



Manejo forestal y diversidad genética de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl, & Cham, en Sierra Juárez, Oaxaca

Forest management and genetic diversity of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl, & Cham, in Sierra Juarez, Oaxaca

Cecilia Alfonso-Corrado¹, Jorge Campos-Contreras², Gerardo Sánchez-García¹,
Alejandro Monsalvo-Reyes² y Ricardo Clark-Tapia^{*}

¹ Instituto de Estudios Ambientales. Universidad de la Sierra de Juárez. Oaxaca, México.

² Laboratorio de Bioquímica Molecular-Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO). Fes-IZTACA-LA, Unam. México.

^{*} Autor para correspondencia. rclarck@juppa.unsjed.edu.mx

RESUMEN

Este trabajo se enfoca en el estudio genético de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham, la especie más importante en el ramo forestal en Sierra Juárez, Oaxaca, con la finalidad de evaluar el efecto del manejo forestal en la diversidad genética en sitios reforestados y de regeneración natural. Asimismo, busca determinar si la intensa explotación forestal de la mitad del siglo XX depauperó genéticamente a la especie en estudio. Se emplearon tres microsatélites, para seis sitios, tres bajo manejo forestal de uno, cinco y 18 años y tres con regeneración natural. Los resultados obtenidos de riqueza alélica ($A_o = 59$ y $A_e = 16$) y diversidad genética ($H_e = 0,802$) fueron altos, y no existen diferencias significativas en la diversidad genética entre sitios manejados y de regeneración natural. Por otro lado, se encontró una estructuración genética intermedia según los criterios de Wright ($F_{st} = 0,056$) entre los sitios. El análisis de agrupamiento de UPGMA sugiere que la procedencia de individuos de los sitios manejados fue de un solo sitio, Capulálpam de Méndez. En conclusión *P. patula* no ha sido depauperado genéticamente por manejo forestal presente o pasado y tiene características en su historia de vida que promueven la diversidad genética como altas tasas de entrecruzamiento. Asimismo, la alta abundancia de individuos en los sitios actúa como factor amortiguador en la pérdida alélica. Sin embargo, una inadecuada selección de árboles padre y un bajo número efectivo de individuos pueden afectar las frecuencias alélicas estables y llevar a una pérdida alélica considerable en el futuro.

PALABRAS CLAVE: Capulálpam de Méndez, FAPATUX, pérdida alélica, regeneración.

ABSTRACT

This work focuses on the genetic study of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham., the most important species in the forest sector of the Sierra Juarez in Oaxaca, in order to evaluate the effect of forest management on genetic diversity of reforested sites and natural regeneration. It also seeks to determine whether the intensive logging of the mid-twentieth century genetically impoverished the species. Three microsatellites were used for six sites, covering three forest areas that had been managed for one, five and eighteen years, and three areas of natural regeneration. The resulting allelic richness ($A_o = 59$ and $A_e = 16$) and genetic diversity ($H_e = 0,802$) was high, and there were no significant differences in genetic diversity between managed and natural regeneration sites. However, there was a lack of genetic structure ($F_{st} = 0,056$) at sites with moderate gene flow ($N_e m = 4,19$). Furthermore, UPGMA cluster analysis suggested that the genesis of individual trees in the managed sites were taken from one site on Capulálpam de Méndez. In conclusion *P. patula* has not been genetically impoverished by present or past forest management and has characteristics in its life story that promote genetic diversity and high rates of inbreeding. Also, the great abundance of in-bred individuals in the sites are actually a dampening factor on allelic loss. However, an inadequate selection of parent trees and a low effective number of in-bred individuals can affect the stability of allelic frequency, and lead to considerable allelic loss in the future.

KEY WORDS: Capulálpam de Méndez, FAPATUX, allelic loss, regeneration.

INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares de ADN han sido propuestos como una herramienta básica para evaluar el efecto del manejo forestal sobre la variabilidad genética y sistemas reproductivos de especies forestales (Lee *et al.*, 2002; du Cros, 2004; Degen *et al.*, 2006). Por lo que su uso es ineludible a nivel mundial, en los planes de manejo (Lee *et al.*, 2002; Rajora y Pluhar, 2003; Glaubitz *et al.*, 2003; Dostálek *et al.*, 2011). El estudio genético de poblaciones de especies bajo tratamiento silvicultural previene que la diversidad genética se erosione y, junto con ella, la capacidad de las especies para responder a factores bióticos como parásitos, enfermedades y depredadores y abióticos, como el cambio climático (Schaal *et al.*, 1991; Yanchuk *et al.*, 2008; Hedrick, 2011; Dvorak, 2012),

A pesar de la relevancia de los estudios genéticos en especies bajo manejo forestal, en el mundo, pocas especies han sido sujetas a este tipo de estudios, particularmente en ecosistemas tropicales (Lee *et al.*, 2002; Glaubitz *et al.*, 2003; Degen *et al.*, 2006) y templados (Rajora y Pluhar, 2003; Luna-Rodríguez *et al.*, 2005; Núñez-Medrano, 2010; Dostálek *et al.*, 2011). En México, los trabajos con marcadores moleculares, particularmente con microsatélites son escasos, a pesar de ser uno de los marcadores moleculares con mayor polimorfismo (Luna-Rodríguez *et al.*, 2005; Núñez-Medrano, 2010), esto probablemente debido a su alto costo monetario (Rentería-Alcántara, 2007; Loo, 2011), la falta de conocimientos por parte de la industria forestal de este tipo de herramientas (Palmberg-Lerche, 2002) y al escaso interés de colaboración entre instituciones de educación superior y las organizaciones forestales del país. Los pocos estudios en México, realizados con microsatélites en el género *Pinus* indican que la diversidad genética (H_e) detectada es alta y la mayoría de ésta se distribuye dentro de poblaciones (Karhu *et al.*, 2006; Dvorak *et al.*, 2009), siendo *P. patula*, la especie que presenta una menor diversidad (Dvorak *et al.*, 2009).

En el estado de Oaxaca, las comunidades indígenas de Sierra Juárez gozan en la actualidad de un prestigio internacional debido a su excelente manejo forestal comunitario (Chapela, 1999; UZACHI, 2003), que conserva el

recurso forestal de la región, la biodiversidad asociada y genera empleos e ingresos económicos para sus habitantes (Antinori, 2007; Sánchez-García, 2011). No obstante, esta historia de buen manejo no siempre fue así, ya que las comunidades pasaron por un largo proceso de explotación forestal que afectó seriamente sus recursos naturales en el siglo XX (UZACHI, 2003; Fuente-Carrasco y Barkin, 2011). Una de las concesiones para explotación forestal más documentada es la otorgada de 1956 a 1982 a la fábrica de papel Tuxtepec (FAPATUX) con un equivalente a 251 825 ha de bosques de la Sierra Juárez (Merino-Pérez, 2004). Durante este periodo se utilizó el “Método Mexicano de Ordenación de Bosques Irregulares” (MMOBI) basado en la corta selectiva de árboles dominantes, dejando a los árboles menos deseados (UZACHI, 2003).

Al lograr la autonomía de sus recursos en el año de 1983, las comunidades de Sierra Juárez impulsaron proyectos de manejo forestal comunitario conducentes a recuperar los bosques dañados por FAPATUX, centrándose en la regeneración de los pinos (Chapela, 1999; Merino-Pérez, 2004), especialmente con la especie *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham (UZACHI, 2003). En el año de 1993, las comunidades de Sierra Juárez sustituyen el MMOBI por alternativas silvícolas basadas en árboles padres, partiendo del Método de Desarrollo Silvícola o MDS (UZACHI, 2003) y el método de corte a matarrasa en franja a partir del año 2004 (SmartWood, 2006).

Diversos autores han sugerido que la calidad comercial del arbolado, así como la calidad genética de los pinos se vio empobrecida durante la segunda mitad del siglo XX, debido a la selección y extracción de individuos adultos de mayor porte y tamaño (Chapela, 1999; Merino-Pérez, 2004; Antinori, 2007), sin embargo, no existen estudios genéticos que confirmen esta hipótesis y evalúen el efecto actual del manejo forestal comunitario en la diversidad genética de las poblaciones de *Pinus patula*.

OBJETIVO

Determinar el efecto del manejo forestal en la diversidad genética de poblaciones reforestadas con *Pinus patula* en la comunidad de Capulálpam de Méndez, Sierra Juárez,



Oaxaca y a su vez, compararlas con poblaciones con regeneración natural presentes en Sierra Juárez, utilizando marcadores moleculares de tipo microsatélites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

Sierra Juárez es una región de gran diversidad de especies y ambientes debido a la compleja fisiografía y a la existencia de poca fragmentación. Se localiza entre las coordenadas: 16° y 18° Norte, 95° y 96° Oeste, con alrededor de 17 000 km² de extensión (Gómez-Mendoza *et al.*, 2006). La temperatura media anual oscila entre 16 °C y 24 °C y presenta un régimen de lluvias de verano, entre los 600 mm y 1200 mm (INEGI, 1998). En la región central de Sierra Juárez, se localiza la comunidad de Capulálpam de Méndez la cual tiene una extensión de 7300 ha (INEGI, 1998). Su ubicación geográfica es 17°18' Norte, 96° 27' Oeste y se encuentra a una altura promedio de 2120 msnm (PMD, 2009).

Descripción de la especie

Pinus patula Schiede ex Schltdl, & Cham, es una especie endémica de México, se distribuye en los estados de Chiapas, Distrito Federal, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz (Velázquez *et al.*, 2004), en las regiones de la Sierra Madre Oriental, la Faja Volcánica Transmexicana y la Sierra Madre del Sur, abarcando también el Macizo de

Oaxaca y la Sierra de Oaxaca (Sánchez-González, 2008). Los árboles de esta especie tienen un tronco recto que llega a medir hasta 35 m - 40 m de alto y entre 50 cm y 120 cm de diámetro (Perry, 1991), posee una corteza gruesa de color gris-café oscuro, con profundas fisuras verticales en la parte inferior del tronco.

Sus ramas son frecuentemente multinodales, delgadas y a menudo caídas; sus acículas de 11 cm a 27 cm de largo y 0,5 cm a 0,9 mm de ancho, tres-cuatro por hacedillo son de color verde pálido a verde amarillento. Los conos son duros, de forma cónica-largo y ligeramente curvados y miden entre 5 cm y 10 cm de largo por 4,0 cm - 6,5 cm de ancho (Velázquez *et al.*, 2004).

Elección de sitios y colecta de muestras

Para determinar la diversidad y estructura genética de *P. patula* se seleccionaron tres sitios bajo manejo forestal y tres sitios de regeneración natural (Tabla 1). Los tres sitios con manejo forestal se localizan en la comunidad de Capulálpam de Méndez y comprenden dos sitios de matorrasa en franja reforestados con plántulas de pino con edades de uno (ST1) y cinco años (ST2) y un sitio reforestado con edad de 18 años (ST3) manejado con el método MDS.

Por otro lado, se seleccionaron tres sitios con regeneración natural donde la empresa FAPATUX extrajo en el pasado árboles adultos, cada sitio corresponde a una comunidad de Sierra Juárez: el primero ubicado en Capulálpam de Méndez (CM), el segundo en El Cajón (ELC) en

TABLA 1. Ubicación geográfica de de los sitios muestreados.

| Sitio | Tipo | Altitud msnm | Latitud | Longitud |
|---------------------------|----------------------|--------------|---------------|---------------|
| Capulálpam de Méndez (CM) | Regeneración natural | 2783 | 17° 23'22,4 N | 96° 30'52,9 O |
| Jaltianguis (ELC) | Regeneración natural | 2634 | 17° 34'47,8 N | 96° 30'52,6 O |
| Santiago Comaltepec (SC) | Regeneración natural | 2782 | 17° 19'35,7 N | 96° 24'09,0 O |
| Sitio de un año (ST1) | Manejo forestal | 2618 | 17° 18'28,2 N | 96° 22'58,2 O |
| Sitio de cinco años (ST2) | Manejo forestal | 2266 | 17° 18'21,1 N | 96° 23'05,1 O |
| Sitio de 18 años (ST3) | Manejo Forestal | 2324 | 17° 19'12,4 N | 96° 23'21,3 O |

Santa María Jaltianguis y el tercero en Agua Fría, Santiago Comaltepec (SC). El contar con dos poblaciones externas al municipio de Capulálpam de Méndez sirvió para comparar la diversidad genética encontrada con otros sitios en la Sierra Juárez.

En los sitios seleccionados, se realizó un transecto de 2,5 km de longitud en donde se colectaron, cada 130 metros aproximadamente, acículas jóvenes de cada individuo. El tejido foliar obtenido en campo se depositó en nitrógeno líquido y se trasladó al laboratorio, donde se congeló en un refrigerador (REVCO) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para su posterior análisis molecular.

Análisis genéticos

Se extrajo DNA de acículas de 108 individuos (18 individuos \times 6 sitios = 108 individuos) siguiendo el protocolo DNeasy Plant Minikit QIAGEN. La calidad y la cantidad del ADN se visualizaron en geles de agarosa al 1%. Se probaron ocho microsatélites nucleares (ptTX2123, ptTX2142, ptTX3012, ptTX3019, ptTX3020, ptTX3025; ptTX3030 y RPS34b) utilizados en trabajos previos en el género *Pinus* (Williams *et al.*, 2000).

Un análisis genético preliminar realizado con cinco individuos de cada población, mostró tres microsatélites polimórficos (ptTX2123, ptTX2142 y ptTX3025). La reacción de amplificación utilizada contiene un volumen de 25 μl de: 1x buffer InvitrogenTM (200 mM Tris-HCl (pH = 8,4; 500 mM de KCl), 2 mM de MgCl_2 (InvitrogenTM), 12,8 μl de agua purificada (InvitrogenTM) 10 ng de DNA de cada muestra; 25 μM de cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP de Pharmacia, 10 mM de Oligonucleótido (primer F), 10 mM de Oligonucleótido (primer R) (InvitrogenTM) y 1 U de *Taq* DNA polimerasa (InvitrogenTM).

La amplificación se realizó con el Termociclador MycyclerTM Thermal Cycler-BIORAD (2008) y el programa de PCR consistió en: 94 $^{\circ}\text{C}$ durante tres minutos y 94 $^{\circ}\text{C}$ por 10 segundos (etapa de desnaturalización), una temperatura ($^{\circ}\text{C}$) variable y específica para cada microsatélite (57 $^{\circ}\text{C}$; ptTX2123, 65 $^{\circ}\text{C}$; ptTX2142 y 59 $^{\circ}\text{C}$; ptTX3025) durante 10 segundos (etapa de alineamiento), 72 $^{\circ}\text{C}$ por

10 segundos (etapa de extensión) por 30 ciclos y por último una extensión final a 72 $^{\circ}\text{C}$ por cinco minutos.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1,2% a 110 Volts durante 45 minutos y se tiñeron con Bromuro de Etidio, para luego visualizarse con luz ultravioleta. Los productos amplificados se diluyeron en relación 1/10 w/w o 1/25 w/w según la calidad del producto de PCR, se mezcló 1 μl de la dilución del producto amplificado; 9,75 μl de HiDi Formamide y 0,25 μl ROX-500, esta mezcla se analizó en un equipo 3100 Genetic Analyzer ABIPRISM de Applied Biosystem por el método de análisis de fragmentos.

Una vez obtenidos los electroferogramas, se identificó el tamaño de cada uno de los fragmentos mediante el programa Gene Scan Analyzer 3.7 de Applied Biosystems. Posteriormente, se procedió a genotipificar cada uno de los individuos; con los genotipos obtenidos se construyó una matriz de datos para el análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron en primer lugar, analizados con el programa Micro-Checker v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) con la finalidad de detectar posibles errores de genotipado y proceder a su corrección.

Análisis estadísticos

Diversidad genética

Se calculó la cantidad de alelos observados totales (A_o) y el número de alelos únicos (A_e) por sitio de muestreo y para el total, con el programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) con 10 000 permutaciones. Mediante una prueba de *chi*-cuadrada (χ^2) (Zar, 1984), se analizó si existían diferencias significativas entre alelos observados totales (A_o) y el número de alelos únicos (A_e) en sitios con regeneración natural y sitios manejados,

También se calcularon dos parámetros para estimar la diversidad genética de las poblaciones de *Pinus patula*: (1) la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) sin sesgo (Nei, 1978). Ambos índices fueron calculados usando el programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Asimismo, se realizó una prueba de *chi*-cuadrada (χ^2) (Zar, 1984) para determinar



si la proporción de heterocigos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg con los valores de H_o y H_e por sitio de muestreo y el total. Si el valor calculado (H_o) es mayor que el teórico (H_e), se rechaza la hipótesis nula

Estructura genética

Los coeficientes de fijación F de Wright (1951) se obtuvieron por medio de un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) mediante el programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) utilizando dos modelos mutacionales: Alelos Infinitos o IAM (Infinite Alleles Model) (Kimura y Crow, 1964), y Paso a Paso o SMM (Stepwise Mutation Model) (Slatkin, 1995). Asimismo, bajo la suposición del modelo de islas (Wright, 1951), se estimó el estadístico $N_e m$, (flujo génico) de acuerdo con Crow y Aoki (1984).

La asociación entre los sitios bajo manejo forestal y de regeneración natural se evaluó usando el estimador de similitud de distancias genéticas de Nei (1978). Con la matriz obtenida se realizó un agrupamiento por pares no ponderados usando la media aritmética (UPGMA) con el programa TFPGA (Miller, 2000). Además, con el TFPGA se realizó un análisis de re-muestreo para 1000 réplicas para probar la fortaleza de los nodos en el dendrograma. Adicionalmente, con la finalidad de comprender mejor las relaciones geográficas e interrelaciones genéticas entre los sitios manejados y de regeneración natural, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA, por su siglas en inglés) basado en la matriz de correlación obtenida de las frecuencias alélicas estandarizadas de los tres *loci* usando para ello el programa STATISTICA Versión 7,0 (Stat Soft, 2004),

RESULTADOS

Diversidad genética

El análisis de errores de genotipado reveló que dos *loci* (ptTX2123 y ptTX2142) presentaban alelos nulos, en su mayoría en bajas frecuencias en menos de 2% de los individuos analizados. No se encontraron errores de tartamudeo y pérdida de alelos en ninguno de ellos. Luego de

corregir las frecuencias alélicas y aplicar la corrección de Bonferroni, los tres *loci* se encontraron en equilibrio de H-W.

Se obtuvieron en total 59 alelos en los seis sitios estudiados. El sitio que mostró mayor riqueza en alelos observados (A_o) y únicos (A_e) fue el sitio ELC, con $A_o = 33$ y $A_e = 6$ respectivamente, y el de menor riqueza alélica $A_o = 24$ y $A_e = 0$, correspondió al ST1 (Tabla 2). Los valores de riqueza alélica (A_o y A_e) fueron, en promedio, más altos en los sitios con regeneración natural que en los manejados; sin embargo, no hubo diferencias significativas para alelos observados ($X^2 = 1,25$; $P > 0,67$) y alelos únicos ($X^2 = 1,25$; $P > 0,67$) entre sitios (Tabla 2).

En términos generales, la región de Sierra Juárez mostró una diversidad genética alta ($H_e = 0,794 \pm 0,022$). Se encontró que la diversidad genética total es ligeramente mayor ($H_e = 0,824 \pm 0,033$) en los sitios con regeneración natural que en los manejados ($H_e = 0,763 \pm 0,007$). El sitio Las Maravillas (ST1) presentó la menor diversidad genética ($H_e = 0,769 \pm 0,126$); sin embargo, no mostró diferencias significativas con las demás áreas de estudio ($X^2 = 15,33$; $P > 0,43$). A nivel de sitios como en conjunto (los seis sitios) no existe equilibrio de Hardy y Weinberg, por lo que se observó deficiencia de heterocigos (Tabla 2).

Estructura genética

En términos generales se encontró que, para modelos mutacionales (IAM y SMM), los sitios de muestreo en conjunto ($F_{st} = 0,059$; $R_{st} = 0,101$; $P > 0,001$), manejados ($F_{st} = 0,019$; $R_{st} = 0,007$; $P > 0,001$) y de regeneración natural ($F_{st} = 0,028$; $R_{st} = 0,050$; $P < 0,001$) no están diferenciados genéticamente. Se obtuvieron valores del coeficiente de endogamia F_{is} altos en el total de sitios ($F_{is} = 0,340$; $P > 0,001$), ($F_{is} = 0,265$; $P > 0,001$), manejados y regeneración natural ($F_{is} = 0,332$; $P > 0,001$). Asimismo, se encontró un flujo génico moderado en el total de los sitios ($N_e m = 4,19$), de regeneración natural ($N_e m = 7,75$) y manejados ($N_e m = 8,16$).

Finalmente, el análisis de agrupamiento basado en las distancias genéticas reveló la separación entre sitios de

TABLA 2. Diversidad genética de los sitios manejados y de regeneración natural de *Pinus patula* en Sierra Juárez.

| Sitio | A_o | A_e | H_o | H_e | EHW |
|----------|---------------|-------------|---------------|---------------|-----|
| CM | 28 | 3 | 0,696 (0,099) | 0,790 (0,046) | ** |
| ELC | 33 | 6 | 0,669 (0,139) | 0,845 (0,029) | ** |
| SC | 28 | 3 | 0,554 (0,205) | 0,838 (0,026) | *** |
| Promedio | 29,6(2,887) | 4,00(1,732) | 0,640 (0,075) | 0,824 (0,030) | *** |
| ST1 | 24 | 0 | 0,746 (0,092) | 0,769 (0,126) | NS |
| ST2 | 31 | 2 | 0,579 (0,048) | 0,775 (0,074) | ** |
| ST3 | 27 | 2 | 0,648 (0,098) | 0,765 (0,085) | ** |
| Promedio | 27,33 (3,512) | 1,33(1,150) | 0,658 (0,084) | 0,763 (0,007) | ** |

A_o , número de alelos observados; A_e , número de alelos únicos; H_o , Heterocigidad observada; H_e , Heterocigidad esperada (Nei, 1978). En parentesis están las desviaciones estándares. EHW; Equilibrio de Hardy y Weinberg, el número de asteriscos indica desviación del equilibrio según su grado de significancia. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Ver tabla 1 para el significado de CM, ELC, SC, ST1, ST2 y ST3.

regeneración natural y manejados, con un soporte de 100% (Fig. 1). La disgregación entre sitios con regeneración natural no está lo suficientemente marcada, en contraste con lo observado en sitios manejados, donde el sitio ST1 está separado de ST2 y ST3, con un soporte de 93%.

Los tres sitios manejados muestran una relación cercana, formando un mismo grupo, mientras que los tres sitios con regeneración natural constituyeron otro grupo con una mayor amplitud de distribución (Fig. 1).

Un resultado similar se obtuvo con el PCA, donde los dos componentes estandarizados del factor 1 y 2 de las frecuencias alélicas explican 82% de la varianza total (Fig. 2). En este análisis, el eje F1 es claramente vinculado a las poblaciones con regeneración natural, mientras el eje F2 es esencialmente vinculado a las poblaciones manejadas.

Este análisis permite observar la presencia de alelos compartidos entre las poblaciones de regeneración ausentes en las poblaciones manejadas. La matriz de correlación obtenida mostró una correlación positiva significativa entre las tres poblaciones manejadas y la población CM, en contraparte con una menor correlación con las poblaciones ELC y SC (Tabla 3).

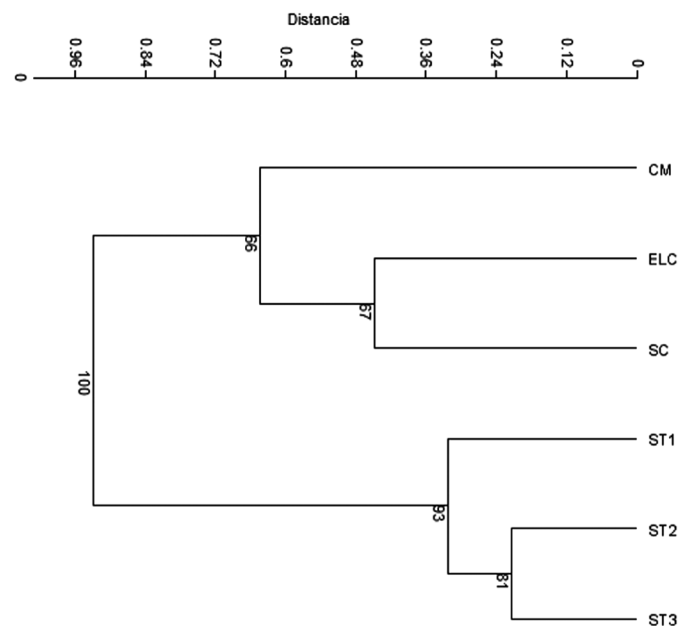


FIGURA 1.- Fenograma basado en las distancias genéticas de Nei (1978). Los números en cada nodo representan el porcentaje (%) de fortaleza obtenida de 1000 réplicas de re-muestreo.

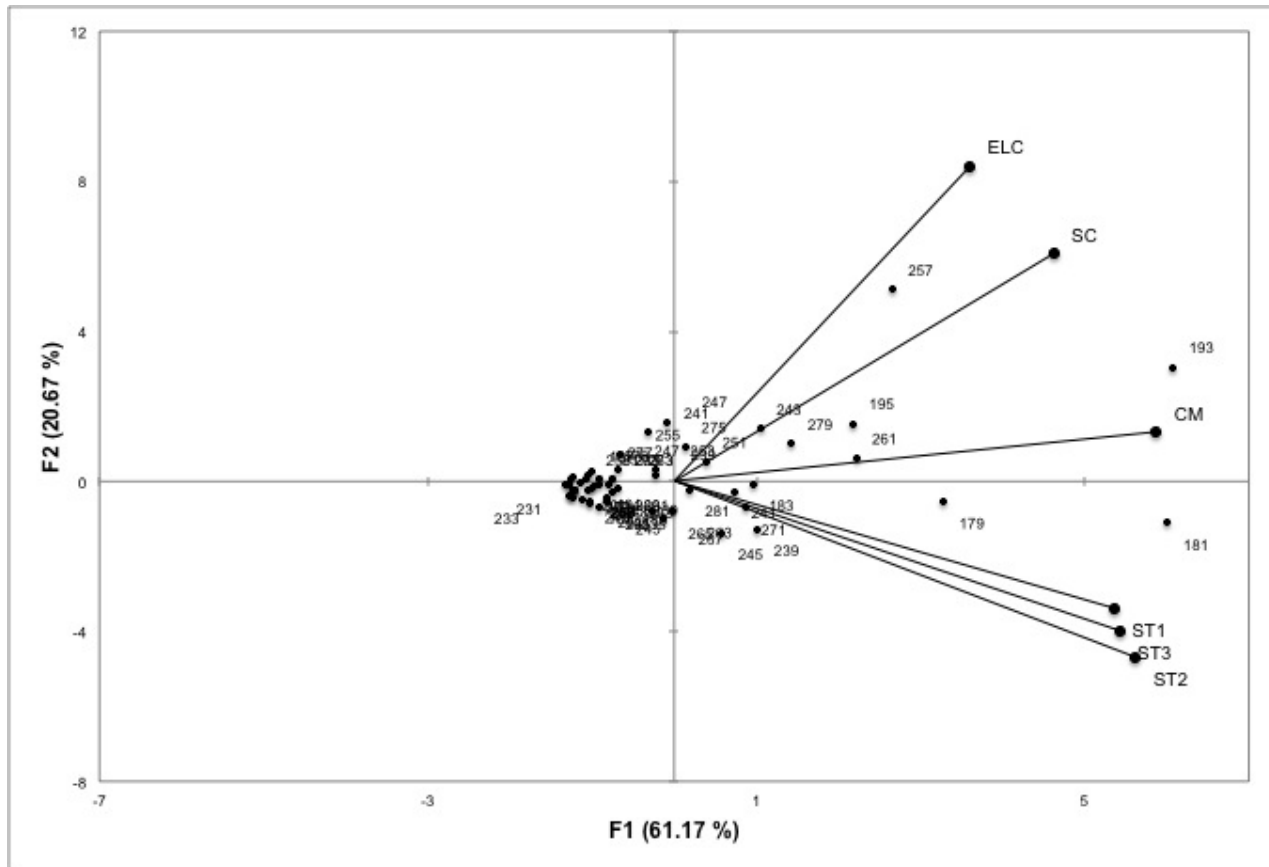


FIGURA 2. Dispersión en dos dimensiones representando la relación entre el factor 1 y 2 del análisis de componentes principales utilizando las frecuencias alélicas de los tres *loci*.

TABLA 3. Matriz de correlación (Pearson) de los sitios manejados y de regeneración natural de *Pinus patula* en Sierra Juárez.

| Variables | CM | ELC | SC | ST1 | ST2 | ST3 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CM | 1 | 0,550 | 0,634 | 0,622 | 0,702 | 0,663 |
| ELC | 0,550 | 1 | 0,612 | 0,207 | 0,208 | 0,219 |
| SC | 0,634 | 0,612 | 1 | 0,458 | 0,341 | 0,385 |
| ST1 | 0,622 | 0,207 | 0,458 | 1 | 0,769 | 0,639 |
| ST2 | 0,702 | 0,208 | 0,341 | 0,769 | 1 | 0,819 |
| ST3 | 0,663 | 0,219 | 0,385 | 0,639 | 0,819 | 1 |

DISCUSIÓN

La diversidad genética observada en las poblaciones de *P. patula* ($A_o = 59$; $H_E = 0,802$), es comparable a la de otras especies de pinos que han estado sujetas a manejo forestal

histórico como *P. strobus* ($A_o = 54$; $H_e = 0,48$) (Marquardt y Epperson, 2004), o especies bajo manejo silvicultural que persiste en la actualidad, como *P. contorta* ($A_o = 83$; $H_e = 0,73$; Thomas *et al.* (1999), *P. pseudostrobus* ($A_o = 14$; $H_e = 0,183$) y *P. montezumae* ($A_o = 13$; $H_e = 0,199$) (Núñez-

Medrano, 2010). Este resultado sugiere que el impacto en la calidad genética de la especie en Sierra Juárez durante la segunda mitad del siglo XX, debido a las actividades forestales de la empresa FAPATUX, no fue drástica como lo han sugerido diversos autores (Merino-Pérez, 2004; Antinori, 2007).

Este resultado sugiere, por un lado, una alta resiliencia genética de *P. patula*, que sustenta la propuesta de Kramer *et al.* (2008) de que la degradación genética, si es que sucede, le toma muchas décadas presentarse, a diferencia de la degradación ecológica que es inmediata. En este contexto, Steinitz *et al.* (2012) publicó que procesos de homogenización debido a flujo génico entre poblaciones o de introgresión, pueden facilitar la llegada de nuevos alelos y mantener niveles considerables de variación genética en plantaciones de *Pinus halepensis*. A futuro, para conocer los procesos de pérdida o recuperación genética en *P. patula*, se recomienda analizar más poblaciones, incorporando más plantaciones y poblaciones no aprovechadas en el pasado para realizar un diagnóstico genético más adecuado del efecto del manejo forestal.

La riqueza alélica presente en los sitios manejados es menor que los sitios con regeneración natural, especialmente ST1 que tiene ausencia total de alelos exclusivos ($A_e = 0$), lo cual se ha considerado como efecto negativo de la extracción de individuos (White *et al.*, 2002). Una estrategia forestal común alrededor del mundo involucra el uso de semillas de uno o pocos árboles padre, o pocas fuentes no locales (Steinitz *et al.*, 2012), esta es una estrategia también común en México. El análisis de componentes principales derivado de las frecuencias alélicas y el agrupamiento obtenido de las distancias genéticas indican no sólo una disgregación entre sitios manejados y de regeneración natural, sino también una alta similitud entre la población de Capulálpam de Méndez (CM) y los sitios manejados, resultado del método de reforestación basado en árboles padres utilizado en el manejo forestal de la comunidad (UZACHI, 2003).

La presencia de alelos únicos pueden representar para la especie un reservorio de diversidad genética en términos de adaptación local y un amortiguador a futuro contra

enfermedades y parásitos (Rajora *et al.*, 2000; Yanchuk *et al.*, 2008) o calentamiento global (Dvorak, 2012). El número de alelos únicos observado en las poblaciones con regeneración natural, no difiere del encontrado por Dvorak *et al.* (2009), sin embargo en poblaciones manejadas, el número de alelos es menor de la mitad. Dvorak (2012) indica que, ante el incremento de enfermedades en plantaciones forestales, es sumamente importante revalorar la importancia de la captura de alelos únicos. Las características de historia de vida de *P. patula*, tales como una vida larga, polinización por viento y alta tasas de entrecruzamiento (Ledig, 1998), aunado a la considerable abundancia de individuos en Sierra Juárez (Castellanos-Bolaños *et al.*, 2008) pueden ser un factor amortiguador en la pérdida alélica (Lee *et al.*, 2002; Glaubitz *et al.*, 2003). Sin embargo, una inadecuada selección de árboles padre y un bajo número efectivo de individuos pueden afectar las frecuencias alélicas estables con el tiempo (Glaubitz *et al.*, 2003), aspecto que debe considerarse a futuro en los programas de mejoramiento genético de Capulálpam de Méndez, con la finalidad de evitar pérdidas económicas, por no tener un control adecuado de alelos únicos como sugiere Dvorak (2012).

Por otro lado, se encontró en sitios de manejo forestal, de regeneración natural y en conjunto una significativa deficiencia de heterocigotos, que coincide con lo encontrado para *P. patula* por Dvorak *et al.* (2009). Esta deficiencia puede deberse a: (1) una alta frecuencia de alelos nulos que pueden subestimar esta variable como se menciona para *P. strobus* (Marquardt y Epperson, 2004), lo cual no es el caso en este estudio, dada la baja frecuencia obtenida de alelos nulos; (2) A endogamia, producto del sistema de reproducción auto-compatible que presenta la especie, que permite la auto-cruza, aspecto común en el género (Williams y Savolainen, 1996; Renteria-Alcantará, 2002); o (3) con una dispersión espacial de semilla limitada a corta distancia que con el tiempo puede inducir a grupos familiares y polinización entre parientes (Farjon y Styles, 1997; Ledig, 1998). Una explicación alternativa de la deficiencia de heterocigotos en sitios manejados y de regeneración natural es que los individuos analizados pro-



ceden de pocos árboles progenitores, lo que implicaría un efecto del manejo forestal pasado y presente, un aspecto prioritario a considerarse en futuras plantaciones, como se ha recomendado para otras especies forestales (Glau-bitz *et al.*, 2003; Degen *et al.*, 2006; Steinitz *et al.*, 2012).

Todos los microsatélites utilizados en este estudio han sido clasificados como polimórficos para especies de pinos duros y pinos blandos (Rentería-Alcántara, 2002). Sin embargo, sólo tres amplificaron y resultaron polimórficos para analizar la diversidad genética de *P. patula*. Resultados similares se han encontrado en otros estudios con *Pinus*, en donde solo una pequeña fracción de los microsatélites utilizados tienen éxito (*i.e.*, Elsik *et al.*, 2000; Devey *et al.*, 2002). A pesar de que el número de *loci* analizados, se encuentran por debajo del rango de otros estudios con pinos, que van de cuatro (Núñez-Medrano, 2010) a más de ocho *loci* (Thomas *et al.*, 1999; Marquardt y Epperson, 2004; Dvorak *et al.*, 2009; Steinitz *et al.*, 2012), el número de alelos observados, alelos únicos y heterocigosis esperada es comparable o superior a estos estudios. Esto sugiere que los resultados obtenidos están bien representados y no existe una subestimación de la diversidad genética. El incrementar el número de *loci* en estudios futuros, implicaría una inversión económica mayor, factor crucial en la investigación actual y una limitante en universidades públicas. Además que un mayor número de *loci*, no garantiza, una diversidad genética diferente a la obtenida en este estudio (Hale *et al.*, 2012).

Por otra parte, el tamaño de muestra representa también una limitante económica y, aun cuando existe un conceso en utilizar un gran número de individuos (>50) (Yan y Zhang, 2004) para estabilizar las frecuencias alélicas y las estimaciones de H_e , este estudio solo utilizó 18 individuos por sitio. Este tamaño de muestra, es superior al promedio de 10 individuos utilizado en diversos estudios empleando microsatélites para especies de pinos manejados (*i.e.* Williams *et al.*, 2000; Dvorak *et al.*, 2009; Steinitz *et al.*, 2012). En este contexto, Hale *et al.* (2012) sugieren, con base en análisis de rarefacción, que un mínimo de 15 individuos permite detectar niveles de diversidad genética similar a la obtenida con un tamaño

de muestra mayor (> 30). Este estudio, utilizó un número de muestras por arriba del mínimo por lo que se puede concluir que los resultados son confiables. No obstante, que los resultados obtenidos son un parte-aguas, para analizar los efectos del manejo forestal en México, con mayores recursos a futuro, se puede incrementar el número de *loci* y el tamaño muestras, para evaluar posibles cambios en la estabilidad de la diversidad genética.

De igual manera, la diferenciación genética total de *P. patula* ($F_{st} = 0,056$; $R_{st} = 0,055$) es similar al valor encontrado en otras especies de *Pinus* utilizando marcadores codominantes (Bucci *et al.*, 1998; Marquardt y Epperson, 2004; Karhu *et al.*, 2006; Dvorak *et al.*, 2009). Estos valores sugieren que *P. patula* presenta flujo génico moderado entre poblaciones. El valor de flujo génico encontrado puede ser producto del sistema de dispersión de polen a grandes distancias, lo que permite colonizar nuevas regiones (Ledig, 1998). La agrupación encontrada en los sitios manejados sugiere que la semilla se colectó de pocos individuos procedentes de una o pocas localidades de Capulálpam (Fig. 1). No obstante esto, el sistema reproductivo, ecológico y genético de la especie, en conjunto con cercanía de los sitios ha impedido una diferenciación genética entre las poblaciones (Hedrick, 2011) y puede permitir a futuro ser un amortiguador que permita una recolonización eficiente e incorpore diversidad genética a las poblaciones (Steinitz *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La gran diversidad genética de *Pinus patula*, junto con su amplia distribución y abundancia representan una ventaja potencial para su evolución a largo plazo frente al manejo forestal. La evidencia indica que el impacto de actividades forestales de la empresa FAPATUX y el manejo actual no han afectado la heterocigosis esperada de la especie. Sin embargo, se observa una pérdida alélica, debido a una inadecuada selección de árboles padre y a un bajo número efectivo de individuos, aspecto que debe considerarse en futuros planes de manejo forestal de la comunidad. Los resultados obtenidos indican que no existe una subestimación de la diversidad genética, a

pesar de solo utilizar tres *loci* y un tamaño de muestra de 18 individuos. Se recomienda considerar en los planes de manejo de la región la procedencia de semillas y el número de individuos involucrados en los programas de reforestación para garantizar el mantenimiento de la diversidad genética de la especie y con ello evitar pérdidas económicas en el futuro.

REFERENCIAS

- Antinori, C. 2007. Integración vertical en las empresas forestales comunitarias de Oaxaca. *In:* L. Bray, D. Merino y D. Berry, eds. Los bosques comunitarios de México: manejo sustentable de paisajes forestales. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. p: 303-342.
- Bucci, G., M. Anzidei, A. Madaghiele y G.G. Vendramin. 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Molecular Ecology* 7(12):1633-1643.
- Chapela, M.F. 1999. Silvicultura comunitaria en la Sierra Norte de Oaxaca. El caso de la Unión Zapoteco-Chinanteca. Estudio del caso sobre la participación campesina en generación, validación y transferencia de tecnología. Red de Gestión de Recursos Naturales. 1a ed. Fundación Rockefeller. México, D.F. 110 p.
- Castellanos-Bolaños, J.F., E.J.T. Garza, Ó.A.A. Calderón, J.J. Pérez, M. Musalem-Santiago y R. López-Aguillón. 2008. Estructura de bosque de *Pinus pátula* bajo manejo en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México. *Madera y Bosques* 14(2):51-63.
- Crow, J.F. y K. Aoki. 1984. Group selection for a polygenic behavioural trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81(19):6073-6077.
- Degen, B., L. Blanc, H. Caron, L. Maggia, A. Kremer y S. Goulet-Fleury. 2006. Impact of selective logging on genetic composition and demographic structure of four tropical tree species. *Biological Conservation* 131(3):386-401.
- Devey, M.E., J.C. Bell, T.L. Uren y G.F. Moran. 2002. A set of microsatellite markers for fingerprinting and breeding applications in *Pinus radiata*. *Genome* 45(5):984-989.
- Dostálek, J., T. Frantík y M. Lukášová. 2011. Genetic differences within natural and planted stands of *Quercus petraea*. *Central European Journal of Biology* 6(4):597-605.
- du Cros, E.T. 2004. Management and conservation of forest genetic resources: Roles of IUFRO a France on the international scene and need for long-term monitoring of genetic diversity in conservation networks. *In:* J. Beaulieu, ed. Silviculture and the conservation of genetic resources for sustainable forest management. Proceedings of the Symposium of the North American Forest Commission. Forest Genetic Resources and Silviculture Working Groups, and the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). Quebec, Canadá. p:3-8.
- Dvorak, W.S., K.M. Potter, V.D. Hipkins y 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(5):609-626.
- Dvorak, W.S. 2012. The strategic importance of applied tree conservation programs to the forest industry in South Africa. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* 74(1):1-6.
- Elsik, C.G., V.T. Minihan, S.E. Hall y C.G. Williams. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus tadea* L. *Genome* 43(3):550-553.
- Excoffier, L. y H. Lischer. 2010. Software Arlequin 3.5.1.2. an integrated software package for population genetics data analysis. Institute of Ecology and Evolution & Swiss Institute of Bioinformatics. University of Berne. Suiza.
- Farjon, A. y B.T. Styles. 1997. Flora neotropica: *Pinus* (Pinaceae). 1a ed. New York Botanical Garden. Nueva York. 191 p.
- Fuente-Carrasco, M. y D. Barkin. 2011. Concesiones forestales, exclusión y sustentabilidad. Lecciones desde las comunidades de la Sierra Norte de Oaxaca. *Desacatos* 37:93-110.
- Glaubitz, J.C., H.X. Wu y G.F. Moran. 2003. Impacts of silviculture on genetic diversity in the native forest species *Eucalyptus sieberi*. *Conservation Genetics* 4(3):275-287.
- Gómez-Mendoza, L., E.I.M. Vega-Peña, J. Ramírez, L. Palacio-Prieto y L. Galicia. 2006. Projecting land use change processes in the Sierra Norte of Oaxaca. México. 1a ed. UNAM-INE-Semarnat. México. 278 p.



- Hale, M.L., T.M. Burg y T.E. Steeves. 2012. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS ONE* 7(9): e45170. doi:10.1371/journal.pone.0045170
- Hedrick, P.W. 2011. Genetics of populations. 4^a ed. Jones and Bartlett Publisher. Massachusetts, EUA. 674 p.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática). 1998. Anuario Estadístico del Estado de Oaxaca. Gobierno del Estado de Oaxaca.
- 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(1):167-175.
- Kimura, M. y J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49(4):725-738.
- Kramer, A.T., J.L. Ison, M.V. Ashley y H.F. Howe. 2008. The paradox of forest fragmentation genetics. *Conservation Biology* 22(4):878-885.
- Ledig, T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: D.M Richardson, ed. Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. EUA. p:251-260.
- Lee, C.T., R. Wickneswari, M.C. Mahani y A.H. Zakri. 2002. Effect of selective logging on the genetic diversity of *Scaphium macropodum*. *Biological Conservation* 104(1):107-118.
- Loo, J.A. 2011. Manual de genética de la conservación. Semarnat y Conafor. México, D.F.
- Luna-Rodríguez, M., J. López-Upton y L.G. Iglesias-Andreu. 2005. Morphometric and molecular (RAPD) variability in a plantation of *Pinus patula* in Veracruz, México. *Agrociencia* 39(2):231-235.
- Marquardt, P.E. y B.K. Epperson. 2004. Spatial and population genetic structure of microsatellites white pine. *Molecular Ecology* 13(11):3305-3315.
- Merino-Pérez, L. 2004. Conservación o Deterioro: El impacto de las políticas públicas en las instituciones comunitarias y en las prácticas de uso de los recursos forestales. 1^a ed. Instituto Nacional de Ecología. México. 321 p.
- Miller, M.P. 2000. Tools for population's genetic analyses (TFPGA) 1.3: A window program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data computer software distributed by author.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3):583-590.
- Núñez-Medrano, J. 2010. Implementación de marcadores moleculares (Microsatélites nucleares, SSRn), para la evaluación genética de áreas semilleras en especies del género *Pinus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 65 p.
- Palmberg-Lerche, C. 2002. Algunas reflexiones sobre la conservación genética en el sector forestal. *Unasylva* 53(209):57-61.
- Perry, P.J. 1991. The pines of México and Central America. 1a ed. Timber Press. Oregon, EUA. 231 p.
- PMD (Plan de Desarrollo Municipal). 2009. Consejo municipal de desarrollo rural sustentable. Gobierno del Estado de Oaxaca/SAGARPA. Capulálpam de Méndez. México.
- Rajora, O.P., M.H. Rahman, G.P. Buchert y B.P. Dancik. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* 9(3):339-348.
- Rajora, O.P. y S.A. Pluhar. 2003. Genetic diversity impacts of forest fires, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). *Theoretical Applied Genetic* 106(7):1203-1212.
- Rentería-Alcántara, M. 2002. Variación y estructura genética de una especie rara en México (*Pinus nelsonii* SHAW). Informe Final de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 57 p.
- Rentería-Alcántara, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. In: L.E. Eguiarte, V Sousa y X. Aguirre, eds. Ecología molecular. Semarnat-INE-UNAM-Conabio. México. p.541-566.
- Sánchez-García, G. 2011. Efecto del manejo forestal en la estructura y variación genética de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. en la Sierra de Juárez, Oaxaca. Tesis de licenciatura. UNSIJ. Oaxaca. 89 p.
- Sánchez-González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques* 14(1):107-120.

- Schaal, B.A., W.J. Leverich y S.H. Rogstad. 1991. A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation of rare plants. *In*: D.A. Falks y K.E. Holsinger, eds. Genetics and conservation of rare plants. Oxford. Nueva York. p:123-134.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics* 139(1):457-462.
- Smartwood. 2006. Resumen público de la certificación de manejo forestal de la Unión de Productores Forestales Zapotecas-Chinantecas de la Sierra de Juárez de R.I. (UZACHI) Certificado: SW-FM/COC-011 auditorías anuales 2004, 2005 y 2006. Certificador Smart Wood Program. Richmond. EUA. 48 p.
- Stat Soft. Inc.. 2004. STATISTICA (Data Analysis Software System). versión 7. www.statsoft.com.
- Steinitz, O., J.J. Robledo-Arnuncio y R. Nathan. 2012. Effects of forest plantations on the genetic composition of conspecific native Aleppo pine populations. *Molecular Ecology* 21(2):300-313.
- Thomas, B.R., S.E. McDonald, M. Hicks, D.L. Adams y R.B. Hodgetts. 1999. Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodge pole pine an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98(5):793-801.
- UZACHI (Unión de comunidades productoras forestales Zapotecas – Chinantecas). 2003. Programa de manejo forestal persistente para el aprovechamiento maderable de la comunidad de Capulálpam de Méndez, Ixtlán, Oaxaca. 96 p.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills y P.Shiple. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping error in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4(3):535-538.
- Velázquez, M.A., G. Ángeles-Pérez, O.T. Llanderal, J.A. Román y H.V. Reyes. 2004. Monografía de *Pinus patula*. 1ª ed. Conafor-Semarnat-Colpos. México. 124 p.
- Yanchuk, A.D., J.C. Murphy y K.F. Wallin. 2008. Evaluation of genetic variation of attack and resistance in lodgepole pine in the early stages of a mountain pine beetle outbreak. *Tree Genetic and Genomes* 4(2):171-180.
- Yan, L.N. y D.X. Zhang. 2004. Effects of sample size on various genetic diversity measures in population genetic study with microsatellite DNA markers. *Acta Zoologica Sinica* 50(2):279-290. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.
- White, G.M., D.H. Boshier y W. Powell. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99(4):2038-2042.
- Williams, C.G. y O. Savolainen. 1996. Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. *Forest Science* 42(1):102-117.
- Williams, C.G., C.G. Elsik y R.D. Barnes. 2000. Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. in Zimbabwe. *Heredity* 84(2):261-268.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15(4):323-354.
- Zar, J.E. 1984. Biostatistical analysis. 2ª ed. Prentice Hall. Nueva Jersey. EUA. 687 p.

Manuscrito recibido el 28 de febrero de 2013.
Aceptado el 25 de marzo de 2014.

Este documento se debe citar como:
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(2):11-22.