignados durante mi estancia en el Centro Nacional de Recursos Genéticos, y al Biol. Sergio Gabriel Olvera Vázquez y M.C. Blanca Amalia Amaro González por el apoyo técnico otorgado.

A todos los miembros de mi consejo particular, en especial al Dr. Carlos Ramírez Herrera por sus enseñanzas, consejos y guía brindados y por su sincera amistad.

A Edgar Hernández Máximo por los conocimientos compartidos, el tiempo dedicado y por todo el apoyo brindado durante la realización de mi trabajo de investigación.

A Liliana Muñoz Gutiérrez por su invaluable apoyo profesional y personal en cada etapa de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	4
CAPITULO II. EFECTO DE LA DENSIDAD ARBÓREA EN CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE CONOS Y SEMILLAS DE ÁRBOLES SELECTOS EN DOS POBLACIONES NATURALES DE <i>Pinus patula</i>	
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Sitios de estudio y recolecta de conos.....	9
Densidad arbórea.....	9
Indicadores reproductivos.....	10
Análisis de datos.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
Peso seco de cono.....	13
Potencial productivo.....	13
Porcentaje de óvulos abortados.....	15
Porcentaje de semilla llena.....	16
Porcentaje de semilla vana.....	17
Porcentaje de semilla dañada.....	18
Índice de endogamia.....	18
Peso de semillas.....	19
Eficiencia reproductiva.....	20
CONCLUSIONES.....	21
LITERATURA CITADA.....	22

CAPITULO III. GERMINACIÓN DE SEMILLAS RECOLECTADAS EN SITIOS CON DIFERENTE DENSIDAD EN DOS POBLACIONES NATURALES DE <i>Pinus patula</i>	
RESUMEN.....	29
INTRODUCCIÓN.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Poblaciones muestreadas y recolecta de conos.....	32
Densidad arbórea.....	32
Germinación.....	33
Análisis de datos.....	34
RESULTADOS.....	35
Capacidad germinativa.....	35
Valor pico.....	38
Valor germinativo.....	38
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	42
LITERATURA CITADA.....	43
CAPITULO IV. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA, Y SISTEMA DE CRUZAMIENTO DE ÁRBOLES SELECTOS EN POBLACIONES NATURALES DE <i>Pinus patula</i>	
RESUMEN.....	47
INTRODUCCIÓN.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
Muestreo para el análisis de diversidad y estructura genética.....	51
Muestreo para el análisis del sistemas de cruzamiento.....	53
Análisis de datos.....	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
Diversidad genética.....	57
Estructura genética.....	59
Sistema de cruzamiento.....	62
CONCLUSIONES.....	66
LITERATURA CITADA.....	67
CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES.....	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
2.1.	Nivel de significancia del análisis conjunto y del análisis por separado para características de conos y semillas en dos poblaciones de <i>Pinus patula</i>	12
2.2.	Medias (\pm error estándar) de características reproductivas de árboles individuales de <i>Pinus patula</i> en diferentes condiciones de densidad arbórea en dos poblaciones	14
3.1.	Nivel de significancia de la densidad de árboles en las características de germinación evaluadas en la semilla de dos poblaciones de <i>Pinus patula</i>	35
3.2.	Medias (\pm error estándar) de los estimadores de los parámetros germinativos de semillas de <i>Pinus patula</i> en diferentes condiciones de densidad arbórea en dos poblaciones	36
4.1.	Iniciadores que se utilizaron para la amplificación de microsatélites para el análisis de diversidad genética de dos poblaciones de <i>Pinus patula</i>	52
4.2.	Iniciadores utilizados en la amplificación de microsatélites para determinar la tasa de cruzamiento en árboles de <i>Pinus patula</i>	
4.3.	Estimaciones de diversidad genética en dos poblaciones naturales de <i>Pinus patula</i>	57
4.4.	Valores de los estadísticos F de Wright para ocho loci polimórficos en dos poblaciones de <i>Pinus patula</i>	59
4.5.	Tasa de cruzamiento t_m y t_s (\pm error estándar) en dos grupos de árboles de <i>Pinus patula</i> con diferente densidad de población en La Selva.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
3.1.	Capacidad germinativa de semilla de <i>Pinus patula</i> recolectada en distintas densidades de las poblaciones La Selva (a) y Villa Cuauhtémoc (b)	37
4.1	Protocolo empleado para la amplificación de ADN de <i>Pinus patula</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	53
4.2	Distribución de individuos dentro del ejido La Selva empleados en el análisis de sistema de cruzamiento.....	54

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

En general, las coníferas presentan niveles altos de diversidad genética dentro de poblaciones; sin embargo, la magnitud y la distribución de la diversidad genética en poblaciones naturales está influenciada por el patrón del sistema de cruzamiento entre los individuos (Ledig, 1998; White *et al.*, 2007). El sistema de cruzamiento determina la estructura genética de la población e incide en la calidad de la semilla recolectada para los programas de conservación de recursos genéticos y las plantaciones forestales (Zobel y Talbert, 1988; White *et al.*, 2007; del Castillo y Trujillo, 2008).

El sistema de cruzamiento depende de los atributos particulares de la biología reproductiva de las especies (del Castillo y Trujillo, 2008). Las semillas pueden ser producto de autofecundación o del cruzamiento en especies monoicas (Kormut'ak y Lindgren, 1996). La autofecundación favorece la diferenciación de la población, la adaptación local y la expresión de alelos recesivos en un extremo de la variación del sistema de cruzamiento (del Castillo y Trujillo, 2008). Al otro extremo, la unión aleatoria de los gametos y el cruzamiento aleatorio promueven el flujo de genes, homogeniza poblaciones, aumenta la heterocigosidad y favorece el equilibrio de ligamiento gamético (Ledig, 1998; del Castillo y Trujillo, 2008).

Aunque en la mayoría de las especies forestales con polinización anemófila predomina el sistema de polinización cruzada, factores como la densidad de plantas pueden interferir y modificar el patrón de cruzamiento en las poblaciones (Farris y Mitton, 1984; El-Kasaby y Jaquish, 1996; Ayari *et al.*, 2011). El cambio en el tamaño de la población y la distribución de los individuos dentro de ésta pueden afectar el sistema de cruzamiento (del Castillo y Trujillo, 2008). No obstante, en coníferas no se

ha encontrado una relación clara entre las tasas de cruzamiento y la densidad arbórea (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2006; Fageria y Rajora, 2013).

El sistema de cruzamiento se estima generalmente a partir de semillas germinadas (Morgante *et al.*, 1991). Sin embargo, durante el desarrollo temprano del embrión abortan una proporción alta de cigotos autofecundados debido a la acción de alelos deletéreos, lo que conduce a la producción de semillas vanas (Karkkainen y Savolainen, 1993). De esta manera, en las estimaciones de las tasas de cruzamiento con base en semillas germinadas no se consideran los efectos letales embrionarios sobre la producción de semillas, por lo que únicamente se registra en este tipo de evaluaciones el cruzamiento efectivo o eventos de endogamia tolerables (Rajora *et al.*, 2000). Las estimaciones de la diversidad genética, los patrones del sistema de cruzamiento y la evaluación de características reproductivas proporcionan una comprensión de los procesos genéticos en una población, y son útiles en la evaluación y monitoreo de la viabilidad de poblaciones (Rajora *et al.*, 2000). Bajo este contexto, en esta investigación se plantearon los objetivos siguientes: a) estudiar la diversidad y la estructura genética de árboles selectos en dos poblaciones naturales de *Pinus patula*; b) analizar si las características reproductivas de los árboles varían entre y dentro de poblaciones como efecto de la densidad poblacional; c) evaluar la calidad germinativa de la semilla recolectada en sitios con densidad arbórea diferente; y d) comparar el sistema de cruzamiento de árboles de *P. patula* como efecto de la densidad poblacional en la que crecen. Dichos objetivos están enfocados a discernir sobre la presencia de endogamia en las poblaciones estudiadas como respuesta a un efecto de la densidad arbórea y factores asociados a ésta, y su impacto sobre la producción de semilla en poblaciones naturales de *P. patula*. Se establecieron las hipótesis: a1) la diversidad genética de *P. patula* es alta en las dos poblaciones estudiadas; a2) existe un flujo de genes alto entre las

poblaciones por lo que la diferenciación entre éstas es mínima; b1) las características reproductivas en los árboles de *P. patula* analizados varían como efecto de la densidad poblacional; b2) en los rodales con densidad poblacional baja el nivel de endogamia es mayor; c1) la calidad germinativa de la semilla es afectada por la densidad de la población; c2) la semilla recolectada en rodales con densidad arbórea alta es de mejor calidad que la semilla recolectada en rodales con densidad poblacional baja; d1) la densidad arbórea influye de manera positiva en la tasa de cruzamiento de *P. patula*; y d2) en los sitios con densidad arbórea baja se presentan niveles altos de autofecundación.

LITERATURA CITADA

- Ayari A., D. Moya, M.N. Rejeb, B. Mansoura, A. Albouch, J. de Las Heras, T. Fezzani, and B. Henchi. 2011. Geographical variation on cone and seed production of natural *Pinus halepensis* Mill. forests in Tunisia. *Journal of Arids Environments* 75: 403-410.
- del Castillo, R.F., and S. Trujillo. 2008. Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. *New Phytologist* 177: 517-524.
- El-Kassaby, Y.A., and B. Jaquish. 1996. Population density and matting pattern in Western Larch. *Journal of Heredity* 87: 438-443.
- Fageria, M.S., and O.P. Rajora. 2013. Effects of harvesting of increasing intensities on genetic diversity and population structure of white spruce. *Evolutionary Applications* 6: 778-794.
- Farris, M.A., and J.B. Mitton. 1984. Population density, outcrossing rate, and heterozygote superiority in ponderosa pine. *Evolution* 38: 1151-1154.
- Kärkkäinen, K., and O. Savolainen, 1993. The degree of early inbreeding depression determines the selfing rate at the seed stage: model and results from *Pinus sylvestris* (Scots pine). *Heredity* 71: 160-166.
- Kormut'ak, A., and D. Lindgren. 1996. Mating system and empty seeds in silver fir (*Abies alba* Mill.). *Forest Genetics* 3: 231-235.
- Ledig, F.T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: D. M. Richardson (ed.) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge. pp: 251-280.
- Morgante, M., G. G. Vendramin, and P. Rossi. 1991. Effects of stand density on outcrossing rate in two Norway spruce (*Picea abies*) populations. *Canadian Journal of Botany* 69: 2704-2708.

- O'Connell, L.M., A. Mosseler, and O.P. Rajora. 2006. Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97:418-426.
- Rajora, P.O., A. Mosseler, and J.E. Major. 2000. Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. II. Genetic diversity, population structure, and mating behavior. *Canadian Journal of Botany* 78: 941–956.
- Robledo-Arnuncio, J.J., P.E. Smouse, L. Gil, and R. Alía. 2004. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *Forest Ecology and Management* 197: 245-255.
- White, T. L., W.T. Adams, and D.B. Neale. 2007. *Forest Genetics*. CABI Publishing. Cambridge, U.S.A. 682 p.
- Zobel, B.J., y J.T. Talbert. 1988. *Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales*. Limusa. North Carolina State University. NC. 545 p.

CAPÍTULO II

EFFECTO DE LA DENSIDAD ARBÓREA EN CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE CONOS Y SEMILLAS DE ÁRBOLES SELECTOS EN DOS POBLACIONES NATURALES DE *Pinus patula*

RESUMEN

La densidad arbórea del rodal puede afectar la calidad de la semilla recolectada en poblaciones naturales para los programas de conservación de recursos genéticos y las plantaciones forestales debido a que ésta influye en la producción y dispersión de polen dentro de la población. La variación en características de conos y producción de semilla de *Pinus patula* en poblaciones naturales como efecto de la densidad arbórea en la que crecen los árboles fue investigada. Las variables peso seco de cono, potencial productivo, porcentaje de óvulos abortados, porcentaje de semillas (llenas, vanas y dañadas), índice de endogamia, peso de semilla y eficiencia reproductiva fueron evaluadas en 79 individuos procedentes de dos poblaciones naturales que se encontraron distribuidos en un gradiente de densidad poblacional que varió desde menos de 50 hasta más de 500 árboles ha⁻¹. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre poblaciones, entre densidades y en la interacción densidad*población se encontraron. El peso seco de cono, el porcentaje de semillas llenas, el peso de semillas y la eficiencia reproductiva fueron superiores en los árboles muestreados en la población Villa Cuauhtémoc. La producción de semilla vana y el índice de endogamia fueron mayores en sitios con densidad arbórea menor en La Selva. El índice de endogamia más bajo se encontró en la densidad mayor a 500 individuos ha⁻¹ en ambas poblaciones; sin embargo, en Villa Cuauhtémoc no se observó una tendencia lineal con respecto a la densidad poblacional.

Palabras clave: características reproductivas, densidad, endogamia, producción de semillas.

INTRODUCCIÓN

Pinus patula Schiede ex Schltdl. et Cham. es una especie monoica y anemófila endémica de México (Perry, 1991), considerada importante para el establecimiento de plantaciones comerciales en zonas tropicales y subtropicales con fines de producción de madera (Dvorak *et al.*, 2000). Los programas de mejoramiento genético de *P. patula* se iniciaron en otros países en la década de 1970 (Dvorak, 1997). En México los primeros esfuerzos de investigación en relación con la selección fenotípica y la evaluación genética para incrementar productividad y calidad de la madera de *P. patula* se implementaron en la década de los noventa y recientemente a nivel operativo (Sáenz-Romero *et al.*, 1994; Valencia *et al.*, 1995; Salaya-Domínguez *et al.*, 2012; Morales-González *et al.*, 2013). No obstante, la producción de planta de *P. patula* en México se realiza con germoplasma recolectado sin ningún control de los árboles en rodales naturales, lo que generalmente ocasiona problemas de adaptación y tasas bajas de crecimiento en las plantaciones.

En especies monoicas las semillas pueden ser producto de autofecundación o del cruzamiento entre individuos (Kormut'ak y Lindgren, 1996). Cuando las semillas son resultado de la autofecundación o del cruzamiento entre individuos emparentados, la endogamia afecta negativamente las características de valor adaptativo de los individuos, provocando el aborto de embriones debido a la presencia de alelos recesivos letales en condición homocigota, lo que conduce a la producción de semillas vanas (Ledig *et al.*, 2000; Mosseler *et al.*, 2000; Rajora *et al.*, 2000) y a una reducción en la proporción de semillas llenas (Kormut'ak y Lindgren, 1996; Williams *et al.*, 1999). Por ello, el porcentaje de semillas vanas comúnmente se utiliza como un indicador del grado de endogamia, mientras que la proporción de semillas llenas es útil como un estimador

de la tasa de cruzamiento entre individuos (Ledig *et al.*, 2000; Mosseler *et al.*, 2000; Rajora *et al.*, 2000).

En general, las coníferas presentan tasas altas de cruzamiento que varían entre y dentro de especies por la influencia de factores genéticos o ambientales. Uno de los factores ambientales que determinan las tasas de cruzamiento es la densidad arbórea (Farris y Mitton, 1984). En especies polinizadas por el viento, la tasa de autofecundación generalmente se correlaciona de manera negativa con el tamaño y densidad poblacional; por lo tanto, un incremento de la endogamia se asocia a poblaciones con densidades bajas (Farris y Mitton, 1984; Mimura y Aitken, 2007).

La distribución espacial de los individuos y el patrón del sistema de cruzamiento entre los individuos influyen en la magnitud y en la distribución de la variación genética en poblaciones naturales, afectando potencialmente la estructura genética de la siguiente generación e incidiendo en la calidad de la semilla recolectada para los programas de conservación de recursos genéticos y plantaciones forestales (Zobel y Talbert, 1988; White *et al.*, 2007). La evaluación de características de conos y semillas son útiles como indicadores del estado reproductivo para la evaluación y monitoreo de la viabilidad de una población (Mosseler *et al.*, 2000). Esta información puede ser útil para elaborar programas de manejo y de conservación genética de poblaciones (Morgante *et al.*, 1991). Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la variación en las características reproductivas de árboles de *Pinus patula* entre y dentro de poblaciones como respuesta al efecto de la densidad arbórea en los procesos de endogamia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio y recolecta de conos

Un total de 753 conos de 79 árboles fenotípicamente superiores de *Pinus patula* se recolectaron en el periodo de diciembre 2012 a enero 2013 en dos rodales naturales en los que existe un gradiente de densidad poblacional que varía desde menos de 50 hasta más de 500 árboles adultos por hectárea, en los ejidos de Villa Cuauhtémoc, municipio de Chignahuapan, Puebla (19° 42' 30" N, 98° 06' 08" O; 2,626 m s.n.m., 39 árboles) y La Selva, municipio de Huayacocotla, Veracruz (20° 34' 37" N, 98° 31' 05" O; 1,855 m s.n.m., 40 árboles). Los conos se colocaron en bolsas de papel identificadas con el número del árbol. El beneficio de la semilla se realizó en el laboratorio del vivero del Postgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Densidad arbórea

La densidad poblacional en el vecindario de cada árbol muestreado se estimó a través del método de muestreo cuadrantes centrados en un punto (Mostacedo y Fredericksen, 2000). La densidad de árboles del vecindario, expresada en número de individuos por hectárea se calculó utilizando la ecuación siguiente:

$$Dh = 10000 / (\bar{D})^2$$

En donde Dh es el número de árboles por hectárea; y \bar{D} es el promedio de las distancias del individuo adulto de la especie más cercano en cada cuadrante hacia el árbol muestra, colocado en el punto central. De esta manera, los individuos muestreados se agruparon en cuatro categorías de densidad poblacional, de acuerdo al número de árboles por hectárea estimado alrededor de cada uno de ellos, con rangos de 1 a 50, 51 a 250, 251 a 500 y >500 individuos ha^{-1} . El número de individuos incluidos dentro de cada categoría

fueron 17, 9, 10 y 3, respectivamente, para Villa Cuauhtémoc y 10, 11, 7 y 12 árboles para La Selva.

Indicadores reproductivos

De dos a quince conos maduros por árbol se seleccionaron al azar, según su disponibilidad. Los conos se colocaron individualmente en bolsas de plástico dentro de un invernadero para el secado y la apertura de las escamas, y la extracción de las semillas. Posteriormente, las semillas que permanecieron en las escamas se liberaron golpeando ligeramente el cono sobre una mesa y con agujas de disección y espátulas se extrajeron las semillas que quedaron atrapadas en las escamas.

El análisis de conos se realizó de acuerdo al procedimiento establecido por Bramlett *et al.* (1977). Las escamas infértiles y fértiles se contaron para determinar el potencial de semillas. Se contaron los óvulos abortados. Las semillas se desalaron manualmente, y aquellas con testa desarrollada se separaron en vanas, llenas y dañadas. Una semilla se consideró llena cuando permanecía firme al ejercer presión sobre ella. Una semilla dañada se identificó cuando presentó daños evidentes ocasionados por hongos, insectos u otros agentes. Las semillas llenas y semillas vanas por cono se contaron, y el peso de las semillas llenas por cono se registró utilizando una balanza analítica. Después de extraer la semilla, los conos se secaron en un horno eléctrico Shell Lab® a 75 °C durante 72 horas para obtener su peso seco.

Análisis de datos

El potencial productivo es el número máximo de semillas que un cono es biológicamente capaz de producir (Bramlett, 1979), y se calculó como el número de escamas fértiles multiplicado por dos. El peso promedio de una semilla se calculó dividiendo el peso total de las semillas que contenía un cono entre el número de semillas. El porcentaje de semillas vanas, llenas y dañadas se calculó con respecto al

potencial de semillas. La relación entre el peso de semillas llenas con respecto al peso seco de cono se consideró como un índice de la eficiencia reproductiva (Mosseler *et al.*, 2000). También se calculó como un índice de endogamia la proporción de semillas vanas con respecto a las semillas desarrolladas (Mosseler *et al.*, 2000), lo que se basa en el supuesto de que las semillas vanas son el resultado de la acción de genes deletéreos en estado homocigótico como consecuencia del efecto de endogamia (Mosseler *et al.*, 2000). El análisis de varianza se realizó con el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, 1999) para características de conos y semillas con base en el modelo siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + D_j + P_i * D_j + A(D)_{jk} + E_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijkl} es la característica de la semilla del l -ésimo cono ($l= 2-15$) del k -ésimo árbol de la j -ésima densidad (1-4) en la i -ésima población; μ es la media poblacional; P es la población; D es la densidad; A es el árbol y E es el error experimental. Las poblaciones, las densidades y la interacción densidad * población se consideraron de efecto fijo, y a los árboles anidados dentro de densidades se supuso como efecto aleatorio. Para cada población por separado se realizó un análisis utilizando el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + A(D)_{ij} + E_{ijk}$$

Los datos de porcentaje de semillas se transformaron utilizando la función arcoseno de la raíz cuadrada de los valores de porcentaje antes de su análisis. Cuando se encontraron diferencias ($p < 0.05$) se realizó una comparación de medias. El coeficiente de correlación de Pearson se calculó para las variables porcentaje de semillas llenas, porcentaje de semillas vanas e índice de endogamia con la densidad poblacional, usando el procedimiento CORR del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diferencias a una $p < 0.05$ entre poblaciones se encontraron para el peso seco del cono, el porcentaje de semillas llenas y vanas, el índice de endogamia, el peso de semilla y la eficiencia reproductiva. Entre densidades se encontraron diferencias ($p < 0.05$) para el porcentaje de semillas vanas y el índice de endogamia. La interacción densidad por población resultó significativa ($p < 0.05$) para el porcentaje de óvulos abortados, el porcentaje de semillas llenas, el índice de endogamia y el peso de semilla (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Nivel de significancia del análisis conjunto y del análisis por separado para características de conos y semillas en dos poblaciones de *Pinus patula*.

Característica reproductiva	Fuente de variación			Población	
	P	D	P*D	Villa Cuauhtémoc	La Selva
Peso seco de cono	0.008*	0.840	0.068	0.5377	0.0154*
Potencial productivo	0.426	0.364	0.169	<0.0001*	<0.0001*
Porcentaje de óvulos abortados	0.952	0.504	0.040*	0.0157*	<0.0001*
Porcentaje de semillas llenas	0.034*	0.546	0.021*	0.0008*	<0.0001*
Porcentaje de semillas vanas	<0.0001*	0.047*	0.137	<0.0001*	<0.0001*
Porcentaje de semillas dañadas	0.668	0.640	0.684	0.5972	<0.0001*
Índice de endogamia	<0.0001*	0.042*	0.033*	<0.0001*	<0.0001*
Peso promedio de una semilla	0.006*	0.859	0.002*	<0.0001*	<0.0001*
Eficiencia reproductiva	0.039*	0.259	0.063	<0.0001*	0.0007*

* $p < 0.05$

En un análisis por separado para cada población se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre densidades para todas las variables excepto para el peso seco de cono y el porcentaje de semillas dañadas en Villa Cuauhtémoc (Cuadro 2.1).

Peso seco de cono

Los conos recolectados en la población Villa Cuauhtémoc tuvieron un peso promedio mayor (33 g) que aquellos (29 g) recolectados en la población de La Selva (Cuadro 2.2). La densidad de población no influyó en el peso de los conos en la población Villa Cuauhtémoc, sin embargo, en La Selva los conos de menor peso se encontraron en la densidad de 251 a 500 individuos ha⁻¹. En otros estudios se encontró que la densidad influyó en el peso de cono de *Abies pinsapo* Boiss., el peso de los conos fue mayor en densidades arbóreas altas, probablemente como resultado de una mayor cantidad de elementos minerales para el desarrollo de los frutos (Arista y Talavera, 1996).

Potencial productivo

El potencial productivo fue similar en ambas poblaciones con valores promedio de 183 y 179 semillas potenciales por cono, para Villa Cuauhtémoc y La Selva, respectivamente. El potencial productivo no presentó consistencia con respecto a la densidad en las dos poblaciones, ya que en La Selva el potencial productivo mayor se registró en la densidad de 1-50 individuos ha⁻¹, mientras que en Villa Cuauhtémoc fue mayor en la densidad superior a 500 individuos ha⁻¹ (Cuadro 2.2). En otros estudios, Bustamante-García *et al.* (2012) encontraron diferencias entre sitios para potencial productivo de semillas en *Pinus engelmannii* Carr., que atribuyeron a la calidad del sitio y características genéticas de los árboles.

Cuadro 2.2. Medias (\pm error estándar) de características reproductivas de árboles individuales de *Pinus patula* en diferentes condiciones de densidad arbórea en dos poblaciones.

Densidad (Individuos ha ⁻¹)	Peso seco cono (g)	Potencial productivo	POA	Porcentaje de semillas			Índice de endogamia	PPS (mg)	Eficiencia reproductiva (mg g ⁻¹)
				Llenas	Vanas	Dañadas			
Villa Cuauhtémoc									
1-50	33.5 \pm 0.6 a	181 \pm 2.3 b	49.0 \pm 1.2 b	40.2 \pm 1.2a	9.5 \pm 0.6 b	0.8 \pm 0.2 a	19.4 \pm 1.2 b	8.4 \pm 0.002 c	18.6 \pm 0.6 a
51-250	34.4 \pm 0.7 a	184 \pm 2.9 b	52.8 \pm 1.5 a	37.8 \pm 1.5a	9.0 \pm 0.7 b	0.4 \pm 0.1 a	20.4 \pm 1.6 b	8.8 \pm 0.003 b	17.6 \pm 0.8 a
251-500	34.2 \pm 0.7 a	175 \pm 2.8 b	55.0 \pm 1.4 a	32.8 \pm 1.4b	11.5 \pm 0.7 a	0.6 \pm 0.1 a	27.0 \pm 1.5 a	8.3 \pm 0.003 d	13.8 \pm 0.7 b
>500	35.1 \pm 1.1 a	200 \pm 4.6 a	54.7 \pm 2.3 a	40.2 \pm 2.3a	4.3 \pm 0.1 c	0.7 \pm 0.2 a	13.6 \pm 2.5 c	9.3 \pm 0.005 a	20.8 \pm 1.2 a
Promedio	33.0 \pm 1.2 A	183 \pm 4.5 A	53.8 \pm 2.3 A	37.5 \pm 2.0 A	8.2 \pm 1.1 B	0.65 \pm 0.16 A	19.5 \pm 2.1 B	8.6 \pm 0.31 A	17.6 \pm 1.0 A
La Selva									
1-50	28.6 \pm 0.5 a	190 \pm 2.9 a	54.2 \pm 1.5b	28.2 \pm 1.3 b	17.0 \pm 0.7 a	0.5 \pm 0.1b	40.0 \pm 1.4 a	7.6 \pm 0.02 b	14.1 \pm 0.6 b
51-250	27.4 \pm 0.5 a	177 \pm 2.8 b	61.2 \pm 1.4 a	26.9 \pm 1.3 b	11.2 \pm 0.7 b	0.6 \pm 0.1 b	30.7 \pm 1.4 b	7.9 \pm 0.02 a	13.3 \pm 0.6 b
251-500	26.6 \pm 0.6 b	171 \pm 3.6 b	53.9 \pm 1.9 b	33.8 \pm 1.7 b	11.8 \pm 0.9 b	0.4 \pm 0.2 b	27.4 \pm 1.8 bc	7.3 \pm 0.02 c	15.8 \pm 0.8 a
>500	28.8 \pm 0.5 a	173 \pm 3.1 b	49.0 \pm 1.3 c	37.6 \pm 1.5 a	12.1 \pm 0.8 b	1.3 \pm 0.1 a	23.8 \pm 1.5c	7.3 \pm 0.02 c	16.7 \pm 0.7 a
Promedio	29.1 \pm 1.0 B	179 \pm 3.6 A	53.3 \pm 2.3 A	32.4 \pm 1.6 B	13.1 \pm 0.86 A	0.73 \pm 0.13 A	30.1 \pm 1.7 A	7.6 \pm 0.24 B	15.1 \pm 0.8 B

Medias con letras iguales dentro de cada población no son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$). Porcentaje de óvulos abortados (POA); Peso promedio de semilla (PPS).

El potencial productivo registrado en ambas poblaciones fue superior a lo reportado para la misma especie, tanto en poblaciones naturales como en huertos semilleros en otros estudios (Dvorak *et al.*, 2000; Ramírez-García *et al.*, 2013; Hagedorn, 2001), y para otras especies del mismo género tales como *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham. (Morales-Velázquez *et al.*, 2010), *P. hartwegii* Lindl. (Alba-Landa *et al.*, 2003) y *P. greggii* Engelm. ex Parl. (López-Upton y Donahue, 1995). Posiblemente, la diferencia en resultados en esta variable con respecto a otros estudios de la misma especie se debió a una variación menor en las condiciones ambientales en las poblaciones incluidas en el presente estudio.

Porcentaje de óvulos abortados

No se encontraron diferencias en el porcentaje de óvulos abortados entre poblaciones pero sí entre densidades dentro de cada población (Cuadro 2.1). El porcentaje de óvulos abortados fue menor en los sitios con densidad superior a 500 individuos ha⁻¹ en La Selva, mientras que en el porcentaje de óvulos abortados menor se presentó en la densidad más baja en Villa Cuauhtémoc (Cuadro 2.2). En ambas poblaciones, los valores fueron menores a los encontrados en *Pinus leiophylla* (Gómez *et al.*, 2010; Morales-Velázquez *et al.*, 2010) y mayores que en *P. greggii* (Lopez-Upton y Donahue, 1995), *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Mápula-Larreta *et al.*, 2007), *Pinus engelmannii* (Bustamente-García *et al.*, 2012) y *Picea mexicana* Martínez (Flores-López *et al.*, 2005). El porcentaje alto de óvulos abortados en ambas poblaciones de *Pinus patula* podría indicar una producción baja de polen, como se observó en *P. halepensis* (Goubitz *et al.*, 2002). La deficiencia en disponibilidad de agua y minerales, la falta de sincronía floral y cantidad y calidad baja del polen aumentaron el porcentaje de óvulos abortados en otras coníferas como *P. halepensis* (Goubitz *et al.*, 2002) y *Pseudotsuga menziesii* (Burczyk y Chalupka, 1997). El aborto de óvulos también se ha asociado con una disminución del vigor y viabilidad de polen causado por temperaturas bajas durante el periodo de polinización en *Pinus banksiana* Lamb. (Despland y

Houle, 1997). Bajo esta perspectiva, es posible que la receptividad de los estróbilos femeninos de *P. patula* coincidió con un periodo de producción baja de polen en las poblaciones estudiadas.

Porcentaje de semilla llena

El porcentaje de semilla llena por cono fue generalmente superior en Villa Cuauhtémoc, con un intervalo entre 32.8 y 40.2 %, mientras que en La Selva los valores oscilaron entre 26.9 y 37.6 % (Cuadro 2.2). Se encontró significancia en la interacción densidad * población para esta variable (Cuadro 2.1). En ambas poblaciones, la producción mayor de semilla llena se registró en la categoría superior de densidad, aunque en Villa Cuauhtémoc la producción de semilla llena no sigue una tendencia con respecto a la densidad, encontrando también altos porcentajes de semilla llena en densidades bajas. Por otro lado, la producción de semilla llena fue menor en las densidades inferiores en La Selva (Cuadro 2.2). La correlación entre densidad arbórea y porcentaje de semilla llena (0.24, $p < 0.0001$; y 0.02, $p < 0.687$) en La Selva y Villa Cuauhtémoc, respectivamente) fue baja o nula en cada población por separado. La correlación baja en La Selva coincidió con los resultados reportados por Stoehr (2000) en árboles de *Larix occidentalis* Nutt. La cantidad de semillas llenas de *P. patula* que se produjo por autofecundación fue 19 % menor que cuando la semilla se originó por cruzamiento entre individuos no emparentados (Williams *et al.*, 1999). Generalmente, la producción menor de semillas llenas se asocia a un incremento de la autofecundación en sitios con densidades arbóreas bajas lo que aumenta la probabilidad de que alelos deletéreos formen genotipos homocigóticos y provoquen el aborto de embriones aumentando la cantidad de semilla vana (Arista y Talavera, 1996; Kormut'ak y Lindgren, 1996; Hedrick *et al.*, 1999). Sin embargo, también es importante considerar que un número reducido de árboles por superficie facilita el movimiento del viento, lo que puede incrementar la eficiencia de la dispersión del polen proveniente de fuentes lejanas en especies anemófilas (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2003; Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004; del Castillo y

Trujillo, 2008). Por lo tanto una proporción alta de la semilla llena que se produce en sitios con densidad arbórea baja puede ser resultado de la fecundación de los óvulos por polen que el viento transportó de rodales distantes (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004). Dicho escenario podría explicar el porcentaje alto de semilla llena encontrado en las densidades bajas de Villa Cuauhtémoc.

Porcentaje de semilla vana

En el porcentaje de semilla vana se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre poblaciones, densidades, y en la interacción densidad*población (Cuadro 2.1). A nivel de población, la producción de semilla vana fue mayor en La Selva que en Villa Cuauhtémoc (Cuadro 2.2). Dentro de poblaciones se observó un efecto diferencial de la densidad sobre esta variable. El porcentaje de semilla vana se redujo significativamente de la densidad 1-50 individuos ha^{-1} a las densidades superiores en La Selva. En tanto que en Villa Cuauhtémoc, aunque la producción de semilla vana menor se registró en la densidad más alta, no se encontró una tendencia definida con respecto a las otras densidades (Cuadro 2.2). El coeficiente de correlación de Pearson entre el porcentaje de semillas vanas y densidad fue de -0.10 ($p=0.062$) y -0.14 ($p=0.003$) en Villa Cuauhtémoc y La Selva, respectivamente, por lo que no se encontró una asociación entre estas variables. El valor promedio en La Selva (13.1 %) es mayor que el porcentaje (9.7 %) de semillas vanas reportado para *Pinus greggii* (López-Upton y Donahue, 1995) y menor que el porcentaje de semillas vanas (20 %) encontrado en *Picea martinezii* T.F. Patterson (Flores-López *et al.*, 2012). La endogamia por autofecundación y cruzamiento entre parientes aumenta la probabilidad de expresión de genes letales (Owens *et al.*, 1994; 2007). Las reducciones severas de la densidad poblacional pueden provocar un aumento de la autofecundación en algunas especies de árboles polinizados por el viento (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004). Dentro de población el porcentaje alto de semilla vana registrado en la densidad menor de La Selva puede atribuirse a una frecuencia mayor de autofecundación, como resultado de un número menor de individuos presentes en estos

sitios, como se ha encontrado en otras coníferas como *Pinus ponderosa* Laws. (Farris y Mitton, 1984), *Larix decidua* Mill. (Slobodník y Guttenberger, 2005) y *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. (Mimura y Aitken, 2007). Por otro lado, en Villa Cuauhtémoc, factores distintos a la densidad como el tamaño efectivo de población y el flujo de genes podrían también estar incidiendo en la producción de semilla (El-Kassaby y Jaquish, 1996; Parraguirre-Lezama *et al.*, 2004; Mimura y Aiken, 2007). Otra causa potencial para el desarrollo de semillas vanas es el ataque de insectos (Bramlett *et al.*, 1977; Mosseler *et al.*, 2000; Owens *et al.*, 2007; Lesieur *et al.*, 2014); sin embargo, en las poblaciones incluidas en el estudio presente no se observó una alta incidencia de insectos u otros patógenos en la semilla recolectada.

Porcentaje de semilla dañada

El porcentaje de semilla dañada fue bajo en las dos poblaciones (Cuadro 2.2), similar al reportado para *Pseudotsuga menziesii* por Mápula-Larreta *et al.* (2007). El valor máximo (1.3 %) de semillas dañadas se registró en la densidad mayor a 500 individuos ha⁻¹ en La Selva.

Índice de endogamia

El índice de endogamia mostró diferencias ($p < 0.0001$) entre poblaciones y fue significativo en la interacción poblaciones*densidad ($p = 0.033$) (Cuadro 2.1). El índice de endogamia promedio fue mayor en La Selva que en Villa Cuauhtémoc, encontrando los valores inferiores para esta variable en la densidad mayor a 500 individuos en ambas poblaciones, sin embargo, ésta no mostró una tendencia definida en cuanto a la densidad en Villa Cuauhtémoc pero sí en La Selva (Cuadro 2.2). El coeficiente de correlación de Pearson entre el coeficiente de endogamia y la densidad indicó una correlación nula (-0.07 ; $p = 0.196$) entre estas variables en Villa Cuauhtémoc, mientras que en La Selva la correlación fue baja y negativa (-0.27 ; $p < 0.0001$) lo cual podría sugerir que en esta población una reducción en la densidad arbórea provoca un incremento en los

niveles de endogamia. Resultados similares a los encontrados en La Selva se reportaron en *P. brutia* Ten. (Lise *et al.*, 2007) *P. ponderosa* (Farris y Mitton, 1984) y *P. strobus* L. (Buchert *et al.*, 1997) en donde niveles de endogamia altos se asocian a densidades poblacionales bajas. Flores *et al.* (2005) encontraron que una menor densidad de árboles se asoció a una mayor endogamia en poblaciones de *Picea mexicana*, como resultado de una menor producción de polen. En ambas poblaciones, este índice es menor al reportado para otras coníferas que crecen en poblaciones reducidas como *Picea martinezii* (Flores-López *et al.*, 2012), *Pseudotsuga menziesii* (Mápula-Larreta *et al.*, 2007) y *Picea mexicana* (Flores *et al.*, 2005), con valores de 75, 60 y 80 %, respectivamente. En cambio, es similar a los valores encontrados en otras especies de *Pinus* con distribución amplia como *P. brutia* (Lise *et al.*, 2007) *P. ponderosa* (Farris y Mitton, 1984) y *P. strobus* (Buchert *et al.*, 1997), lo cual en general podría sugerir que en las dos poblaciones de *Pinus patula* incluidas en la presente investigación los niveles de endogamia son bajos.

Peso de semillas

El peso promedio estimado para una semilla fue superior en Villa Cuauhtémoc que en La Selva, con valores promedio de 8.6 y 7.6 mg, respectivamente (Cuadro 2.2). La densidad influyó de manera diferencial en el peso de semillas en las dos poblaciones estudiadas. Por ejemplo, en Villa Cuauhtémoc las semillas de mayor peso se registraron en la densidad mayor, mientras que en esta misma categoría de densidad para La Selva se encontró el peso de semillas menor. El peso promedio de la semilla procedente de La Selva fue similar al peso (7.9 mg) que se reportó para *P. patula* en conos recolectados en poblaciones naturales (Mendizábal-Hernández *et al.*, 2006). Mientras que, Castillo-Torres *et al.* (2004) reportaron un peso promedio de semillas de 10 mg en árboles de *P. patula* en un huerto; sin embargo, para ese mismo huerto Márquez *et al.* (2007) encontraron un peso promedio de semillas de 6, 7 y 9 mg en tres cosechas. En este estudio el peso de semilla siguió el patrón reportado para otras especies, donde conos de peso superior

tuvieron semillas más pesadas, como en el caso de *P. halepensis* Mill. (Moya *et al.*, 2008) y *P. pinea* L. (Bouthenia *et al.*, 2013). La presencia de conos de peso mayor y con peso de semilla superior en la población Villa Cuauhtémoc podrían ser una respuesta adaptativa a condiciones ambientales menos favorables, como humedad y temperaturas más bajas que en la población La Selva (CONAGUA, 2015a, 2015b).

Eficiencia reproductiva

El valor promedio de eficiencia reproductiva presentó diferencias ($p=0.039$) entre poblaciones (Cuadro 2.1), siendo superior en Villa Cuauhtémoc (Cuadro 2.2). Las diferencias también fueron evidentes entre densidades dentro de cada población. En Villa Cuauhtémoc la eficiencia reproductiva mayor se encontró en las densidades extremas, mientras que en La Selva se presentó un incremento en las densidades más altas (Cuadro 2.2). La eficiencia reproductiva es un indicador relativo de la energía que un árbol dedica a la producción de semilla y es influenciada por el peso y número de semillas llenas por cono (Mosseler *et al.*, 2000). En ambas poblaciones el valor promedio es mayor que el encontrado en *Pinus leiophylla* (Gómez *et al.*, 2010; Morales-Velázquez *et al.*, 2010), pero menor a los valores de otras coníferas como *Picea rubens* Sarg. (Mosseler *et al.*, 2000), *Picea mexicana* (Flores *et al.*, 2005) y *Pseudotsuga menziesii* (Mápula-Larreta *et al.*, 2007). Una producción mayor de semilla por cono y semillas más grandes producen plantas vigorosas (Mosseler *et al.*, 2000). Los resultados indican que el esfuerzo reproductivo de *Pinus patula* fue mayor en Villa Cuauhtémoc, probablemente como un mecanismo adaptativo a condiciones ambientales menos favorables, como humedad y temperaturas más bajas que en La Selva (CONAGUA, 2015a, 2015b).

CONCLUSIONES

Las características de conos y semillas registraron variación con relación a las densidades arbóreas en las dos poblaciones naturales en las que los árboles crecen en los ejidos de Villa Cuauhtémoc, Chignahuapan, Puebla y La Selva, Huayacocotla, Veracruz. La producción mayor de semilla llena de *P. patula* se encontró en la densidad mayor (>500 árboles ha^{-1}) tanto en la población La Selva como en la población Villa Cuauhtémoc; sin embargo, se encontró también un porcentaje alto de semillas llenas en la densidad menor (< 50 árboles ha^{-1}) en Villa Cuauhtémoc. La producción mayor de semilla vana se encontró en los árboles que crecen en sitios con densidad arbórea menor (< 50 árboles ha^{-1}) en la Selva, mientras que en Villa Cuauhtémoc el valor mayor de producción de semillas vanas se encontró en la densidad intermedia superior (251 a 500 árboles ha^{-1}). El índice de endogamia fue mayor en La Selva que en Villa Cuauhtémoc. Además, en La Selva el índice de endogamia mayor se encontró en la densidad menor (< 50 árboles ha^{-1}), mientras que en Villa Cuauhtémoc el índice mayor de endogamia se encontró en una densidad intermedia (251-500 árboles ha^{-1}).

LITERATURA CITADA

- Alba-Landa, J., A. Aparicio-Rentería, y R.J. Márquez. 2003. Potencial y eficiencia de producción de semillas de *Pinus hartwegii* Lindl. de dos poblaciones de México. *Foresta Veracruzana* 5(1): 3-38.
- Arista, M., and S. Talavera. 1996. Density effect on the fruit-set, seed crop viability and seedling vigour of *Abies pinsapo*. *Annals of Botany* 77: 187-192.
- Bouthenia, A., M.H. El Aouni, and P. Balandier. 2013. Influence of stand and tree attributes and silviculture on cone and seed productions in forests of *Pinus pinea* L. in northern Tunisia. *In: Mutke S., M. Piqué, and R. Calama (eds.). Mediterranean Stone Pine for Agroforestry. CIHEAM/FAO/INIA/IRTA/CESEFOR/CTFC. Zaragoza. Options Méditerranéennes. Série A. Séminaires Méditerranéens. No 105. pp: 9-14.*
- Bramlett, D.L., E.W. Belcher, G.L. De Barr, G.D. Hertel, R.P. karrfalt, C.W. Lantz, T. Miller, K.D. Ware, and H.O. Yates. 1977. Cone analysis of southern pines: A guidebook. Southeast Forest Experiment Station. General Technical Report SE-13. USDA, Forest Service. Asheville, NC. 28 p.
- Bramlett, D.L. 1979. Efficiency of seed production in southern pines seed orchards. Proceedings of the Thirteenth Lake States Forest Tree Improvement Conference. North Central Forest Experiment Station. General Technical Report NC-50. USDA Forest Service. pp: 17-25.
- Buchert, G.P., O.P. Rajora, J.V. Hood, and B.P. Dancik. 1997. Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine in Ontario, Canada. *Conservation Biology* 11: 747-758.
- Burczyk, J., and W. Chalupka. 1997. Flowering and cone production variability and its effects on parental balance in a Scots pine clonal seed orchard. *Annals of Forest Science* 54:129-144.

- Bustamante-García, V., J.A. Prieto-Ruíz, E. Merlín-Bermudes, R. Álvarez-Zagoya, A. Carrillo-Parra, and J.C. Hernández-Díaz. 2012. Potencial y eficiencia de producción de semilla de *Pinus engelmannii* Carr., en tres rodales semilleros del estado de Durango, México. *Madera y Bosques* 18: 7-21.
- CONAGUA. 2015a. Normales climatológicas (1951-2010). Estación 00021140 Chignahuapan, Puebla.
- CONAGUA. 2015b. Normales climatológicas (1951-2010). Estación 00030067 Huayacocotla, Veracruz.
- Castillo-Torres, J.R., L. del C., Mendizábal-Hernández, y E.O. Ramírez-García. 2004. Variación de semillas de *Pinus patula* Schl. et Cham. procedentes de un huerto semillero de tercera generación en Orizaba, Veracruz, México. *Foresta Veracruzana* 6: 27-30.
- del Castillo, R.F., and S. Trujillo. 2008. Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. *New Phytologist* 177: 517-524.
- Despland, E., and G. Houle. 1997. Climate influences on growth and reproduction of *Pinus banksiana* (Pinaceae) at the limit of the species distribution in eastern North America. *American Journal of Botany* 84: 928-937.
- Dvorak, W.S. 1997. The improvement and breeding of *Pinus patula*. Proceedings of the 24th. Southern Forest Tree Improvement Conference. Orlando, Florida. pp: 53-68.
- Dvorak, W.S., G.R. Hodge, J.E. Kietzka, F. Malan, L.F. Osorio, and T.K. Stanger. 2000. *Pinus patula*. In: Conservation & Testing of Subtropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative College of Natural Resources, NCSU. Raleigh. pp: 149-173.
- El-Kassaby, Y.A., and B.C. Jaquish. 1996. Population density and matting pattern in Western Larch. *Journal of Heredity* 87: 438-443.

- Farris, M.A., and J.B. Mitton. 1984. Population density, outcrossing rate, and heterozygote superiority in Ponderosa pine. *Evolution* 38: 1151-1154.
- 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., 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. *Revista Forestal Baracoa* 31:49-58.
- Goubitz, S., M.J.A Werger, A. Shmida, and G. Ne'eman. 2002. Cone abortion in *Pinus halepensis*: the role of pollen quantity, tree size and cone location. *Oikos* 97:125–133.
- Gómez J., D.M., C. Ramírez H., J. Jasso M., y J. López U. 2010. Variación en características reproductivas y germinación de semillas de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33: 297-304.
- Hagedorn, S.F. 2001. Studies on ovulate strobili and seed production of *Pinus patula* in KwaZulu-Natal. *Southern African Forestry Journal* 192: 3-8.
- Hedrick, P.W., O. Savolainen, and K. Kärkkäinen. 1999. Factors influencing the extent of inbreeding depression: an example from Scots pine. *Heredity* 4: 441-450.
- Kormut'ak, A., and D. Lindgren. 1996. Mating system and empty seeds in Silver Fir (*Abies alba* Mill.). *Forest Genetics* 3: 231-235.
- Ledig, F.T., B. Bermejo-Velázquez, P.D. Hodgskiss, D.R. Johnson, C. Flores-López, and V. Jacob-Cervantes. 2000. The mating system and genic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of México's Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1156–1164.

- Lesieur, V., A. Yart, S. Guilbon, P. Lorme, M. Auger, and A. Roque. 2014. The invasive *Leptoglossus* seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity? *Biological Invasions* 16: 1833-1849.
- Lise, Y., Z. Kaya, F. Isik, R. Sabuncu, I. Kandemir, and S. Önde. 2007. The impact of over-exploitation on the genetic structure of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) populations determined by RAPD markers. *Silva Fennica* 41: 211–220.
- López-Upton, J., and J.K. Donahue. 1995. Seed production of *Pinus greggii* Engelm. in natural stands of México. *Tree Planter's Notes* 46: 1-10.
- 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. *Biodiversity and Conservation* 16:727–742.
- Márquez R., J., J. Alba-Landa, y M.H. López. 2007. Variación en semillas de siete familias y tres cosechas de *Pinus patula* Schl. et Cham. de un huerto de tercera generación de selección. *Foresta Veracruzana* 9:35-42.
- Mendizábal-Hernández, L. del C., J. Alba- Landa, y M.I. Cabrera-Callejas. 2006. Variación de semillas de *Pinus patula* Schl. et Cham. con respecto a su posición en el fruto. *Foresta Veracruzana* 8:13-16.
- Mimura, M., and S.N. Aitken. 2007. Increased selfing and decreased effective pollen donor number in peripheral relative to central populations in *Picea sitchensis* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 94: 991-998.
- Morales-Velázquez, M. G., C.A Ramírez-Mandujano, P. Delgado-Valerio, y J. López-Upton. 2010. Indicadores reproductivos de *Pinus leiophylla* Schtdl. et Cham. en la cuenca del Río Ángulo, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 1: 31-38.

- Morales-González, E., J. López-Upton, J. J. Vargas-Hernández, C. Ramírez-Herrera, y A. Gil-Muñoz. 2013. Parámetros genéticos de *Pinus patula* en un ensayo de progenies establecido en dos altitudes. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 155 – 162.
- Morgante, M., G. G. Vendramin, and P. Rossi. 1991. Effects of stand density on outcrossing rate in two Norway spruce (*Picea abies*) populations. *Canadian Journal of Botany* 69: 2704-2708.
- Mostacedo, B., y T.S. Fredericksen. 2000. *Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal*. Santa Cruz, Bolivia. 87 p.
- 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. *Canadian Journal of Botany* 78: 928-940.
- Moya, D., J. De las Heras, F.R. López-Serrano, and V. Leone. 2008. Optimal intensity and age of management in young Aleppo pine stands for post-fire resilience. *Forest Ecology and Management* 255: 3270-3280.
- O'Connell, L.M., A. Mosseler, and O.P. Rajora. 2006. Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97: 418-426.
- Owens, J.N., S.J. Morris, and G.L. Catalano. 1994. How the pollination mechanism and prezygotic and postzygotic events affect seed production in *Larix occidentalis*. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 917-927.
- Owens, J.N., T. Kittirat, and M.F. Mahalovich. 2007. Whitebark pine (*Pinus albicaulis* Engelm.) seed production in natural stands. *Forest Ecology and Management* 255: 803-809.
- Parraguirre-Lezama, C., J.J. Vargas-Hernández, P. Ramírez-Vallejo, y C. Ramírez-Herrera. 2004. Sistema de cruzamiento en cuatro poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Agrociencia* 38: 107-119.

- Perry, J.P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231 p.
- Rajora, P.O., A. Mosseler, and J.E. Major. 2000. Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. II. Genetic diversity, population structure, and mating behavior. Canadian Journal of Botany 78: 941–956.
- Ramírez-García, E., J. C. Sánchez R., J. M. Ramírez, y H. Cruz-Jiménez. 2013. Características de estructuras reproductivas en progenitores seleccionados de *Pinus patula* Schl. et Cham. Foresta Veracruzana 15:37-44.
- Robledo-Arnuncio, J.J., L. Gil, R. Alía, y I. Cañellas. 2003. Efecto de dos métodos selvícolas de regeneración natural sobre la dispersión polínica en masas naturales de *Pinus sylvestris* L. Ecosistemas 3: 1-5.
- Robledo-Arnuncio, J.J., P.E. Smouse, L. Gil, and R. Alía. 2004. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. Forest Ecology and Management 197: 245-255.
- SAS Institute. 1999. SAS/STAT Computer Software. Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, USA.
- Sáenz-Romero, C., H. Nienstaedt, and J.J. Vargas-Hernández. 1994. Performance of *Pinus patula* genotypes selected in South Africa and growing in their native Mexican environment. Silvae Genetic 43: 73-81.
- Salaya-Domínguez, J.M., J. López-Upton, y J.J. Vargas-Hernández. 2012. Variación genética y ambiental en dos ensayos de progenies de *Pinus patula*. Agrociencia 46: 519-534.
- Slobodník, B., and H. Guttenberger. 2005. Zygotic embryogenesis and empty seed formation in European larch (*Larix decidua* Mill.). Annals of Forest Science 62: 129-134.
- Stoehr, M.U. 2000. Seed production of western larch in seed-tree systems in the southern interior of British Columbia. Forest Ecology and Management: 7-15.

- Valencia M., S., C. Ramírez H., y J. J. Vargas H. 1995. Comparación de diferentes métodos de selección en un ensayo de progenie de polinización libre de *Pinus patula*. In: Salazar, R. (ed). Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina: Memoria del Simposio. Managua. pp: 63-69.
- White, T. L., W.T. Adams, and D.B. Neale. 2007. Forest Genetics. CABI Publishing. Cambridge, U.S.A. 682 p.
- Williams, C.G., R.D. Barnes, and I. Nyoka. 1999. Embryonic genetic load for a neotropical conifer, *Pinus patula* Schiede et Deppe. The American Genetic Association 90: 394-398.
- Zobel, B.J., y J.T. Talbert. 1988. Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales. Limusa. México, D.F. 545 p.

CAPÍTULO III

GERMINACIÓN DE SEMILLAS RECOLECTADAS EN SITIOS CON DIFERENTE DENSIDAD EN DOS POBLACIONES NATURALES DE *Pinus patula*

RESUMEN

La densidad poblacional puede afectar negativamente los niveles de endogamia en especies de coníferas con sistema reproductivo mixto y polinización anemófila. Los niveles altos de endogamia influyen sobre las características de valor adaptativo de los individuos, por lo que la germinación de la semilla podría ser afectada negativamente debido a la acumulación de alelos deletéreos. La calidad de la semilla de *Pinus patula* recolectada en rodales con una densidad arbórea que varió de menos de 50 a más de 500 individuos por hectárea se evaluó en dos poblaciones naturales comparando la capacidad germinativa (CG), el valor pico (VP), los días en el que se alcanzó el valor pico (DVP) y el valor de germinación (VG). La capacidad germinativa promedio (60 %) presentó niveles moderados para la especie en ambas poblaciones. La calidad de la semilla recolectada en densidades bajas fue superior a aquella recolectada en sitios con densidad arbórea alta. La capacidad germinativa mayor se registró en la semilla recolectada en rodales con densidad de 1 a 50 individuos ha^{-1} con valores promedio de 57 y 48 % para La Selva y Villa Cuauhtémoc, respectivamente. El valor pico y el valor germinativo también fueron superiores en la densidad menor de Villa Cuauhtémoc, mientras que en La Selva éstos fueron superiores en la densidad de 51 a 250 individuos ha^{-1} . Es probable que una restringida dispersión de polen y la estructura familiar promovieran el cruzamiento entre individuos emparentados en los sitios con densidad arbórea alta incrementando el nivel de endogamia en la progenie. Lo anterior sugiere que es posible dejar relativamente pocos árboles como progenitores en diversas prácticas silvícolas sin afectar los valores germinativos de las semillas.

Palabras clave: calidad de semilla, densidad de arbolado, germinación.

INTRODUCCIÓN

La proporción y velocidad de germinación son indicadores de la calidad de la semilla que permiten evaluar el estatus reproductivo y monitoreo genético de las poblaciones de árboles forestales (Mosseler *et al.*, 2000; Aravanopoulos, 2011). La endogamia puede influir en la germinación de semillas debido a la acumulación de alelos deletéreos en individuos dentro de poblaciones (Baskin y Baskin, 1998). Cuando las semillas resultan de la autofecundación o del cruzamiento entre individuos emparentados, la endogamia puede afectar negativamente las características de valor adaptativo como el tamaño de semilla y la tasa de germinación y crecimiento (Ledig *et al.*, 2000; Rajora *et al.*, 2000).

La densidad demográfica local influye en los niveles de endogamia en especies de coníferas con sistema reproductivo mixto y polinización anemófila (Farris y Mitton, 1984). Generalmente, un incremento en la tasa de autofecundación se asocia a un descenso en la densidad poblacional de árboles con un sistema reproductivo mixto (Farris y Mitton, 1984; Mimura y Aitken, 2007). Se esperaría que la nube de polen que rodea árboles individuales en un rodal con una densidad poblacional baja contenga una proporción alta de su propio polen, aumentando la probabilidad de autofecundación, mientras que en sitios más densos un individuo estará en contacto con una nube de polen que tiene una proporción baja de su propio polen, disminuyendo la probabilidad de autofecundación (Arista y Talavera, 1996). Sin embargo, diversos estudios también han reportado que una reducción de la densidad del dosel puede mejorar la circulación del aire dentro de los bosques lo que contribuye a una mayor dispersión del polen e incrementa la proporción de apareamiento con individuos distantes, aumentando la diversidad en el acervo de polen (Dyer y Sork, 2001; Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2008). De esta manera el aumento de movimiento del polen dentro de estos sitios podría compensar, en cierta medida, una reducción

moderada de la densidad de árboles de la misma especie en términos de la diversidad de los gametos masculinos que contribuyen a la progenie de un individuo (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004).

Pinus patula Schiede ex Schltdl. & Cham. es una especie forestal de importancia económica a nivel mundial (Dvorak *et al.*, 2000) con un sistema reproductivo mixto y polinización anemófila (Perry, 1991), por lo que la densidad poblacional podría influir sobre la calidad de la semilla producida en las poblaciones naturales. La evaluación de estas características es necesaria para implementar programas de manejo de las poblaciones de esta especie con miras a su utilización como fuentes de germoplasma. El objetivo del estudio fue evaluar la calidad germinativa de la semilla recolectada en rodales con densidades arbóreas distintas en dos poblaciones naturales de *Pinus patula*. Se estableció la hipótesis de que la semilla recolectada de árboles que crecen en densidades poblacionales altas tendría un porcentaje de germinación y una velocidad de germinación superiores a la semilla procedente de sitios con densidad poblacional alta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones muestreadas y recolecta de conos

Un total de 616 conos de 60 árboles fenotípicamente superiores de *Pinus patula* se recolectaron en el periodo de diciembre 2012 a enero 2013 en dos poblaciones naturales, en el ejido Villa Cuauhtémoc, municipio de Chignahuapan, Puebla (19° 42' 30" N, 98° 06' 08" O; 2,626 m s.n.m., con 20 árboles) y en el ejido La Selva, municipio de Huayacocotla, Veracruz (20° 34' 37" N, 98° 31' 05" O; 1,855 m s.n.m., con 40 árboles). La densidad arbórea varió de menos de 50 a más de 500 árboles adultos por hectárea en las dos poblaciones. Los árboles se identificaron con un número consecutivo cuando estos fueron seleccionados en 2012. Los conos se colocaron en bolsas de papel identificadas con el número del árbol. El beneficio de la semilla se realizó en el laboratorio del vivero del Postgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Densidad arbórea

La densidad poblacional en el vecindario de cada árbol muestreado se estimó a través del método de muestreo cuadrantes centrados en un punto (Mostacedo y Fredericksen, 2000). La densidad de árboles del vecindario, expresada en número de individuos por hectárea se calculó utilizando la ecuación siguiente:

$$Dh = 10000 / (\bar{D})^2$$

En donde Dh es el número de árboles por hectárea; y \bar{D} es el promedio de las distancias del individuo adulto de la misma especie más cercano en cada cuadrante hacia el árbol muestra, colocado en el punto central.

Los individuos muestreados se agruparon en cuatro categorías de densidad poblacional, de acuerdo al número de árboles por hectárea estimado alrededor de cada uno de ellos, con rangos de 1 a 50, 51 a 250, 251 a 500 y >500 individuos ha⁻¹. El número de individuos incluidos dentro de cada categoría para La Selva fueron 10, 11, 7 y 12 árboles, respectivamente. Debido a que en Villa Cuauhtémoc solo se tuvo un árbol dentro de la categoría de densidad mayor a 500 individuos ha⁻¹ ésta fue excluida del análisis, por tal razón el análisis estadístico se realizó para cada población por separado. Los individuos incluidos en las categorías restantes en esta población fueron 6, 10 y 3 árboles, respectivamente.

Germinación

Las semillas se desinfectaron sumergiéndolas durante 30 s en una mezcla comercial de hipoclorito de sodio (cloralex®) diluido a 0.5 %. Una muestra de 200 semillas de cada uno de los 40 árboles de La Selva se germinó sobre una cama de agrolita humedecida con 200 ml de agua potable en cajas de plástico de 27 x 20 cm. Cada caja se usó como un bloque, por lo que se tuvo un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones (50 semillas de cada árbol por repetición). Las cajas se cerraron herméticamente con tapas, y éstas se colocaron en un cuarto de germinación a una temperatura de 25 °C. Las semillas germinadas se contabilizaron diariamente por un periodo de 30 días.

La germinación de semillas de la población Villa Cuauhtémoc se realizó sobre tela absorbente Virutex® en cajas de plástico de 27 x 20 cm a las cuales se les agregó 150 ml de agua potable. Las semillas se sembraron en un diseño de bloques completos al azar, con 4 repeticiones y 50 semillas por repetición. El ensayo se estableció en un cuarto de germinación a una temperatura de 25 °C. La germinación de las semillas se contabilizó diariamente por un periodo de 30 días.

Análisis de datos

La capacidad germinativa (CG), el valor pico (VP), el número de días en el que se alcanzó el valor pico (DVP) y el valor de germinación (VG) fueron las variables evaluadas. CG es el porcentaje final de semillas germinadas durante 30 días; VP es el valor máximo que se obtiene al dividir el porcentaje de germinación acumulado en cada fecha de medición entre el número de días transcurridos hasta esa fecha; VG se obtiene como el producto de la germinación media diaria (GMD) multiplicado por el valor pico, en donde la GMD es la capacidad germinativa dividida entre el número de días del ensayo (Kolotelo *et al.*, 2001).

En virtud de que los datos de capacidad germinativa (CG) no reunieron los supuestos de las pruebas paramétricas, estos se analizaron a través de regresión logística mediante el procedimiento *Logit binario* (SAS Institute, 2004). Los datos VP, DVP y VG se analizaron con el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2004). Para ambos análisis se utilizó el modelo siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + D_j + A(D)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde Y es el indicador de germinación del *k*-ésimo árbol, en la *j*-ésima densidad, en la *i*-ésima repetición, μ es la media poblacional, R_i es el efecto fijo de la repetición, D_j es el efecto fijo de la densidad, $A(D)_{jk}$ es el efecto aleatorio del árbol anidado en la densidad y E_{ijk} es el error experimental.

RESULTADOS

La densidad influyó en la germinación de la semilla de *Pinus patula* utilizada en este estudio. Todas las variables evaluadas en ambas poblaciones mostraron diferencias ($p < 0.05$) entre densidades, excepto para los días en el que se alcanzó el valor pico en Villa Cuauhtémoc ($p=0.053$) (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Nivel de significancia de la densidad de árboles en las características de germinación evaluadas en la semilla de dos poblaciones de *Pinus patula*.

Característica	Población	
	Villa Cuauhtémoc	La Selva
Capacidad germinativa (CG)	0.001	<0.001
Valor pico (VP)	0.008	<0.001
Día de valor pico (DVP)	0.053	<0.001
Valor germinativo VG	0.001	<0.001

Capacidad germinativa

La capacidad germinativa promedio fue moderada en todas las categorías de densidad de ambas poblaciones de *Pinus patula*, con valores que oscilan de 43 a 50 y de 42 a 57 % para Villa Cuauhtémoc y La Selva, respectivamente (Cuadro 3.2). Los valores máximos de germinación se encontraron en la densidad menor en las dos poblaciones; sin embargo, ésta no mostró una tendencia lineal con respecto a un incremento en la densidad (Figura 3.1).

Cuadro 3.2. Medias (\pm error estándar) de los estimadores de los parámetros germinativos de semillas de *Pinus patula* en diferentes condiciones de densidad arbórea en dos poblaciones.

Densidad (Individuos ha ⁻¹)	Capacidad Germinativa (%)	Valor Pico	Día de Valor Pico	Valor Germinativo
La Selva				
1-50	57.0 \pm 1.2 a	3.1 \pm 0.08 b	15.2 \pm 0.3a	6.8 \pm 0.3 b
51-250	55.5 \pm 1.1 a	3.4 \pm 0.08 a	13.7 \pm 0.3b	7.6 \pm 0.2 a
251-500	41.8 \pm 1.4 c	2.4 \pm 0.10 c	15.0 \pm 0.4a	4.3 \pm 0.3 c
>500	45.0 \pm 1.1 b	2.6 \pm 0.07 c	15.2 \pm 0.3a	4.2 \pm 0.2 c
Villa Cuauhtémoc				
1-50	49.6 \pm 1.3 a	3.4 \pm 0.1 a	13.7 \pm 0.5 a	7.1 \pm 0.3 a
51-250	42.0 \pm 1.0 b	3.1 \pm 0.1 b	12.3 \pm 0.4 b	5.4 \pm 0.2 b
251-500	43.3 \pm 1.9 b	2.8 \pm 0.1 c	13.7 \pm 0.7 a	5.2 \pm 0.4 b

Medias con letras iguales dentro de cada población no son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$)

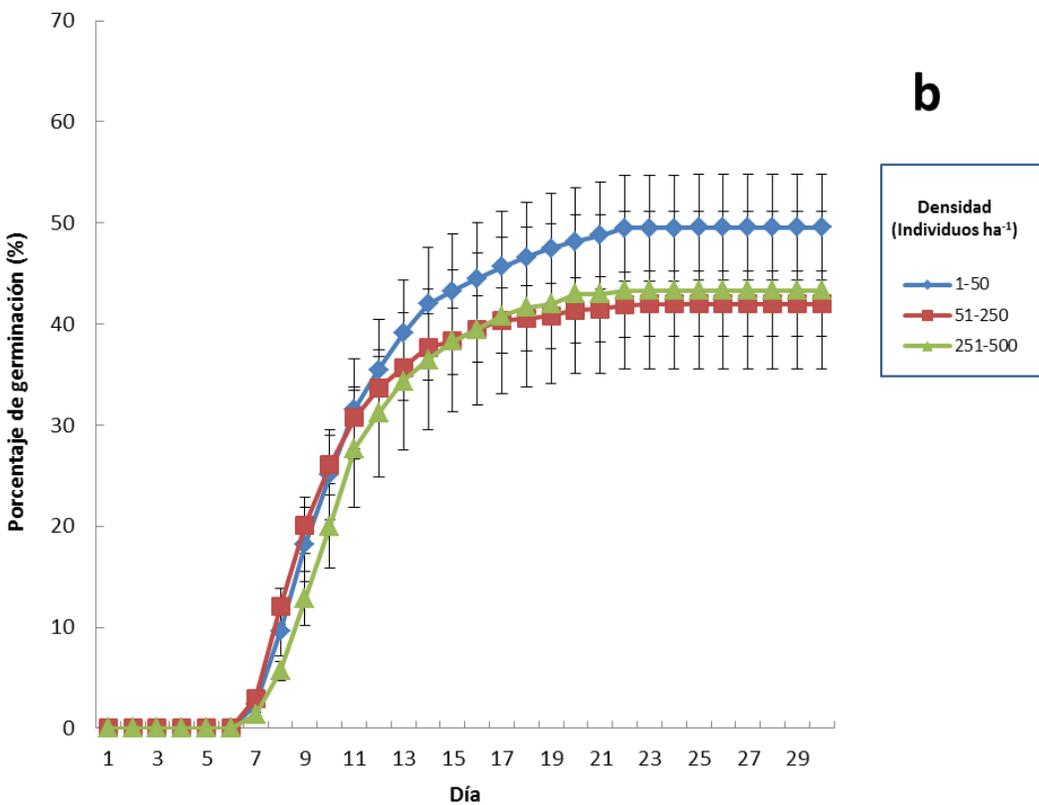
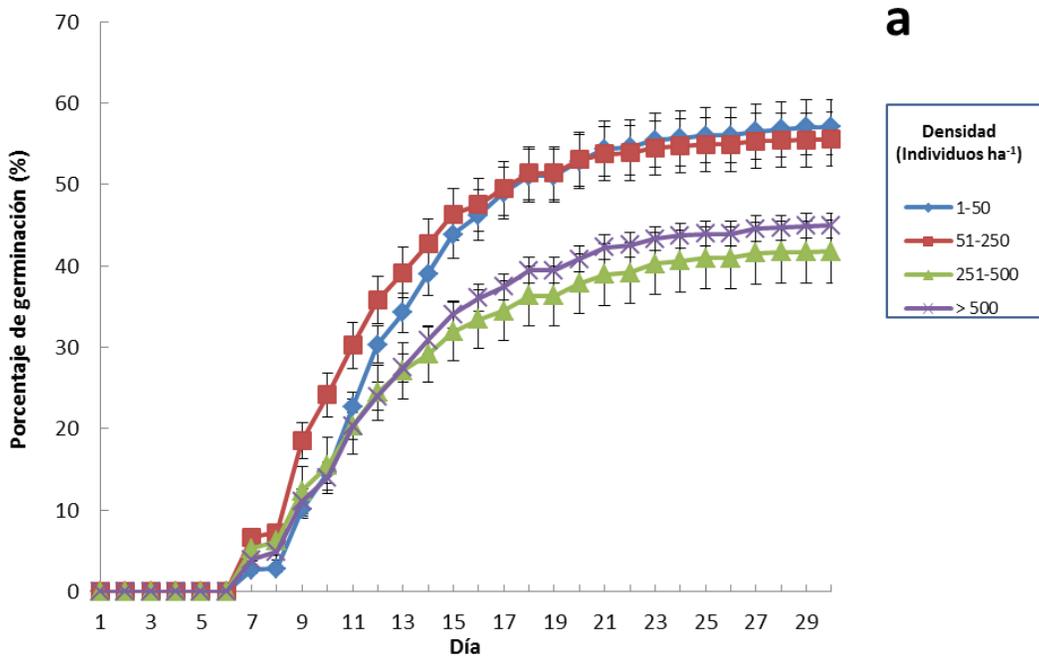


Figura 3.1. Capacidad germinativa de semilla de *Pinus patula* recolectada en distintas densidades de las poblaciones La Selva (a) y Villa Cuauhtémoc (b).

Valor pico

El valor pico no mostró una tendencia lineal con respecto a la densidad en La Selva pero si en Villa Cuauhtémoc. El valor pico de la germinación en la Selva fue superior en la densidad de 51 a 250 individuos ha^{-1} mientras que en Villa Cuauhtémoc éste fue superior en la densidad de 1 a 50 individuos ha^{-1} (Cuadro 3.2). El valor pico menor se registró en la densidad de 251 a 500 individuos ha^{-1} en ambas poblaciones (Cuadro 3.2). El valor pico máximo se registró en el día 14 en las dos poblaciones, con diferencias de uno a dos días entre las categorías de densidad en cada una de ellas.

Valor germinativo

La densidad influyó en el valor germinativo de las semillas en las dos poblaciones de estudio. La semilla proveniente de las densidades menores tuvo el valor germinativo superior, mientras que el valor germinativo menor se encontró en la semilla recolectada de árboles que crecen en densidades mayores a 500 individuos ha^{-1} en La Selva y en la densidad 251-500 individuos ha^{-1} en Villa Cuauhtémoc (Cuadro 3.2).

DISCUSIÓN

En general, la capacidad de germinación de *Pinus patula* es alta con un rango para la especie que oscila entre 75 y 90% (Patiño y Kageyama, 1991; Gillespie, 2000). Sin embargo, los valores de capacidad germinativa encontrados tanto en La Selva como en Villa Cuauhtémoc fueron menores al reportado en otras investigaciones para la especie, incluso para semilla procedente de la misma región donde se encuentran las poblaciones incluidas en este estudio. Piedrahita (1998) reportó un porcentaje de germinación de 62 % para semillas de *P. patula*. Aparicio-Rentería *et al.* (1999) encontraron porcentajes de germinación entre 75 y 84 % para semillas de *P. patula* recolectadas en Huayacocotla. Romero-Arenas *et al.* (2013) encontraron una variación de 81.2 a 84.5% en la germinación de semilla procedente de Chignahuapan, Puebla. Diversos factores pueden afectar la calidad fisiológica de la semilla, por ejemplo, la edad fisiológica de la planta, factores genéticos como la endogamia y factores ambientales como la posición del fruto, la humedad del suelo, el tiempo de recolecta y la presencia de patógenos (Baskin y Baskin, 2014). Además, el envejecimiento y deterioro de la semilla debido al manejo de beneficio y almacenamiento pueden tener un efecto negativo sobre su germinación (Shaban, 2013). Tigabu y Odén (2004) reportaron una disminución de la capacidad germinativa de semillas de *P. patula* de 99 a 13 % con un incremento en el tiempo medio de germinación de 8.9 a 19.1 días después de haber sido sometidas a varios regímenes de envejecimiento. Sin embargo, la semilla de *P. patula* almacenada en frío puede ser conservada por más de 10 años sin que su capacidad germinativa se afecte (Patiño y Kageyama, 1991). El almacenamiento prolongado y envejecimiento de la semilla no sería una causa probable del porcentaje bajo de germinación encontrado en éste estudio, debido a que la evaluación germinativa de la semilla se realizó poco tiempo después de que la semilla se recolectó. Sin embargo, es importante considerar que la calidad inicial de las semillas

es afectada a lo largo de las diferentes etapas de recolección, manejo y procesamiento. Por ejemplo, un inadecuado manejo de los conos durante la maduración post-cosecha o durante el procesamiento de las semillas provoca su deterioro y reduce su vigor y niveles de germinación (Wang y Beardmore, 2004). Lo cual podría ser una posible explicación a los bajos porcentajes de germinación obtenidos en este estudio para *P. patula*. La latencia de la semilla es otro factor que afecta la germinación (Baskin y Baskin, 2014). En este sentido, la falta de un tratamiento pre-germinativo para romper la latencia de la semilla de *P. patula* empleada en este estudio también pudo haber contribuido a la reducida tasa de germinación. Dvorak *et al.* (2000) reportaron que la aplicación de diversos tratamientos como estratificación en frío, aplicación de peróxido de hidrogeno o inmersión en agua con pH ácido, incrementa la germinación de semillas de *P. patula*. Asimismo, Piedrahita (1998) encontró que además de la capacidad germinativa, el valor pico y valor germinativo de las semillas de *P. patula* mejoraron después de haber sido sometidas a diferentes tratamientos pre-germinativos de osmoacondicionamiento.

Los valores de capacidad germinativa y velocidad de germinación indicaron que la calidad de la semilla que se recolectó en árboles que crecen en densidades bajas fue superior a aquella de las semillas que se obtuvo de los árboles en sitios con densidad arbórea alta. Esto se pudo deber a que en los sitios con densidades arbóreas altas una proporción alta de la semilla llena fue producto de la fecundación entre individuos cercanos, los cuales debido a la estructura familiar podrían estar emparentados (Mimura y Aitken, 2007). Asimismo, la presencia de un número alto de árboles en un sitio puede actuar como barreras que reducen la velocidad del viento y por lo tanto la dispersión del polen alcanza distancias menores, de tal forma que la diversidad genética en la nube de polen que rodea a un individuo en estos sitios pudo ser baja (Arista y Talavera, 1996; Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2008). En contraste, la mayoría de la semilla

llena de los árboles en sitios con densidades arbóreas bajas pudo ser producto de la fecundación de polen de árboles que crecen en rodales lejanos, por lo que la probabilidad de encontrar alelos diferentes en la nube podría ser mayor (Mimura y Aitken, 2007; Tomita *et al.*, 2008; Ozawa *et al.*, 2012). Esto sugieren los resultados obtenidos en un estudio realizado simultáneamente para estimar variaciones en el sistema de cruzamiento como efecto de la densidad poblacional (Capítulo 3), en donde se encontró que los árboles que crecen en densidades poblacionales bajas tuvieron una tasa de cruzamiento superior, así como un número mayor de individuos que participan en los eventos de polinización para un árbol dado.

Por otro lado, también es importante considerar que la germinación está influenciada por el tamaño y peso de la semilla. Semillas más grandes y de mayor peso tienen un porcentaje y velocidad de germinación mayor que semillas más pequeñas, de menor peso, debido a una mayor cantidad de las reservas de nutrientes almacenados en el endospermo (Rawat y Bakshi, 2011). Este hecho podría explicar, en parte, la tasa de germinación mayor encontrada en la semilla recolectada en los sitios con baja densidad en la población La Selva en donde la semilla que presentó un valor germinativo superior fue también aquella de mayor peso (datos presentados en el Capítulo 2).

Finalmente, los valores germinativos altos encontrados en la semilla procedente de sitios con densidades poblacionales bajas sugieren que las prácticas silvícolas que dejan un número escaso de individuos no tendrán efectos significativos en la capacidad germinativa de las semillas de *P. patula* en estas poblaciones, y podrían incidir en un incremento de la diversidad genética en la regeneración al fomentar el cruzamiento entre árboles distantes.

CONCLUSIONES

La capacidad germinativa y valor germinativo de las semillas de *Pinus patula* fue moderada en las dos poblaciones naturales muestreadas. La densidad poblacional influyó de manera negativa en la germinación y calidad de semilla. La semilla recolectada de árboles que crecen en sitios con densidad poblacional baja fue de mejor calidad a aquella recolectada en sitios con densidades superiores.

LITERATURA CITADA

- Aparicio-Rentería, A., H. Cruz-Jiménez, y J. Alba-Landa. 1999. Efecto de seis sustratos sobre la germinación de *Pinus patula* Schl. et Cham., *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus pseudostrabus* Lindl. en condiciones de vivero. *Foresta Veracruzana* 1: 31-36.
- Aravanopoulos, F.A. 2011. Genetic monitoring in natural perennial plant populations. *Botany* 89: 75-81.
- Arista, M., and S. Talavera. 1996. Density effect on the fruit-set, seed crop viability and seedling vigour of *Abies pinsapo*. *Annals of Botany* 77: 187-192.
- Baskin, C.C., and J.M. Baskin. 1998. Causes of within-species variations in seed dormancy and germination characteristics. *In*: Baskin, C.C., and J.M. Baskin (eds). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego, CA. Academic Press. pp: 181-237.
- Baskin, C.C., and J.M. Baskin. 2014. Variation in seed dormancy and germination within and between individuals and populations of a species *In*: Baskin, C.C., and J.M. Baskin (eds). *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. 2nd ed. Kentucky. Academic Press. pp: 277–373.
- Dvorak, W.S., G.R. Hodge, J.E. Kietzka, F. Malan, L.F. Osorio, and T.K. Stanger. 2000. *Pinus patula*. *In*: *Conservation and Testing of Subtropical and Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative*. College of Natural Resources, NCSU. Raleigh. pp: 149-173.
- Dyer, R.J., and V.L. Sork. 2001. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* 10: 859-866.
- Farris, M.A., and J.B. Mitton. 1984. Population density, outcrossing rate, and heterozygote superiority in ponderosa pine. *Evolution* 38: 1151-1154.

- Gillespie, A.J.R. 1992. *Pinus patula* Schiede and Deppe. Patula pine. SO-ITFSM-54. USDA, Forest Service. Southern Forest Experiment Station. New Orleans, L.A. USA. 5 p.
- Kolotelo, D., E. V. Steenis, M. Bennett, D. Trotter, and Y.J. Dennis. 2001. Seed Handling Guidebook. Ministry of Forests, Tree Improvement Branch. British Columbia, Canada. 106 p.
- Ledig, F.T., B. Bermejo-Velázquez, P.D. Hodgskiss, D.R. Johnson, C. Flores-López, and V. Jacob-Cervantes. 2000. The mating system and genic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of México's Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1156–1164.
- Mimura, M., and S.N. Aitken. 2007. Increased selfing and decreased effective pollen donor number in peripheral relative to central populations in *Picea sitchensis* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 94: 991-998.
- 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. *Canadian Journal of Botany* 78: 928-940.
- Mostacedo, B., y T.S. Fredericksen. 2000. Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal. BOLFOR. Santa Cruz, Bolivia. 87 p.
- Ozawa, H., A. Watanabe, K. Uchiyama, Y. Saito, and Y. Ide. 2012. Genetic diversity of *Pinus densiflora* pollen flowing over fragmented populations during a mating season. *Journal of Forest Research* 17: 488-498.
- Patiño, F.V., and P.Y. Kageyama. 1991. *Pinus patula* Schiede & Deppe. Seed Leaflet No. 8. Danida Forest Seed Centre. Humleback, Denmark. 25 p.

- Perry, J.P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231 p.
- Piedrahita, E. 1998. Aumento del vigor en semillas de *Pinus patula* (Schlecht. & Cham.) por efecto del osmoacondicionamiento. *Crónica Forestal y Medio Ambiente* 13: 1-20.
- Rajora, P.O., A. Mosseler, and J.E. Major. 2000. Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. II. Genetic diversity, population structure, and mating behavior. *Canadian Journal of Botany* 78: 941–956.
- Rawat, K., and M. Bakshi. 2011. Provenance variation in cone, seed and seedling characteristics in natural populations of *Pinus wallichiana* A.B. Jacks (Blue Pine) in India. *Annals Forest Research* 54: 39-55.
- Robledo-Arnuncio, J.J., P.E. Smouse, L. Gil, and R. Alía. 2004. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *Forest Ecology and Management* 197: 245-255.
- Romero-Arenas, O., J.A. Rivera, J.F. López-Olguín, O.A. Villarreal, M. Huerta, y C. Parraguirre. 2013. Germinación de semillas de *Pinus patula* en residuos de cáscara de nuez (*Juglans regia* L.) en vivero. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias* 2: 1-19.
- SAS Institute Inc. 2004. Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.1 User's Guide
- Shaban, M. 2013. Review on physiological aspects of seed deterioration. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 6: 627-631.
- Tigabu, M., and P.C. Odén. 2004. Rapid and non-destructive analysis of vigour of *Pinus patula* seeds using single seed near infrared transmittance spectra and multivariate analysis. *Seed Science and Technology* 32: 593-606.

- Tomita, M., H. Saito, and Y. Suyama. 2008. Effect of local stand density on reproductive processes of the sub-boreal conifer *Picea jezoensis* Carr. (Pinaceae). *Forest Ecology and Management* 256: 1350-1355.
- Wang, B.S.P. y T. Beardmore. 2004. Almacenamiento y manejo de germoplasma. *In* Vargas H.J.J., J.B. Bermejo y F.T. Ledig (eds.). 2004. *Manejo de Recursos Genéticos Forestales*, 2da ed. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. pp: 103-127.

CAPÍTULO IV

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA, Y SISTEMA DE CRUZAMIENTO DE ÁRBOLES SELECTOS EN POBLACIONES NATURALES DE *Pinus patula*

RESUMEN

La diversidad genética de la progenie de árboles selectos se origina de la diversidad de los progenitores y del patrón del sistema de cruzamiento. El sistema de cruzamiento determina la estructura genética de una población e incide en la calidad de la semilla que se recolecta, por lo que la cuantificación de la diversidad genética de especies forestales es necesaria para el desarrollo de programas de conservación de recursos genéticos y plantaciones forestales. Los objetivos de la presente investigación fueron estimar la diversidad y estructura genética de árboles selectos de *Pinus patula* en dos poblaciones naturales y analizar diferencias en el sistema de cruzamiento de individuos que crecen en sitios con densidad poblacional distinta, con base en información obtenida de marcadores moleculares (microsatélites). Entre los parámetros de diversidad genética estimados para cada población se incluyó el número promedio de alelos por locus (A), la heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) y el índice de fijación (F). La estructura genética se analizó utilizando los estadísticos de F de Wright. El sistema de cruzamiento se evaluó estimando las tasas de cruzamiento multilocus (t_m) y de un locus simple (t_s). Los árboles selectos dentro de cada población tuvieron niveles altos de diversidad genética ($H_e = 0.693$) y un índice de endogamia moderado ($F = 0.137$). Un déficit de individuos heterocigotos se encontró cuando las dos poblaciones se analizaron en conjunto ($F_{IT} = 0.239$) y dentro de cada una de éstas ($F_{IS} = 0.124$). La diferenciación entre poblaciones fue moderada ($F_{ST} = 0.131$). El número de migrantes por generación estimado en *P. patula* fue mayor a 1 ($Nm = 1.7$). Un nivel alto de autofecundación ($t_m = 0.596$) se encontró en rodales con densidad poblacional alta (>500 individuos ha^{-1}) mientras que un nivel alto de cruzamiento ($t_m = 1.002$) se

registró en rodales con densidad poblacional baja. La endogamia entre parientes ($t_m - t_s = -0.039$) fue nula en los sitios con densidad arbórea baja, mientras que en los sitios con densidad alta se encontró que 4 % de la endogamia se debió al cruzamiento entre individuos emparentados. La correlación de paternidad fue superior en la densidad poblacional mayor a 500 individuos ha^{-1} encontrando que la probabilidad de que dos progenies que resultan de cruzamiento elegidos al azar dentro de una familia materna fueran hermanos completos fue de 33 %. La diversidad genética en *P. patula* fue alta en las dos poblaciones, con un nivel alto de diferenciación entre éstas. La densidad poblacional influyó negativamente en el sistema de cruzamiento de los árboles analizados en este estudio.

Palabras clave: diversidad genética, densidad arbórea, endogamia, sistema de cruzamiento.

INTRODUCCIÓN

Una diversidad genética alta es esencial para que los individuos puedan adaptarse a los cambios ambientales y para la expresión de caracteres de interés económico como tamaño y forma de tronco, velocidad de crecimiento, calidad de la madera y resistencia a enfermedades o a factores ambientales extremos (White *et al.*, 2007). La cuantificación de la diversidad genética de especies forestales es necesaria para el desarrollo de programas de mejoramiento y conservación (Ledig, 1988; Johnson *et al.*, 2001). La diversidad genética de la progenie de árboles selectos se origina de la diversidad de los progenitores y de los patrones del sistema de cruzamiento (Wasielewska *et al.*, 2005).

El sistema de cruzamiento tiene un papel central en la estructura genética de una población e incide en la calidad de la semilla que se recolecta para los programas de conservación de recursos genéticos y plantaciones forestales (Zobel y Talbert, 1988; White *et al.*, 2007; del Castillo y Trujillo, 2008). Tasas altas de cruzamiento junto con una dispersión amplia de polen pueden promover una variabilidad genética alta en la descendencia (Burczyk *et al.*, 1996; Wasielewska *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque la mayoría de las coníferas tienen tasas altas de cruzamiento, éstas varían entre y dentro de especies por la influencia de factores como el tamaño y la densidad poblacional (Farris y Mitton, 1984; El-Kasaby y Jaquish, 1996; Ayari *et al.*, 2011). No obstante, la relación entre la tasa de cruzamiento y la densidad varía en coníferas; mientras que en *Pinus strobus* L. y *Picea rubens* Sarg. se reportó una asociación positiva entre la densidad y la tasa de cruzamiento (Buchert *et al.*, 1997; Rajora *et al.*, 2000a; Marquardt *et al.*, 2007), en *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen y *Pinus pinaster* Aiton se encontró una asociación negativa entre esas variables (del Castillo y Trujillo, 2008; de-Lucas *et al.*, 2008). Incluso, la variación en la densidad el rodal no afectó el sistema de cruzamiento en especies arbóreas con polinización

anemófila cuando se aplicaron métodos diferentes de aprovechamiento (Morgante *et al.*, 1991; Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2006; Fageria y Rajora, 2013).

Marcadores moleculares como las aloenzimas y microsatélites se utilizan ampliamente para medir la variabilidad genética y determinar la tasa de cruzamiento en especies forestales (Godt *et al.*, 2001; Marcucci *et al.*, 2001; Barrios *et al.*, 2004; Zelener *et al.*, 2005; Gaspar *et al.*, 2009). La diversidad genética se cuantificó en poblaciones naturales de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. *et Cham.* a través de marcadores aloenzimáticos y microsatélites (Ramírez-Herrera *et al.*, 1998; Dvorak *et al.*, 2009; Alfonso-Corrado *et al.*, 2014). Sin embargo, la asociación de la densidad poblacional con la tasa de cruzamiento en poblaciones naturales no se ha reportado para esta especie. Por lo anterior, los objetivos de este estudio fueron evaluar la diversidad y la estructura genética de árboles fenotípicamente superiores de dos poblaciones naturales de *Pinus patula* y estimar la tasa de cruzamiento en árboles fenotípicamente superiores de *Pinus patula* que crecen en sitios con densidad poblacional distinta. Las hipótesis fueron que hay una diversidad genética alta en las poblaciones de *P. patula* analizadas, que existe un flujo de genes alto entre ellas, por lo que su diferenciación es mínima, y que la densidad arbórea influye de manera positiva en la tasa de cruzamiento de *P. patula*, por lo que en los sitios con densidad de población baja ocurre un nivel elevado de autofecundación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo para el análisis de diversidad y estructura genética

Follaje joven se obtuvo de 161 árboles de *Pinus patula* en dos poblaciones naturales ubicadas en los ejidos de Villa Cuauhtémoc, municipio de Chignahuapan, Puebla (19° 42' 30" N, 98° 06' 08" O, 2,626 m s.n.m., 78 árboles) y La Selva, municipio de Huayacocotla, Veracruz (20° 34' 37" N, 98° 31' 05" O, 1,855 m s.n.m., 83 árboles). Los árboles se marcaron con un número consecutivo cuando éstos se seleccionaron para la obtención de yemas con el fin de establecer un huerto semillero en 2012. El follaje se colocó en bolsas de plástico marcadas con el número de árbol. Las bolsas se transportaron en una hielera al laboratorio del Posgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, para el procesamiento, extracción y purificación del ADN. Una muestra de 100 mg de follaje fresco se utilizó para la extracción del ADN a través del protocolo ChargesSwitch® gDNAPlant Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Se utilizaron ocho iniciadores de microsatélites nucleares (PtTX2123, PtTX2146, PtTX3034, PtTX3107, PtTX3127, NZPR5, NZPR114, NZPR1078) que fueron desarrollados para otras especies y evaluados previamente en la estimación de diversidad genética de cinco poblaciones de *Pinus patula* (Dvorak *et al.*, 2009) (Cuadro 4.1). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen de reacción de 25 µL con 20 ng de ADN genómico, 1 pmol del iniciador hacia adelante, 1 pmol del iniciador para reversa, 0.5 mM de dNTPs, 5X de Buffer Taq, 2 mM de MgCl₂, y 0.4 unidades de TaqDNA polimerasa. La amplificación se hizo en un Termociclador GeneAmp®PCR System 9700. La PCR se completó con el protocolo siguiente: 15 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización); 60 s a 60.9 °C (NZPR5), 64.3 °C (NZPR1078), 59.1 °C (PtTX2146, PtTX3034, PtTX3127 y NZPR114) y 58.3 °C (PtTX2123 y PtTX3107) (alineamiento); y un minuto a 72 °C (extensión); todos seguidos por 15 min de extensión final a 72 °C, manteniendo finalmente a 4 °C (Figura 4.1).

Cuadro 4.1. Iniciadores que se utilizaron para la amplificación de microsatélites para el análisis de diversidad genética de dos poblaciones de *Pinus patula*.

Locus	Secuencia (5' – 3')	T (°C)	Referencia
PtTX2123	F:GAAGAACCCACAAACACAAG R:GGGCAAGAATTCAATGATAA	58.3	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX2146	F:CCTGGGGATTTGGATTGGGTATTTG R:ATATTTTCCTTGCCCCTTCCAGACA	59.1	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX3034	F:TCAAAATGCAAAAGACG R:ATTAGGACTGGGGATGAT	59.1	Elsik <i>et al.</i> , 2000
PtTX3107	F: AAACAAGCCCACATCGTCAATC R: TCCCCTGGATCTGAGGA	58.2	Elsik y Williams, 2001
PtTX3127	F: ACCCTTACTTTCAGAAGAGGATA R: AATTGGGGTTCAACTATTCTATTA	59.1	Elsik y Williams, 2001
NZPR5	F: CTCCTTTTCTCTCTCAAATCC R:GAGATATGGAGTGACATAGTGACTC	60.9	Fisher <i>et al.</i> , 1998
NZPR114	F:AAGATGACCCACATGAAGTTTGG R:GGAGCTTTATAACATATCTCGATGC	59.1	Chagné <i>et al.</i> , 2004
NZPR1078	F:TGGTGATCAAGCCTTTTTCC R:GTTGATGAGTGATGGCATGG	64.3	Chagné <i>et al.</i> , 2004

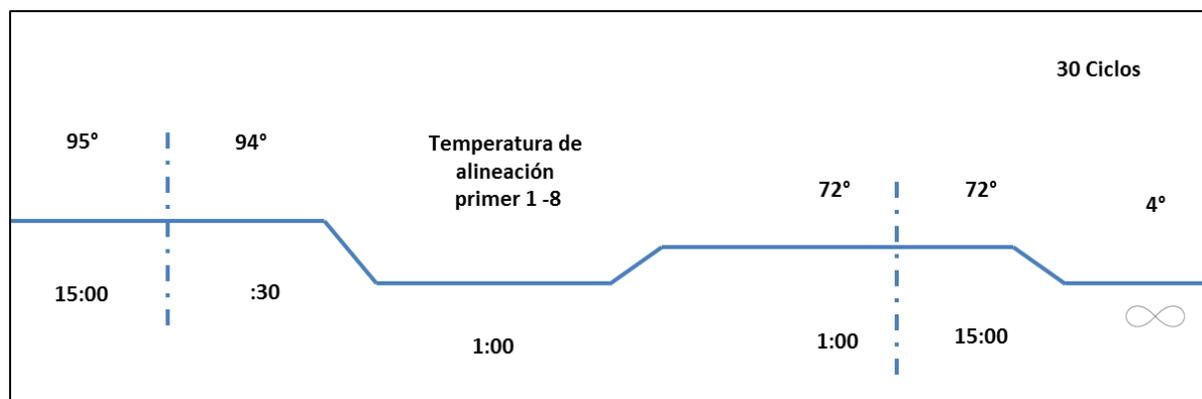


Figura 4.1. Protocolo empleado para la amplificación de ADN de *Pinus patula* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los productos que resultaron de la amplificación de la PCR se separaron en un secuenciador automático Genetic Analyzer marca Hitachi AB 3130[®] Applied Biosystems, y éstos se analizaron con el programa GeneMapper[®] V. 4.0 (Applied Biosystems, 2005).

Muestreo para el análisis del sistema de cruzamiento

Doce árboles fenotípicamente superiores se incluyeron en el estudio. Estos árboles se seleccionaron en la población La Selva, en el municipio de Huayacocotla, Veracruz, con base en la densidad poblacional en los sitios donde éstos crecen. La densidad poblacional se estimó considerando un radio de 25 m a partir del árbol madre, donde se instaló una parcela circular en la cual se registraron todos los individuos de *Pinus patula* en etapa reproductiva. De esta manera los individuos muestreados se agruparon en dos categorías de densidad las cuales fueron: menor a 50 individuos hectárea⁻¹ (6 árboles), y mayor a 500 individuos (6 árboles). Con el fin de conocer si existe influencia de otras especies que representen barreras físicas para la dispersión del polen también se registraron los individuos de otras especies. Cabe mencionar que dichos grupos están geográficamente separados entre sí, en donde los árboles incluidos en la categoría de densidad poblacional baja se encuentran espacialmente distribuidos en la zona este del ejido,

mientras que los árboles pertenecientes a la categoría de densidad alta están situados en la zona oeste (Figura 4.2).

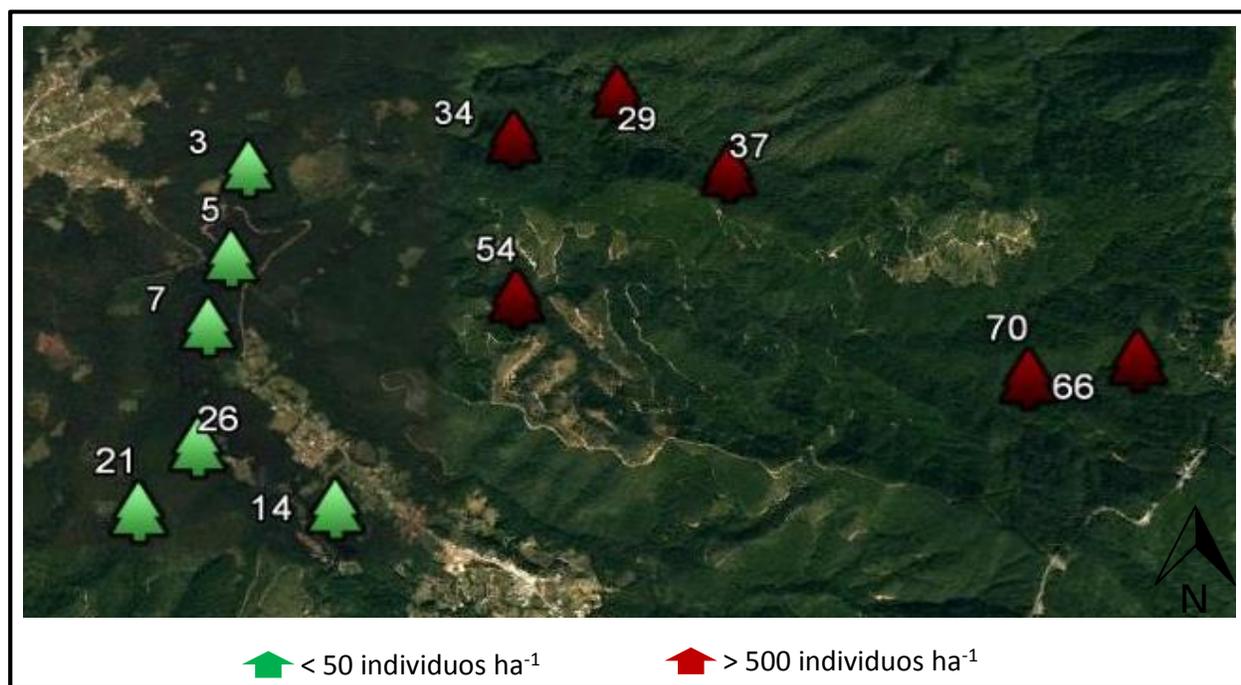


Figura 4.2. Distribución de individuos dentro del ejido La Selva empleados en el análisis de sistema de cruzamiento.

Los conos maduros de los 12 árboles seleccionados para este análisis se recolectaron en diciembre 2012 y enero 2013. Los conos se colocaron en bolsas de papel identificadas con el número del árbol para su transporte. Los conos se beneficiaron en las instalaciones del Posgrado en Ciencia Forestales del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Texcoco, Estado de México. Las semillas llenas de cada árbol se almacenaron a 4 °C hasta que éstas se usaron. Una muestra de 200 semillas de cada árbol se germinó sobre una cama de agrolita humedecida con 200 ml de agua potable en cajas de plástico de 27 x 20 cm en un cuarto de germinación a una temperatura de 25 °C por 30 días. Las plántulas se trasplantaron a tubetes de plástico con una capacidad de 310 ml en un sustrato elaborado con aserrín, agrolita y perlita en una proporción 50:25:25. Las plántulas crecieron en condiciones de invernadero por seis meses.

En los árboles madre y en dieciséis plántulas obtenidas de la semilla de cada árbol se recolectaron muestras de follaje para extraer ADN. El follaje se colocó en bolsas de papel que se identificaron y posteriormente se introdujeron en bolsas Ziploc® para su transporte y procesamiento en el laboratorio de ADN y Genómica del Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta que éstas se liofilizaron. La extracción y purificación de ADN genómico se realizó a partir de 50 mg de material vegetal liofilizado. El protocolo modificado que desarrolló Saghai-Marroof *et al.* (1984) se utilizó para la extracción de ADN. La calidad de ADN se visualizó en geles de agarosa al 1 %. El análisis de microsatélites se realizó a partir de cinco iniciadores (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Iniciadores utilizados en la amplificación de microsatélites para determinar la tasa de cruzamiento en árboles de *Pinus patula*.

Locus	Secuencia Primer (5' – 3')	Referencia
PtSIFG4454	F:CTTGCTATGCCAACCAGACA	Echt <i>et al.</i> ,2011
	R:CCCACACCAGCTCCATTTTA	
PtTX4056	F:TTAAGGCCAGTTCCAATACAAA	Zhou <i>et al.</i> , 2002
	R:GAGCCCAACAACACTAAAACAAT	
PtSIFG4304	F:CATGCATGTGTGGAGGAGTT	Echt <i>et al.</i> ,2011
	R:CTCATGTGCTTTGATCCCCT	
PtRIP0609	F:CAAAATGCAGAGGGGCTTAA	Echt <i>et al.</i> ,2011
	R:CCAGTCCATCGAATCACGTA	
PtRIP9315	F:GGCTTAGGCATAGAGGGACC	Echt <i>et al.</i> ,2011
	R: AACAAGTTGGAAGCCACCAT	

La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un volumen de reacción de 10 μ L compuesta por 20 ng de ADN genómico, 0.5 μ L del iniciador hacia adelante, 0.5 μ L del iniciador de reversa, 4 μ L de RedTaq[®]ReadyMix[™]. Un Termociclador AB[®]Veriti se utilizó para amplificar el ADN. La PCR se completó con el protocolo siguiente: 5 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 60 s a 95 °C (desnaturalización); 60 s a 57 °C (alineamiento); y 2 minutos a 72 °C (extensión); Esto terminó con 10 min de extensión final a 72 °C, manteniendo finalmente a 4 °C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6 % con tinción de plata conforme al protocolo de Sanguinetti *et al.* (1994). Los geles se documentaron en el sistema Carestream[®] MI Gel Logic112, y los perfiles alélicos se identificaron con el programa GelQuest 3.1.3.

Análisis de datos

Los alelos para cada locus se detectaron para cada individuo y se registraron. El número promedio de alelos por locus (A), el índice de heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) y el índice de fijación (F) se estimaron para cada una de las poblaciones. La estructura genética se analizó utilizando los estadísticos de F de Wright (Nei, 1978). El análisis de datos se realizó con el programa POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1997). El número de migrantes por generación (N_m) se estimó a partir de la ecuación $N_m = (1-F_{ST}) / (4F_{ST})$ (Wright, 1951).

La tasa de cruzamiento con base en datos de un locus simple (t_s), la tasa de cruzamiento multilocus (t_m) y la correlación de paternidad (r_p) se estimaron para cada grupo de árboles en cada categoría de densidad con el programa MLTR (Ritland, 1994). La tasa de endogamia biparental se calculó como $t_m - t_s$ (Ritland, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSION

Diversidad genética

El número promedio de alelos por locus encontrado indicó una variabilidad genética alta para las poblaciones de *Pinus patula* analizadas. La Selva presentó el número promedio de alelos por locus más alto (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Estimaciones de diversidad genética en dos poblaciones naturales de *Pinus patula*.

Población	A	He	Ho	F
Villa Cuauhtémoc	7.5	0.7059	0.6569	0.069
La Selva	9.6	0.6806	0.5410	0.205
Promedio	8.5	0.6932	0.5989	0.137

Número promedio de alelos por locus (A), Heterocigocidad esperada (He), Heterocigocidad observada (Ho), Índice de fijación (F).

El número promedio de alelos por locus determinado en éste estudio fue superior al reportado para otras poblaciones de la misma especie. Por ejemplo, Dvorak *et al.* (2009) encontraron un número promedio de alelos por locus de 4.6 en cinco poblaciones de *P. patula* utilizando los mismos microsatélites, mientras que Delgado-Valerio y Rebolledo-Camacho (2016) encontraron 4.9 alelos por locus en promedio, en seis poblaciones de *P. patula*. Ramírez-Herrera *et al.* (1998) registraron un promedio de 2.3 alelos por locus utilizando aloenzimas. El número promedio de alelos por locus que se encontró en las poblaciones de *P. patula* analizadas en el presente estudio también fue superior al reportado para *P. radiata* D. Don (8.2, Karhu *et al.*, 2006), *P. oocarpa* Schiede (5.0, Dvorak *et al.*, 2009); *P. tecunumanii* (Schw.) Eguiluz *et Perry* (4.9); *P. banksiana* Lamb. (4.0, Nkongolo *et al.*, 2012) y *P. resinosa* Ait. (2.6, Nkongolo *et al.*, 2012) e inferior al número promedio de alelos por locus reportado para *P. strobus* L. (9.4 y 10.8, Rajora *et al.*, 2000b; Chhatre y Rajora, 2014).

Los valores mayores de heterocigocidad esperada (H_e) y heterocigocidad observada (H_o) se encontraron en Villa Cuauhtémoc (Cuadro 4.3). Estos valores son menores a los reportados ($H_e = 0.80$ y $H_o = 0.64$) para poblaciones de *P. patula* en la Sierra de Juárez, Oaxaca (Alfonso-Corrado, *et al.* 2014), pero mayores que los registrados por Dvorak *et al.* (2009) ($H_e = 0.55$ y $H_o = 0.48$) y por Delgado-Valerio y Rebolledo-Camacho (2016) ($H_e = 0.50$ y $H_o = 0.51$). Las diferencias entre heterocigocidades en los estudios que se mencionaron líneas atrás con los resultados que se encontraron en la presente investigación podrían deberse al número y tamaño de las poblaciones y número de *loci* que se incluyeron en cada estudio. Los resultados de H_e obtenidos en este estudio indican un nivel alto de polimorfismo y son similares a los que se encontraron en otros estudios que emplearon microsatélites en especies del género *Pinus*. Por ejemplo, *P. banksiana* y *P. resinosa* presentaron valores de heterocigocidad esperada igual a 0.72 y 0.46, respectivamente (Nkongolo *et al.*, 2012). *P. oocarpa* y *P. tecunumanii* presentaron valores de H_e de 0.71 y 0.65, respectivamente (Dvorak *et al.*, 2009), mientras que en *P. radiata* se reportó una H_e de 0.73 (Karhu *et al.*, 2006). El valor estimado de H_e en *P. contorta* Dougl. ex Loud fue 0.74 (Thomas *et al.*, 1999), y 0.61 en *P. strobus* (Rajora *et al.*, 2000b; Chhatre y Rajora, 2014). *P. resinosa*, en cambio, generalmente muestra valores bajos de H_e (0.185 y 0.46), con una deficiencia de individuos heterocigóticos (Boys *et al.*, 2005; Nkongolo *et al.*, 2012).

El índice de fijación (F) fue positivo en ambas poblaciones de *Pinus patula* (Cuadro 4.3). El valor positivo de F indica una deficiencia de heterocigotos tanto en La Selva como en Villa Cuauhtémoc. Sin embargo, la deficiencia de heterocigotos fue mayor en La Selva. El valor promedio de F en las dos poblaciones es inferior al valor ($F=0.186$) que reportó para la misma especie Alfonso-Corrado *et al.* (2014) y superior al que encontró Delgado-Valerio y Rebolledo-Camacho (2016) en seis poblaciones de *P. patula* ($F= -0.02$). Comparado con otras especies, el índice de fijación de *P. patula* fue similar al promedio (0.13) que se registró en cuatro

poblaciones de *P. johannis* M.-F. Robert-Passini utilizando aloenzimas por García-Gómez *et al.* (2015) y al valor ($F = 0.14$) reportado en poblaciones de *P. strobus* utilizando microsatélites (Chhatre y Rajora, 2014). Sin embargo, el índice de fijación reportado aquí es menor al que se encontró en poblaciones de *P. contorta* ($F = 0.37$, Thomas *et al.*, 1999); *P. banksiana* ($F = 0.32$), *P. resinosa* ($F = 0.80$), *P. mariana* ($F = 0.18$) (Nkongolo *et al.*, 2012); y *P. glauca* ($F = 0.17$, Fageria y Rajora, 2013).

Estructura genética

Los valores de F_{IT} para la mayoría de los loci fueron positivos, lo cual indica una deficiencia de individuos heterocigóticos considerando las dos poblaciones de *Pinus patula*, con excepción del valor de F_{IT} para el locus NZPR114 el cual fue negativo indicando un exceso ligero de individuos heterocigóticos (Cuadro 4.4). El F_{IT} para el locus PtTX3107 expresó el valor mayor de endogamia, mientras que el F_{IT} para el locus NZPR114 no registró endogamia considerando ambas poblaciones. El índice de fijación total (F_{IT}) promedio que se encontró en el presente estudio indica una moderada deficiencia de individuos heterocigóticos en la población total (Wright, 1951).

Cuadro 4.4. Valores de los estadísticos F de Wright para ocho loci polimórficos en dos poblaciones de *Pinus patula*.

Locus	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}
PtTX2123	0.098	-0.361	0.337
PtTX2146	0.113	0.101	0.013
PtTX3034	0.344	0.297	0.067
PtTX3107	0.461	0.325	0.202
PtTX3127	0.317	0.258	0.079

NZPR5	0.223	-0.206	0.356
NZPR114	-0.006	-0.011	0.005
NZPR1078	0.399	0.369	0.048
Promedio	0.239	0.124	0.131

Índice de fijación total, considerando las dos poblaciones de *P. patula* como una población (F_{IT}), Índice de fijación dentro de cada población (F_{IS}), Índice de fijación entre poblaciones (F_{ST}).

Dvorak *et al.* (2009) también reportan un valor positivo de F_{IT} (0.036), aunque menor, para cinco poblaciones de *P. patula* localizadas a lo largo de su distribución natural. En otras coníferas de polinización anemófila y dispersión de semilla por el viento, se han reportado deficiencias moderadas ($F_{IT} = 0.201$) o altas ($F_{IT} = 0.643$) de heterocigotos, como en *Picea glauca* (Fageria y Rajora, 2013) y *Pinus resinosa* (Boys *et al.*, 2005), respectivamente. Las deficiencias de individuos heterocigotos se puede deber a la endogamia, la selección en contra de heterocigotos y al efecto de Wahlund (Thomas *et al.*, 1999).

Los valores de F_{IS} para cinco de los loci fueron positivos lo cual indicó una deficiencia de individuos heterocigóticos, mientras que los valores de F_{IS} de tres loci fueron negativos lo cual reveló un exceso de individuos heterocigóticos a nivel de cada una de las poblaciones, mientras que el locus NZPR1078 mostró el valor mayor de endogamia (Cuadro 4.4). Dvorak *et al.* (2009) encontraron un valor promedio de $F_{IS} = 0.146$ en cinco poblaciones de *P. patula* ubicadas a lo largo de la distribución natural de la especie similar al obtenido en este estudio ($F_{IS} = 0.124$). Otras especies que presentaron valores de F_{IS} similares a éste son *Picea glauca* ($F_{IS} = 0.175$, Fageria y Rajora, 2013) y *Pinus strobus* ($F_{IS} = 0.139$, Chhatre y Rajora, 2014). Por otro lado, Alfonso-Corrado *et al.* (2014) reportaron valores más altos ($F_{IS} = 0.340$) en otras poblaciones de *Pinus patula*. En otras especies también se han encontrado valores altos de F_{IS} , como los reportados para *P. contorta* ($F_{IS} = 0.360$, Thomas *et al.*, 1999) y *P. resinosa* ($F_{IS} = 0.504$, Boys *et*

al., 2005). En especies como *P. brutia* Ten. se reporta un valor bajo ($F_{IS} = 0.02$, Lise *et al.*, 2007), indicando una deficiencia mínima de heterocigotos dentro de cada una de las poblaciones.

La diferenciación genética entre las poblaciones de *P. patula* analizadas fue moderada con base en el F_{ST} promedio (Cuadro 4.4). El locus NZPR5 tuvo una influencia mayor, mientras que el locus NZPR114 una influencia menor en detectar la diferenciación entre poblaciones de *P. patula* en el presente estudio. La diversidad genética entre poblaciones en la mayoría de las especies del género *Pinus* es cercana a 10 % aun cuando éstas tienen tamaños grandes de población y una diversidad genética alta (Ledig, 1998). Delgado-Valerio y Rebolledo-Camacho (2016) encontraron un valor promedio de F_{ST} (0.113) en seis poblaciones de *P. patula* similar al registrado en la presente investigación. Valores similares ($F_{ST} = 0.141$ y $F_{ST} = 0.16$) se han encontrado en *P. radiata* (Karhu *et al.*, 2006; Vogl *et al.*, 2002). Por otro lado, Alfonso-Corrado *et al.* (2014) encontraron una diferenciación baja ($F_{ST} = 0.059$) en otras poblaciones de *P. patula*, al igual que en *P. contorta* ($F_{ST} = 0.028$, Thomas *et al.*, 1999), *P. brutia* ($F_{ST} = 0.07$, Lise *et al.*, 2007) y *P. strobus* ($F_{ST} = 0.083$, Chhatre y Rajora, 2014), como consecuencia de un flujo alto de genes y tamaño grande de las poblaciones. Bajo esta perspectiva, los niveles altos de diferenciación genética encontrada entre las poblaciones de *P. patula* que se analizaron en el presente estudio podrían indicar un flujo bajo de genes debido a la distancia geográfica entre éstas.

El número de migrantes estimados fue 1.7 por generación. Un migrante por generación es suficiente para evitar la diferenciación de las poblaciones por el efecto de la deriva genética (Hartl y Clark, 2007). El valor de Nm en el presente estudio fue similar al que se obtuvo (1.81) para cinco poblaciones naturales de *P. patula* (Dvorak *et al.*, 2009), pero menor ($Nm = 4.19$) al que se registró entre poblaciones de la Sierra Juárez, en el estado de Oaxaca (Alfonso-Corrado *et*

al., 2014). El número mayor de migrantes por generación se puede deber a las distancias geográficas menores entre las poblaciones localizadas en la Sierra Juárez.

Sistema de cruzamiento

La mayoría de la semilla llena que produjeron los árboles que crecen en sitios con densidad poblacional alta fue resultado de autofecundación. La tasa de cruzamiento estimada en árboles con densidad poblacional alta (> 500 individuos ha^{-1}) fue menor que en los árboles con una densidad de menos de 50 individuos ha^{-1} (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5. Tasa de cruzamiento t_m y t_s (\pm error estándar) en dos grupos de árboles de *Pinus patula* con diferente densidad de población en La Selva.

Densidad (individuos ha^{-1})	(t_m)	(t_s)	($t_m - t_s$)	(r_p)
< 50	1.022 (± 0.120)	1.069 (± 0.159)	-0.047 (± 0.070)	0.120 (± 0.063)
> 500	0.596 (± 0.157)	0.557 (± 0.190)	0.039 (± 0.059)	0.334 (± 0.232)

Estimación multilocus de la tasa de cruzamiento (t_m), estimación de la tasa de cruzamiento considerando un locus individual (t_s), tasa de endogamia biparental ($t_m - t_s$), correlación de paternidad (r_p). Nota: Las estimaciones del sistema de cruzamiento se realizan simultáneamente para todos los árboles dentro de cada categoría de densidad.

Los valores de t_m y t_s son inferiores en árboles con densidad poblacional alta que el valor ($t_m=0.9$) que se reportó en general para el género *Pinus* (Mitton, 1992). La tasa de cruzamiento es cercana a uno en coníferas con polinización anemófila cuando no existen otros factores que interfieran en el proceso de cruzamiento (Ledig, 1998). Dentro de estos factores, la densidad de árboles puede influir positivamente o negativamente sobre el patrón de cruzamiento en una población de especies monoicas con polinización anemófila del género *Pinus* debido a que la cantidad y distribución espacial de los individuos pueden determinar la cantidad de polen que se produce y dispersa dentro de la población (Farris y Mitton, 1984; Rajora *et al.*, 2002). Por ejemplo, de manera general, se esperaría que la nube de polen que rodea árboles aislados o con

densidades poblacionales bajas contenga una proporción alta de su propio polen, lo que aumenta la probabilidad de autofecundación, mientras que en sitios con densidad poblacional alta se esperaría que la nube de polen alrededor de un árbol tenga una proporción baja de su propio polen, lo que disminuye la probabilidad de autofecundación e incrementa la tasa de cruzamiento (Arista y Talavera, 1996). En este sentido, una relación positiva se reportó entre las tasas de cruzamiento y la densidad de población en *Pinus strobus* (Buchert *et al.*, 1997; Marquardt *et al.*, 2007), *P. attenuata* Lemmon. (Burczyk *et al.*, 1997) y *Picea rubens* (Rajora *et al.*, 2000a). Sin embargo, también, una correlación negativa se encontró entre la tasa de cruzamiento y la densidad arbórea en poblaciones de *Larix occidentalis* Nutt. (El-Kasaby y Jaquish, 1996), *Pinus chiapensis* (del Castillo y Trujillo, 2008) y *P. pinaster* (de Lucas *et al.*, 2008) como consecuencia del tamaño de las copas de los árboles y la presencia de árboles circundantes que actuaron como barreras físicas para limitar el movimiento lateral del polen. Frecuentemente, la velocidad del viento es un factor físico que influye en la dispersión del polen (Ozawa *et al.*, 2012). La apertura del dosel y la reducción en la densidad arbórea de las especies asociadas podrían permitir un aumento en el flujo de alelos diferentes transportados en el polen de especies anemófilas (Bacles, 2014). Por ejemplo, la tasa de cruzamiento fue menor en bosques con densidad arbórea alta ($t_m = 0.54$) de *Pinus chiapensis* que en bosques fragmentados con densidad arbórea baja ($t_m = 1.0$) (del Castillo y Trujillo, 2008). De la misma manera, El-Kasaby y Jaquish (1996) encontraron que la tasa de cruzamiento fue menor en una población de *Larix occidentalis* con densidad alta ($t_m = 0.793$) que en poblaciones de esta especie con densidad poblacional baja ($t_m = 0.914$). Estos resultados fueron similares a la tasa de cruzamiento que se encontró en árboles de *P. patula* con densidad poblacional menor a 50 individuos ha^{-1} en el presente estudio. Esto podría deberse a que el viento transportó con eficiencia mayor el polen con alelos diferentes de árboles ubicados en rodales distantes por la interferencia menor que representó el número reducido de árboles

circundantes (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004; Dyer y Sork, 2001). Es importante mencionar que los lotes de semillas que se utilizaron para el análisis de indicadores reproductivos (capítulo 2) y sistema de cruzamiento fueron los mismos. Una tasa alta de endogamia estimada a partir de semillas vanas se detectó en árboles con densidades arbóreas bajas, sin embargo una tasa baja de endogamia se registró en semillas llenas a partir de la evaluación con marcadores moleculares. Las semillas vanas son una manifestación de depresión endogámica donde los genes deletéreos en estado homocigótico son eliminados como un mecanismo de selección (O'Connell *et al.*, 2006; Mosseler *et al.*, 2000). Por lo tanto la semilla llena fue producto del cruzamiento entre individuos no relacionados genéticamente en los árboles en rodales con densidad arbórea baja. Por otro lado, la tasa alta de autofecundación que se encontró en los árboles que crecen en sitios con densidad poblacional mayor a 500 individuos ha⁻¹ sugirió que la presencia de una proporción alta de árboles de otras especies pudo limitar la dispersión de polen como se encontró en *Larix occidentalis* Nutt. (El-Kasaby y Jaquish, 1996) y *Pinus chiapensis* (del Castillo y Trujillo, 2008). Adicionalmente, es probable que una proporción de la progenie resultante de eventos de autofecundación fue capaz de tolerar niveles altos de endogamia debido a la ausencia de alelos deletéreos, y posiblemente a una diversidad genética mayor en los padres (Hedrick, 2005; Rajora *et al.*, 2000a).

La tasa de cruzamiento con base en información de un locus simple (t_s) fue menor que la tasa de cruzamiento multilocus en los árboles en densidad alta, mientras que t_s fue mayor que la t_m en árboles que crecen en una densidad baja (Cuadro 4.5). La diferencia entre t_m y t_s indicó que el 4% del cruzamiento ocurrió entre individuos emparentados en sitios con densidad arbórea alta, mientras que el cruzamiento entre individuos emparentados estuvo ausente, en los árboles en densidad arbórea baja (Cuadro 4.5). Una estructura familiar es común en los bosques con una densidad poblacional alta (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004). Por lo tanto los árboles vecinos

generalmente son parientes, lo que aumenta la probabilidad de endogamia por el cruzamiento entre individuos genéticamente relacionados parientes (Mimura y Aitken, 2007). Por lo contrario, la estructura familiar está ausente en bosques con densidad arbórea baja (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2008).

La correlación de paternidad (r_p) entre la progenie derivada de cada árbol madre fue superior en los árboles con densidad poblacional alta, en comparación con la estimada en los árboles en densidades menores a los 50 individuos ha^{-1} ; es decir, la probabilidad de que dos progenies resultado del cruzamiento al azar sean hermanos completos fue mayor en los árboles con una densidad poblacional alta (Cuadro 4.5). Esto se pudo deber a que en sitios con densidad arbórea baja el polen puede alcanzar una distancia mayor de dispersión debido a que los pocos árboles vecinos no representaron una barrera a la circulación y flujo de polen, como se encontró en otros estudios (El-Kassaby y Jaquish, 1996; Dyer y Sork, 2001). Los resultados para *P. patula* en la presente investigación fueron consistentes con los resultados encontrados en *Picea jezoensis* Carr. (Tomita *et al.*, 2008), *Pinus sylvestris* (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004 y *Larix occidentalis* (El-Kassaby y Jaquish, 1996) en rodales donde una remoción de los árboles circundantes redujo la correlación de paternidad como consecuencia de un movimiento mayor del polen (Tomita *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

La diversidad genética de *Pinus patula* fue alta en las dos poblaciones muestreadas, con deficiencias moderadas de heterocigotos. La población de La Selva presentó un nivel mayor de polimorfismo, y además existe una diferenciación genética moderada entre las dos poblaciones, con un flujo génico reducido entre ellas. Los árboles con menor densidad de población presentaron tasas de cruzamiento mayores y una proporción menor de cruzamientos entre individuos emparentados.

LITERATURA CITADA

- Alfonso-Corrado, C., J. Campos-Contreras, G. Sánchez-García, A. Monsalvo-Reyes, y R. Clark-Tapia. 2014. Manejo forestal y diversidad genética de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl, & Cham, en Sierra Juárez, Oaxaca. *Madera y Bosques* 20: 11-22.
- Applied Biosystems. 2005. GeneMapper® Software Version 4.0. Reference and Troubleshooting Guide. Applied Biosystems Inc. Foster City, CA. 82 p.
- Arista, M., and S. Talavera. 1996. Density effect on the fruit-set, seed crop viability and seedling vigour of *Abies pinsapo*. *Annals of Botany* 77: 187-192.
- Ayari A., D. Moya, M.N. Rejeb, B.A. Mansoura, A. Albouch, J. De Las Heras, T. Fezzani, and B. Henchi. 2011. Geographical variation on cone and seed production of natural *Pinus halepensis* Mill. forests in Tunisia. *Journal of Arids Environments* 75: 403-410.
- Bacles, C.F.E. 2014. Pollen, wind and fire: how to investigate genetic effects of disturbance-induced change in forest trees. *Molecular Ecology* 23: 20–22.
- Barrios, D., V. García, L.F. Osorio, N. Isaza, J.D. Palacio, F. García, y A. Sánchez. 2004. Análisis de la diversidad genética de colecciones élite de *Eucalyptus*, por medio de marcadores moleculares microsatélites. *Fitotecnia Colombiana* 4: 96-106.
- Boys, J., M. Cherry, and S. Dayanandan. 2005. Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of red pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *American Journal of Botany* 92: 833–841.
- Burczyk S., W.T. Adams, and J.Y. Shimizu. 1996. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. *Heredity* 77: 251-260.
- Burczyk, S., W.T. Adams, and J.Y. Shimizu. 1997. Mating system and genetic diversity in natural populations of knobcone pine (*Pinus attenuata*). *Forest Genetics* 4: 223-226.

- Buchert, G.P., O.P. Rajora, J.V. Hood, and B.P. Dancik. 1997. Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus* L.) in Ontario, Canada. *Conservation Biology* 11: 747-758.
- Chagné, D., P. Chaumeil, A. Ramboer, C. Collada, A. Guevara, M.T. Cervera, G.G. Vendramin, V. Garcia, J.M. Frigerio, C. Echt, T. Richardson, and C. Plomion. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1204–1214.
- Chhatre, V.E., and O.P. Rajora. 2014. Genetic divergence and signatures of natural selection in marginal populations of a keystone, long-lived conifer, Eastern White Pine (*Pinus strobus*) from Northern Ontario. *PLoS ONE* 9: 1-13.
- del Castillo, R.F., and S. Trujillo. 2008. Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. *New Phytologist* 177: 517-524.
- Delgado-Valerio, P., y V. Rebolledo-Camacho. 2016. Diferenciación genética de rodales semilleros de *Pinus patula* Schiede Ex Schltd & Cham. mediante microsatélites. II Reunión Internacional Científica y Tecnológica. XXIX Reunión Científica y Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Veracruz.
- de-Lucas, A.I., J.J. Robledo-Arnuncio, E. Hidalgo, and S.C. González-Martínez. 2008. Mating system and pollen gene flow in mediterranean maritime pine. *Heredity* 100: 390–399.
- 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 pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *International Journal of Plant Sciences* 170: 609-626.
- Dyer, R.J., and V.L. Sork. 2001. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* 10:859-866.

- Echt, C.S., S. Saha, K.V. Krutovsky, K. Wimalanathan, J.E. Erpelding, C. Liang, and C. D. Nelson. 2011. An annotated genetic map of loblolly pine based on microsatellite and cDNA markers. *BMC Genetics* 12: 1-16.
- El-Kassaby, Y.A., and B. Jaquish. 1996. Population density and matting pattern in Western Larch. *Journal of Heredity* 87: 438-443.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1189–1195.
- Fageria, M.S., and O.P. Rajora. 2013. Effects of harvesting of increasing intensities on genetic diversity and population structure of white spruce. *Evolutionary Applications* 6: 778-794.
- Farris, M.A., and J.B. Mitton. 1984. Population density, outcrossing rate, and heterozygote superiority in Ponderosa Pine. *Evolution* 38: 1151-1154.
- Fisher, P.J., T.E. Richardson, and R.C. Gardner. 1998. Characteristics of single- and multi-copy microsatellites from *Pinus radiata*. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 969–979.
- García-Gómez, V., C. Ramírez-Herrera, C. Flores-López, y J. López-Upton. 2015. Diversidad y estructura genética de *Pinus johannis*. *Agrociencia* 48: 863-873.
- Gaspar, G.M., A.I. de-Lucas, R. Alía, J.A. Pinto-Paiva, E. Hidalgo, J. Louzada, H. Almeida, and S.C. González-Martínez. 2009. Use of molecular markers for estimating breeding parameters: a case study in a *Pinus pinaster* Ait. progeny trial. *Tree Genetics and Genomes* 5: 609-616.
- Godt, M.J.W., J.L. Hamrick, M.A. Edwards-Burke, and J.H. Williams. 2001. Comparisons of genetic diversity in white spruce (*Picea glauca*) and jack pine (*Pinus banksiana*) seed orchards with natural populations. *Canadian Journal of Forest Research* 31: 943-949.

- Hartl, D.L., and A.G. Clark. 2007. Principles of Population Genetics. 4th ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. 651 p.
- Johnson, R., B.S. Clair, and S. Lipow. 2001. Genetic conservation in applied tree breeding programs. *In*: Thielges, B.A., S.D. Sastrapradja, and A. Rimbawanto (eds.). Proceedings of the International Conference on *Ex Situ* and *In Situ* Conservation of Commercial Tropical Trees. GadjahMada University, Yogyakarta, Indonesia and ITTO, Yokohama, Japan. pp: 215-230.
- Karhu, A., C. Vogl, G.F. Moran, J.C. Bell, y O. Savolainen. 2006. Analysis of microsatellite variation in *Pinus radiata* reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 167-175.
- Ledig, T.F. 1988. The conservation of diversity in forest trees. Why and how should genes be conserved? *BioScience* 38: 471-479.
- Ledig, T.F. 1998. Genetic variation in *Pinus*. *In*: Richardson, D. M. (ed.). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, New York. pp: 251–280.
- Lise, Y., Z. Kaya, F. Isik, R. Sabuncu, I. Kandemir, and S. Önde. 2007. The impact of over-exploitation on the genetic structure of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) populations determined by RAPD markers. *Silva Fennica* 41: 211–220.
- Marcucci, S., C. Acuña, S. Torales, N. Zelener, P. Pathaver, G. López, L.Harrand, and E. Hopp. 2001. Evaluación de la variabilidad genética en huertos semilleros de especies de *Eucalyptus*. *IDIA XXI* : 180-184.
- Marquardt, P.E., S.E. Craig, B.K. Epperson, and D.M. Pubanz. 2007. Genetic structure, diversity and inbreeding of eastern white pine under different management conditions. *Canadian Journal of Forest Research* 37: 2652-2662.
- Mitton, J.B. 1992. The dynamic mating systems of conifers. *New Forests* 6: 197-216

- Morgante, M., G.G. Vendramin, and A. M. Olivieri. 1991. Mating system analysis in *Pinus leucodermis* Ant.: detection of self-fertilization in natural populations. *Heredity* 67: 197-203.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89; 583-590.
- Nkongolo, K.K., R. Narendrula, M. Mehes-Smith, S. Dobrzeniecka, K. Vandelight, M. Ranger, and P. Beckett. 2012. Genetic sustainability of fragmented conifer populations from stressed areas in northern Ontario (Canada): Application of molecular markers. *In*: Blanco, J.A. (ed.). *Forest Ecosystems - More than Just Trees*. ISBN: 978-953-51-0202-1, Available from: <http://www.intechopen.com/books/forest-ecosystemsmore-than-justtrees/sustainability-of-spruce-and-pine-populations-from-stressed-areas-in-northern-ontariocanadawww>.
- O'Connell, L.M., A. Mosseler, and O.P. Rajora. 2006. Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97:418-426.
- Ozawa, H., A. Watanabe, K. Uchiyama, Y. Saito, and Y. Ide. 2012. Genetic diversity of *Pinus densiflora* pollen flowing over fragmented populations during a mating season. *Journal of Forest Research* 17: 488-498.
- Rajora, O.P., A. Mosseler, and J.E. Major. 2000a. Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. II. Genetic diversity, population structure and mating behavior. *Canadian Journal of Botany* 78: 941–956.
- Rajora, O.P., M.H. Rahman, G.P. Buchert, and B.P. Dancik. 2000b. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* 9: 339–348.

- Rajora, O.P., A. Mosseler, and J. E. Major. 2002. Mating system and reproductive fitness traits of eastern white pine (*Pinus strobus*) in large, central versus small, isolated, marginal populations.
- Ramírez-Herrera, C., J.J. Vargas-Hernández, and J. López-Upton. 1998. Allozyme variation in the mexican closed-cone pines. *In*: Bruns, S., S. Mantell, C. Trägårdh, and A.M. Viana (eds.). Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation, and Management. Proceedings of an IFS Workshop. IFS, Stockholm. pp. 89–93.
- Ritland, K. 1994. Multilocus mating system program MLTR, version 0.9 edition. Department of Botany, University of Toronto, Ont.
- Robledo-Arnuncio, J.J., P.E. Smouse, L. Gil, and R. Alía. 2004. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *Forest Ecology and Management* 197: 245-255.
- Saghai-Marouf, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 8014-8018.
- Sanguinetti, C.J., N.E. Días, y A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:915-919.
- Thomas, B.R., S.E. Macdonald, M. Hicks, D.L. Adams, and R.B. Hodgetts. 1999. Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 793-801.

- Tomita, M., H. Saito, and Y. Suyama. 2008. Effect of local stand density on reproductive processes of the sub-boreal conifer *Picea jezoensis* Carr. (Pinaceae). *Forest Ecology and Management* 256: 1350-1355.
- Vogl, C., A. Karhu, G. Moran, and O. Savolainen. 2002. High resolution analysis of mating systems: inbreeding in natural populations of *Pinus radiata*. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 433–439.
- Wasielewska, M., M. Klem, and J. Burczyk. 2005. Genetic diversity and mating system of scots pine plus trees. *Dendrobiology* 53: 57-62.
- White, T.L., W.T. Adams, and D.B. Neale. 2007. *Forest Genetics*. CABI Publishing. Cambridge, U.S.A. 682 p.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yeh, F., R. Yang, and T. Boyle. 1997. Popgene. Versión 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Alberta, Canada. 28 p.
- Zelener, N., S.N. Marcucci-Poltri, N. Bartoloni, C.R. López, and H.E. Hopp. 2005. Selection strategy for a seedling seed orchard design based on trait selection index and genomic analysis by molecular markers: a case study for *Eucalyptus dunnii*. *Tree Physiology* 25: 1457–1467
- Zhou, Y., T. Bui, L.D. Auckland, and C.G. Williams. 2002. Undermethylated DNA as a source of microsatellite from a conifer genome. *Genome* 45: 91–99.
- Zobel, B.J., y J.T. Talbert. 1988. *Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales*. Limusa. México, D.F. 545 p.

CONCLUSIONES GENERALES

La densidad arbórea afectó la producción de semilla y características de conos de *Pinus patula*. El índice de endogamia fue mayor en La Selva. En las dos poblaciones de estudio el índice de endogamia menor se encontró en los sitios con densidad mayor. El índice de endogamia se incrementó en los sitios con densidad arbórea menor a árboles ha⁻¹ en La Selva, mientras que en Villa Cuauhtémoc no se encontró una tendencia definida con respecto a la densidad.

Derivado del análisis de germinación se determinó que la calidad de la semilla procedente de árboles que crecen en densidades bajas fue superior a aquella recolectada en sitios con densidad arbórea alta. Lo anterior sugiere por un lado, una diversidad genética alta de la nube de polen que rodea a los individuos que crecen en sitios con densidad poblacional baja como resultado de una mayor dispersión de polen en estos sitios y, por otro lado, procesos de endogamia en los sitios más densos como resultado de una estructura familiar de las poblaciones, lo cual redujo el rendimiento de la semilla como resultado de niveles altos de endogamia.

En general, las poblaciones de *P. patula* investigadas presentaron niveles altos de diversidad genética y una diferenciación moderada entre poblaciones. Factores asociados a la densidad poblacional como dispersión de polen y estructura genética de la población incidieron en la tasa de cruzamiento de la semilla de *P. patula* evaluada en éste estudio.

A pesar de que una proporción alta de la semilla vana que se produce en rodales con densidad poblacional baja fue asociada con un incremento en el nivel de autofecundación, la proporción de semilla llena que se produce en estos sitios fue presumiblemente derivada de eventos de cruzamiento con individuos distantes. Por otro lado, debido a la estructura de la población, la semilla producida en sitios con densidad poblacional alta pudo haber sido probablemente resultado del cruzamiento entre individuos genéticamente relacionados.

Los resultados obtenidos sugieren que un número reducido de individuos en rodales naturales de *Pinus patula* no tendrán efectos negativos significativos en la calidad de las semillas, y podrían incidir en un incremento de la diversidad genética en la regeneración al fomentar el cruzamiento entre árboles distantes.