



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
CAMPUS IZTACALA



**Estudio isoenzimático de la variación
genética en poblaciones naturales
de *Picea chihuahuana*, en los Estados
de Chihuahua, Durango y Nuevo León**

TESIS

que para obtener el
título de **BIOLOGA**
presenta:

Virginia Jacob Cervantes

Los Reyes, Iztacala

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, a 2 de diciembre de 19 93.

APROBACION DE TESIS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
JEFE DE LA UNIDAD
DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología: Virginia Jacob Cervantes

titulado: "Estudio isoenzimatico de la variación genética en poblaciones naturales de Picea chihuahuana, en los Estados de Chihuahua, Durango y Nuevo León".

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

M.en C. DIODORO GRANADOS SANCHEZ

DR. J. JESUS VARGAS HERNANDEZ

BIOL. IRMA E. DUEÑAS GARCIA

BIOL. ROBERTO VELASCO GARCIA

BIOL. DANIEL TEJERO DIEZ

(Nombre completo)

(Firma)

DEDICATORIA

Emilio Jacob Romero y Mercedes Cervantes Gazca

Mis Padres

Mercedes, Emilio , Alberto, Marcela y Ernesto

Hermanos

*porque sin ustedes,
ninguna de las metas alcanzadas
tendrian el mismo valor.*

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Jesús Vargas Hernández, cuya valiosa ayuda ha significado más allá que una Dirección de tesis.

Al Centro de Genética Forestal, A. C. que como Institución a través del Dr. Teobaldo Eguiluz Piedra, fungió como medio principal para que este estudio pudiera realizarse.

I am especially grateful and also indebted with Dr. Thomas Ledig, Biol. Tech. Paul Hodgskiss, Dr. Thompson Conkle and Dr. Robert Westfall for their guidance, patience and encouragement during my stay at the Institute of Forest Genetics (Placerville) and at the Pacific Southwest Research Station (Berkeley), because without them this study could not be possible to realize.

Al Programa Forestal del Colegio de Postgraduados por su apoyo para la finalización del escrito.

Al valor infinito que ha significado la amistad (en el amplio concepto), que reflejo del don maravilloso de la vida, he tenido la fortuna de conocer; enmarcando con ello a un gran grupo de excelentes personalidades: Salvador Valencia, Antonio Plancarte, José Luis Campos, Celestino Flores, Salvador Montes, Rufino Benítez, Victor Bonilla, Emanuel Farfán, Leticia Mejía, Alberto Domínguez, Eladio Cornejo, Carlos Mar, Nicolas Bautista, Olivia Calixto, Vicente Peña, Cuauhtémoc Sáenz, Guadalupe Peña, Leticia Morales y María Eugenia; que han servido como estímulo y aliento para la culminación de una meta en mi vida.

Y como parte de momentos muy especiales a Elena, Ofelia y Gregorio, Margarita y por supuesto Salvador.

I would like to acknowledge to all the wonderful people of those places in California, for sharing part of their life to make me feel at home.

I need to express my gratitude to Hans and Marj Nienstaedt and Knud and Johanna Clausen for providing me through all this time their friendship; that means a big example of life. For being always there. Thank you!.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
1. INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Marco Biogeográfico del Género <i>Picea</i>	5
2.1.1 Origen	5
2.1.2 Taxonomía y distribución geográfica	9
2.1.3 Importancia actual	17
2.2 Descripción Botánica de <i>Picea chihuahuana</i> Martínez.	20
2.3 Ecología del Género <i>Picea</i> en México	24
2.3.1 Relaciones fitogeográficas	24
2.3.2 Clima	27
2.3.3 Características edáficas	28
2.3.4 Hábitat de la especie	29
2.4 Variación Genética	31
2.4.1 Conceptos básicos	31
2.4.2 Niveles y causas de variación	34
2.5 Métodos de Separación de Proteínas	35
2.5.1 Fundamentos	35
2.5.2 Electroforesis: Características generales	37
2.5.3 Electroforesis en gel de almidón	39
2.5.4 Aplicación de la técnica en estudios de variación genética	43
2.5.5 Estudios electroforéticos en coníferas con referencia especial al género <i>Picea</i>	48

3. MATERIALES Y METODOS	49
3.1 Poblaciones Incluidas en el Estudio	49
3.2 Trabajo de Campo	50
3.2.1 Colecta del material experimental	50
3.3 Trabajo de Laboratorio	50
3.3.1 Preparacion del material experimental	50
3.3.1.1 Estratificación	50
3.3.1.2 Germinación	53
3.3.1.3 Disección de las semillas	53
3.3.2 Análisis electroforético	54
3.3.2.1 Preparación de geles y buffers	54
3.3.2.2 Preparación de las muestras de semilla	56
3.3.2.3 Corrimiento electroforético	57
3.4 Medición y Registro de Información de los Zimogramas	62
3.4.1 Análisis estadístico	64
4. RESULTADOS Y DISCUSION	69
4.1 Número de Loci Resueltos	69
4.2 Medidas de Variabilidad Genética	75
4.2.1 Frecuencias alélicas y número de alelos por locus	75
4.2.2 Porcentaje de loci polimórficos	81
4.2.3 Heterocigosidad observada y esperada	84
4.2.4 Distancias genéticas	89
5. CONCLUSIONES	100
6. LITERATURA CITADA	104

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	NUMERO CROMOSOMICO Y ALGUNAS CARACTERISTICAS DEL GENERO <i>Picea</i> .	12
CUADRO 2.	NOMBRES COMUNES ASIGNADOS AL GENERO <i>Picea</i> EN MEXICO.	15
CUADRO 3.	CARACTERISTICAS BOTANICAS DE LAS ESPECIES DEL GENERO <i>Picea</i> DISTRIBUIDAS EN MEXICO.	21
CUADRO 4.	LOCALIZACION GEOGRAFICA DE LAS POBLACIONES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.	52
CUADRO 5.	CONSTITUCION DE LOS SISTEMAS UTILIZADOS EN LA ELECTROFORESIS.	55
CUADRO 6.	REACTIVOS PARA TINCION DEL SISTEMA "A".	60
CUADRO 7.	REACTIVOS PARA TINCION DEL SISTEMA "B".	60
CUADRO 8.	REACTIVOS PARA TINCION DEL SISTEMA "D".	61
CUADRO 9.	REACTIVOS PARA TINCION DEL SISTEMA "E".	61
CUADRO 10.	RELACION DE SISTEMAS ENZIMATICOS Y BUFFER UTILIZADOS.	65
CUADRO 11.	FRECUENCIAS ALELICAS EN 25 LOCI DE 11 POBLACIONES NATURALES DE <i>Picea chihuahuana</i> .	76
CUADRO 12.	MEDIDAS DE VARIABILIDAD GENETICA EN 11 POBLACIONES DE <i>Picea</i> DEL NORTE DE MEXICO.	79
CUADRO 13.	MATRIZ DE DISTANCIAS GENETICAS.	90

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Picea chihuahuana</i> . CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	22
FIGURA 2. COMPOSICION GENOTIPICA DE UNA SEMILLA DE CONIFERA.	46
FIGURA 3. LOCALIDADES DE <i>Picea chihuahuana</i> INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.	51
FIGURA 4. ZIMOGRAMA DE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS ANALIZADOS.	70
FIGURA 5. AGRUPAMIENTOS DE 11 POBLACIONES DE <i>Picea chihuahuana</i> EN BASE A LAS DISTANCIAS GENETICAS ESTIMADAS A PARTIR DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS DE 25 LOCI.	92
FIGURA 6. AGRUPAMIENTO DE LAS POBLACIONES DE <i>Picea chihuahuana</i> DE ACUERDO CON LAS DISTANCIAS GENETICAS.	96

RESUMEN

El presente estudio se realizó con los objetivos de estimar la magnitud de la variación genética en 11 poblaciones de *Picea chihuahuana*, comparar la variación dentro y entre las poblaciones y estimar las distancias genéticas existentes entre cada una de ellas.

La variación isoenzimática se analizó mediante la técnica de electroforesis en gel de almidón, utilizando el megagametofito (tejido haploide de la semilla). El estudio se realizó en un total de 206 individuos, con un tamaño de muestra que varió de 8 a 25 individuos por población. Para caracterizar el genotipo de cada individuo se empleó una muestra de 6 semillas.

Se analizó un total de 25 loci pertenecientes a 17 sistemas enzimáticos; de éstos, seis sistemas revelaron un solo locus, nueve mostraron dos loci y en los dos restantes se identificaron tres loci.

Con base en las frecuencias alélicas observadas en cada locus se pudieron diferenciar 3 grupos de loci: a) loci monomórficos (loci con un solo alelo); b) el grupo de loci polimórficos con un alelo predominante y uno o varios alelos raros y c) el grupo de loci polimórficos con más de un alelo frecuente.

El número promedio de alelos por locus (1.4), el porcentaje de polimorfismo (34.5%) y el valor promedio de la heterocigosidad esperada (0.12) para el total de las poblaciones analizadas muestra una alta tendencia hacia la fijación de alelos, posiblemente por efecto de deriva genética, dado el tamaño reducido de

la mayoría de las poblaciones naturales de esta especie. Estas medidas de variabilidad implican la presencia de endogamia y una tendencia hacia la pérdida de variabilidad genética, con una reducción en la capacidad de la población para adaptarse a cambios ambientales.

Asímismo, la estimación de las distancias genéticas entre las poblaciones, mostró un nivel moderado de diferenciación entre ellas, dando origen a 4 grupos de poblaciones que no muestran un gradiente geográfico, altitudinal o climático. Este agrupamiento aparentemente aleatorio, apoya la hipótesis de que éstas poblaciones están expuestas al proceso de deriva genética.

SUMMARY

Genetic variability in eleven mexican spruce (*Picea chihuahuana*) populations was analyzed to compare variation within and between populations and to estimate genetic distances between each one of them.

Starch gel electrophoresis was used to survey 206 megagametophytes for 17 enzyme systems presumably representing 25 structural loci; 6 of them developed one locus, 9 showed two loci and the last 2 were identified by three loci.

Based on the resulting gene frequency data, the intrapopulation genetic variability was specified by several common variability measures.

The average number of alleles per locus (1.4), 34.5% of polymorphic loci and 0.12, as the average heterozygosity per population, show a high tendency to fix alleles, probably due to genetic drift, mainly because the small population size in most of the natural populations.

All of these variability measures implies inbreeding and a tendency to the loss of genetic variability with a reduction of the population ability to succeed in a changing environments.

Likewise, genetic distances determine a moderate level of differentiation between populations, distinguishing 4 population groups that do not show up a geographical, altitudinal or climatic range. This apparently random gathering, supports the hypothesis that all of the analyzed populations are exposed to the process of genetic drift.

1. INTRODUCCION

Es ampliamente conocido el hecho de que al paso del tiempo, los mejores individuos de los bosques naturales se han extraído con el fin de aprovecharlos y obtener productos de buena calidad. Los individuos que por sus características fenotípicas no han cubierto las "exigencias" que se marcan para su aprovechamiento son los únicos que sobreviven, con lo que se ocasiona la pérdida de recursos genéticos que nunca más podrán ser recuperados.

Como única solución posible a esta pérdida de germoplasma, a nivel de especies vegetales cultivadas, se ha propuesto la conservación genética; esto significaría la recolección y preservación sistemática de semillas y plantas que actualmente forman parte de los cultivos más importantes para el hombre (Brown, 1978).

Si se considera que en poblaciones extensas o masas arbóreas ampliamente distribuidas, la pérdida de variación genética es importante, en poblaciones cuya área de distribución cubre únicamente pequeños manchones del territorio, el problema es aún más agudo.

La posibilidad de mantener niveles adecuados de variación genética en poblaciones reducidas y escasas es crucial para la conservación de recursos genéticos y la capacidad de la especie para responder a cambios ambientales a fin de evitar su extinción (Ledig y Conkle, 1983; Niebling y Conkle, 1990; Ledig, 1988a, 1988b).

Sin embargo, Ledig (1988a) considera que los recursos genéticos enfrentan mayores riesgos que la extinción de especies, resultando prioritaria la pérdida de poblaciones y la reducción de la diversidad genética local.

La aplicación de las técnicas electroforéticas en la separación de proteínas y el análisis isoenzimático, ha hecho posible el conocimiento rápido de la variación genética. De esta manera se puede determinar donde se encuentran los genes representativos, los genes únicos o las combinaciones genéticas deseadas (Ledig, 1986, 1988b).

El género *Picea*, cuyas especies se conocen comúnmente como pinoabetos espinosos o piceas, es uno de los géneros de coníferas menos conocidos en nuestro país, en cuanto a su biología, distribución natural y hábitat. No existen datos actualizados sobre variación genética, relaciones ecológicas o biogeografía de las especies de este género en nuestro país.

Desde el año de 1942 en que *Picea chihuahuana* fue descrita, hasta la fecha, se han realizado solo algunos estudios encaminados a profundizar un poco en el conocimiento de esta especie.

Tanto *Picea mexicana*, la otra especie del género *Picea* que se encuentra distribuida exclusivamente en nuestro país, como *Picea chihuahuana* se encuentran localizadas en áreas restringidas, bajo condiciones ecológicas muy particulares.

De hecho, ambas especies se consideran paleoendémicas en las sierras de los Estados de Chihuahua, Durango y Nuevo León, únicos estados que contienen a dichas especies.

Así, además del valor económico potencial que el género *Picea* representa para nuestro país, estas especies representan un

valor fitogeográfico ya que sirven como base para entender la evolución y distribución de las coníferas en México. Actualmente este género desempeña un papel ecológico relevante en la composición y estructura de algunos bosques de coníferas, ya que forma parte de rodales con características específicas. Sin embargo, la mayoría de las poblaciones se encuentran en serio peligro de extinción por la acción de diferentes factores bióticos y abióticos. A pesar de lo anterior, aún sigue siendo mínimo el conocimiento que se tiene actualmente de estas especies en nuestro país (Rzedowski, 1978; Domínguez, 1986).

Lo anterior plantea la necesidad de estudiar las poblaciones naturales de *Picea* para ampliar nuestro conocimiento ecológico y genético sobre el género, y se reconsidere la posición que ocupa dentro de las comunidades vegetales de las que forma parte. Sólo mediante la obtención de este tipo de información será posible lograr la conservación íntegra de las poblaciones naturales, evitando una reducción drástica en los acervos génicos existentes en ellas.

Por ello, en la realización de este trabajo se plantean los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL:

Conocer la magnitud y distribución de la variación genética de las poblaciones naturales de *Picea* en 11 localidades geográficas de los Estados de Chihuahua, Durango y Nuevo León.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- a) Determinar la magnitud de la variación genética de las poblaciones naturales de *Picea* colectadas en Chihuahua, Durango y Nuevo León.
- b) Analizar y comparar la variación inter e intrapoblacional de las localidades geográficas incluidas en el estudio.
- c) Establecer las distancias y relaciones genéticas existentes entre las diferentes poblaciones estudiadas.
- d) Aportar información que sirva de apoyo para el establecimiento de planes de protección, fomento y manejo de las poblaciones naturales de *Picea*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Marco Biogeográfico del Género *Picea*

2.1.1 Origen

Se han dado a conocer dos corrientes sobre el origen del género *Picea*, una de las cuales menciona que éste surgió del Noreste asiático y llegó a Norteamérica a través de varias ondas migratorias (Wright, 1955; Gordon, 1968) y la otra sugiere, como origen, el Este de Asia o bien el Oeste americano (Wright, 1955). Sin embargo, el Este asiático parece ser el más indicado debido a que en él se encuentra la mayor variedad de especies, incluyendo a *Picea koyamai*, que es considerada como la especie más primitiva del género.

Basándose en la compatibilidad de cruzamiento y sus afinidades taxonómicas, Wright (1955) sugirió que el grupo de "*Picea rubens-mariana* del Este de América", es más antiguo que el grupo de "*Picea glauca-engelmannii-pungens-sitchensis* del Noroeste". Dicho autor considera a *P. jezoensis* como el enlace más probable entre las especies asiáticas y las del **Noroeste americano** (*Picea glauca*, *P. engelmannii*, *P. pungens* y *P. sitchensis*). Sin embargo, Fowler (1966), con base en estudios de cruzamiento, sugirió que el enlace del que se habla, estaba dado por *Picea glauca* y no por *P. jezoensis* (Wright, 1955).

Un descubrimiento reciente de conos fósiles de una especie extinta, *P. banksii*, apoya la hipótesis expuesta por Fowler. Los fósiles se encontraron en *Banks Island* en el Artico canadiense, asociado con la formación del Mioceno Tardío o Plioceno Temprano. *Picea banksii* presenta conos similares a *P. rubens*,

P. mariana y *P. glauca*, y puede diferenciarse solamente de *Picea glauca* con base en la media del tamaño de cono (Nienstaedt y Teich, 1971). Se concluye que *P. glauca*, o un ancestro cercano como *P. banksii*, proporcionaron el enlace entre piceas norteamericanas y asiáticas. Se señala además que el grupo del noroeste americano se originó a través de *P. banksii*, del cual se desarrolló *P. glauca* y subsecuentemente se diferenció el complejo relativamente reciente "*sitchensis-engelmannii-pungens*", se sugiere que el "grupo *mariana-rubens*" está relacionado con *P. glauca* en línea basal, precediendo el origen de *P. banksii*.

Fowler en 1971, cuestiona la interpretación dada anteriormente acerca del origen del "grupo *mariana-rubens*" y sugiere que la separación de la "línea *glauca*" va en retroceso al menos hasta *P. omorika*. Considera que el grupo llegó a Norteamérica por el Este, durante el Cretáceo, antes de la separación de los continentes (Nienstaedt y Teich, 1971).

Una hipótesis aceptable de la evolución de las piceas americanas, debe considerar el origen de tres especies relictuales: *P. breweriana*, *P. chihuahuana* y *P. mexicana*, (descubierta y descrita esta última en 1961). Dallimore y Jackson (1966), consideran a *Picea mexicana* como "intermedia en varios aspectos" entre *P. engelmannii* y *P. pungens*; en particular en cuanto a las características del cono.

Varios autores han coincidido en señalar que el género *Picea* se encuentra retraído hacia la parte norte de México, debido al efecto posterior de las últimas glaciaciones, que originaron un ambiente hostil (más cálido) para dicho género. Esto propició la aparición de posibles adaptaciones a las fluctuaciones climáti-

cas, que aunadas al aislamiento geográfico de las poblaciones restantes, originó en consecuencia una alta especialización de su nicho ecológico (Dallimore y Jackson, 1966; Sánchez y Narváez, 1983; 1985; Narváez *et al.*, 1983).

Wright (1955) expone datos de su estudio taxonómico y menciona que *Picea chihuahuana* y *P. breweriana* muestran similitud morfológica respecto a algunas especies del Sur asiático, considerando que dichas especies son de un grupo diferente al de las especies del Noroeste americano.

De acuerdo a las diferencias taxonómicas, Wright (1955), indica que es más probable que *Picea chihuahuana* haya tenido su origen en el Cretáceo o en el Jurásico y con menor probabilidad, que esta especie o bien un ancestro, pudo haber entrado durante el Terciario Tardío cuando existía el enlace entre Asia y Norteamérica. También se expone que las piceas americanas del noroeste llegaron después, en el Terciario Temprano o Medio, hasta que mostraron su mejor establecimiento en el Pleistoceno Tardío (Clisby y Sears, 1955; Wright, 1955).

Los conos de *Picea chihuahuana* y *P. banksii* son más parecidos entre sí, siendo que esta última especie es del Mioceno tardío o del Plioceno Temprano. Hills y Ogilvie en 1970, sugieren que *P. mariana* y *P. rubens* están relacionadas con *P. glauca* en línea basal, siendo posible que *P. chihuahuana* y *P. breweriana* sean especies antiguas relacionadas con la misma línea basal y con *P. banksii*. La edad sugerida y la similitud en la morfología de los conos no contradice esta conclusión (Nienstaedt y Teich, 1971).

Como prueba de las relaciones filogenéticas antes citadas, numerosos estudios, llevados a cabo en materia de Paleobotánica y Palinoestratigrafía, han servido de apoyo a las teorías sobre la migración de la especie como consecuencia de los cambios climáticos que se han sucedido desde las glaciaciones.

Clisby y Sears (1955), refieren la presencia esporádica del Pinoabeto espinoso (*Picea*) en los depósitos de la Cuenca de México a niveles bajos e intermedios (muestras tomadas en dos núcleos de perforación bajo la Ciudad de México), demostrando con ello temperaturas más bajas que las actuales y oscilaciones de humedad y sequía con grandes períodos de cambios térmicos que aparentemente se remontan más allá de la glaciación Wisconsiniana Temprana o Cuarta Glaciación (Sears, 1955; Sears y Clisby, 1955).

Haciendo alusión a los numerosos fósiles de coníferas identificados, los que a su vez representan géneros ya extintos o bien poblaciones muy restringidas, Rueda-Gaxiola (1967), menciona una relación muy cercana de dichos fósiles con los géneros actuales de *Abies*, *Araucaria*, *Cedrus*, *Dacrydium*, *Larix*, *Metasequoia*, *Pherosphaera*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Sequoia*, *Thujopsis* y *Tsuga*, con lo que se considera que pudieron estar presentes en México durante el Cretáceo Superior (Rueda-Gaxiola, 1967; Rzedowski et al., 1977) y cuya distribución en la actualidad está restringida al hemisferio Boreal.

Graham en 1972 (Rzedowski et al., 1977), reporta una flora polínica en la región del Istmo de Tehuantepec compuesta por 300 tipos morfológicos distintos, entre los que pueden identificarse géneros como *Picea*, *Abies*, *Pinus* y *Podocarpus*; y para la micro-

flora fósil de la región de Veracruz, identifica granos de polen de las mismas especies, reportando mayor frecuencia para el género *Podocarpus*.

Estudios referentes al Mioceno Inferior y Mioceno Medio realizados en Chiapas por Palacios (1977; 1985) y Biaggi *et al.* (1977), muestran la abundancia de polen de *Picea* y *Pinus* que llega a ser dominante en los sedimentos terciarios analizados.

Palacios (1985), considera con la presencia de microesporas de *Picea* que el paleoambiente cercano a estos sedimentos estuvo habitado por bosques de coníferas en donde *Picea* estaba asociado con *Abies*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, y en menor proporción *Tsuga*, *Larix* y *Cupressus*.

Esta serie de registros han derivado a la conclusión de que los bosques de coníferas predominaron en México, al menos durante algunas épocas del Mesozoico o por lo menos desde fines del Paleozoico hasta el presente, probablemente en forma ininterrumpida. Esto coincide con otros estudios que refieren el apogeo de coníferas a nivel mundial durante el Cretáceo Inferior o el Jurásico Superior (Rzedowski *et al.*, 1977).

2.1.2 Taxonomía y distribución geográfica

Sargent reporta 37 especies del género *Picea* en el año de 1902 (Martínez, 1963), posteriormente Redher cita 38 especies de las cuales 7 corresponden a Estados Unidos y Canadá, 29 a Asia y 2 a Europa; sin embargo, esta clasificación no incluye las especies designadas para México, debido a que éstas se dieron a conocer por primera vez en 1942 (Lacassagne, 1934; Martínez, 1963; Sargent, 1965; Gordon, 1968).

Destaca el estudio realizado por Lacassagne (1934), quien al hacer una compilación de numerosos trabajos y basado en estudios morfológicos y anatómicos, resume 43 especies con 2 variedades para *Picea*.

Estudios recientes coinciden en una clasificación del número total de especies de *Picea* que oscila entre 30 y 40 taxa (Martínez, 1963; Wright, 1964; Fowells, 1965; Hitchcock et al., 1969; Cronquist et al., 1972 y Rushforth, 1987), las cuales habitan en climas fríos, y se distribuyen desde el círculo polar Artico hasta el paralelo 35 de latitud Norte y se menciona que cerca de la mitad de las especies se encuentran confinadas en China, donde se desconoce el número exacto de especies que se mezclan (Fowells, 1965).

Wright (1964) considera a las especies del género *Picea* como originarias de las regiones más frías del hemisferio septentrional. Este autor señala que dentro del género no existen brechas bien delimitadas como para justificar la creación de subgéneros y propone una clasificación aplicable en cada uno de los tres continentes del hemisferio Norte y que incluye dos grupos: Nórdico y Meridional.

Sin embargo, se propone una nueva clasificación (Rushforth, 1987) en la que se coloca a las especies en 7 grupos diferentes, dentro de los cuales *Picea chihuahuana* se incluye en el grupo 3 que comprende las siguientes especies:

GRUPO 3 *P. abies*, *P. obovata*, *P. wilsonii*, *P. morrisonicola*,
P. neveitchii, *P. smithiana*, *P. schrenkiana*,
P. asperata, *P. retroflexa*, *P. aurantiaca*,
P. crassifolia, *P. meyeri*, *P. koyamae*,
P. koraiensis, *P. polita*, *P. chihuahuana*

El esquema filogenético propuesto por Wright (1955), coloca a *Picea chihuahuana* en una relación muy cercana con algunas de las especies del Sur asiático. Con base en la descripción de Martínez (1963), y pocas extrapolaciones para algunos caracteres, Wright mostró que *Picea chihuahuana* difería de *P. polita* y *P. maximowiczii*, de Japón, con base en los registros de sólo 12 y 15 caracteres ponderados, respectivamente (de un total de 53), de *P. brachytyla*, de China, en 15 y de *P. breweriana*, de Oregon y Norte de California, en 17 caracteres; *P. morrisonicola* y *P. wilsonii* se separan en 18 caracteres y *P. orientalis* y *P. pungens* (siendo estas últimas cuatro especies del Sur), con 19 diferencias.

El mayor número de diferencias morfológicas encontradas entre las especies analizadas fue de 31 (Wright, 1955).

Darlington y Wylie (1955), establecieron un número cromosómico haploide de 12 para los géneros de *Picea* y *Pinus*, y por ser de interés comparativo, parte de la lista publicada por estos autores, complementada con la que presenta Khoshoo (1961) para el género *Picea*, así como una apreciación general de características propias de algunas de sus especies se muestran en el Cuadro 1.

CUADRO 1. NUMERO CROMOSOMICO Y ALGUNAS CARACTERISTICAS DEL GENERO PICEA

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	NUMERO CROMOSOMICO	USOS	DISTRIBUCION	AUTORES
<i>Picea abies</i>	Norway spruce	24 24, 48 24, 28 36, 48 24, 28 - 30 30 - 36, 36 37, 48 60, 70	R	EUROPA	Sax y Sax 1933 L. y L. 1948 Kiellander 1950 Kiellander 1950 Ilies 1953, 1958 Ilies 1953, 1958 Ilies 1953, 1958 Ilies 1953, 1958
<i>P. asperata</i>	Dragon s.	(n)12	O	O. DE CHINA	Santamour 1960
<i>P. bicolor</i>		(n)12			Santamour 1960
<i>P. engelmannii</i>	Engelmann s.	(n)12	M, H, P, F	NORTEAMERICA	Santamour 1960
<i>P. glauca</i>	White s.	24	M	NORTEAMERICA	Sax y Sax 1933 Stiff 1952 Santamour 1960
<i>P. jezoensis</i>	Yeddo s.	(n)12	F	E. DE ASIA	Santamour 1960
<i>P. koyamai</i>	Koyama s.	(n)12	F	JAPON	Santamour 1960
<i>P. likiangensis</i> (<i>balfouriana</i>)		(n)12			Santamour 1960
<i>P. mariana</i> (<i>nigra</i>)	Black s.	24	O, C, M, P, H	NORTEAMERICA	Sax y Sax 1933 Little y P. 1958 Santamour 1960 Santamour 1960 Santamour 1960
<i>mariana x glauca</i>		(n)12			
<i>P. maximowiczii</i>		(n)12			Santamour 1960
<i>P. montigena</i>		(n)12			Santamour 1960
<i>P. omorika</i>	Serbian s.	(n)12	F	YUGOSLAVIA	Santamour 1960
<i>P. orientalis</i>	Oriental s.	(n)12	M, F	ASIA MENOR Y S. DE RUSIA	Santamour 1960
<i>P. pungens</i>	Blue s.	24	F, M, C	O. NORTEAMERICA	Sax y Sax 1933
<i>P. rubens</i>	Red s.	(n)12	M, H, P	E. NORTEAMERICA Y S. DE QUEBEC	Santamour 1960
<i>P. sitchensis</i>	Sitka s.	24	M	O. NORTEAMERICA	Thomas 1945
<i>P. smithiana</i>	Himalayan s.	(n)12	M, F	AFGANISTAN Y NEPAL	Mehra y K. 1956

NOMBRE COMUN: Dragon s. (Dragon spruce)

USOS: R (resinas y madera); H (hábitat/comida para vida silvestre); F (ornamental); M (madera); P (protección de cuencas); C (cinturones de protección)

Compilado de: Safford (1974), Santamour (1970) y Khoshoo (1961).

Han quedado mencionados casos excepcionales de poliploidía en *Picea* (Taylor y Patterson, 1980; Khoshoo, 1961; Gordon, 1968), y se señala la existencia de individuos triploides, tetraploides e incluso octaploides (Gordon, 1968), aunque sean casos muy raros dentro del género. Santamour (1970) comenta que de los poliploides encontrados en algunas especies de *Picea* y *Pinus* no ha habido registros de que hayan alcanzado la madurez sexual, se indica un número cromosómico diploide de 24 y se sugiere que las restricciones en la realización de cruzamientos interespecíficos se debe a diferencias génicas o tal vez citoplásmicas y no a divergencias cromosómicas estructurales.

Recientemente se han realizado estudios sobre hibridación entre varias especies de *Picea*, con distintos niveles de éxito, señalando una extensiva hibridación e introgresión (Wright, 1964; Fowells, 1965; Fechner, 1985; Gordon, 1990).

Wright (1964), indica que la hibridación en el género *Picea*, está sujeta a dos factores importantes: El grado de similaridad morfológica y la proximidad de los habitats naturales; al respecto, se considera que existe una población de híbridos naturales del pinoabeto espinoso (*Picea*), en México. La población "sin nombre" analizada por Taylor y Patterson (1980), en sus caracteres morfológicos y químicos, parece ser un híbrido relictos, cuyos progenitores pueden ser, por una parte, *Picea engelmannii* (incluso *P. mexicana*), y el otro posiblemente *P. chihuahuana* o *P. pungens*.

La distribución actual de los bosques de *Picea* en México, se encuentra restringida a pequeñas poblaciones aisladas en el Norte del país, por lo que se considera como un estado relictual

(Rzedowski, 1978). Al hablar de esta condición, se ha propuesto el término epibiótico o sobreviviente para los endemismos que son relictos de una flora perdida o flora anterior casi desaparecida de una región (Sánchez y Narváez, 1985; Gordon, 1968).

En nuestro país el género se encuentra representado actualmente por las especies *Picea chihuahuana* y *P. mexicana*, localmente conocidas bajo la denominación común de *Picea* o Pinabete espinoso, aunque también reciben otros nombres, dependiendo de la región del país (Cuadro 2).

Picea mexicana, se encuentra localizada en la Sierra Madre Occidental, en el Cerro Mohinora, Chihuahua, y en la Sierra Madre Oriental, entre los Estados de Coahuila y Nuevo León. Este taxón fue designado por Taylor y Patterson en 1980 como *Picea engelmannii* var. *mexicana*.

Capó (1972a, 1972b), confirmó el endemismo de esta especie, localizada entre los 3000 y 3500 m.s.n.m. en la Sierra de la Marta, municipio de Rayones, Nuevo León.

Picea chihuahuana se encuentra distribuida en la Sierra Madre Occidental en Durango y Chihuahua (Sánchez y Narváez, 1983; 1990; Narváez et al., 1983) y se reportó en 1984 en Nuevo León (Müller-Using y Alanis, 1984; Müller-Using y Velázquez, 1983; Palacios, 1985).

Los parajes en los que habita esta especie se encuentran ubicados entre los paralelos 26° 08' - 28° 40' de latitud Norte, y los meridianos 106° 22' - 108° 48' de longitud Oeste, del lado occidental y entre los 23° 53' - 25° 11' latitud Norte, y los meridianos 99° 52' y 100° 07' longitud Oeste, en el lado oriental de la República Mexicana.

**CUADRO 2. NOMBRES COMUNES ASIGNADOS AL
GENERO PICEA EN MEXICO**

NOMBRE	LOCALIDAD
MATEGO ó MATEGOCO (TARAHUMARA) PINABETE	CHIHUAHUA
PICEA	San Juanito, Chihuahua El Vergel, Chihuahua UCDF 9, 3, 8, Chihuahua Quebrada del Infierno, Durango
PINABETE	San Juanito, Chihuahua
PINABETE ESPINOSO	UCDF 5, Chihuahua
PINOABETO ESPINOSO/ CAHUTTE ESPINOSO	DURANGO
HAYA ó CIPRES Picea mexicana	Sierra de la Marta, Coahuila El Carmen, Nuevo León/Coahuila

Las cotas altimétricas entre las que se ubica son de 2150 a 2700 m.s.n.m. Sin embargo, 18 de los 20 sitios que se conocen en el Estado de Chihuahua, se encuentran entre los 2220 y 2400 m.s.n.m (Narváez et al., 1983; Müller-Using y Velázquez, 1983).

Picea chihuahuana presenta una distribución discontinua en el Estado de Chihuahua (Gordon, 1968; Sánchez y Narváez, 1985).

Cabe destacar que tomando como referencia a las poblaciones localizadas más al Norte del país, existen 25 km de distancia del Cerro Mohinora (localización de una de las poblaciones de *Picea mexicana*) hasta la población más cercana de *Picea chihuahuana*, y que esa misma población del Cerro Mohinora se encuentra separada 800 km de la población más cercana de *Picea pungens* localizada en Arizona, EUA., y 700 km respecto de la población más cercana de *Picea engelmannii*, en Arizona, EUA. Hay 400 km de distancia entre las poblaciones reportadas por Müller-Alanís en el estado de Nuevo León y las poblaciones que se encuentran en la Sierra Madre Occidental; pero desde la Sierra de La Marta, Coahuila, Méx. en que se localizan otras poblaciones, hasta la población más cercana de *Picea engelmannii* en Nuevo Mexico, EUA. existen 1000 km (Ledig, 1993). Todo ello nos indica el aislamiento geográfico y genético al que se encuentra sujeta la especie.

Gordon (1968) en un estudio sobre las poblaciones de *Picea chihuahuana* en Durango, señala que el número total de individuos es muy reducido y que el área total incluye pocos kilómetros cuadrados.

Rzedowski (1978), considera un área total cubierta por los bosques de *Pseudotsuga* y *Picea* que probablemente no rebasa los 250 km² en toda la zona de distribución de estos géneros.

Sánchez y Narváez (1990), mencionan que el número total de individuos de *Picea chihuahuana*, considerando tanto plántulas como arbolado adulto, en el estado de Chihuahua, es de 13,910 individuos en una superficie de 157 ha, y calculan un total de 17,000 individuos incluyendo las poblaciones de Durango.

En 1983, Müller-Using y Velázquez, agregan a la distribución del género *Picea* en México dos nuevas localidades: La Tinaja, propiedad del Ejido Forestal "La Encantada", Mpio. de Zaragoza y El Butano, Ejido Forestal "La Trinidad", Mpio. de Montemorelos, ambas en el Estado de Nuevo León. La primera constituye el área de distribución más austral del género en nuestro país, muy cercana al Trópico de Cáncer, la segunda está situada a un nivel más bajo que todas las áreas de *Picea* descritas para México, entre los 2150 y 2250 m.s.n.m.

2.1.3 Importancia actual

El género *Picea* es considerado como uno de los grupos arbóreos de gran importancia debido al extensivo aprovechamiento al que ha estado sujeto a través del tiempo, contribuyendo de manera relevante en la economía de Estados Unidos, Canadá y Eurasia (Safford, 1974; Gordon, 1968; Sánchez y Narváez, 1985).

La madera se utiliza en la obtención de pulpa para papel de alta calidad, en la construcción, así como en la fabricación de instrumentos musicales debido a la alta calidad de resonancia que posee, especialmente la madera de *P. abies*

(Safford, 1974; Sánchez y Narváez, 1985). Se obtienen ungüentos medicinales, gomas y destilaciones aromáticas de *Picea glauca* y *Picea mariana*; se utilizan las raíces de *P. abies* y *P. glauca* para hacer cuerdas; en la fabricación de partes de aeronaves se utiliza madera de *P. sitchensis* y se obtienen bebidas antiescorbúticas y diuréticas de las ramillas y acículas de especies como *P. abies*, *P. mariana* y *P. rubens*, además de que muchas especies son altamente apreciadas como ornamentales por el porte elegante que presentan, realzado por la presencia de los conos masculinos en la primavera y que a veces son de color rojo brillante intenso (Martínez, 1945; 1963; Safford, 1974; Sánchez y Narváez, 1985).

Safford (1974) y Narváez (1984), mencionan que propiedades como el peso ligero, resistencia, color claro, vetado fino, textura suave y fibras largas hacen que la madera en la mayoría de las especies de este género pueda usarse potencialmente como madera aserrada.

Para la fauna silvestre, el género descrito representa una fuente de alimento para las aves y los mamíferos que se alimentan de sus semillas y en especial para las ardillas que se alimentan de las yemas vegetativas y reproductivas; además de significar un refugio importante durante el invierno, sobretodo en latitudes muy elevadas (Safford, 1974).

Arboles de este género son apreciados por su rápido crecimiento y debido a su tolerancia a vientos extremos y temperaturas frías, han sido utilizados en fajas de protección en plantaciones, especialmente *P. glauca* y *P. sitchensis*.

Picea pungens es altamente valorado como protector de cuencas hidrológicas y sirve como indicador de las corrientes de agua (Fechner, 1985); se destaca la especie *P. omorika* como "tolerante a atmósferas impuras" (Safford, 1974), debido a que los individuos de este género no son tolerantes a sitios secos o ambientes con aire contaminado.

En México no es posible el aprovechamiento del género *Picea* a nivel comercial, debido a que su distribución es altamente restringida.

Picea chihuahuana muestra actualmente un empobrecimiento genético a consecuencia de un prolongado aislamiento originado por las barreras geográficas existentes entre las poblaciones, una alta especialización de su nicho ecológico y una baja agresividad de la regeneración natural con respecto a las especies con las que cohabita (Gordon, 1968; Sánchez y Narváez, 1983; 1985; Narváez *et al.*, 1983; Sánchez, 1984; Rzedowski *et al.*, 1977).

Narváez *et al.* (1983), Sánchez y Narváez (1985) y Basurto *et al.* (1990), coinciden en señalar que *Picea chihuahuana* no tiene usos industriales en nuestro país; sin embargo, en las localidades se hacen cortas de las puntas de árboles, árboles completos y arbolitos de forma clandestina para aprovechar la madera y como arbolitos de Navidad. Niembro (1986), menciona que el cultivo de esta especie en gran escala sería de gran utilidad para la fabricación de pulpa para papel y como planta de ornato por la belleza de su follaje.

2.2 Descripción Botánica de *Picea chihuahuana* Martínez

Las piceas son árboles siempre verdes, monoicos, de ramas generalmente extendidas y verticiladas; hojas más o menos rígidas y cuadrangulares, con estomas en las cuatro caras. En algunas especies las hojas son comprimidas y, en tal caso, los estomas se encuentran en dos de las caras. Las hojas están dispuestas en espiral, orientadas en todas direcciones y se insertan sobre la prolongación de un cojinete recurrente; en el árbol duran muchos años, pero en seco se desprenden con mucha facilidad (Martínez, 1963) (Cuadro 3).

Picea chihuahuana se ha descrito como un árbol de 25 a 40 m de altura y tronco de 45 a 70 cm de diámetro, con una corteza gris agrietada externamente y moreno obscura por dentro, de 20 mm de espesor y superficie escamosa (Figura 1).

Las ramas inferiores se presentan de los 2 a los 5 m de altura sobre el suelo, son casi horizontales, mientras que las superiores son extendidas o algo levantadas, formando una copa cónica. Las ramillas son opuestas, a veces bifurcadas, muy ásperas y de color amarillento con tinte rosado en sus partes internas y obscuro en las adultas, las cuales se descaman a medida que envejecen (Martínez, 1942; 1963).

Las yemas son terminales en grupos de tres, ovoide-acuminadas, de 7 a 8 mm, con las brácteas apretadas, ovadas u ovals, de borde laciniado. En la base se observan otras brácteas pequeñas y largamente acuminadas (Martínez, 1942; 1963).

Las hojas son solitarias, de 15 a 21 mm de largo por 1.7 mm de ancho, rígidas, con el ápice agudo, córneo y punzante. La

**CUADRO 3. CARACTERISTICAS BOTANICAS DE LAS ESPECIES
DEL GENERO PICEA DISTRIBUIDAS EN MEXICO**

CARACTERISTICAS	<i>Picea chihuahuana</i>	<i>Picea mexicana</i>
ARBOL	25 a 30 m	25 a 28 m
COPA	piramidal	piramidal
DIAMETRO	45 - 60 cm	50 - 60 cm
CORTEZA	agrietada, de color grisáceo.	de 18 mm de grueso, lisa, con placas moreno blanquecinas
RAMILLAS	ásperas y opuestas.	pubescentes, color amarillo opaco.
HOJAS	cuadrangulares, solitarias, lineares, rígidas, rectas o ligeramente encorvadas, articuladas sobre bases decurrentes y salientes; de color verde claro glauco, con 4 a 6 hileras de estomas.	sin canales resiníferos, cuadrangulares, tiesas, sin olor, de 3 a 4 hileras de estomas.
LARGO	de 15 a 20 mm, frecuente de 17 a 19 mm.	de 18 a 36 mm.
APICE	agudo y pungente, de 1 a 2 mm.	pungente y córneo.
CONO	10.5 a 12 cm. cilíndricos u oblongo cilíndricos, a veces levemente encorvados, romos; terminales o subterminales, colgantes; color café amarillento, brillantes, con pedúnculos de 10 mm.	6.5 cm. oval, color amarillento opaco. Terminal o lateral.
ESCAMAS	imbricadas, coriáceo leñosas, abova- das, 20 mm de largo por 18 de ancho; ápice redondeado y entero; numerosas y tiesas.	subrómicas, de 14 mm de largo por 12 mm de ancho; ápice redondeado, margen crosco- denticulado.
SEMILLA	subangulosa, aguda en la base, morena, de 4 a 5 mm con ala casi oval, de 15 a 17 mm.	parda, ovoide, de 3.5 mm de largo por 2.5 de ancho.

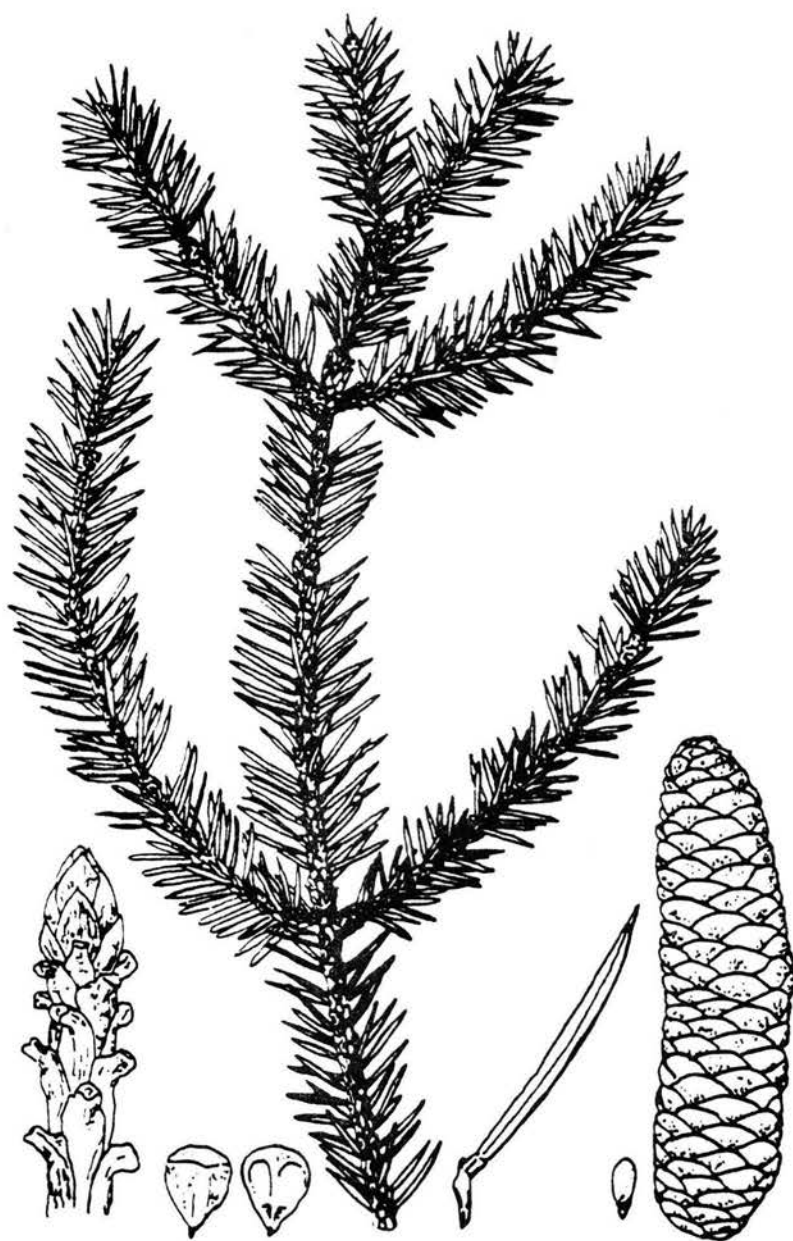


FIGURA 1. *Picea chihuahuana*. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS
(MARTINEZ, 1942)

epidermis está formada de células cuadrangulares formando una fila con interrupciones en el sitio de los estomas. La subepidermis consta de células gruesas que forman una capa continua, doble en las extremidades y simple entre estomas con pocas interrupciones. Presenta además, células de refuerzo en torno de los canales resiníferos y en la extremidad del eje mayor. El tejido en palizada y el tejido lagunoso son parecidos, siendo más alargadas las células del primero y más cortas e irregulares las del segundo. Los canales resiníferos son dos, situados en las extremidades del eje menor (Martínez, 1942; 1963).

El endodermo está formado por unas 17 a 19 células largamente elípticas, de paredes delgadas. En el cilindro central se observa un haz vascular rodeado de células poligonales, y abajo de los vasos liberianos se ven 5 o 6 células gruesas. La sección transversal de la ramilla, practicada a 1 cm de la extremidad, presenta una figura circular lobulada. La epidermis es continua, revestida por una capa de células gruesas, excepto en las superficies entrantes de los lóbulos (Martínez, 1942; 1963).

Como inflorescencia masculina presenta un pequeño cono oval de unos 3 cm de largo de color violáceo. Constan de numerosas anteras con dos sacos poliníferos, colocados en espiral, y su conectivo se engancha en la extremidad figurando una escama. Los conos femeninos se presentan solitarios o en pares, formados por numerosas escamas delgadas y persistentes, colocadas en espirales en torno de un eje llevan una pequeña bráctea; miden de 10.5 a 14 cm de largo por 4 de diámetro (Martínez, 1942; 1963).

Respecto a las semillas de *Picea chihuahuana*, Gordon (1968) menciona una longitud promedio de 3.8 mm, y 12.5 mm para la

semilla con ala. En promedio, se consideran 283 semillas por gramo o un peso de 3.56 gramos por cada 1000 semillas.

En cuanto a la madera, la albura y el duramen son de color blanco (2.5 y 8/2) (Münsell, 1954), no tiene brillo, olor o sabor característicos; presenta una textura fina, homogénea, de grano derecho y veteado tenue. La madera de primavera presenta una coloración más clara y un grosor mayor que los presentados en la de verano, la cual es de color negro obscuro (2.5 y 5/21) (*op. cit.*).

2.3 Ecología del Género *Picea* en México

2.3.1 Relaciones fitogeográficas

Con el aporte de los hallazgos polínicos en diferentes estratos y regiones de la República Mexicana, ha quedado remarcada la fuerte relación existente entre los géneros *Picea*, *Pseudotsuga* y *Abies*. Sin embargo, en la actualidad los bosques de *Picea*, son mucho más reducidos que los bosques de los otros dos géneros (Rzedowski, 1978).

En un estudio de impacto ambiental realizado en 1990, para los Estados de Chihuahua y Durango, resalta que la comunidad vegetal donde se localiza al género *Picea*, que generalmente es en sitios protegidos y humedad relativa elevada, está conformada por masas boscosas compuestas de *Pinus arizonica*, *P. engelmannii* y *P. durangensis*, así como *Pseudotsuga*, *Abies*, *Populus*, *Cupressus* y *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* (Basurto et al., 1990).

En este tipo de comunidades se identifican cuatro estratos (Sánchez y Narváez, 1983). El estrato herbáceo, que presenta la mayor diversidad de especies, está integrado principalmente por *Pteridium aquilinum*, *Galium mexicanum*, *Penstemon campanulatus*, *Fragaria mexicana* y *Bromus anomalus*. El estrato arbustivo, cuenta con especies de los géneros *Arctostaphylos arguta* y *A. pungens*, *Arbutus xalapensis*, *Salvia elegans*, *Crataegus spatulata*, *Prunus* sp. y especies transgresivas de estratos superiores. *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*, *P. durangensis*, *P. arizonica*, *Populus tremuloides* y *Quercus sideroxyla* son los componentes principales del estrato arbóreo inferior. En el último estrato, el estrato arbóreo superior, se encuentran individuos de *Pseudotsuga* sp., *Abies durangensis* y *Cupressus*, que son notablemente más altos.

En la Sierra de la Marta, Coahuila, Cornejo (1987), señala la presencia del bosque de *Picea* en la exposición NNE, entre los 2500 y 3600 m.s.n.m., y menciona la composición florística de los estratos arbóreo, arbustivo y herbáceo. En el primero incluye *Pseudotsuga flahaulti*, *Pinus hartwegii*, *Abies vejarii*, *Pinus ayacahuite* y *Picea mexicana*; considerando en el segundo estrato a *Quercus pungens*, *Q. emoryi*, *Q. hypoxantha*, *Arbutus xalapensis*, *Cercocarpus mojadensis*, *Yucca carnerosana*, *Gymnosperma glutinosum* y *Dasylyrion* sp., y para el estrato herbáceo *Bromus* sp., *Vulpia octaflora*, *Geranium mexicanum* e *Hibiscus cardiophyllus*.

Rojas (1965), señala dentro del bosque perenne-aciculifolio de *Pinus-Pseudotsuga-Abies*, en el estado de Nuevo León a los siguientes elementos: *Pinus montezumae*, *Pinus arizonica* var.

stormiae, *Pinus ayacahuite*, *Pseudotsuga macrolepis*, *Pseudotsuga flahaultii*, *Abies mexicana* y *Picea mexicana*. Capó (1972a), reporta por primera vez a *Taxus globulosa* como parte de la asociación vegetal presente en la comunidad de *Picea mexicana* en el estado de Nuevo León.

Para el municipio de Santiago, en Nuevo León, Valdéz en 1981 (citado en Cornejo, 1987) describe el bosque de *Pseudotsuga-Pinus-Abies* que se localiza en las Sierras de Potrero de Abrego y Rancho Nuevo, entre los 2500 y 3470 msnm. El autor define 4 estratos con respecto a la altura que presenta la composición vegetal: Estrato superior, medio inferior, inferior y rasante. Las especies que componen el primer estrato son *Abies* sp., *Arbutus xalapensis*, *Cupressus arizonica*, *Picea engelmannii* var. *mexicana*, *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera*, *Pinus montezumae*, *Pinus pseudostrobus* var. *estevezi*, *Populus tremuloides*, *Pseudotsuga flahaultii* y *Pseudotsuga macrolepis*. El segundo estrato comprende a especies como *Abies* spp., *Ceanothus fendleri*, *Ceanothus greggii*, *Crataegus greggiana*, *Garrya lauriflora*, *Garrya ovata*, *Juniperus flacida*, *Juniperus monosperma*, *Populus tremuloides*, *Prunus* sp., *Pseudotsuga* spp., *Quercus affinis*, *Q. crassifolia*, *Q. greggii*, *Q. hypoxantha* y *Q. sideroxyla*. El tercer estrato incluye a *Achillea millefolium*, *Amoreuxia wrightii*, *Castilleja* aff. *sessiliflora*, *Chimaphila maculata*, *Chimaphila umbellata*, *Eriogonum hemipterum*, *Geranium* sp., *Rosa woodsii*, *Symphoricarpos microphyllus*, *Senecio bifelovii* y *Trisetum canescens*. El estrato rasante está integrado por *Hypnum cupressiforme* var. *lacunosum*, *Hypnum cupressiforme*, *Entodon erythropus*, *Dicranum scoporium*, *Cladonia*

sp. y *Parmelia* sp.

Müller-Using y Velázquez (1983), definen para el Ejido Forestal "La Encantada", parte de un bosque virgen en una sección de "La Tinaja", integrado por encinos, pinos, oyamel, hayarín, pinabetes y mezquitillo. En su descripción incluyen especies como *Quercus mexicana*, *Pinus teocote* y *Taxus globulosa*, siendo la regeneración de *Picea chihuahuana* muy abundante.

En el Ejido Forestal "La Trinidad", en el Mpio. de Montemorelos, N.L., se remarca la influencia del hombre en el bosque, que se muestra altamente afectado pero no muy deteriorado. La vegetación acompañante es muy similar a las anteriormente descritas. En cuanto a las coníferas y latifoliadas del estrato arbóreo, se distingue dentro de esta localidad a *Cupressus arizonica*, *Tilia floridana*, *Carpinus* sp., *Hicoria pecan* e *Ilex* sp. Este tipo de comunidad se distingue porque no representa ni a la comunidad forestal de alta montaña ni al bosque boreal, ya que también se cuenta con especies como la vid silvestre. (Müller-Using y Velázquez; 1983).

2.3.2 Clima

Picea chihuahuana se presenta en áreas que según la clasificación climática de Köeppen, modificado por García (1973), corresponde al clima semifrío, el más húmedo de los templados subhúmedos (C(w₂)(b')(e)), por la temperatura media de -3 a 18°C del mes más frío y de 15 a 22°C del mes más caliente, con una oscilación de 7 a 14°C, con verano fresco y largo. Se presenta una precipitación anual promedio de 500 a 700 mm. El periodo libre de heladas es de 150 a 160 días al año (García, 1973).

Gordon (1968), reporta una temperatura media anual entre los 11 y los 19°C, con una precipitación media anual que va de los 400 a 925 mm en los sitios donde existe *Picea* en el estado de Durango. Para el estado de Chihuahua, Sánchez y Narváez (1983, 1990), coinciden con lo anterior, además de mencionar la localización de la especie en laderas con pendientes de 35 a 65% con exposiciones Norte, Noroeste y Noreste.

Basurto *et al.* (1990) mencionan una temperatura media anual entre 12 y 18°C, la presencia de lluvias en verano y un cociente de P/T de 55.

El grupo que comprende los climas templado fríos y subhúmedos con lluvias en verano, considera una temperatura media anual de 12°C. En el caso de Durango, ésta va de 9 a 10°C y en Chihuahua es de 11°C.

En Durango se presenta una mayor uniformidad respecto a las temperaturas medias mensuales. También es común la presencia de una menor precipitación en el Norte y centro de Chihuahua, y una mayor precipitación en el centro, Sur y Suroeste de Durango. En el estado de Nuevo León, las poblaciones de *Picea* se localizan en un clima frío y húmedo (Cwbn), en especial en el Bosque perenne aciculifolio con *Pinus-Pseudotsuga-Abies*, del cual *Picea* es un componente, con temperatura media anual entre 4.5 y 13°C y una precipitación estimada entre 1800 y 2200 mm anuales (Rojas, 1965).

2.3.3 Características edáficas

Gordon (1968), describe para las poblaciones de *Picea* en Durango, la presencia de suelos litosoles de montaña y suelos

café de montaña, señalados como suelos delgados, con un pH que va de ligeramente ácido (6.0) a alcalino (7.6). El humus tipo Duff-mull, cuya tendencia es derivar a Mull-like destaca como principal diferencia en la comparación de dos localidades, una de ellas caracterizada como fresca y otra como húmeda.

Sánchez (1984), menciona para la comunidad de *Picea* en Chihuahua, suelos medianamente profundos, pedregosos, coloración gris y textura franco-arenosa; pH ácido de 5.3 a ligeramente ácido de 6.7, con altos contenidos de Potasio. Presentan un alto contenido de materia orgánica en el horizonte superficial y en horizontes intermedios es de mediano a bajo. En los horizontes superficiales se reporta una alta capacidad de intercambio catiónico, y para los intermedios, mediana. Estos suelos se caracterizan como suelos inmaduros, de color rojo, café o rojo amarillento de montaña.

Para el Estado de Nuevo León, se identifican suelos castaños (chestnut), semidesérticos y desérticos (sierozem), suelos negros (chernozem) y suelos complejos de montaña (Rojas, 1965).

2.3.4 Hábitat de la Especie

Los diversos ambientes a los cuales los pinoabetos espinosos se han adaptado naturalmente, proveen una extensa gama de variaciones individuales, ecológicas y geográficas. La hibridación natural y la introgresión son comunes entre las piceas, donde las áreas de distribución de especies compatibles se traslapan. También ha sido posible realizar cruza artificiales entre varias especies que se encuentran ampliamente separadas, y ocurren en forma natural cuando las especies se encuentran

plantadas en el mismo lugar (Safford, 1974).

Las características ecológicas de *Picea chihuahuana* fueron descritas en el primer trabajo reportado para la especie, realizado por Gordon (1968) y posteriormente en el trabajo de Narváez (1984). Estos trabajos abordan ampliamente las características que definen el ámbito ecológico en el que prospera la especie en estudio, por lo que refiero su consulta para profundizar en estos aspectos. De acuerdo con estos autores, la especie prospera en hábitats especiales cuyas características son determinadas por las condiciones geográficas, edáficas y climáticas de cada sitio, lo cual ha tornado a estos ambientes en lugares frágiles cuya perturbación implica una amenaza para *Picea chihuahuana*.

En los estudios señalados se presentan datos sobre las relaciones de crecimiento/diámetro, diámetro/año, análisis químico del follaje para contenido de Calcio, Sodio, Potasio y Nitrógeno, características edáficas, gravedad específica, vegetación, regeneración y endemismo (Gordon, 1968), aspectos relacionados con el crecimiento de los árboles en distintas poblaciones naturales de Chihuahua, además de asociaciones vegetales, características climáticas, edáficas, así como los efectos de regeneración, competencia y enfermedades (Narváez, 1984; Sánchez y Narváez, 1990).

Gordon (1968), Narváez (1984), Sánchez y Narváez (1990), Cibrian-Tovar et al. (1986) y Basurto et al. (1990), coinciden en señalar que agentes nocivos como la palomilla *Laspeyresia* y *Cydia*, barrenan las semillas y conos de *Picea*, ocasionando mortalidades de semilla superiores al 95%.

Los géneros *Alternaria* y *Nigrospora* (hongos ficomicetos), también ocasionan fuertes daños en las poblaciones de *Picea*.

Finalmente la actividad antropogénica derivada de la ganadería, cortas clandestinas y despuntamiento de árboles, también constituye una agente perturbador de esta comunidad.

2.4 Variación Genética

2.4.1 Conceptos básicos

La importancia que reviste la variación dentro de una población animal o vegetal queda señalada específicamente en el concepto de que la variación genética es la materia prima para la selección natural y la evolución, así como para el mejoramiento genético; Darwin utilizó esta base como argumento principal para explicar la Teoría de la Evolución: "Toda variación que no es heredada carece de importancia para nosotros" (Mettler y Gregg, 1982; Nienstaedt, 1979; Dobzhansky *et al.*, 1980).

Así, la variación natural permite la adaptación de los organismos a los ambientes cambiantes y por lo tanto el dominio de ciertos hábitats (Guries, 1979). En respuesta a las presiones del medio ambiente sobre el organismo y su genotipo, ciertos caracteres pueden ser acentuados o bien determinadas combinaciones genéticas pueden ser perpetuadas con mayor frecuencia en una población con un ambiente determinado, originando de esta manera la predominancia de un fenotipo (Hocker, 1984).

La variación genética se encuentra dividida en componentes aditivos y no aditivos. El primer caso es resultado de los efectos acumulados de alelos de todos los loci que influyen en una característica. Los efectos no aditivos son el producto de

la interacción de alelos específicos en un mismo locus (dominancia) o de la interacción entre alelos en diferentes loci (epistasia). Sin embargo, la mayoría de las características de importancia económica en el área forestal se encuentran bajo cierto grado de control genético aditivo, lo que permite utilizarlas satisfactoriamente en sistemas de selección simple (Zobel y Talbert, 1984).

La variación de un carácter puede ser cuantitativa o cualitativa (polimórfica). La diferencia principal entre ambos tipos es el número y la acción de los factores genéticos que determinan los caracteres. La variación cuantitativa considera el tipo de caracteres que se encuentran gobernados por varios genes con efecto acumulativo; en el caso de la variación cualitativa o polimórfica existen dos, tres o más tipos diferentes de formas fácilmente identificables en una población, son iniciados probablemente por la acción de genes de "cambio", cuya acción lleva el epigenotipo a una vía de desarrollo diferente (Mettler y Gregg, 1982).

Las especies arbóreas presentan la capacidad de adaptarse a un amplio rango de condiciones bióticas debido a la alta variabilidad genética que presentan. Lo anterior les permite que ante cambios ambientales bruscos, las poblaciones puedan ajustarse y permanecer en competitividad con otras especies a fin de ocupar los nuevos nichos que se van creando (Nienstaedt, 1979).

El fenotipo, referido como el aspecto morfológico o apariencia física de un individuo (árbol), es influido por el potencial genético del árbol y por el ambiente en el cual se desarrolla y se encuentra indicado por la fórmula: $F = G + A$ (fenotipo =

genotipo + ambiente) (Dobzhansky, 1975; Guries, 1979; Zobel y Talbert, 1984) y el genotipo, que considera la constitución genética de un organismo; es decir, la suma total de toda la información genética que posee un individuo, está determinado por los genes que residen en los cromosomas del núcleo de cada célula en el árbol (Guries, 1979).

Definidos los genes como las unidades funcionales de la herencia; cada gen puede estar representado en la población por una, dos o más formas alternativas, cada una de las cuales recibe entonces el nombre de alelos; su localización en un cromosoma es conocido como locus y cada locus se encuentra representado dos veces en una célula diploide, uno en cada uno de los cromosomas homólogos.

Secuencias especiales de aminoácidos prescritas por el ADN determinan en las enzimas funciones específicas otorgando que tanto su estructura polipeptídica, propiedades químicas y funcionales sean útiles para el análisis de cada una de las formas múltiples que separadas por métodos electroforéticos se han designado como isoenzimas o isozimas; éstas, se presentan en el mismo organismo y tienen actividades catalíticas similares o idénticas, son codificadas por genes diferentes, por lo que difieren en su composición de aminoácidos y en los valores de su pH isoeléctrico (Ferret y Bergmann, 1976; Harris y Hopkinson, 1978; Gottlieb, 1981; Lehninger, 1983; Sheeler y Bianchi, 1987).

Así mismo, las variantes enzimáticas producidas por diferentes alelos del mismo locus génico reciben el nombre de aloenzimas, aleloenzimas o bien electromorfos (Ferret y Bergmann, 1976; Ayala y Kiger, 1984).

2.4.2 Niveles y causas de variación

De acuerdo con el modelo fenotípico, presentado anteriormente, todas las diferencias entre los árboles son resultado de tres factores:

- a) Los diferentes ambientes en los que crecen los árboles.
- b) Las diferencias genéticas entre árboles.
- c) Las interacciones entre los genotipos y los ambientes en los que crecen.

Existe un gran número de categorías de variación dentro de los árboles forestales. Esta agrupación separa los niveles jerárquicos entre especies, procedencias, sitios, rodales, árboles individuales y la variación dentro del árbol (Wright, 1964; Zobel y Talbert, 1984; Fins, 1979).

La variación dentro de especies queda determinada por factores como la migración, el aislamiento, el tamaño de la población, el componente genético y la selección debida a diversas condiciones ambientales. Dichos factores, en interacción conjunta, dan origen a la variación clinal y a los ecotipos y razas dentro de una especie (Wright, 1964).

La variación clinal o continua representa un gradiente continuo de variación a través de un espacio geográfico, lo cual provoca que un carácter tenga valores secuenciales a través de las diferentes poblaciones que constituyen el área de distribución de una especie. La variación corresponde al gradiente ambiental que ha causado la evolución del patrón de variación (Wright, 1964; Nienstaedt, 1979).

La variación ecotípica en cambio, es una variación disconti-

nua y presenta cambios bruscos en una o varias características de una población a otra (Wright, 1964). Nienstaedt (1979), menciona el hecho de la presencia de especies cuya área de distribución es discontinua donde se han encontrado cambios abruptos en las condiciones ambientales. Además de señalar que éste tipo de variación es difícil de demostrar, puede también ser el resultado de un muestreo inadecuado. En el caso de que la variación sea discontinua, es importante conocer los límites de los ecotipos o de las razas (Wright, 1964).

Se han realizado estudios relacionados con cada uno de los aspectos anteriores, referidos a la variación morfológica, con la finalidad de proporcionar un apoyo en la diferenciación poblacional que nos lleve a definir ecotipos potenciales. Sin embargo, es necesario realizar ensayos de procedencias y/o progenies para determinar la validez de éstos (Plancarte, 1990). Este tipo de estudios contribuyen al conocimiento sobre la taxonomía de la especie. La tendencia de los patrones de variación para cada una de las características morfológicas cubre una de las primeras fases en los estudios de procedencias (Plancarte, 1990).

2.5 Métodos de Separación de Proteínas

2.5.1 Fundamentos

Con la finalidad de separar y analizar los constituyentes macromoleculares de células y tejidos, se han desarrollado a través del tiempo, toda una gama de técnicas que difieren entre sí en el grado de precisión con el que se lleva a cabo la sepa-

ración. Estas técnicas se apoyan en parámetros tales como: Tamaño molecular, forma, densidad, carga neta o absoluta, y solubilidad diferencial, lo cual provee de manera simultánea, información respecto a su naturaleza química (Lehninger, 1983; Sheeler y Bianchi, 1987).

La necesidad de poseer información relacionada con los efectos genéticos de varios sistemas silvícolas en las especies forestales de importancia económica, así como la necesidad de proteger en sus ambientes nativos a las especies en peligro de extinción, requiere la identificación de características genéticas únicas de dichas especies. Este tipo de necesidades han dirigido la atención de los investigadores hacia la búsqueda de procedimientos para la identificación de productos de numerosos genes, facilitando de esta manera la evaluación de la diversidad y el mapeo de patrones geográficos de variación.

Entre los métodos utilizados para la separación de las proteínas, se mencionan: Precipitación Isoeléctrica, Solubilización por Salado e Insolubilización por Salado, Diálisis, Ultrafiltración, Centrifugación en Gradiente de Densidad (zonal) y Filtración en Gel, también conocida como Cromatografía de Exclusión Molecular o Cromatografía de Tamíz Molecular, Electroforesis de "Frente-Movil" o Electroforesis Libre, Electroforesis de Zona, de Disco, así como el Enfoque Isoeléctrico, Inmuno-electroforesis y la Cromatografía.

La mayoría de estas técnicas que se aplican para la separación de macromoléculas requieren que dichas sustancias se encuentren en estado soluble. Consecuentemente, las macromoléculas presentes en fluidos extracelulares tales como plasma, linfa

y secreciones hormonales y digestivas son fácilmente aisladas y es por eso que han sido objeto de numerosos estudios (Sheeler y Bianchi, 1987).

2.5.2 Electroforesis: Características generales

La migración de partículas a través de un medio líquido o semisólido bajo la influencia de un potencial eléctrico fué definida originalmente como ELECTROFORESIS.

Actualmente, dicho término es más extenso en la inclusión de ciertas características específicas, ya que define propiamente el movimiento de moléculas en un gel, bajo la influencia de una corriente eléctrica (Fins, 1979; Harris y Hopkinson, 1978; Morris, 1987; Ayala y Kiger, 1984; Feret y Bergmann, 1976; Wagner et al., 1980); se aplica a cualquiera de las técnicas en las que las partículas son separadas en gradientes de potencial eléctrico y toma en consideración las diferencias en tamaño, carga neta y forma de las partículas (Sheeler y Bianchi, 1987). Asimismo, considera un medio o matriz de soporte (puede ser papel filtro, gel de almidón o de acrilamida), el uso de sistemas buffer a pH específicos para la saturación de la matriz de soporte y el extracto proteico del tejido a analizar (Wagner et al., 1980).

Químicamente, las proteínas poseen cierta carga neta que, a menos que se encuentren en su punto isoeléctrico, dependerán de las proporciones de aminoácidos cargados negativa o positivamente. El número y los tipos de carga asociados con las terminales de aminoácidos de una proteína están determinados por el pH del medio. A pH bajos, la proteína tiende a llevar más cargas

positivas que negativas, mostrando así una carga neta positiva y su migración será hacia el cátodo (electrodo negativo) durante el corrimiento; a pH altos, el comportamiento se invierte y la migración será hacia el ánodo.

Esto remarca la influencia del pH dentro del proceso y es por eso que se aconseja el mantenimiento de un pH constante del electrolito durante el corrimiento (Sheeler y Bianchi, 1987).

Las características mencionadas son aprovechadas directamente por la electroforesis para la separación proteica, la cual estará en función de las diferentes tasas a las que se desplazan en el campo eléctrico de un electrodo al otro; estas tasas son las movilidades electroforéticas de las macromoléculas en estudio (Wagner *et al.*, 1980; Sheeler y Bianchi, 1987).

Smithies introdujo el gel de almidón para la Electroforesis de Zona e hizo una revisión de sus ventajas teóricas. Esta técnica provee una resolución superior que el papel como medio de soporte (Feret y Bergmann, 1976).

La Electroforesis de Zona permite realizar la separación de diferentes proteínas en una muestra y proporciona un mayor campo de resolución de los componentes proteicos en una mezcla.

Las proteínas pueden ser separadas en un medio de soporte semisólido o poroso como el papel filtro o en varios tipos de geles (poliacrilamida, acetato de celulosa y almidón hidrolizado, entre otros) que toma la forma de hojas angostas, rebanadas o columnas.

2.5.3 Electroforesis en gel de almidón

El almidón se utiliza ampliamente en la elaboración del medio o matriz de soporte (gel) en esta técnica, debido a que las resoluciones electroforéticas resultan más precisas, al permitir la exclusión de moléculas de proteínas basándose en su tamaño molecular (Lehninger, 1983).

Conjuntamente, se ha preferido el uso de rebanadas o capas de gel en lugar de las columnas debido a que durante el mismo corrimiento pueden analizarse varios sistemas enzimáticos en un grupo de 25 individuos o más (Gottlieb, 1981).

El tipo de geles mencionados ha proporcionado ventajas sobre otro tipo de matrices de soporte en estudios de poblaciones; una de ellas y la más significativa, ha sido el poder conocer el genotipo de un individuo a través del análisis de un gran número de loci génicos en un solo corrimiento; permitiendo de una manera rápida el conocimiento de la composición genética de una población o bien de la identidad genética de un individuo (Cheliak y Pitel, 1984; Gottlieb, 1981).

El calor generado durante el proceso está en relación directa con el voltaje aplicado a la matriz de soporte y la corriente que pasa a través de todo el sistema, razón por la cual la producción de calor se controla mediante voltajes bajos y soluciones buffer de alta resistencia; un calentamiento excesivo provocaría la inactivación de las isoenzimas en estudio o bien la distorsión de los patrones de bandeo; es por eso que la refrigeración con aire circulante y bolsas de hielo sobre los geles durante el corrimiento desempeña un papel importante dentro de esta etapa, ya que de ello depende en gran medida el

que los resultados sean consistentes y reproducibles (Harris y Hopkinson, 1978; Feret y Bergmann, 1976).

Aunado a la especificidad que otorga el uso de un material como el almidón para la separación de cierto tipo de enzimas, se encuentra también el uso de una gran variedad de sistemas buffer, que ayudan a la mejor resolución del bandeo obtenido en los geles.

La preparación de mezclas de buffers iónicos es común en este tipo de electroforesis, ejemplo de ello es el que se prepara con un buffer catiónico, TRIS, mezclado con un buffer aniónico como el Acido Cítrico que ha probado ser mejor para la resolución y separación de los sistemas analizados (Feret y Bergmann, 1976).

Feret y Bergmann (1976), señalan la importancia de sistemas de buffer específicos para una separación óptima de sistemas enzimáticos o proteínas individuales específicas.

Otro aspecto importante que se presenta en esta técnica, es la combinación del proceso de electroforesis, aplicado para la separación proteica, y la especificidad del método de tinción de los geles para revelar las clases de enzimas específicas; esta fase permite la distinción de la diversidad genética cuando las bandas de isoenzimas teñidas muestran diferentes tasas de migración, cuya resolución proporciona información sobre la segregación y recombinación en las familias de acuerdo a las bases de la herencia mendeliana (Conkle, 1971, 1972, 1987; Conkle et al, 1982, Gottlieb, 1981; Miller et al., 1989).

Dependiendo del tipo de sistema enzimático por analizar, será necesaria la aplicación de una solución de tinción específica para poder visualizar el tipo de bandeo resultante. Este proceso

requiere, para ciertos sistemas, una temperatura de 37°C en incubación por un período de 1 a 3 hrs para que pueda apreciarse el zimograma ó patrón de bandeo que se presenta en el gel.

Normalmente, para el proceso de tinción, se prepara cada una de las soluciones específicas para el sistema enzimático por analizar. Estas soluciones deben contener los siguientes elementos:

- a) solución buffer específica para mantener el pH determinado para cada reacción enzimática.
- b) substratos específicos para cada enzima
- c) Coenzimas (se utilizan en casos específicos). El NAD o NADP, son empleadas comúnmente para mejorar la separación, estabilidad e intensidad en la tinción isoenzimática de las deshidrogenasas (Alcohol deshidrogenasa, Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o Fosfogluconato deshidrogenasa).
- d) Cofactores; necesarios para mostrar una máxima actividad enzimática.

La resolución de un zimograma se encuentra en estrecha relación con la aplicación de dos importantes reacciones enzimáticas. La primera se basa en el mecanismo de óxido-reducción de todos los sistemas de deshidrogenasas dependientes del NAD y NADP. En este mecanismo, la reacción se lleva a cabo mediante la reducción de la sal de tetrazolio a formazan, de tal forma que cualquier deshidrogenasa puede ser identificada con alta especificidad.

El segundo tipo de reacción es menos específico y permite la identificación de esterasas y fosfatasas, entre otras.

La determinación de cada una de las enzimas que constituyen una mezcla, requiere el desarrollo de diversas técnicas de tinción que nos permitan de una manera confiable, la determinación de cada una de las bandas de los componentes proteicos (Harris y Hopkinson, 1978); es por eso que han surgido métodos de tinción como el Cromogénico, Fluorogénico, Por Transferencia de Electrones o el de Tinción por Ligamiento de Enzimas (en Hernández, 1990) y que brevemente se describen a continuación:

METODO CROMOGENICO:

El revelado de las isoenzimas se lleva a cabo por la acción de una enzima que convierte al sustrato de menor color en un producto coloreado. Ejemplo de esto, es la acción de la fosfatasa ácida (ACP1) sobre el sustrato de fosfato de fenolftaleina. La formación de zonas brillantes es debida a la formación de fenolftaleina en los sitios de la actividad de la fosfatasa.

METODO FLUOROGENICO:

Incluye dos tipos: Tinción fluorescente "positiva" y Tinción Fluorescente "Negativa". Es distintivo de este método la obtención de productos altamente fluorescentes cuando el sustrato no lo es (Tinción "Positiva") o bien la obtención de un producto no fluorescente (Tinción "Negativa"). En el Método de Tinción "Positiva", el empleo de derivados del 4-metilumbeliferona como sustratos ha resultado de gran valor para el estudio de las hidrolasas.

METODO POR TRANSFERENCIA DE ELECTRONES:

Este método se ha aplicado ampliamente en la detección isoenzimática. El Tetrazolio tiazolil de metilo (MTT) y el Carbazole 3-amino 9-etil son los dos colorantes más comunmente empleados.

El MTT ha sido utilizado en reacciones con deshidrogenasas y el Carbazole en reacciones con oxidasas y peroxidasas. El Nitro Blue Tetrazolium (NBT), es otro colorante que también puede utilizarse en lugar del MTT, aunque con una menor sensibilidad.

METODO POR LIGAMIENTO-ENZIMA:

En este método se utilizan las enzimas hexógenas en la mezcla de tinción para atrapar y cambiar el producto de la reacción enzimática en una sustancia. La reacción se detecta por la coloración presentada o por las propiedades fluorescentes. Un procedimiento común es el empleo de una deshidrogenasa hexógena, como enzima de ligamiento, junto con su coenzima para generar un precipitado de formazan en los sitios de las isoenzimas, los cuales catalizan la primera reacción.

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) se utiliza como enzima de ligamiento para los teñidores hexoquinasa, fosfoglucomutasa y glucosa fosfato isomerasa; la especificidad de cada teñidor está determinada por el o los sustratos utilizados. Ejemplos de ellos se citan a continuación:

TEÑIDOR	SUSTRATO
Hexoquinasa	Glucosa y ATP
Fosfoglucomutasa	Glucosa y 1-Fosfato
Glucosa fosfato isomerasa	Fructuosa 6-Fosfato

2.5.4 Aplicación de la técnica en estudios de variación genética

Entre los estudios clásicos que se reportan, se encuentran los de Pauling y colaboradores (Wagner *et al.*, 1980) quienes demostraron las primeras diferencias proteicas genéticamente

determinadas, utilizando la electroforesis como técnica.

Cabe destacar que los primeros estudios electroforéticos se realizaron en especies de mamíferos y plantas cultivadas (Simpson y Withers, 1986).

En 1964 se da inició a estudios electroforéticos cuya aplicación versa en el análisis de proteínas de polen de pinos (Conkle, 1972). Posteriormente se realizaron análisis en proteínas solubles de gametofitos y embriones de dos especies de pino y picea. Dos años más tarde, los genetistas empezaron a percatarse de la potencialidad de la técnica y demostraron su aplicación al análisis de poblaciones naturales. A partir de esa fecha, se ha descrito la herencia enzimática en varios organismos.

La facilidad que se tiene de poder analizar varios tipos de tejidos (endospermo o megagametofito, follaje o acículas y yemas vegetativas) mediante la aplicación de la técnica de electroforesis en gel de almidón ha favorecido el desarrollo de estudios en varias especies de coníferas. Predominan en la mayoría de ellos, el uso de los tejidos macerados de semillas que se prefieren por su fácil almacenamiento y poca presencia de metabolitos secundarios, aun cuando se tienen algunos problemas al inferir el genotipo diploide cuando se tiene el tejido haploide, en comparación con la información directa obtenida de tejidos somáticos (vegetativos).

Los gametofitos de las semillas proporcionan un excelente material para el estudio de la variación isoenzimática (Morris y Spieth, 1978), y se han realizado estudios en diferentes estadios o etapas de germinación emergencia de radícula o bien

elongaciones de hipocótilo (Figura 2). Muhs (1974) y Eckert y Ryu (1983), resaltan la importancia de realizar estudios isoenzimáticos con el follaje debido a que muestran una complementariedad respecto al análisis con los megagametofitos.

Conkle (1981), menciona que un tamaño de muestra mínimo es de 6 megagametofitos por árbol. Con este tamaño de muestra, la probabilidad de que un individuo heterocigote para un loci determinado sea erróneamente clasificado como homocigote es de $0.03 (2 \times 0.5^6)$.

Cuando no hay disponibilidad de semilla o bien la cosecha es muy pobre, se puede realizar el análisis en tejidos vegetativos, ya sea de árboles jóvenes o maduros, cuyas muestras de follaje se colectan y mantienen en congelación hasta su estudio.

El uso de este tipo de tejidos, al igual que en el caso de semillas, tiene algunas ventajas y desventajas como lo señalan Cheliak y Pitel (1984) y Strauss y Conkle (1986). Aunque la observación directa de la información genética en el tejido somático es preferible, la presencia de productos secundarios (fenoles, quinonas, etc.) hacen de la extracción y mantenimiento enzimático un proceso complicado que en algunos casos puede inhibir o precipitar las enzimas presentes en las soluciones extraídas de los tejidos. A pesar de ello, se han elaborado algunos buffers de extracción que permiten mejores resultados (Cheliak y Pitel, 1984; Pitel y Cheliak, 1984).

En la actualidad, los estudios de electroforesis se han enfocado a estudios de sistemática, variación poblacional, sistemas de cruzamiento, mapeo genético y desarrollo vegetal, incluyendo en este último caso: Diferencias tisulares, cambios

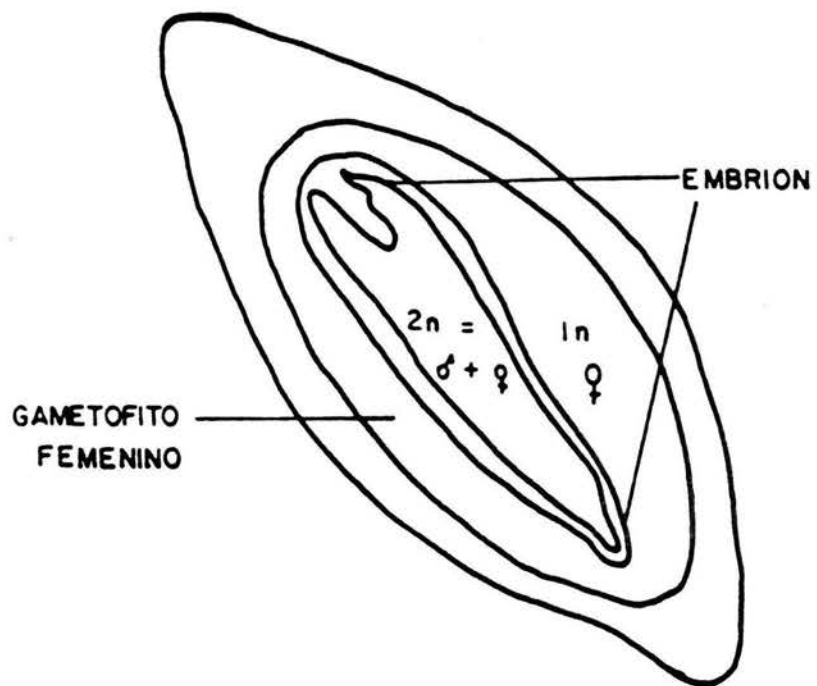


FIGURA 2. COMPOSICION GENOTIPICA DE UNA SEMILLA DE CONIFERA.
(CHELIAK Y PITEL, 1984)

durante el desarrollo, respuesta a estímulos externos y respuesta a enfermedades.

La electroforesis ha probado ser una herramienta muy útil para los genetistas ya que permite estimar la cantidad de la variación en las especies, evaluar el grado de diferenciación geográfica y determinar las relaciones filogenéticas existentes, además de proveer directamente medidas cuantitativas de los porcentajes de similitud genética entre taxa (Brown, 1973; Buth, 1984; Ayala y Kiger, 1984; Conkle, 1987; Miller *et al.*, 1989; Niebling y Conkle, 1990).

Miller *et al.* (1989), menciona que el objetivo de un laboratorio de electroforesis es conducir análisis que resuelvan problemas en áreas como: a) Mapeo de patrones de variación genética; b) Evaluación de los efectos del manejo en la diversidad genética; c) Certificación de lotes de semilla comercial; d) identificación de rametos, familias, procedencias y lotes de semilla; e) Verificación de cruza específicas; f) Estimación de dispersión de polen y contaminación de huertos semilleros; g) Evaluación de la efectividad de técnicas de polinización complementaria; h) Cuantificación de niveles de cruzamiento y Evaluación periódica de la diversidad genética en programas de selección masal recurrente.

Estudios basados en la técnica de electroforesis han ayudado a conocer la variación genética de las poblaciones en un gran número de coníferas y han permitido el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre taxa relacionados (Conkle, 1981; Conkle *et al.*, 1988; Strauss y Conkle, 1986; Millar *et al.*, 1988), la delimitación de zonas de cruzamiento de las especies

(Conkle y Westfall, 1984), así como la definición en algunos casos de la posición en que se encuentran las poblaciones respecto al deterioro genético que han sufrido por el aislamiento al que han estado sujetas (Conkle, 1987; Ledig y Conkle, 1983).

2.5.5 Estudios electroforéticos en coníferas con referencia especial al género *Picea*

Entre los sistemas enzimáticos más comúnmente analizados en los estudios electroforéticos se encuentran: Alcohol deshidrogenasa, Aconitasa, Fosfatasa Acida, Isocitrato deshidrogenasa, Malato deshidrogenasa, Fosfoglucomutasa, Fosfoglucosa Isomerasa y Glutamato Oxaloacetato Transaminasa, entre otras. En uno de los primeros estudios, realizado en 1964, se incluyó el análisis de algunos sistemas enzimáticos en embriones y gametofitos de 27 procedencias de *Picea abies*, indicando la actividad de las enzimas Malato deshidrogenasa, Glutamato-Piruvato transaminasa y Aldolasa. En dicho estudio se encontró variación clinal en la actividad enzimática; las fuentes de mayores altitudes mostraron la mayor actividad enzimática por gramo de peso fresco que las fuentes de menores altitudes. Tanto los tejidos del embrión como del gametofito exhibieron la misma tendencia. Sin embargo, la actividad enzimática del embrión fue tres veces más grande que la mostrada por el gametofito (Ferret y Bergmann, 1976).

En 1968, Durzan comparó patrones electroforéticos de proteínas en tejidos haploide y diploide de *Picea glauca*, *Pinus banksiana* y *Pinus strobus*. En todos los casos, los patrones proteicos diferían entre los tejidos del embrión y del

gametofito.

Bergmann (1973a, 1973b), identificó la esterasa y la leucin-amino-peptidasa en el estudio que realizó en *Picea abies*. Dichos loci mostraron patrones isoenzimáticos con gran variación. El autor reporta otro estudio con la misma especie en el que la distribución de las frecuencias génicas demuestran un alto polimorfismo dentro de las poblaciones, con poca diferenciación entre éstas.

Tigerstedt (1973), analiza los sistemas enzimáticos señalados por Bergmann (1973b), agregando el sistema de fosfatasa ácida.

Otros sistemas isoenzimáticos como leucin-amino-peptidasa, glutamato deshidrogenasa y peroxidasa se estudiaron en 1977 en diversas especies de *Picea*, *Abies* y *Pinus*. El estudio realizado por Fowler y Morris (1977) es una muestra de la contraparte sobre la variación presentada hasta ese momento en otras coníferas, ya que no se observó variación en el patrón de bandeo expresado en los sistemas analizados en *Pinus resinosa* concluyendo que la especie presenta un empobrecimiento genético.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Poblaciones Incluidas en el Estudio

Inicialmente se colectó material de 13 localidades geográficas, las cuales cubren el área de distribución natural de *Picea chihuahuana* en México, exceptuando sólo algunas localidades debido a la dificultad presentada para la colecta del material necesario. Sin embargo, debido a la falta de material suficiente para el análisis, se eliminó la localidad Arroyo Chachamuri, Chih. y la localidad del Cerro Mohinora, Chih.

De las 11 poblaciones incluidas en el estudio, 6 provienen del Estado de Chihuahua, 4 de Durango y 1 de Nuevo León (Figura 3). En el Cuadro 4, se describen las características geográficas de cada una de las localidades.

3.2 Trabajo de Campo

3.2.1 Colecta del material experimental

La colecta de semillas se realizó manteniendo la identidad de los árboles en cada población. Se colectó un total de 238 individuos y a cada uno de ellos se les asignó un número de identificación que se conservó a lo largo de todo el estudio.

Se tomaron los conos de los árboles que estaban produciendo ese año, asegurando así la identidad de la semilla. Los conos cerrados se colocaron en costales harineros, etiquetados cada uno con los datos correspondientes del rodal en que se colectó, fecha de colecta, número de árbol y colector.

Los conos se trasladaron al Centro de Genética Forestal, A.C. en Lomas de San Juan, Chapingo, para realizar el beneficio de la semilla (extracción, desalado, limpieza y aplicación de fungicidas).

3.3 Trabajo de Laboratorio

3.3.1 Preparación del Material experimental

3.3.1.1 Estratificación

Se procedió a la esterilización del papel filtro, agua y esponjas mediante el uso de un autoclave; las cajas petri, por

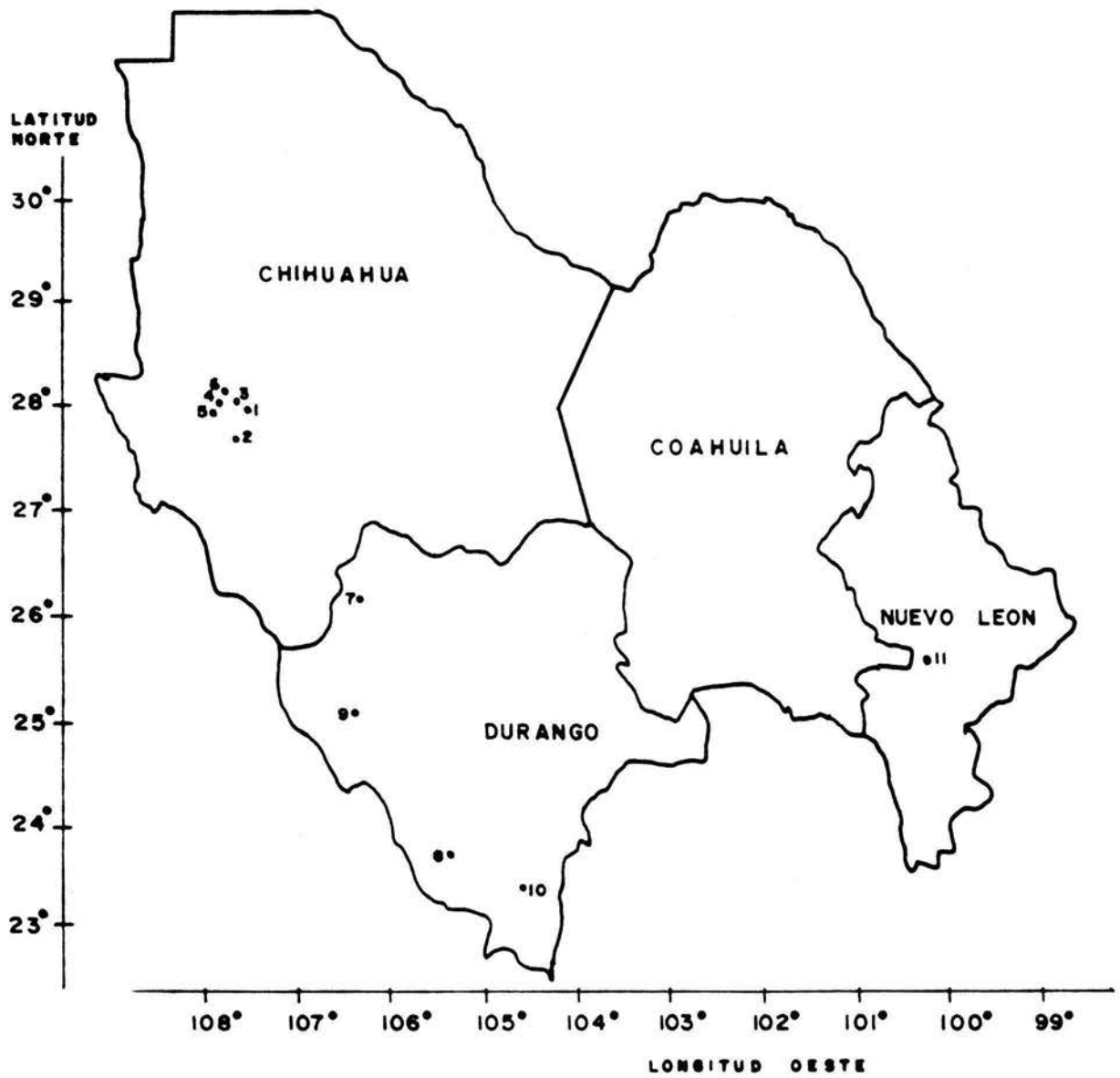


FIGURA 3. LOCALIDADES DE *Picea chihuahuana* INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.

CUADRO 4. LOCALIZACION GEOGRAFICA DE LAS POBLACIONES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

ESTADO / POBLACION	LOCALIDAD	LATITUD (N)	LONGITUD (W)	ASNM (m)	EXPOSICION	FAMILIAS (No.)
CHIHUAHUA						
1 CERRO DE LA CRUZ	SAN JUANITO	27°55'37"	107°36'00"	2420	NW	12
2 BATUYBO	BATUYBO	27°44'30"	107°42'00"	2250	NE-NW	20
3 EL REALITO	LA LAJA	27°55'45"	107°36'45"	2340	NW	19
4 LA TINAJA	EL RANCHITO	27°57'00"	107°46'15"	2380	NW	14
5 TALAYOTES	LOS VOLCANES	27°55'00"	107°49'00"	2340	N	8
6 ARROYO ANCHO	AHUICHIQUE	28°04'30"	107°45'00"	2330	N	24
DURANGO						
7 ARROYO DE LA QUEBRADA	GUANACEVI	26°08'35"	106°23'18"	2570	25° NE	24
8 ARROYO DEL INFIERNO	STA. BARBARA	23°39'27"	105°26'32"	2600	50° NE	15
9 CEBOLLITAS	CEBOLLITAS	25°05'41"	106°26'18"	2350	20° NW	25
10 ARROYO DE LA PISTA	GUACAMAYA	23°19'40"	104°43'45"	2650	25° NE	25
NUEVO LEON						
11 LA ENCANTADA	ZARAGOZA	25°22'00"	100°10'00"	2450	20° NW	20

ser material de plástico, se trataron con etanol al 70% o bien cloro comercial y posteriormente se lavaron con agua destilada. Este material se utilizó para cada lote de semillas que se estratificaron durante un día a 10°C.

Cada uno de los lotes de semilla se roció con Peróxido de Hidrógeno al 3%, y cuando la presencia de hongos fue persistente, se aplicó al 30% mediante el uso de un pincel.

En lotes de semillas con serios problemas de fungosis, se utilizó un remojo de 10 min. en hipoclorito de sodio al 1.2% y un lavado en agua destilada o purificada (Cline y Reid, 1982). Las esponjas se colocaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1%.

3.3.1.2 Germinación

En este estudio, se empleó material biológico pregerminado, considerando la emergencia de la radícula, con una elongación entre 2 y 5 mm (Conkle *et al.*, 1982), con el fin de poder mantener estable este factor durante el desarrollo del análisis.

Cada uno de los lotes se prepararon de la forma antes mencionada y se mantuvieron a 7°C en refrigeración una vez alcanzado el estadio deseado.

3.3.1.3 Disección de las semillas

Completada la serie de individuos necesarios para cada corrimiento electroforético, se procedió a la disección de las semillas.

En forma paralela se preparó un buffer de extracción (buffer de fosfato, 0.2M, pH 7.5), del cual se aplicaron dos gotas a los tejidos disectados. En todas las poblaciones se analizó el tejido haploide ó (megagametofito).

3.3.2 Análisis electroforético

3.3.2.1 Preparación de geles y buffers

Para llevar a cabo el proceso de electroforesis, se hizo necesaria la preparación previa de geles, buffers (Cuadro 5) y papeles filtro o "pabilos" para la absorción de los sobrenadantes, resultado de la maceración de los tejidos. La metodología para realizar este proceso se encuentra en Conkle *et al.* (1982).

En este estudio se emplearon geles de almidón como matriz de soporte. La preparación de los geles incluyó la suspensión previa del almidón en una solución buffer específica (los buffers necesarios para los corrimientos se prepararon previamente) y el calentamiento de ésta hasta el punto de ebullición.

Un punto importante durante la preparación del gel, es la degasificación que se lleva a cabo para la eliminación de burbujas de aire que pudieran quedar contenidas dentro de la solución. Durante la degasificación se lleva a cabo una agitación continua que ayudará a que se elimine la mayor cantidad de burbujas posibles y que la suspensión sea clara y homogénea.

La preparación de los geles se llevó a cabo con cantidades específicas para dos geles en cada uno de los sistemas de buffers utilizados. De esta manera se logró analizar un mayor

CUADRO 5. CONSTITUCION DE LOS SISTEMAS UTILIZADOS EN LA ELECTROFORESIS

SISTEMA Y BUFFER	VOL.	REACTIVOS	CANTIDAD	pH	ADICIONAR (lo necesario)	PREPARACION DEL GEL	BUFFER PARA LA CHAROLA
A GEL	10 L	BASE TRIZMA	62.0 g	8.3	----	90 %	---
		ACIDO CITRICO	14.6 g				
CHAROLA	10 L	LiOH (monohidratado)	12.0 g	8.3	----	10 %	100 %
		ACIDO BORICO	118.9 g				
B GEL	10 L	BASE TRIZMA	121.1 g	8.8	ACIDO CITRICO 1.0M	100 %	---
CHAROLA	10 L	ACIDO BORICO	185.5 g	8.0	NaOH sol. 4N	---	100 %
		NaOH	20.0 g				
D GEL Y CHAROLA	8 L	AC. CITRICO (anhidro)	61.6 g	6.1	N-(3-AMINO-PROPIL) MORFOLINA aprox. 80 ml	5 %	100 %
E GEL Y CHAROLA	8 L	AC. CITRICO (anhidro)	61.6 g	8.1	N-(3-AMINO-PROPIL) MORFOLINA aprox. 133 ml	5 %	100 %

Vol.- volumen (litros)

número de individuos para cada sistema (en forma simultánea se trabajó con 8 geles, 2 para cada uno de los 4 sistemas empleados).

Los geles se moldearon con el uso de placas de vidrio (soporte) y barras de acrílico, que aseguradas con ligas, permitieron que se mantuvieran firmes hasta solidificarse y quedar consistentes.

Una vez preparados los geles, se mantuvieron en refrigeración durante 1 a 1 1/2 horas, como mínimo, a una temperatura aproximada de 4°C. Posteriormente se realizó el corte de los geles en el punto de referencia u origen del corrimiento electroforético.

3.3.2.2 Preparación de las muestras de semilla

La maceración de los tejidos se llevó a cabo con una varilla de vidrio que se limpió cada vez que se cambiaba de muestra, con el propósito de evitar contaminación entre una muestra y otra, colocando las muestras sobre hielo a fin de evitar la degeneración enzimática. Posteriormente se introdujeron los "pabilos" en cada una de las celdillas a fin de absorber los sobrenadantes o fracción líquida resultante de la maceración. Dichos pabilos se colocaron cada uno de ellos en el corte del origen que se realizó en los geles (éstos se prepararon previamente para esta etapa), adheriéndolos y procurando un espaciamiento uniforme entre cada uno de ellos para eliminar el traslape o indefinición en la información obtenida al resolver los geles.

En este caso se utilizaron 4 pabilos por cada muestra, ya que cada uno de ellos se colocó en un sistema buffer diferente.

Cada una de las familias (semillas provenientes de un

individuo), quedó representada por 6 gametofitos. En cada gel se incluyó un total de 48 individuos de *Picea chihuahuana* y 2 de *Pinus resinosa* como referencia o testigo debido a la baja variabilidad que presenta esta especie (Fowler y Morris, 1977). La heterocigosidad genética en esta especie, es igual a 0.0, lo cual permite su uso como un patrón de referencia al compararse con la variación de la especie por analizar.

3.3.2.3 Corrimiento electroforético

Se prepararon las charolas de electroforesis con los buffers específicos para cada sistema a analizar y las esponjas necesarias para el cátodo y el ánodo. El gel quedó colocado dentro de una charola y cubierto con las esponjas a fin de ponerlo en contacto con los buffers.

La colocación de los geles dentro de las charolas para electroforesis estuvo de acuerdo a la migración que presentarían las enzimas, es decir, del cátodo al ánodo.

Las charolas se introdujeron en un refrigerador con aire circulante y se conectaron a la corriente de las fuentes de poder a 320 voltios. Se cita a continuación el amperaje específico de cada sistema utilizado (Cuadro 5):

SISTEMA BUFFER	AMPERAJE (miliamperes)
Sistema A	75 mA
Sistema B	70 mA
Sistema D y E	60 mA

Después de 10 min de corrimiento, los pabilos introducidos en los geles se removieron y los geles se volvieron a colocar en las charolas, evitando que al remover los pabilos se formaran burbujas de aire entre la placa de vidrio y el gel.

Debido a que la apreciación del frente de corrimiento es más fácil en los sistemas A y B, y en los sistemas D y E el corrimiento enzimático es más rápido, el procedimiento para la remoción de los pabilos inició siempre con el sistema E seguidos del D, B y A.

El corrimiento continuó durante cuatro horas aproximadamente o bien cuando el frente de corrimiento alcanzó una distancia cercana a los 8.0 cm a partir del origen. En ese momento los geles se sacaron de las charolas de electroforesis y se cortaron en capas de 1 mm de grosor aproximadamente. En la realización de los cortes se emplearon franjas de acrílico del mismo grosor que sirvieron como guía para cada corte, colocándose a cada lado del gel y adicionando una sobre otra a medida que se avanzaba en el rebanado. El corte del gel se realizó con un hilo nylon tensado con los dedos índices de cada mano a fin de mantener la misma fuerza para que el corte fuera parejo en cada capa. En cada uno de los cortes se tomó la precaución de utilizar un pedazo diferente de hilo nylon. Se realizó un corte en la esquina superior izquierda del gel que sirvió de referencia para la identificación de las muestras analizadas.

Normalmente no se consideró ni la primera ni la última rebanada de los geles, ya que para estas capas la resolución de las isoenzimas no es muy precisa, sólo en casos extremos en que por algún motivo hubo fallas en alguna otra rebanada intermedia.

Para la etapa de tinción, cada una de las rebanadas se colocó en un sustrato específico (Cuadros 6-9), el cual se preparó paralelamente al corrimiento electroforético.

El proceso de tinción utilizado proporciona resultados visibles directamente, en función del tipo de bandeo que aparece en cada una de las rebanadas con los diferentes sustratos. Debido a que ciertas tinciones permanecen corto tiempo en la reacción que se forma con el gel, es necesario un análisis rápido de la información a fin de obtener los resultados más veraces (Ejem. la esterasa fluorescente).

Una vez colocadas las rebanadas de gel en cada uno de los sustratos específicos, los refractarios que los contenían se cubrieron con plástico y se incubaron a 37°C. Esta etapa finalizaba para cada sistema enzimático al momento en que las bandas que se revelaron mostraron una resolución nítida y homogénea para todo el gel; para ello fue preciso una revisión constante, y una agitación de los refractarios para que el sustrato "bañara" al gel completamente.

Se aspiró el sobrante de cada tinción con una bomba que conectada a un depósito, favorecía el que no se estuviera en contacto directo con los residuos químicos aportando seguridad en el manejo de los geles. Posteriormente, los geles se enjuagaron varias veces con agua corriente y posteriormente se dejaron en agua destilada, cubiertos con el mismo plástico hasta su análisis.

Algunos sistemas enzimáticos como la Catalasa (CAT) y la esterasa fluorescente (fEST) se resolvieron con una metodología diferente durante la etapa de tinción (Conkle *et al.*, 1982) la

CUADRO 6. REACTIVOS PARA TINCION DEL SISTEMA " A "

SISTEMA ENZIMATICO	SUSTRATOS	*CANT.	MgCl	ENZIMAS/ CANTIDAD	NAD	NADP
ADB	ALCOHOL ETILICO	1 ml	--	--	x	--
ALAP	POTASIO NEGRO sal ALANIN b-NAFTILAMINA *disueltos en 2 ml DMSO	40 mg *100 mg	--	--	--	--
b-EST	GARNET RAPIDO GBC sal b-NAFTIL ACETATO sol.	50 mg 2 ml	--	--	--	--
e-EST	- MUMB ACETATO *disueltos en 3 ml de acetona	* 10 mg	--	--	--	--
LAP	LEUCIN b-NAFTILAMINA sol. POTASIO NEGRO sal	5 ml 40 mg	--	--	--	--
MNR	MENADION NADH NBT	25 mg 25 mg 10 mg	--	--	--	--
PGI	FRUCTUOSA 6 FOSFATO	50 mg	x	G6PD / 20 ul	--	x

*CANT.- cantidad

CUADRO 7. REACTIVOS PARA TINCION DEL SISTEMA " B "

SISTEMA ENZIMATICO	SUSTRATOS	* CANT.	MgCl	ENZIMAS/ CANTIDAD	NAD	NADP
ACP	NAFTIL POSFATO ACIDO GARNET RAPIDO GBC sal	80 mg 80 mg	--	--	--	--
CAT	KI sol. 2 % PEROXIDO DE HIDROGENO 0.03%	100 ml 100 ml	--	--	--	--
GDE	I ACIDO GLUTAMICO	2 g	--	--	x	--
GOT	ACIDO ASPARTICO sol. PIRIDOXAL 5 FOSFATO sol. a-CETOGLUTARATO sol. AZUL RAPIDO BB ml	7 ml 1 ml 2 ml 50 mg	--	--	--	--

* CANT.- Cantidad

CUADRO 8. REACTIVOS PARA TINCION DEL SISTEMA " D "

SISTEMA ENZIMATICO	SUBSTRATOS	*CANT.	MgCl	ENZIMAS/ CANTIDAD	NAD	NADP
ACO	ACIDO CIS ACONITICO	200 mg	x	IDH / 1 ml		x
IDH	ACIDO ISOCITRICO	100 mg	x			x
MDH	ACIDO MALICO sol.	5 ml			x	
6PGD	AC. 6 FOSFOGLUCONICO	50 mg				x
PGM	GLUCOSA 1 FOSFATO	150 mg	x	G6PD / 20 ul		x
SKDH	ACIDO SHIKIMICO	200 mg	x			x

*CANT.- Cantidad

CUADRO 9. REACTIVOS PARA TINCION DEL SISTEMA " E "

SISTEMA ENZIMATICO	SUBSTRATOS	*CANT.	MgCl	ENZIMAS/ CANTIDAD	NAD	NADP
ACO	ACIDO CIS ACONITICO	200 mg	x	IDH / 1 ml		x
ADH	ALCOHOL ETILICO	1 ml			x	
FDP	FRUCTUOSA 1,6 DIFOSFATO	100 mg		PGI / 0.5 ml		x
	ALBUMINA	10 mg	x	G6PD / 20 l		
	GLUCOSA 1,6 DIFOSFATO sol.	1 ml				
MDH	AC. MALICO sol.	5 ml			x	
PGM	GLUCOSA 1 FOSFATO	150 mg	x	G6PD / 20 l		x
SKDH	ACIDO SHIKIMICO	200 mg	x			x

*CANT. Cantidad

cual dependió principalmente del tipo de reactivos utilizados para llevar a cabo el revelado de las muestras. Es preciso mencionar que para el caso de la esterasa fluorescente, se hizo uso de la lámpara de luz ultravioleta para poder visualizar el tipo de zimograma resuelto.

3.4 Medición y Registro de Información de los Zimogramas

La medición de las bandas fue posterior al revelado de los geles, seguida de su análisis, fotografiado, y finalmente la fijación de cada una de las rebanadas en una solución de metanol:agua:ácido acético glacial, en una proporción 5:5:1. Una vez aplicada la solución fijadora los geles presentaron una consistencia más rígida y las bandas se tornaron difusas. Los geles se dejaron durante una noche en la solución fijadora y posteriormente se aspiró la solución, siguiendo el mismo procedimiento que en la tinción. Cada gel se envolvió en plástico con su respectiva etiqueta de identificación del sistema enzimático al que correspondía; de esta manera, tanto los geles como las fotografías quedan como un archivo de las tasas de migración del tipo de enzimas que se analizaron en el estudio.

Las mediciones que se obtuvieron fueron resultado de medir las distancias presentadas en cada una de las bandas reveladas en los geles respecto a un control (*Pinus resinosa*) ya conocido en cuanto a su comportamiento migratorio.

Cada una de las bandas observadas tuvo una designación basada en la resolución que presentó. Se le asignó el número 1 para la más obscura y frecuente, y así sucesivamente conforme fueron apareciendo nuevos tipos de bandeo. Para la confirmación de cada

uno de los loci resultantes, se rectificó cada una de las mediciones originales una vez estandarizadas respecto al control, con la finalidad de no equivocar las bandas.

Para que la caracterización de cada una de las variantes encontradas en los zimogramas fuera consistente en todos los casos, la comparación realizada con el estándar o testigo utilizado se apoyó fundamentalmente en la consideración dada por Cheliak y Pitel (1984), en donde la distancia recorrida por una variante isoenzimática dentro de un locus, es medida y comparada con la distancia total de migración del frente de corrimiento.

Es así que la movilidad relativa de cada alelo en particular se obtiene mediante la formula:

$$R_m = \frac{\text{Distancia de migración de la variante (mm)}}{\text{Distancia de migración del estándar (mm)}}$$

Los valores obtenidos sirvieron como guía y no se consideraron como valores absolutos, ya que también presentan un error estándar.

La representación gráfica de los resultados consistió en la elaboración de zimogramas para cada uno de los sistemas enzimáticos resueltos. Asumiendo que todas las bandas representan isoenzimas, y que la variación presentada en el patrón de bandeo entre los individuos de la especie analizada no es debida a factores ambientales o de desarrollo (Ferret y Bergmann, 1976), puede realizarse una correlación con la variación alélica. En este caso, cada una de las bandas isoenzimáticas mostradas en el zimograma representa la expresión fenotípica de un gen de acuerdo a la hipótesis de "un gen-un polipéptido".

El estudio incluyó 17 sistemas enzimáticos y un total de 25 loci resueltos (Cuadro 10).

3.4.1 Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981), para analizar estadísticamente los resultados e interpretar la información genética detectada electroforéticamente.

Dicho paquete incluye varias subrutinas y en cada una de ellas proporciona información sobre:

- a) Frecuencias Alélicas
- b) Variabilidad Genética
- c) Prueba de Ajuste del Equilibrio Hardy-Weinberg
- d) Cálculo de Similaridad y Distancia Genética entre poblaciones.

En las medidas de frecuencias alélicas y variabilidad genética, se toma en cuenta el número de loci y el tamaño de muestra, así como el número de alelos por locus.

En el cálculo de las frecuencias alélicas, el análisis se realizó para cada una de las poblaciones y loci por separado, considerando que las frecuencias de un alelo en un locus determinado es igual a la frecuencia de individuos homocigotes para dicho alelo mas la mitad de la frecuencia de los heterocigotes que contienen el mismo alelo. Esto es, para un locus con dos alelos (a_1 y a_2 , la frecuencia de a_1 es:

$$f(a_1) = [f(a_1a_1) + 1/2 f(a_1a_2)] / N$$

donde N es el número de individuos en la población.

CUADRO 10. RELACION DE SISTEMAS ENZIMATICOS Y BUFFERS UTILIZADOS

SISTEMA ENZIMATICO	CODIGO ENZIMATICO	NUMERO DE LOCI	*ABREV. S.E. / LOCUS	BUFFER
1 ACONITASA	E.C.4.2.1.3	1	ACO1	E,D
2 FOSFATASA ACIDA	E.C.3.1.3.2	1	ACPI	B
3 ALCOHOL DESHIDROGENASA	E.C.1.1.1.1	1	ADH	A,D
4 CATALASA	E.C.1.11.1.6	1	CAT1	B
5 B-ESTERASA	E.C.3.1.1.1	1	EST1	A
6 ESTERASA FLUORESCENTE	E.C.3.1.1.1	1	fEST	A
7 FRUCTUOSA 1,6 DIFOSFATO	E.C.3.1.3.11	2	FDP2 FDP4	A
8 GLUTAMATO DESHIDROGENASA	E.C.1.4.1.3	1	GDH	B
9 GLUTAMATO-OXALACETATO-TRANSAMINASA	E.C.2.6.1.1	2	GOT1 GOT3	B
10 ISOCITRATO DESHIDROGENASA	E.C.1.1.1.42	1	IDH1	D
11 LEUCIN-AMINO-PEPTIDASA	E.C.3.4.11.1	1	LAP1	A
12 MALATO DESHIDROGENASA	E.C.1.1.1.37	3	MDH1 MDH2 MDH4	D,E
13 MENADION REDUCTASA	E.C.1.6.99.2	2	MNR1 MNR2	A
14 6 FOSFOGLUCONATO-DESHIDROGENASA	E.C.1.1.1.44	2	6PGD1 6PGD2	D
15 FOSFOGLUCOSA ISOMERASA	E.C.5.3.1.9	1	PGI2	A
16 FOSFOGLUCOMUTASA	E.C.2.7.5.1	2	PGM1 PGM2	D,E
17 SHIKIMATO DESHIDROGENASA	E.C.1.1.1.25	2	SKDH1 SKDH2	D,E

*ABREV. S. E.- Abreviatura del Sistema Enzimático

Adicionalmente con esta misma información se obtuvo el número promedio de alelos por locus (A), el porcentaje de loci polimórficos (P), así como la heterocigosidad promedio observada (H_o) y esperada (H_e).

El porcentaje de loci polimórficos se obtuvo considerando el número de loci en los que se detectó variación alélica y tomando como criterio que la frecuencia del alelo más común en dicho locus es menor o igual a 0.99.

Dentro de la prueba de ajuste del equilibrio Hardy-Weinberg, la estimación de la heterocigosidad por locus incluyó:

- a) La proporción de individuos heterocigotos ("conteo directo"), que puede obtenerse únicamente si se tienen las frecuencias genotípicas; esto es : $H_o = f(\text{heterocigotes}) / N$, y
- b) Estimación del valor esperado de frecuencias genotípicas, incluyendo los heterocigotes (h_e), en base a las frecuencias alélicas observadas, si la población estuviera en equilibrio de Hardy-Weinberg. La prueba de χ^2 de bondad de ajuste con las frecuencias genotípicas observadas y esperadas bajo equilibrio Hardy-Weinberg determinó 3 tipos de genotipos:

- a) Homocigotes para el alelo más común
- b) Heterocigotes comunes y raros
- c) Homocigotes raros y otros heterocigotes

La heterocigosidad poblacional esperada por locus (H) se calculó como:

$$H = 2n (1 - \sum x_i^2) / (2n - 1)$$

y la heterocigosidad promedio estimada para todos los loci (\hat{H}), como:

$$\hat{H} = \frac{\sum_{k=1}^r H_k}{r} \text{ donde:}$$

n = número de individuos para cada locus;

x_i = frecuencia del alelo "i" en la población;

H_k = valor de H para el locus "k" y

r = número de locus.

El paquete BIOSYS - 1 utiliza los métodos de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) y Nei (1978), para calcular los coeficientes de distancia y similaridad genética.

En este estudio se consideró el método propuesto por Cavalli-Sforza y Edwards (1967), el cual utiliza la transformación de la raíz cuadrada de las frecuencias génicas, estandarizando de esta manera las varianzas y considerando intervalos de confianza de 0.05 a 0.95. Este método se basa en el modelo de una población ubicada en un eje cartesiano y un espacio euclidiano cuyas frecuencias génicas $p_1, p_2 \dots p_m$ se representan con los vectores $(\sqrt{p_1}, \sqrt{p_2} \dots \sqrt{p_m})$, siendo así que el espacio ocupado por cada población es 1/2 de la superficie de una hiperesfera unitaria con coordenadas positivas.

Así, la distancia angular entre dos poblaciones se obtiene de la fórmula:

$$\cos \theta = \sum_{i=1}^m \sqrt{p_i p_i'}$$

siendo;

$p_1, p_2, p_3 \dots p_m$ y

$p_1', p_2', p_3' \dots p_m'$ = las frecuencias génicas en cada uno de los loci de las dos poblaciones.

Angulo θ = $\pi / 2$ indica una substitución génica completa de una población a otra, y para fines prácticos se maneja como $2 \theta / \pi$; así, una distancia unitaria entre dos poblaciones representa una substitución génica entre ellas (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967).

Los valores de distancia genética que se obtienen con este método van de 0 a 1; en donde el valor más bajo indica la similitud genética (no hay presencia de alelos diferentes) entre las poblaciones comparadas, mientras que el valor más alto representa una substitución completa de alelos (no hay alelos comunes) entre las poblaciones comparadas.

Con las distancias genéticas obtenidas se formó una matriz denominada Matriz de similitud genética y coeficientes de distancia, que representa las distancias existentes entre todos los pares posibles de las poblaciones incluídas en el estudio.

Se realizó el análisis de agrupamiento con los datos de la matriz de distancias genéticas utilizándose el Método de grupos par no ponderado o Técnica de ligamiento promedio no ponderado en base a medias aritméticas (UPGMA) (Crisci y López, 1983; Sneath y Sokal, 1973).

La representación gráfica de los valores obtenidos en esta parte del análisis recibe el nombre de Fenograma y de esta forma es posible visualizar el grado de similitud entre dos o más poblaciones denominadas taxonómicamente como "Unidades Taxonómicas Operativas " (UTOs) (Sneath y Sokal, 1973).

La realización del fenograma se originó en la matriz de similitud genética previamente mencionada y la combinación de las poblaciones ("y" y "x") que presentaron menor distancia

genética, fueron la base o la nueva unidad (UTO = xy) para posteriores agrupaciones. La formación de cada nueva UTO que se unirá a las UTOs ya existentes, se obtuvo por una serie de matrices derivadas, siendo la primera matriz diferente de la original en que considera al núcleo o UTO formado como una unidad respecto a las demás UTOs. Los valores para cada nueva UTO se obtienen mediante las siguientes ecuaciones:

$$D_{(xy)2} = (D_{y2} + D_{yz}) / 2$$

$$D_{(yx)(zw)} = (D_{(xy)}^2 + D_{(yx)w}) / 2$$

Cada una de las matrices derivadas disminuye en tamaño en una columna y en una fila, y en cada una de éstas se busca el siguiente valor de mayor similitud o el más bajo con respecto al orden de agrupación que se lleve a cabo.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Número de Loci Resueltos

Para cada una de las 11 poblaciones analizadas se ensayaron 17 sistemas enzimáticos, resolviéndose un total de 25 loci. En el Cuadro 10 se presentan los sistemas enzimáticos y el número de loci resueltos para cada uno de ellos. Los zimogramas respectivos se encuentran representados en la Figura 4, donde pueden observarse las movilidades relativas (obtenidas con respecto al *Pinus resinosa*).

Se aprecia en la figura 4 que en 6 de los sistemas enzimáticos (ACO, ACP, ADH, CAT, EST y GDH) se identificó un solo locus; 9 de los sistemas enzimáticos (fEST, GOT, IDH, LAP, MNR, PGI,

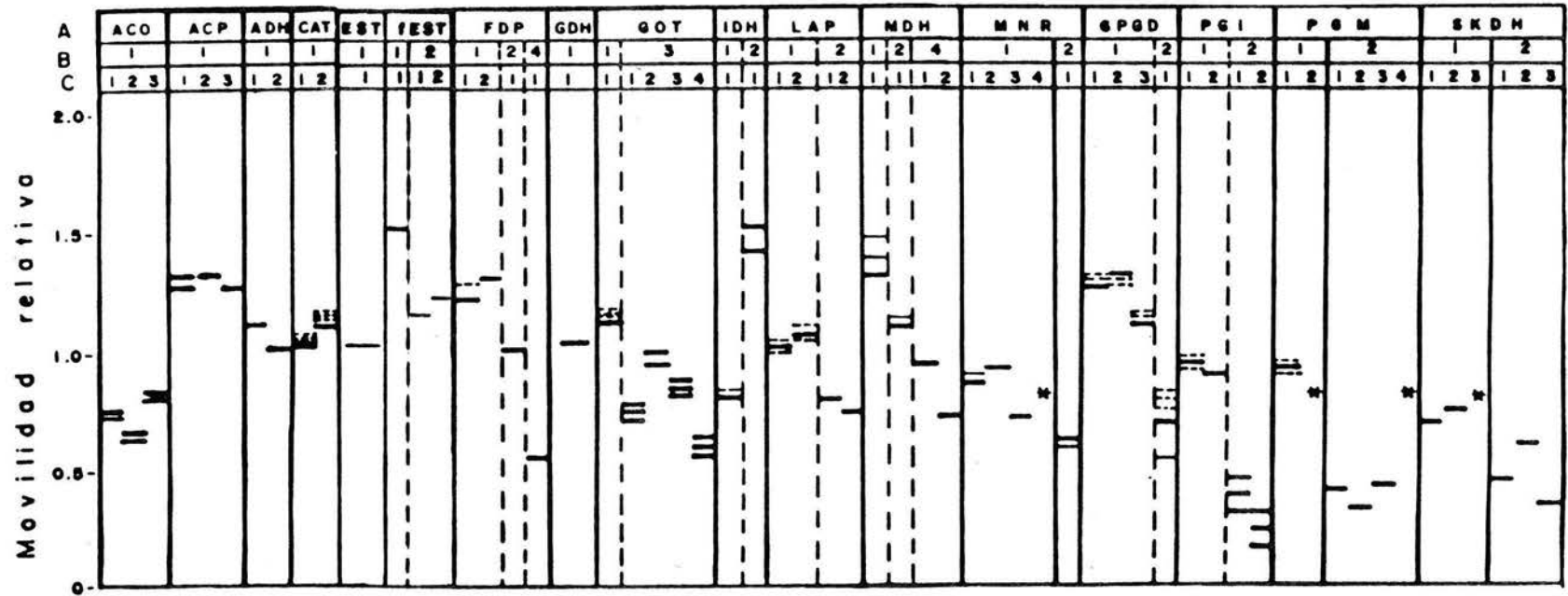


FIGURA 4. ZIMOGAMA DE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS ANALIZADOS
 A. SISTEMA ENZIMATICO; B. LOCUS; C. ALELOS; *. ALELOS NULOS

PGM, SKDH y 6PGD) mostraron dos loci y en los dos restantes (FDP y MDH) se identificaron tres loci. El número máximo de alelos observados por locus fue de 4 para los loci GOT3, MNR1 y PGM2, mientras que el mínimo fue de uno para los loci EST1, FDP2, FDP4, GDH, GOT1, IDH1, IDH2, MDH1, MDH2, MNR2 y 6PG2.

Debe mencionarse que el análisis estadístico consideró la información más consistente de los patrones enzimáticos resueltos para cada sistema, aunque en la representación zimográfica se muestra el total registrado a lo largo de todo el estudio.

En la designación de los sistemas, loci y alelos se consideró la siguiente terminología:

El nombre del sistema enzimático .- **ACO**
El número de locus correspondiente .- ACO1
El número de alelo para dicho locus .- ACO1(1)

En estudios anteriores se han señalado problemas y resultados semejantes en la resolución de los patrones de bandeo en especies del mismo género como *Picea abies* (Tigerstedt, 1973; Bergmann, 1973a, 1973b, 1974, 1978; Brunel y Rodolphe, 1985), *Picea glauca* (Feret, 1971; Cheliak y Pitel, 1984) y *Picea mariana* (Boyle et al., 1990).

De manera similar a nuestro estudio, en trabajos anteriores se ha mencionado un solo locus en ACO, ADH, GDH, IDH y PGM para las especies de *Abies amabilis*, *A. grandis*, *Larix laricina*, *L. occidentalis*, *Pseudotsuga menziesii*, *Thuja plicata*, *Tsuga heterophylla*, *T. mertensiana* e inclusive en algunas especies del género *Picea* como *P. engelmanni*, *P. glauca*, *P. mariana* y *P. sitchensis* (El-Kassaby y Chipman, s/f).

Para las mismas especies antes mencionadas se señalan de 1 a 5 loci en los sistemas enzimáticos EST, fEST, MDH, PGI y 6PGD, con un promedio de 3 loci para el género *Picea*. Cabe señalar que *Picea chihuahuana* mostró problemas similares a los descritos en los estudios de El-Kassaby y Chipman (s/f) y Feret (1971), es decir, baja resolución o inconsistencia, principalmente en los sistemas de Esterasas.

En los sistemas enzimáticos en los que se identificó un solo locus (Figura 4) como en el caso específico de Aconitasa (ACO), puede notarse la presencia de tres alelos, cada uno de ellos con un doble bandeo que incluyó una banda oscura y otra muy tenue debajo de ésta.

En el locus ACP (Fosfatasa Acida), también con 3 alelos, ACP1(1) fue el que presentó un doble bandeo homogéneo en tonalidad oscura, similar al que describe Bergmann (1975). El patrón de resolución mostrado para este sistema fue difícil de interpretar debido al "barrido" de las bandas. En este estudio fue frecuente que este sistema enzimático presentara problemas en la resolución de los patrones de bandeo, similares a los que se presentaron en *Picea abies* (Lundkvist, 1975). Cabe señalar que para dicho estudio se menciona una ligera substitución entre el alelo 1 y 2 debido a las diferencias entre los estados germinativos de los endospermos utilizados.

Los sistemas EST, ADH y GDH tuvieron consistentemente patrones de resolución muy tenues, a veces difíciles de distinguir, con lo que se denota la misma dificultad que se ha presentado para otras especies como *Picea glauca* (Hedrick et al., 1976, Cheliak y Pitel, 1984); la baja resolución en el

sistema ADH se asocia a los proceso de respiración anaerobia, por lo cual se recomienda cierto tiempo de imbibición de las semillas antes de su análisis a fin de poder detectar mejor la presencia de este sistema (Hedrick, et al., 1976).

En el grupo de sistemas enzimáticos que presentaron dos loci (Figura 4), frecuentemente se revelaron patrones de bandeo más complejos: doble o triple bandeo, aunque no siempre muy bien definidos debido a lo difuso de las bandas superiores o inferiores a la banda principal.

Dentro de este grupo de enzimas también se notó la presencia de alelos nulos en 3 de los sistemas analizados (MNR, PGM y SKDH), en particular en los loci MNR1, PGM1, PGM2 y SKDH1. La caracterización de este tipo de alelos se basó principalmente en la ausencia notoria de información entre los loci de un mismo individuo (El-Kassaby, 1981); es decir, si en el locus 1 un individuo X mostró un bandeo y en el locus 2 no se presentó información, ésta se consideró como alelo nulo. Es conveniente destacar también que dentro de este estudio se detectaron algunos problemas en la resolución de la información de ciertos individuos analizados y que quedó atribuida a una mala germinación y a una consecuente infección por hongos.

El sistema fEST mereció especial atención sobre todo por la rapidez que requiere la interpretación del zimograma revelado, que de otra manera se corre el riesgo de hacer una mala interpretación. En este sistema los corrimientos realizados mostraron dificultad en la obtención de patrones claros y bien definidos, aunque hubo ciertas excepciones; regularmente el primer locus estuvo mejor definido que el segundo, sobre todo por la

coloración más intensa.

El sistema GOT resuelto para este estudio mostró semejanza con los resultados expuestos por Rudin (1975) para *Pinus sylvestris*, debido a que se revelaron dos zonas, pero difirió en la presencia alélica entre cada uno de ellos. GOT1 mostró un alelo, mientras que GOT3 mostró la presencia de 4 alelos con dobles y triples bandas. Conkle (1991) menciona que el patrón de migración lenta comúnmente presenta fenotipos de dos bandas que están asociadas con la fracción citoplásmica. Una característica importante de este sistema (Conkle, 1991) es el tipo de tinción que se presenta; se menciona que una sola banda de rápida migración, que en nuestro estudio coincide con el patrón revelado por GOT1(1), muestra una coloración intensa, y un teñido consistente en el patrón de migración lenta cuyo comportamiento es de dos o más bandas. Los patrones de migración rápida presentan mayores intensidades en su coloración conforme avanza el proceso germinativo, y esto, en relación al estudio realizado por Conkle (1991), se debe fundamentalmente a que la fracción mitocondrial tiene una correlación con los altos niveles de respiración mitocondrial esperada en tejidos nutritivos durante la germinación.

El último grupo, constituido por FDP y MDH, incluyó los sistemas que revelaron 3 loci. FDP tuvo un patrón de bandeo más difuso y tenue que los patrones revelados en otros sistemas, y únicamente se distinguió un doble bandeo en FDP1(1).

En el sistema MDH se distinguieron doble (MDH2(1)) y triple (MDH1(1)) bandeo, no siempre bien definidos pero sí de color oscuro; en este sistema se notaron bandas más anchas que en los

demás sistemas considerados en el estudio. El estudio de este sistema (El-Kassaby, 1981), ha revelado la presencia de un heterodímero que frecuentemente llega a confundirse entre los loci MDH2 y MDH3, además de la discrepancia entre MDH3 y MDH4, que por diferencias de pH en los sistemas buffer utilizados llegan a variar ligeramente su migración en el gel; por ello, pudiera ser común que el patrón de bandeo que se presenta para este sistema llegue a tener modificaciones en estudios posteriores sobre la misma especie.

Tanto FDP como MDH se representaron por 3 loci denominados como 1, 2 y 4, que sin seguir un orden secuencial, coinciden con los patrones de referencia que ya han sido revelados en otros estudios llevados a cabo para otras especies (El-Kassaby, 1981).

4.2 Medidas de Variabilidad Genética

4.2.1 Frecuencias alélicas y número de alelos por locus

De acuerdo a las frecuencias alélicas observadas en cada locus (Cuadro 11), es posible diferenciar 3 grupos distintos de loci a nivel de todas las poblaciones en general.

- 1) Loci monomórficos (loci con un solo alelo). Este grupo incluye a los siguientes 5 loci (20% del total):
EST1, IDH1, MDH1, MNR2 y 6PG2.
- 2) Loci polimórficos con un alelo predominante y uno o varios alelos raros. En este grupo se incluyen 12 loci, es decir, casi un 50% del total de loci analizados: ADH, CAT1, fEST, FDP2, FDP4, GDH, GOT1, GOT3, MDH2, MNR1, 6PGD1 y PGI2.

CUADRO 11. FRECUENCIAS ALELICAS EN 25 LOCI DE 11 POBLACIONES NATURALES DE PICEA CHIHUAHUANA

LOCUS	P O B L A C I O N E S											\bar{X}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1 ACO1												
(N)	12	15	14	14	8	21	20	15	26	18	18	
1	0.833	0.100	0.286	1.000	0.687	0.500	0.725	0.933	0.038	0.389	0.583	0.552
2	0.125	0.200	0.321	0.000	0.125	0.095	0.275	0.000	0.442	0.306	0.167	0.186
3	0.042	0.700	0.393	0.000	0.187	0.405	0.000	0.067	0.519	0.306	0.250	0.260
2 ACPI												
(N)	12	20	13	14	8	20	17	7	26	15	16	
1	0.375	0.275	0.654	0.750	0.750	0.525	0.529	0.786	1.000	0.667	0.031	0.576
2	0.250	0.525	0.346	0.179	0.250	0.300	0.088	0.214	0.000	0.067	0.844	0.278
3	0.375	0.200	0.000	0.071	0.000	0.175	0.382	0.000	0.000	0.267	0.125	0.145
3 ADH												
(N)	11	13	13	14	4	20	14	14	25	18	17	
1	0.864	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.647	0.955
2	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.353	0.044
4 CAT1												
(N)	12	20	16	14	8	22	20	15	26	22	18	
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.917	0.992
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.007
5 EST1												
(N)	9	17	15	14	8	13	17	14	26	22	18	
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6 PEST												
(N)	6	19	16	14	8	22	21	15	26	22	18	
1	1.000	0.763	1.000	0.679	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.949
2	0.000	0.000	0.000	0.321	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029
3	0.000	0.237	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021
7 FDP2												
(N)	12	18	13	13	8	21	13	15	18	6	16	
1	1.000	0.972	1.000	1.000	1.000	1.000	0.923	1.000	0.917	1.000	1.000	0.982
2	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.077	0.000	0.083	0.000	0.000	0.017
8 FDP4												
(N)	9	13	13	14	7	21	15	14	18	17	18	
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.964	1.000	0.912	1.000	0.988
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.088	0.000	0.011
9 GDH												
(N)	12	20	15	14	8	22	21	15	26	22	18	
1	1.000	0.950	1.000	1.000	1.000	0.977	1.000	0.933	1.000	0.773	0.889	0.956
2	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.067	0.000	0.227	0.111	0.043

CUADRO 11. (CONTINUACION)

P O B L A C I O N E S												
LOCUS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	X
21 PGI2												
(N)	12	18	14	14	8	21	21	15	26	22	18	
1	1.000	0.972	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.750	0.974
2	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.025
22 PGM1												
(N)	12	19	13	14	8	21	20	15	26	22	18	
1	0.542	0.921	0.923	0.536	0.937	0.524	0.925	1.000	1.000	1.000	1.000	0.846
2	0.458	0.079	0.077	0.464	0.063	0.476	0.075	0.000	0.000	0.000	0.000	0.153
23 PGM2												
(N)	12	17	8	14	8	17	20	12	10	17	17	
1	0.250	0.559	0.625	0.000	0.750	0.618	0.650	0.958	0.900	0.324	0.500	0.557
2	0.750	0.235	0.375	1.000	0.187	0.382	0.275	0.042	0.000	0.412	0.353	0.364
3	0.000	0.206	0.000	0.000	0.063	0.000	0.075	0.000	0.100	0.147	0.088	0.061
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.118	0.059	0.016
24 SKDH1												
(N)	12	18	13	14	8	21	19	15	26	22	4	
1	0.583	0.944	0.808	1.000	0.875	0.833	0.553	1.000	1.000	0.795	1.000	0.853
2	0.417	0.056	0.115	0.000	0.125	0.167	0.447	0.000	0.000	0.205	0.000	0.139
3	0.000	0.000	0.077	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007
25 SKDH2												
(N)	10	18	14	14	8	21	21	15	26	22	18	
1	0.700	0.778	1.000	1.000	1.000	1.000	0.667	0.800	1.000	0.159	0.750	0.804
2	0.300	0.222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.333	0.200	0.000	0.841	0.250	0.195

(N). Número de individuos

X. Valor promedio

CUADRO 12. MEDIDAS DE VARIABILIDAD GENETICA EN 11 POBLACIONES DE PICEA DEL NORTE DE MEXICO

POBLACIONES	A	P	Ho	He
1 CERRO DE LA CRUZ	1.5	40.0	0.050	0.154
2 BATUYBO	1.7	52.0	0.092	0.158
3 EL REALITO	1.4	32.0	0.109	0.127
4 LA TINAJA	1.2	16.0	0.077	0.074
5 TALAYOTES	1.4	32.0	0.100	0.098
6 ARROYO ANCHO	1.4	28.0	0.095	0.124
7 ARROYO DE LA QUEBRADA	1.5	40.0	0.079	0.125
8 ARROYO DEL INFIERNO	1.4	36.0	0.051	0.087
9 CEBOLLITAS	1.2	20.0	0.046	0.056
10 ARROYO DE LA PISTA	1.6	40.0	0.103	0.149
11 LA ENCANTADA	1.7	44.0	0.132	0.178
PROMEDIO	1.4	34.5	0.084	0.120

A. No. de alelos promedio por locus

P. Porcentaje de loci polimórficos

Ho. Heterocigosidad promedio observada

He. Heterocigosidad promedio esperada

En estos casos la frecuencia del alelo predominante fue mayor a 0.90.

- 3) Loci polimórficos con más de un alelo frecuente: Se consideran dentro de este grupo a 8 loci (32% del total; ACO1, ACP1, LAP1, MDH4, PGM1, PGM2, SKD1, SKD2). En estos casos las frecuencias alélicas del alelo predominante fluctuó entre 0.225 y 0.892.

Los resultados previamente señalados coinciden con lo expuesto por Conkle (1991), quien menciona que al incrementarse el número de alelos por gen, disminuyen los alelos con altas frecuencias.

En estudios anteriores se han mencionado datos de polimorfismo en diferentes sistemas enzimáticos analizados, y aunque en algunos casos no queda especificado el porcentaje de ellos (Adams y Joly, 1980), en *Picea abies* se ha encontrado polimorfismo en los sistemas ACP, GDH, GOT, PGI y PGM (Tremblay y Simon, 1989). Cheliak y Pitel (1984) señalan polimorfismos en *Picea glauca* para los sistemas ACP, EST, GDH, MDH1, MDH3 Y MDH4, 6PGD, PGI y PGM. Considerando que los estudios antes mencionados no presentan datos más precisos, es importante señalar que dos de estos sistemas que han mostrado ser polimórficos en otras especies del género, EST y 6PGD fueron monomórficos en *Picea chihuahuana*.

Otros géneros, como *Pseudotsuga menziesii* (Yeh y O'Malley, 1980; Conkle, 1981), registran polimorfismo en los sistemas de ACO1, EST1, GOT, IDH, LAP1, LAP2, MDH1-MDH4, PGI2, PGM y 6PGD. En el caso de *Pinus rigida* (Guries y Ledig, 1978), se pudo detectar polimorfismo en los sistemas ACO1, GOT1, GOT2, IDH,

LAP1, LAP2, MDH1, MDH2, 6PGD y PGM.

A nivel poblacional se obtuvo un número promedio de 1.4 alelos por locus (A) (Cuadro 12), con un valor mínimo de 1.2 en las poblaciones de La Tinaja, Chih. y Cebollitas, Dgo., y un valor máximo de 1.7 en las poblaciones de Batuybo, Chih. y La Encantada, N. L. Estos resultados son similares a los datos reportados para otras especies de coníferas (Adams, et al, 1990; Tremblay y Simon, 1989; Li y Adams, 1989; Lagercrantz y Ryman, 1990), en donde se han encontrado valores extremos de 1.0 para *Pinus resinosa*, y de 4.7 para *Abies alba*. Sin embargo, en el caso particular de especies del género *Picea*, los valores mínimos reportados son de 2.29, en *Picea glauca*, y de 2.7 para *Picea abies* (Tremblay y Simon, 1989; Adams et al., 1990), lo cual indica que los valores encontrados en nuestro estudio para las poblaciones de *Picea chihuahuana* son relativamente menores al promedio de este género y presentan una alta tendencia hacia la fijación de un alelo en particular. La razón por la cual este estimador es utilizado, radica en que es una de las medidas de diversidad genética menos ambiguas y sencillas, que resulta muy adecuada en los análisis de variación genética y en el desarrollo de planes de conservación (Marshall y Brown, 1991).

4.2.2 Porcentaje de loci polimórficos

Con base en el criterio de considerar como polimórfico aquel locus cuya frecuencia del alelo más común es igual o menor a 0.99 (Ayala y Kiger, 1984), el porcentaje de loci polimórficos (P) más bajo (16%) se registró en la población de la Tinaja, Chih. y el valor más alto (52%) en Batuybo, población del

mismo estado (Cuadro 12).

El valor promedio de loci polimórficos para el total de las poblaciones analizadas en este estudio alcanza un 34.5% y es inferior a los valores promedios señalados en otros trabajos, como el de Tremblay y Simon (1989) en *Picea glauca* (67%), el de Lagercrantz y Ryman (1990) en *Picea abies* (73%) y el de Li y Adams (1989) en *Pseudotsuga menziesii* (37%); esto indica que aún cuando solo 5 loci (20%) fueron estrictamente monomórficos en todas las poblaciones, existe una elevada tendencia hacia la fijación (65.5% de los loci), dada por una frecuencia elevada (>99%) del alelo más común, sugiriendo con esto la reducida variabilidad existente en estas poblaciones de *Picea*, dada quizás por efecto del aislamiento entre ellas y el tamaño reducido de las mismas. Con base en características poblacionales similares, Barret y Kohn (1991), mencionan que la deriva genética puede tener una influencia dominante en la estructura poblacional. En las poblaciones en las que se encuentra actuando la deriva genética, la pérdida de la variación es más rápida que en las que éste factor no se encuentra involucrado, coincidiendo este supuesto con el de muchos otros autores, en el sentido de que esta pérdida de variación provocaría la reducción de la habilidad de la población para adaptarse a cambios ambientales, incrementando de la susceptibilidad a plagas y enfermedades. También se hace mención que como consecuencia de esta reducción en el tamaño poblacional, se presenta la endogamia o bien el cruzamiento entre individuos una misma familia. La pérdida en la capacidad de adaptación, que resulta de los cruzamientos entre individuos emparentados, se conoce como depresión endogámica

(Barret y Kohn, 1991).

Las especies que se consideran como endémicas, e incluso aquellas que presentan un movimiento genético limitado, muestran tamaños de población efectivos muy reducidos y pueden experimentar pérdidas muy grandes de su variación genética a través del proceso de deriva genética (Adams *et al.*, 1990), tornándose en especies más vulnerables que las especies que muestran una alta variación (Grunwald *et al.*, 1986).

Lo anterior coincide con los datos de esta investigación, ya que en varias de las poblaciones estudiadas se encontraron pocos individuos, como los casos de Cerro de la Cruz, Chih. con alrededor de 25 individuos adultos, y las poblaciones de La Tinaja, Chih., Arroyo de la Quebrada, Arroyo del Infierno y Arroyo de la Pista, en el estado de Dgo., que no rebasan los 300 individuos.

En general, en la mayoría de las poblaciones se observaron problemas por daños de insectos, baja viabilidad de la semilla y poca producción de ésta en algunos individuos, al grado que fue difícil obtener una muestra representativa en la colecta realizada. En este sentido, se encontró una clara correspondencia entre los datos de polimorfismo y el tamaño de la población.

En estudios anteriores se ha mencionado que las coníferas en general presentan mayor polimorfismo que muchas otras especies vegetales estudiadas (Hamrick *et al.*, 1981), aunque también se ha dicho (Guries, 1984) que los patrones de variación pueden diferir en loci individuales, con lo cual se sugiere que la selección puede ser considerada como un factor importante que determina la estructura poblacional.

Con respecto al origen geográfico de las poblaciones, se encontró un promedio de 33% de loci polimórficos para las poblaciones de Chihuahua, 34% para las poblaciones de Durango y 44%, el valor más alto, para la población de Nuevo León.

En relación a los valores de monomorfismo, los valores más altos se encontraron en las poblaciones de La Tinaja, con 21 (84%), y en Cebollitas, con 20 loci monomórficos (80%). Las poblaciones Cerro de la Cruz, Chih., Arroyo de la Quebrada, Dgo. y Arroyo de la Pista, Dgo., presentaron igual cantidad de loci monomórficos entre ellas (15 loci) y en Chihuahua dos poblaciones más, El Realito y Talayotes, tuvieron 17 loci monomórficos.

Al respecto, Li y Adams (1989) mencionan que todos los loci tienden al homoalelismo en las poblaciones muy pequeñas, coincidiendo con las características de las poblaciones estudiadas, de entre las cuales la población que presenta mayor número de individuos es Batuybo, Chih, con un total de 3364 (SARH e INIFAP, 1990), mostrando ser la población con el porcentaje más bajo de loci monomórficos (48%), en relación con las demás poblaciones.

4.2.3 Heterocigosidad observada y esperada

La estimación de la heterocigosidad observada (H_o) tuvo un valor promedio de 0.084, siendo los valores extremos de 0.046 en Cebollitas, Dgo. y de 0.132 en La Encantada, N.L., las mismas poblaciones en donde se observaron los valores extremos para el número de alelos por locus (Cuadro 12). De la misma manera, el promedio de los valores de la heterocigosidad esperada (H_e) para

todas las poblaciones fue de 0.120, siendo las poblaciones antes mencionadas (Cebollitas y La Encantada) las que presentaron los valores extremos de 0.056 y 0.178, respectivamente. Aunque estos valores se ubican dentro del intervalo de valores mencionados para la mayoría de las coníferas (Ledig, 1986), en donde el valor más bajo es de 0.0 para *Pinus torreyana* y el más alto de 0.362 en *Pinus taeda*, el valor más alto encontrado para la población de Nuevo León en nuestro estudio, apenas alcanza el valor de la heterocigosidad promedio esperada en los estudios revisados por Ledig (1986). Esto indica un menor grado de variabilidad genética en las poblaciones de *Picea* consideradas en este estudio, con respecto a la mayoría de las especies forestales que se han estudiado.

A pesar de las diferencias numéricas que existen entre las poblaciones, todos estos valores de heterocigosidad se pueden considerar relativamente bajos si se comparan con los valores encontrados en otras especies de árboles con polinización cruzada, como en el caso de *Pinus contorta* var. *latifolia* y *Pinus banksiana*, con valores promedio de Heterocigosidad de 0.184 y 0.115, respectivamente (Dancik y Yeh, 1983); en *Abies alba* se reportan valores de 0.563, 0.416 y 0.431 (Adams et al., 1990), siendo este último un valor de Heterocigosidad observada; en *Picea abies*, especie del mismo género en estudio, se registró un valor promedio de 0.115 (Lagercrantz y Ryman, 1990), aunque existe una amplia variación en la información con valores que fluctúan desde 0.165 hasta 0.424 de heterocigosidad promedio esperada (H_e) (Adams et al., 1990; Müller-Starck et al., 1992 y Brown, 1979). En el caso de *Pseudotsuga menziesii* se señala un

valor promedio de H_e de 0.137 (Li y Adams, 1989) y 0.178 (Merkle y Adams, 1987).

En una revisión realizada por Hamrick *et al.* (1981) (en Tremblay y Simon, 1989), en donde se incluyen datos de 20 especies de coníferas, se señala un valor promedio de H_e a 0.207.

Se aprecia en el Cuadro 12, que las poblaciones de Talayotes, La Tinaja y Cebollitas muestran valores casi idénticos de H_o y H_e , mientras que las otras poblaciones muestran normalmente menores valores de H_o que de H_e , con diferencias de casi el doble entre estas variables; Ledig (1993) menciona al respecto, que en coníferas, las diferencias tan altas entre H_o y H_e , cuando H_o es menor que H_e , indican cierto grado de endogamia, es decir una reducción de la heterocigosidad esperada de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg. Es importante mencionar que en particular la población de Cerro de la Cruz presenta la mayor diferencia entre los valores de H_o y H_e , siendo la población que cuenta con 25 individuos registrados únicamente, es decir una de las poblaciones más pequeñas. Debido a ello, puede suponerse una pérdida mucho más rápida de alelos raros si por alguna razón se alterara el ambiente en que se desarrolla esta población. Lo expuesto anteriormente queda también apoyado por el supuesto de que poblaciones pequeñas y aisladas en condiciones marginales se encuentran más expuestas a la endogamia y a la deriva génica, aunado al hecho de que alguna condición extrema para una o más variables ecológicas puede ocasionar una selección direccional más intensa (Soulé, 1973 en Tremblay y Simon, 1989).

Los resultados anteriores coinciden con los de los autores previamente citados, en el sentido de que las poblaciones peque-

ñas y marginales se encuentran restringidas principalmente a depresiones, o bien ubicadas en pendientes con una exposición característica, como en el caso de *Picea glauca* (Tremblay y Simon, 1989). En el caso de las poblaciones de *Picea chihuahuana* incluidas en este estudio no muestran una exposición típica, ya que se localizan en exposiciones noroeste o noreste, aunque sí se concentran en cañadas y sitios con pendientes muy pronunciadas. Este aislamiento geográfico que presentan las poblaciones de *Picea chihuahuana* explica las restricciones de flujo genético que ocurren entre ellas, lo cual reduce de alguna forma el entrecruzamiento entre las poblaciones. Se ha sugerido que la heterocigosidad por sí misma confiere mejor aptitud, independiente de la depresión endogámica, y se concluye que la heterocigosidad frecuentemente se asocia con altas tasas de crecimiento y sobrevivencia, en especial para árboles forestales (Ledig, 1986 en Huenneke, 1991).

Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los casos los valores de heterocigosidad observada (H_o) fueron numéricamente menores a los valores esperados (H_e), y la prueba de χ^2 mostró diferencias estadísticas respecto de los valores esperados por la ley de Hardy-Weinberg (H-W). Se encontró que las poblaciones de Cerro de la Cruz, Batuybo y la Encantada presentan entre 6 y 8 loci que no cumplen esta ley de equilibrio, por lo que se deduce una deficiencia de heterocigotes en la mayoría de las poblaciones y una alta tendencia hacia la fijación en 8 de las 11 poblaciones analizadas.

Un reducido tamaño de la población y una desviación de las frecuencias genotípicas esperadas sugiere la presencia de

problemas con el supuesto de panmixia dentro de las poblaciones (Barret et al., 1987). Una posible explicación a lo antes mencionado puede deberse al restringido flujo genético que se presenta entre las poblaciones de *Picea chihuahuana* al considerar las condiciones geográficas en que se encuentran localizadas.

La tendencia observada hacia la fijación de ciertos alelos, probablemente está ocasionando una drástica reducción de la variación genética en las poblaciones pequeñas. Las posibles modificaciones de las frecuencias génicas observadas únicamente podrán darse si intervienen fuerzas como la mutación o migración, que substituyan a los alelos que se están perdiendo (Mettler y Gregg, 1982). Sin embargo, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la reducción de la variabilidad genética y el aumento de la endogamia observada, en la mayoría de las poblaciones, se debe fundamentalmente al efecto de deriva genética ocasionado por el tamaño reducido de las poblaciones (Ledig, 1993).

Barret y Kohn (1991) mencionan que en las especies con distribución escaza, las poblaciones pequeñas pueden poseer sistemas genéticos que se ajusten a una endogamia muy cercana, así como adaptaciones que compensen las desventajas que se presentan por su rareza (durante el cruzamiento). En contraste, las especies que han experimentado reducciones muy severas en el número poblacional, debido a destrucción de hábitat o bien por pastoreo, pueden ser más susceptibles al estrés genético impuesto por el tamaño poblacional.

En el caso citado por Dancik y Yeh (1983), se mencionan valores calculados de F de 2.5 a 9.7% de deficiencia de heterocigotos en relación al equilibrio de H-W, en las especies de *Pinus contorta* var. *latifolia* y *Pinus banksiana*, respectivamente; también se resalta el hecho de que únicamente el 2% de la variabilidad genética observada en esas especies pareció ser interpoblacional, y el resto se debió a diferencias entre los individuos dentro de poblaciones, mientras que en *Picea chihuahuana*, la divergencia entre poblaciones parece ser mucho mayor.

4.2.4 Distancias genéticas

Los resultados obtenidos de este análisis dieron origen a la matriz de distancias genéticas (Cuadro 13), cuyos valores muestran las relaciones existentes entre todas las poblaciones analizadas en este estudio. Con base en estas distancias se elaboró un fenograma (Figura 4), donde se representan esquemáticamente los agrupamientos de las 11 poblaciones de *Picea chihuahuana*, de acuerdo a su grado de similaridad o diferenciación en las frecuencia alélicas de los 25 loci considerados en el estudio.

La utilización del método mediante el cual se estimaron las distancias genéticas entre las poblaciones (Cavalli-Sforza y Edwards, 1977) permite la determinación del patrón de relaciones existentes entre las poblaciones estudiadas (Hedrick, 1985). Estas relaciones pueden utilizarse posteriormente para enmarcar una posible clasificación del esquema filogenético de la especie

CUADRO 13. MATRIZ DE DISTANCIAS GENETICAS

POBLACIONES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 CERRO DE LA CRUZ	****										
2 BATUYBO	0.207	****									
3 EL REALITO	0.235	0.178	*****								
4 LA TINAJA	0.212	0.261	0.228	*****							
5 TALAYOTES	0.219	0.180	0.099	0.200	*****						
6 ARROYO ANCHO	0.179	0.161	0.127	0.182	0.115	*****					
7 ARROYO QUEBRADA	0.162	0.202	0.209	0.224	0.169	0.171	*****				
8 ARROYO INFIERNO	0.223	0.200	0.184	0.240	0.155	0.187	0.201	*****			
9 CEBOLLITAS	0.287	0.204	0.189	0.283	0.165	0.202	0.215	0.209	*****		
10 ARROYO PISTA	0.230	0.182	0.209	0.271	0.205	0.204	0.180	0.203	0.239	*****	
11 LA ENCANTADA	0.289	0.292	0.343	0.361	0.328	0.329	0.322	0.310	0.353	0.337	*****

* VALORES OBTENIDOS EN BASE AL METODO DE CAVALLI-SFORZA Y EDWARDS (1967).

(Wright, 1978) y ayude a dilucidar de alguna forma su proceso evolutivo (Camussi, *et al.*, 1985).

Debido a que el análisis se realiza con base en las distancias genéticas existentes entre cada par de poblaciones, la descripción del fenograma se da con respecto a los grandes grupos formados, así como a los subconjuntos o subgrupos contenidos en cada uno de ellos, y finaliza con el núcleo que está estructurado por las poblaciones con mayor similitud entre ellas; es decir, las que presentan las menores distancias genéticas (Crisci y López, 1983; Hernández, 1990).

A una distancia genética de 0.208 es posible identificar 4 grupos de poblaciones claramente definidos (Figura 5). Sin embargo, dos de estos grupos contienen a la mayoría de las poblaciones, mientras que los otros dos están constituidos únicamente por una población.

El primer grupo (grupo A) que contiene el núcleo del fenograma, está constituido por 6 poblaciones, en el se encuentran las 2 poblaciones que presentaron la mayor similitud en frecuencias alélicas (Figura 5): El Realito (3) y Talayotes (5), ambas del estado de Chihuahua, con una distancia genética de 0.098. Estas dos poblaciones comparten un total de 17 loci monomórficos (Cuadro 11), y están localizadas a una altitud (2340 m) y latitud similares (alrededor de los 27° 55').

En este grupo se incluyen además, las poblaciones de Arroyo Ancho (6) y Batuybo (2), en el estado Chihuahua, y de Arroyo Infierno (8) y Cebollitas (9), en el estado de Durango.

En el segundo grupo (grupo B), se incluyeron 3 poblaciones, Cerro de la Cruz (1), de Chihuahua, y Arroyo de la Quebrada (7)

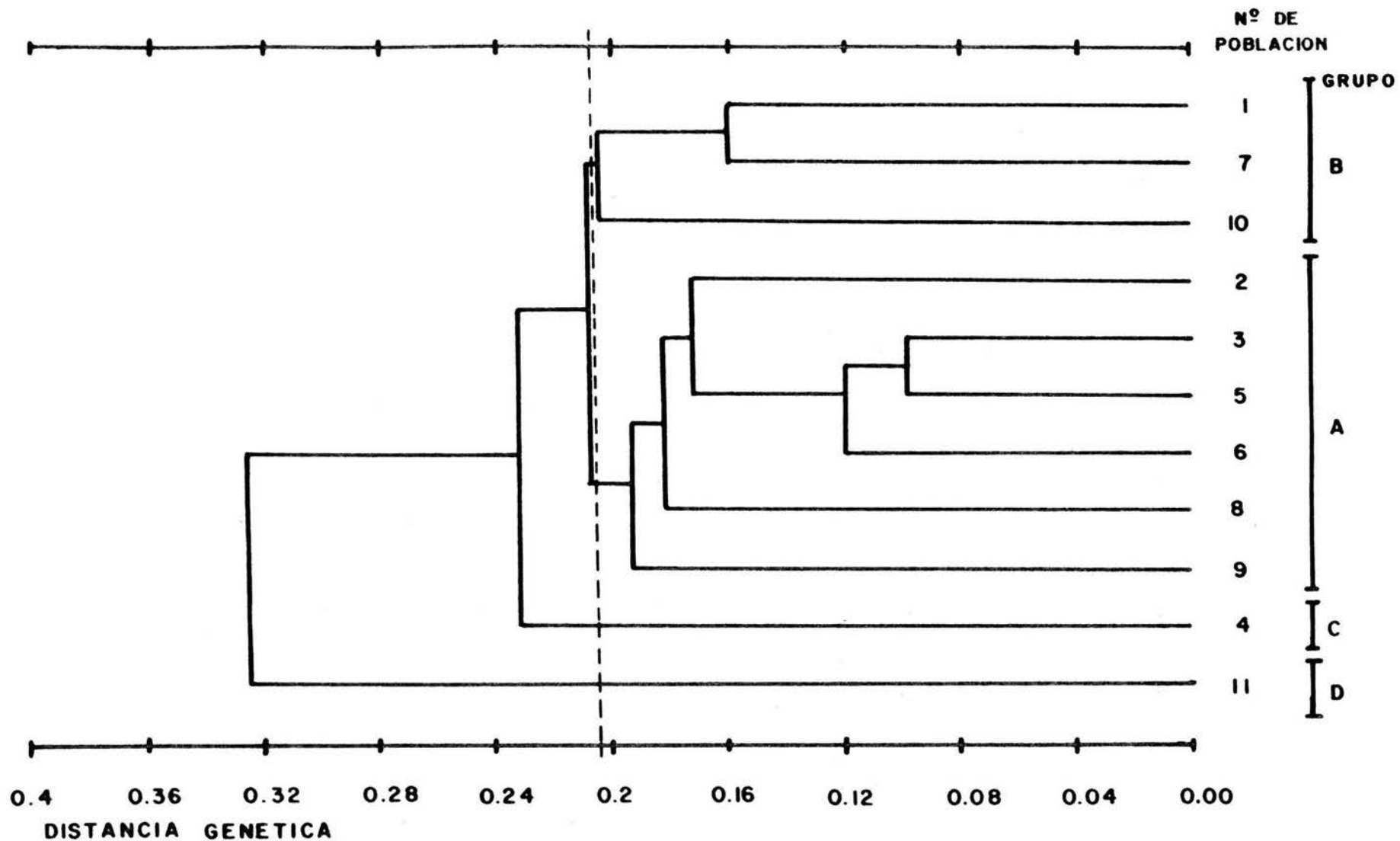


FIGURA 5. AGRUPAMIENTO DE 11 POBLACIONES DE *Picea chihuahuana* EN BASE A LAS DISTANCIAS GENETICAS ESTIMADAS A PARTIR DE LAS FRECUENCIAS ALELICAS DE 25 LOCI.

y Arroyo de la Pista (10), de Durango, con una distancia genética promedio entre ellas de 0.18, y con frecuencia alélicas en 15 de los 25 loci, 5 de los cuales son monomórficos para todas las poblaciones (Cuadro 11). En estas 3 poblaciones se registró un tamaño de la población inferior a los 300 individuos, siendo la población de Cerro de la Cruz la más pequeña, con 25 individuos únicamente.

El tercer grupo (grupo C) estuvo conformado exclusivamente por la población de la Tinaja (4) en el estado de Chihuahua, la cual se integró a los grupos de poblaciones A y B a una distancia de 0.233 (Figura 5). Esta población presentó valores de variabilidad relativamente bajos, con un total de 21 loci monomórficos; en algunos loci, inclusive, fue notoria la ausencia de alelos que normalmente están presentes en frecuencias elevadas en otras poblaciones, como el alelo 1 del locus PGM2, y el alelo 3 del locus MDH4, o la fijación de un alelo que ocurre a menores frecuencias en otras poblaciones, como el caso del alelo 1, en el locus ACO1, y el alelo 2, en el locus PGM2 (Cuadro 11). Es importante señalar que a pesar de que la población de la Tinaja (4) está relativamente cerca, geográficamente, de la población de Talayotes (5), a una distancia aproximada de 7 km en línea recta, la distancia genética entre ambas es de 0.20, lo que las hace ubicarse en diferentes grupos. Estas dos poblaciones presentan diferencias relativamente fuertes en las frecuencias alélicas de 8 loci, al grado que los loci que son polimórficos en una de ellas están fijos en la otra (Cuadro 11), indicando una tendencia a la divergencia de las poblaciones.

Sin duda, la mayor divergencia genética con respecto al resto de las poblaciones muestreadas, se presentó en la población de La Encantada (11), en el estado de Nuevo León.

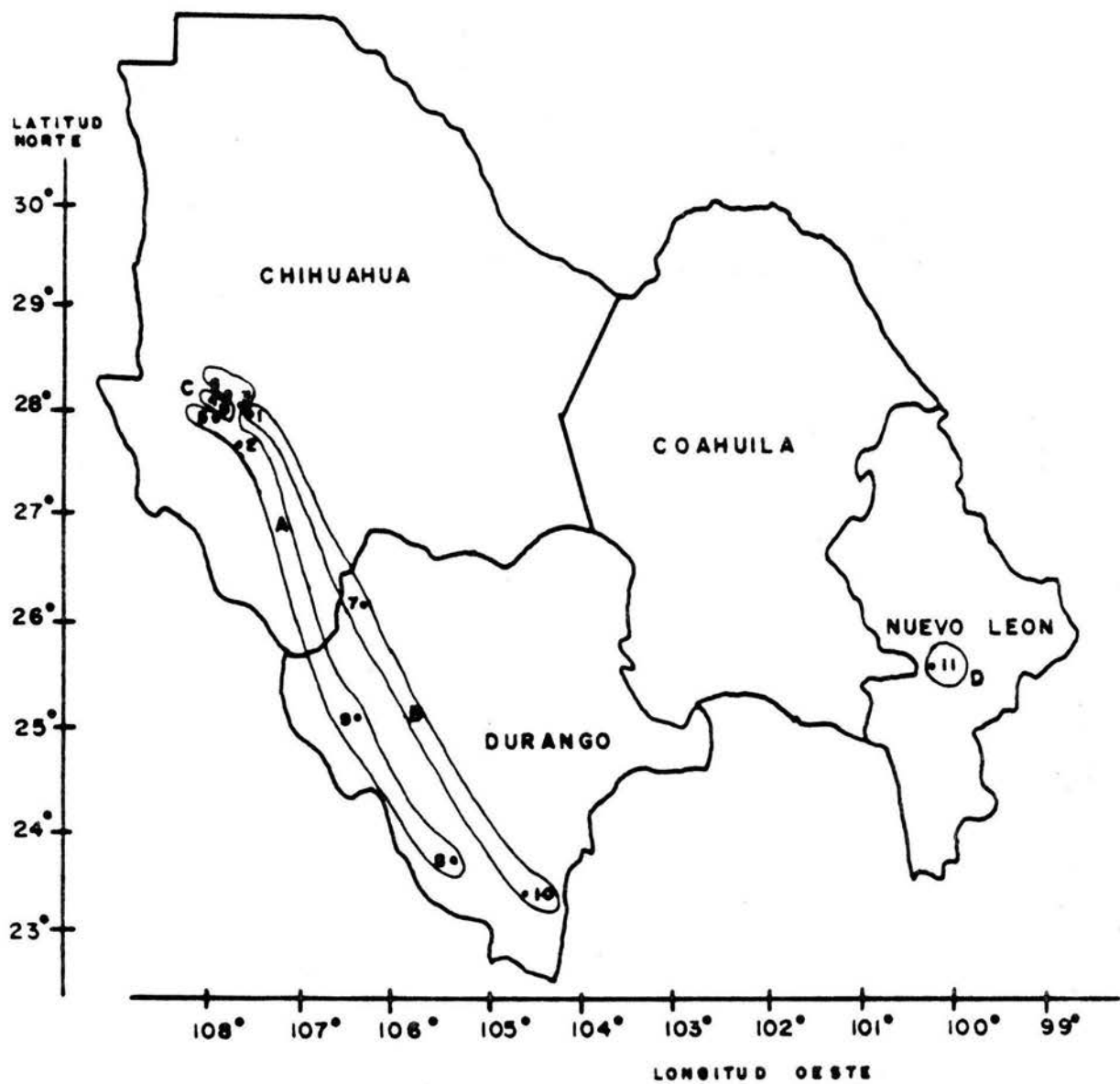
Esta población constituyó por sí sola el cuarto grupo (grupo D) en el fenograma (Figura 5), con distancias genéticas que fluctuaron de 0.289 a 0.353 con el resto de las poblaciones (Cuadro 13). A pesar de que esta población tiene un tamaño reducido, no superior a los 64 individuos adultos (Müller-Using y Velázquez, 1983), presentó 14 loci monomórficos (Cuadro 11), observándose uno de los valores más elevados de variabilidad genética, con valores de $H_e = 0.178$ (Cuadro 12), e inclusive, en algunos loci como GOT3, MNR1 y PGM2 presentó alelos que comúnmente no existen en las otras poblaciones (alelos "exclusivos"), llegando al extremo de la fijación de uno de ellos, el alelo 3 del locus GOT3.

Es probable que el distanciamiento genético de la población de La Encantada se deba, en gran medida, a las características ecológicas en que se encuentra, dado que el ambiente del sitio de la Sierra Madre Oriental donde se localiza difiere totalmente del ambiente en las poblaciones de Durango y Chihuahua, (Müller-Using y Velázquez, 1983). En particular, dicha población muestra rasgos morfológicos disímiles a la descripción dada para la especie (Patterson, 1988). Los valores de diferenciación genética encontrados en este estudio, aunado a lo anterior, señalan que esta población difiere de las demás, al grado que podría constituir un taxon diferente, como se propone en un estudio reciente, denominándola como *Picea martinezii* (Patterson, 1988).

Sin embargo, el patrón de agrupamiento de las poblaciones muestreadas en la Sierra Madre Occidental, en los estados de Durango y Chihuahua, es más difícil de explicar puesto que aparentemente no sigue un gradiente geográfico, altitudinal o climático. Así por ejemplo, las 6 poblaciones de Chihuahua que están relativamente cercanas entre ellas (20 km en promedio en línea recta) y con diferencias de altitud menores a los 200 m, están dispersas en tres grupos diferentes. Por otro lado, poblaciones que están separadas geográficamente por más de 300 km y diferencias altitudinales de entre 250 y 350 m están dentro del mismo grupo (Figuras 5 y 6). La única explicación posible es que el agrupamiento observado en estas poblaciones ha sido resultado del proceso de deriva genética, que ha ocasionado la diferenciación de las poblaciones de manera aleatoria, al grado de que poblaciones relativamente cercanas entre sí, están incluidas en diferentes grupos. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que las distancias genéticas entre la mayoría de las poblaciones de *Picea chihuahuana* fue mayor a 0.15.

Además, como se mencionó anteriormente, la mayoría de las poblaciones muestreadas tienen un tamaño reducido y se encuentran aisladas genéticamente entre ellas por barreras topográficas (la mayoría de las poblaciones se encuentran en cañadas), condiciones que favorecen su diferenciación por efecto de deriva genética y conducen a la fijación y pérdida de alelos.

Diferentes autores han mencionado el hecho de que la evolución y diferenciación de los taxa está en estrecha relación con los niveles de variación genética; las especies longevas, de polinización cruzada y amplia distribución, comúnmente mantienen



A, B, C, D = GRUPOS DE POBLACIONES

FIGURA 6. AGRUPAMIENTO DE LAS POBLACIONES DE *Picea chihuahuana* DE ACUERDO CON LAS DISTANCIAS GENETICAS.

altos niveles de variación genética intrapoblacional (Conkle, 1988), misma que influye tanto en la respuesta fisiológica como demográfica de cada población (Solbrig, 1980; Huenneke, 1991). En el caso particular de las poblaciones de *Picea chihuahuana*, las características de su distribución actual y su estructura genética coinciden con lo que se ha mencionado para especies más vulnerables (Huenneke, 1991), en donde los patrones de distribución natural han sido alterados históricamente, ocasionando la fragmentación de poblaciones extensas en pequeñas poblaciones aisladas, sin flujo genético entre ellas.

Parte de este comportamiento en las poblaciones de *Picea* puede explicarse como consecuencia de los efectos de las glaciaciones ocurridas durante el Pleistoceno y del movimiento tectónico de placas en fechas posteriores, de manera similar a como se ha mencionado anteriormente para otras especies de coníferas (Wright, 1984; Critchfield, 1984; Li y Adams, 1989), incluyendo el caso de especies del género *Picea*, como *P. glauca* y *P. mariana*, en que las poblaciones se han retraído hacia el Norte debido al efecto de las glaciaciones (Critchfield, 1984).

Daubenmire (1968) menciona que durante el Pleistoceno las especies sufrieron cambios drásticos en sus áreas de distribución natural, forzando migraciones en direcciones opuestas de manera alterna, así como la fragmentación en sus áreas de distribución. Lógicamente no todas las especies estuvieron sujetas a las mismas influencias, de tal manera que sus áreas de distribución actuales pueden diferir grandemente en lo que respecta al grado y antigüedad en que ocurrió el aislamiento entre las poblaciones (Daubenmire, 1968).

En nuestro país el género *Picea* ha mostrado una reducción significativa en el número y tamaño de sus poblaciones, ya que por registros palinológicos y estratigráficos, así como por estudios sobre el impacto de glaciaciones y periodos interglaciales (Clisby y Sears, 1955; Sears y Clisby, 1955; Wright, 1955 y Palacios, 1977, 1985); se sabe de la presencia de este género en el Istmo de Tehuantepec, algunas regiones de Chiapas y del Valle de México.

Es probable que los cambios climáticos ocurridos en épocas pasadas provocaron principalmente la migración de las poblaciones hacia las partes boreales, como lo describe Daubenmire (1968), y que gran parte del efecto que se ha suscitado en éstas ha sido la contracción en el tamaño de las poblaciones y el aislamiento entre ellas a través del tiempo, ocasionando una reducción drástica de la variabilidad intrapoblacional. Este efecto se ha incrementado debido a la baja producción y viabilidad de las semillas, daños por insectos y una fuerte acción antropogénica en contra de los individuos que conforman las poblaciones.

En relación con las especies en peligro de extinción, un concepto que resulta por demás importante es el de viabilidad de la población, el cual permite establecer la probabilidad de extinción de éstas en un periodo de tiempo definido. A partir de este concepto se puede estimar el tamaño poblacional mínimo necesario para tener una baja probabilidad de extinción (Huenneke, 1991). Es probable que la mayoría de las poblaciones de *Picea chihuahuana* consideradas en el estudio no alcancen éstos tamaños mínimos para mantener la población viable.

Adams et al. (1990), mencionan que la distribución geográfica es la mejor forma de predecir los niveles de variación genética en las especies leñosas longevas. Las especies forestales endémicas comúnmente tienen la menor diversidad genética, mientras que las que se encuentran tanto regional como ampliamente distribuidas mantienen mayores niveles de diversidad genética.

Es lógico esperar que las especies endémicas, como *Picea chihuahuana*, estén constituidas de poblaciones pequeñas y con limitaciones ecológicas más pronunciadas, debido posiblemente a que en épocas anteriores sufrieron uno o varios eventos de "cuello de botella", ocasionando en ella una reducción drástica en su variabilidad. La historia evolutiva de las especies puede jugar un papel crítico en determinar su composición genética actual. Por estas mismas razones, se recomienda que los planes de conservación biológica tomen en cuenta los cambios históricos en los tamaños poblacionales y su distribución actual como una forma de predecir la cantidad y patrones de diversidad genética existentes (Hamrick et al., 1991).

Los efectos combinados de un reducido tamaño de la población y una tasa de entrecruzamiento baja pueden conducir a una reducción drástica de la variación genética, que unida a una aleatoriedad demográfica puede desembocar en una declinación y posterior extinción de la población (Huenneke, 1991).

Una problemática importante en relación con el mantenimiento de la variación genética y la viabilidad de las poblaciones es la posibilidad de flujo genético que pueda existir entre ellas. Es probable que poblaciones pequeñas no prevalezcan mucho tiempo a menos que se presente una inmigración continua de otras áreas

en las que la especie es más abundante o diversa (Huenneke, 1991). Es importante el asegurar la viabilidad de las poblaciones para mantener la mayor cantidad posible de genes representativos dado el interés general de preservar al menos una copia de cada uno de los diferentes alelos de la especie en estudio (Solbrig, 1980; Marshall y Brown, 1991).

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible establecer las siguientes conclusiones:

1.- Los 17 sistemas enzimáticos analizados mostraron de 1 a 3 loci, con un número de alelos que varió de 1 a 4. Aunque prevaleció el grupo de loci polimórficos con un alelo predominante y uno o varios alelos raros, en los que la frecuencia del alelo predominante fue mayor de 0.90 (12 de los 25 loci estudiados), un 20% de los loci fueron completamente monomórficos (EST1, IDH1, MDH1, MNR2 y 6PGD2).

2.- Para todas las poblaciones consideradas en el estudio, se encontró un número promedio de alelos por locus de 1.4 y un 34.5% de loci polimórficos. *Picea chihuahuana* se encuentra, por lo tanto, por debajo de los valores mínimos de variabilidad genética que se han encontrado en otras especies del mismo género.

Las poblaciones de La Tinaja y Cebollitas presentaron los valores mínimos de variabilidad genética (No. de alelos promedio por locus de 1.2 para ambas poblaciones, 16 y 20% de loci polimórficos y 0.74 y 0.56 de heterocigosidad esperada, respectiva-

mente); las poblaciones de Batuybo y La Encantada, revelaron los valores más altos en cuanto al número de alelos por locus (1.7 en las dos poblaciones) y un porcentaje de loci polimórficos de 52 y 44, respectivamente. Se concluye una elevada tendencia hacia la fijación de ciertos alelos y la pérdida acelerada de variación genética en las poblaciones que muestran los valores más bajos.

3.- La heterocigosidad observada (H_o), con valor promedio de 0.084, resultó ser menor que la heterocigosidad promedio esperada ($H_e = 0.120$), con diferencias significativas de acuerdo a la prueba de χ^2 , lo que indica una deficiencia de heterocigotos de acuerdo a lo esperado por la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, señalando la presencia de un cierto grado de endogamia. Destacó de manera particular la población Cerro de la Cruz, cuyos valores de H_o y H_e difirieron significativamente, estimándose una pérdida de alelos raros en forma más acelerada en caso de cualquier disturbio en el medio. En este caso, las poblaciones con menor número de individuos, como la población Cerro de la Cruz que solo incluye 25 individuos, tenderán a la endogamia, debido a que el aislamiento geográfico al que han estado sujetas ha restringido el flujo genético entre ellas, favoreciendo el proceso de deriva génica.

4.- Con las distancias genéticas obtenidas, se formaron 4 grupos de poblaciones con una distancia genética de 0.208. Las poblaciones con mayor similaridad genética entre sí son El Realito y Talayotes, con una distancia de 0.098. Con respecto a las medidas de distanciamiento genético se encontró que, posiblemente, debido a las barreras geográficas entre las pobla-

ciones, el patrón de deriva génica está jugando un papel importante, ya que las poblaciones de los estados de Durango y Chihuahua aparentemente se agrupan en forma aleatoria. De los grupos formados, la población de La Tinaja constituyó un solo grupo, con lo que quedó completamente aislada de las demás poblaciones, siendo ésta una población pequeña con solo 136 individuos, aproximadamente. Esta población presentó 21 loci monomórficos, con una tendencia muy marcada de divergencia poblacional con respecto a la población de Talayotes, que es la población más cercana geográficamente (menos de 7 km en línea recta).

5.- La población de La Encantada, única población que formó el grupo D, mostró la mayor distancia genética (entre 0.289 y 0.353) con respecto de las demás poblaciones. Dentro de esta población se distinguieron alelos que no estuvieron presentes en loci de las demás poblaciones, siendo notorios los altos valores de variabilidad genética que se presentaron en ella. La posición geográfica que ocupa, respecto de las demás poblaciones que se encuentran en la Sierra Madre Occidental, así como las características propias del hábitat y manejo al que ha estado sujeta, son los factores que posiblemente han provocado la diferenciación de esta población, por lo que genéticamente muestra rasgos diferentes. Es probable que esta población pertenezca a un taxón diferente, y que debido a la variación que presenta podría, a pesar de los pocos individuos que la constituyen, establecerse mejor que la mayoría de las poblaciones de la Sierra Madre Occidental.

6.- El comportamiento de las poblaciones de la Sierra Madre Oriental muestra que podrían existir mayores problemas para su recuperación, debido a lo restringido de su base genética. Sin embargo, cada una de las poblaciones presenta alelos en sus loci, que podrían resultar importantes en cuanto al crecimiento de la especie en zonas por demás restringidas.

El hecho de que en todas las poblaciones localizadas en la Sierra Madre Occidental esté actuando fuertemente el proceso de deriva genética provocará que dichas poblaciones vayan incrementando la fijación de alelos presentes y que cada vez se pierdan más alelos. Este proceso puede acelerarse si en forma simultánea actúa el proceso de selección, por lo que es posible que en un periodo breve se reduzca aún más el nivel de variación genética existente en la actualidad.

6. LITERATURA CITADA

- ADAMS, W. T. y R. J. JOLY. 1980. Genetics of allozyme variants in loblolly pine. *J. Hered.* 71: 33 - 40.
- ADAMS, W. T., S. H. STRAUSS, D. L. COPES y A. R. GRIFFIN (edit). 1990. Population genetics of forest trees: Proceedings of the international symposium of population genetics of forest trees. *Forestry Sciences*. Vol. 42. Kluwer Academic Pub. Netherlands. 420 p.
- AYALA, F. J. y J. A. KIGER, Jr. 1984. *Genética Moderna*. Fondo Educativo Interamericano. España. pp. 611 - 763.
- BARRET, J. W., P. KNOWLES y W. M. CHELIAK. 1987. The mating system in a black spruce clonal seed orchard. *Can. J. For. Res.* 17: 379 - 382.
- BARRET, S. C. H. y J. R. KOHN. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. *In: Genetics and conservation for rare plants*. Center for plant conservation. (Falk D. A. y K. E. Holsinger edit.) Oxford University Press. USA. pp. 3 - 30.
- BASURTO, R. *et al.* 1990. Manifestación preliminar de impacto ambiental del proyecto de desarrollo forestal de los estados de Chihuahua y Durango. (SARH/BM). C.I.C.T.U.S. pp. 8 - 192.
- BERGMANN, F. 1973a. Genetic studies in *Picea abies* with the aid of isoenzyme identification II. Genetic control of esterase and leucine aminopeptidase isoenzymes in haploid macrogametophytes of dormant seeds. *Theor. Appl. Genet.* 43: 222 - 225.
- _____. 1973b. Genetic studies in *Picea abies* with the aid of isoenzyme identification. III. Geographical variation at 2 esterase and 2 leucin-aminopeptidase loci in the swedish spruce populations. *Silvae Genetica* 22: 63 - 66.
- _____. 1974. The genetics of some isoenzyme systems in spruce endosperm (*Picea abies*). *Genetika* 6: 353 - 360.
- _____. 1975. Adaptive acid phosphatase polymorphism in conifer seeds. *Silvae Genetica* 24: 175 - 177.
- _____. 1978. The allelic distribution at an acid phosphatase locus in Norway spruce (*Picea abies*) along similar climatic gradients. *Theor. Appl. Genet.* 52: 57 - 64.
- BIAGGI, R., L. H. FISK y E. MARTINEZ H. 1977. Palinología y Paleocología de sedimentos de la formación La Quinta (Oligo-Mioceno), Chiapas. México. En: III Coloquio sobre Paleobotánica. México.

- BOYLE, T., C. LIENGSIRI y C. PIEWLUANG. 1990. Genetic structure of black spruce on two contrasting sites. *Heredity* 65: 393 - 399.
- BROWN, A. H. D. 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52 (3): 145 - 157.
- BROWN, A. H. D. y G. F. MORAN. 1981. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: *Proceedings of symposium on isozymes of north american forest trees and insects.* Gen. Tech. Rep. PSW-48. Berkeley, CA. pp. 1 - 10.
- BRUNEL, D. y F. RODOLPHE. 1985. Genetic neighbourhood structure in a population of *Picea abies* L. *Theor. Appl. Genet.* 71(1): 101 - 110.
- BUTH, D. G. 1984. The application of electroforetic data in systematic studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 501 - 22.
- CAMUSSI, A., E. OTTAVIANO., T. CALINSKI y Z. KACZMAREK. 1985. Genetic distances based on quantitative traits. *Genetics* 111(4): 945 - 962.
- CAPO A., M. A. 1972a. Observaciones sobre la taxonomía y distribución de las coníferas de Nuevo León, México. Tesis de Licenciatura. UANL. Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, Nuevo León.
- CAPO A., M. A. 1972b. Notas para la colecta de coníferas en Nuevo León. *Bosques IX* (4): 30 - 36.
- CAVALLI-SFORZA L. L. y A. W. F. EDWARDS. 1967. Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Gen.* 19(3) part I (may): 233 - 257.
- CIBRIAN-TOVAR D., B. H. EBEL, H. O. YATES III y J. T. MENDEZ-MONTIEL. 1986. Insectos de conos y semillas de las coníferas de México. UACH-SARH-USDA-FS. Estación Experimental Forestal del Sureste. Asheville, Carolina del Norte. pp. 96 - 97
- CLINE, M. L. y C. P. P. REID. 1982. Seed source and micorrhizal fungus effects on growth of containerized *Pinus contorta* and *P. ponderosa* seedlings. *Forest Science* 28 (2): 237 - 250.
- CLISBY, K. H. y P. B. SEARS. 1955. Palynology in southern North America. Part III. Microfossil profiles under Mexico city correlated with the sedimentary profiles. *Bull. Geol. Soc. Amer.* 66 (5): 511 - 520.
- CONKLE, M. T. 1971. Isozyme specificity during germination and early growth of Knobcone pine. *Forest Science* 17(4): 494 - 498.

- _____. 1972. Analyzing genetic diversity in Conifers...Isozyme resolution by starch gel electrophoresis. PSW- Forest and Range Exp. Station. USDA-FS. Research Note PSW- 264. Berkeley, CA. 6 p.
- _____. 1981. Isozyme variation and linkage in six conifer species. In: Proceedings of the symposium on isozymes of north american forest trees and forest insects. Gen. Tech. Rep. PSW-48., USDA-FS. Berkeley, CA. pp. 11 - 17.
- _____. 1987. Electrophoretic Analysis of Variation in Native Monterey Cypress (*Crupressus macrocarpa* Hartw.). In: Conservation and Management of rare and endangered plants (Elias T. S. edit.): Proc. of a Conference. CA Native Plant Soc., Sacramento, CA. pp. 249 - 256.
- _____. 1991. Genetic diversity - seeing the forest through the trees. In: Population genetics of forest trees: Proceedings of the international symposium on population genetics of forest trees. Forestry Sciences. Vol. 42. Kluwer Academic Publishers. pp. 5 - 22.
- CONKLE, M. T., P. D. HODGSKISS, L. B. NUNNALLY y S. C. HUNTER. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. Gen. Tech. Rep. PSW -64. Berkeley, CA: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, USDA. 18 p.
- CONKLE, M. T. y R. WESTFALL. 1984. Evaluating Breeding Zones for Ponderosa pine in California. In: Progeny Testing. Proceed. of Servicewide Genetics Workshop; Charleston, SC. Dec. 5 - 9, 1983. USDA-FS, Timber Management. Washington, DC. pp. 89 - 98.
- CONKLE, M. T., G. SHILLER y C. GRUNWALD. 1988. Electrophoretic Analysis of Diversity and Phylogeny of *Pinus brutia* and closely related taxa. Systematic Botany 13 (3): 411 - 424.
- CORNEJO, O., E. H. 1987. Aspectos ecológicos y dasonómicos del bosque de *Pseudotsuga - Pinus- Abies* en la Sierra de la Marta, Arteaga, Coahuila. Tesis de Licenciatura. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coah. México. 146 p.
- CRISCI, J., V. y M. F. LOPEZ A. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. O.E.A. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington. D. C. 132 p.
- CRITCHFIELD, W. B. 1984. Impact of the Pleistocene on the genetic structure of North American conifers. In: Proceedings of the 8th. North American Forest Biology Workshop. (Lanner, R. M. edit. y comp.). Utah State University. Logan, Utah. pp. 70 - 118.

- CRONQUIST, A., A.H. HOLMGREN, N. H. HOLMGREN y J. L. REVEAL. 1972. Intermountain Flora. Vascular Plants of the Intermountain West, USA. Volume One. Geological and Botanical History of the Region, its plant geography and a glossary. The Vascular Cryptogams and the Gymnosperms. Noble offset Printers, Inc. USA. pp. 224.
- CHELIAK, W. M. y J. A. PITEL. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Institute. Canadian Forestry Service. Information Report PI - X - 42. 49 p.
- DALLIMORE, W. I. S. O. y A. B. JACKSON A. L. S. 1966. Handbook of Coniferae and Ginkgoaceae. 4th ed. Edward Arnold. London. Great Britain. pp. 1 - 22.
- DANCIK, B. P. y F. C. YEH. 1983. Allozyme variability and evolution of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) and jack pine (*P. banksiana*) in Alberta. Can. J. Genet. Cytol. 25: 57 - 64.
- DARLINGTON, C. D. y A. P. WYLIE. 1955. Chromosome Atlas of flowering plants. George Allen and Unwin LTD, University Press Aberdeen. Great Britain. pp. 6.
- DAUBENMIRE, R. 1968. Some geographic variations in *Picea sitchensis* and their ecologic interpretation. Can. J. Bot. 46: 787 - 798.
- DOBZHANSKY, T. 1975. Genética del Proceso Evolutivo. Extemporáneos, S. A. México. 463 p.
- DOBZHANSKY, T., F. J. AYALA, G. L. STEBBINS y J. W. VALENTINE. 1980. Evolución. Omega. España. 558 p.
- DOMINGUEZ, A., F. A. 1986. Estudio ecológico de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en la región de Huayacocotla, Ver. Tesis Licenciatura. UACH. Chapingo, México.
- DURZAN, D. J. 1968. Disc electrophoresis of soluble protein in the female gametophyte and embryo of conifer seed. Can. J. Bot. 46: 417 - 428.
- ECKERT, R. T. y J. B. RYU. 1983. Foliar isozyme variation in 27 provenances of *Pinus strobus* L.: Relationship of three foliar isozyme alleles with height growth and multivariate patterns of range - wide variation. In: Proceed. of the 7th. North American Forest Biology workshop. Physiology and genetics of intensive culture. (Thielges, B. A. edit. y comp.) Lexington, Kentucky. . pp. 179 - 187.
- EL-KASSABY, Y. A. 1981. Genetic interpretation of malate dehydrogenase isozymes in some conifer species. J. Hered. 72: 451 - 452.

- EL-KASSABY, Y. A. y D. CHIPMAN. (s/f). Starch gel electrophoresis of enzymes for 23 different conifer tree species - A method and compilation of recipes. 15 p. (manuscrito).
- FECHNER, G. H. 1985. Silvical characteristics of Blue spruce. USDA-FS. Rocky Mountain forest and Range Experiment Station, Fort Collins, CO. Gen. Tech. Report RM-117. 19 p.
- FERET, P. P. 1971. Isoenzyme variation in *Picea glauca* (Moench) Voss seedlings. *Silvae Genetica* 20 (1-2): 46 - 50.
- FERET, P. P. y F. BERGMANN. 1976. Gel electrophoresis of proteins and enzymes. In: *Modern Methods in Forest Genetics*. (Miksche, J. P. edit.). Springer-Verlang. N. Y. *Proceedings in Life Sciences*. Cap. 3. pp. 49 - 77.
- FINS, L. 1979. Natural variation. In: *Northeastern area tree improvement short course for field foresters*. NE Area state and private forestry. USDA-FS. Minnesota, USA. pp. 1 - 25.
- FOWELLS, H. A. 1965. *Silvics of forest trees of the United States*. USDA-FS. Agriculture Handbook No. 271. Washington. pp. 287 - 327.
- FOWLER, D. P. y R. W. MORRIS. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genic heterozygosity. *Can. J. For. Res.* 7: 343 - 347.
- GARCIA, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). 2^a Edic. UNAM. México. 240 p.
- GORDON, A. G. 1968. Ecology of *Picea chihuahuana* Martínez. *Ecology*. 49 (5): 880 - 896.
- _____. 1990. Supplementing the population restoration of *Picea mexicana* in Nuevo Leon, Mexico. In: *Forest Genetics Working Group Meeting*. COFAN. México. 5 p. (Manuscrito)
- GOTTLIEB, L. D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. In: *Progress in Phytochemistry*. Pergamon Press. N. Y. 7: 1 - 46.
- GRUNWALD, C., G. SHILLER y M. T. CONKLE. 1986. Isozyme variation among native stands and plantations of allepo pine in Israel. *Israel J. Bot.* 35: 161 - 174.
- GURIES, R. P. 1979. Variation and evolution in natural populations. In: *Northeastern area. Tree improvement short course for field foresters*. NE area state and private forestry. USDA-FS. Bromall, Pennsylvania and Department of Forest Resources. University of Minnesota. Minnesota.

- GURIES, R. P. 1984. Genetic variation and population differentiation in Forest trees. In: Proceed. of the 8th. North American Forest Biology Workshop. (Lanner, R. M. edit. y comp.) Logan. Utah. pp. 119 - 131.
- GURIES, R. P. y F. T. LEDIG. 1978. Inheritance of some polymorphic isozymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Heredity*. 40(1): 27 - 32.
- HAMRICK, J. L., J. B. MITTON y Y. B. LINHART. 1981. Levels of genetic variation in trees: Influence of life history characteristics. In: Proceedings of the symposium on isozymes of north american forest trees and forest insects. Gen. Tech. Rep. PSW-48. USDA-FS. Berkeley, CA. pp. 35 - 41.
- HAMRICK, J. L., M. J. W. GODT, D. A. MURAWSKI y M. D. LOVELESS. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology. In: Genetics and conservation of rare plants. Center for plant conservation. (Falk, D. A. y K. E. Holsinger edit.) Oxford University Press. USA. pp. 75 - 86.
- HARRIS, H. y D. A. HOPKINSON. 1978. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North - Holland Publ. Co. Supplement. Netherlands.
- HEDRICK, P. W. 1985. Genetics of populations. Jones and Batlett Publisher. Inc. USA. 629 p.
- HEDRICK P. W., M. E. GINEVAN y E. P. EWING. 1976. Genetic Polymorphism in heterogeneous environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 7: 1 - 32.
- HERNANDEZ, G., J. J. 1990. Variación genética isoenzimática en *Pinus ayacahuite* y sus dos variedades de México y Centroamérica. Tesis de Maestría. UACH - DICIFO. México. 103 p.
- HITCHCOCK, C. L., A. CRONQUIST, M. OWNBEY y J. W. THOMPSON. 1969. Vascular Plants of the Pacific Northwest. Part 1: Vascular Cryptogams, Gymnosperms and Monocotyledons. University of Washington Press. USA. pp. 121
- HOCKER, H. W. Jr. 1984 . Introduction to Forest Biology. John Wiley & Sons. Chap. 1. pp. 12 - 40.
- HUENNEKE, L. F. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: Genetics and conservation of rare plants. Center for plant conservation. (Falk, D. A. y K. E. Holsinger edit.) Oxford University Press. USA. pp. 31 - 45.
- KHOSHOO, T. N. 1960. Chromosome numbers in gymnosperms. *Silvae Genetica* 10 (1): 1 - 9.

- LACASSAGNE, M. 1934. Etude morphologique, anatomique et systematique du genre *Picea*. Tome II - Etudes Dendrologiques. Laboratoire Forestier de Toulouse. Faculté des Sciences. Toulouse. Volume III. Article I. 289 p.
- LAGERCRANTZ, U. y N. RYMAN. 1990. Genetic structure of norway spruce (*Picea abies*): Concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution* 44(1): 38 - 53.
- LEDIG, F. T. 1986. Conservation strategies for forest gene resources. *Forest Ecology and Management* 14: 77 - 90.
- _____. 1988a. Conservation of genetic diversity: The Road to La Trinidad. The Leslie L. Schaffer Lectureship in Forest Science. Vancouver, B. C., Canada. 19 p.
- _____. 1988b. The Conservation of Diversity in Forest Trees. Why and how should genes be conserved?. *BioScience*. 38 (7): 471 - 479.
- LEDIG, F. T. y M.T. CONKLE. 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey Pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr. *Evolution*. 37 (1): 79-85
- LEHNINGER, A. L. 1983. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2 ed. Omega. España. pp. 161 - 187.
- LI, P. y ADAMS, W. T. 1989. Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. For. Res.* 19: 149 - 161
- LUNDKVIST, K. 1975. Inheritance of acid phosphatase isozymes in *Picea abies*. *Hereditas* 79: 221 - 226.
- MARSHALL, D. R. y A. H. D. BROWN. 1991. Optimum sampling strategies in genetic conservation. *In: Crop genetic resources for today and tomorrow.* (Frankel, O. H. y J. G. Hawkes edit.) pp. 53 - 80.
- MARTINEZ, M. 1942. Una nueva Pinácea Mexicana *Picea chihuahuana*. *Anal. del Inst. de Biol.* 13: 31 - 34.
- _____. 1963. Las Pináceas Mexicanas. 3a. ed. U.N.A.M. México. 345 p.
- MERKLE, S. A. y W. T. ADAMS. 1987. Patterns of allozyme variation within and among Douglas - fir breeding zones in southwest Oregon. *Can. J. For. Res.* 17: 402 - 407.
- METTLER, L. E. y T. G. GREGG. 1982. Genetica de las poblaciones y evolución. UTEHA. México. 245 p.

- MILLAR, C. I., S. H. STRAUSS, M. T. CONKLE y R. D. WESTFALL. 1988. Allozyme Differentiation and Biosystematics of the Californian Closed-cone Pines (*Pinus* subsect. *Oocarpae*). Systematic Botany. 13 (3): 351 - 370.
- MILLER, R. G., M. T. CONKLE y S. T. FRIEDMAN. 1989. The Forest Service Laboratory for The Genetic Analyses of Trees. Tree Planters' Notes 40 (4): 25 - 29.
- MORRIS, J. G. 1987. Fisicoquímica para biólogos. Edic. Repla, S. A. Serie de Biología Fundamental. México. pp. 165 -166.
- MORRIS, R. W. y P. T. SPIETH. 1978. Sampling strategies for using female gametophytes to estimate heterozygosity in conifers. Theor. Appl. Genet. 51: 217 - 222.
- MUHS, H.-J. 1974. Distinction of Douglas-fir Provenances Using Peroxidase - Isoenzyme - Patterns of Needles. Silvae Genetica 23 (1-3): 71 - 76.
- MUNSELL. 1954. Munsell soil color charts. Edition Munsell Color Co. Inc. Maryland, USA.
- MULLER-STARCK, G., PH. BARADAT y F. BERGMANN. 1992. Genetic variation within european tree species. In: Population genetics of forest trees: Proceedings of the International Symposium of population genetics of forest trees. Forestry Sciences. Vol. 42. Kluwer Academic Publishers. pp. 23 - 47.
- MULLER-USING, B. y G. ALANIS F. 1984. Nuevos registros del pinabete de Chihuahua (*Picea chihuahuana* Martínez) en Nuevo León. Propuesta para la protección legal de dos áreas de especial interés ecológico. En: Reunión Regional de Ecología. Norte. SEDUE-Subsecretaría de Ecología. Monterrey, Nuevo León. pp. 130 - 132.
- MULLER-USING, B. y S. VELAZQUEZ F. 1983. Aportes a la distribución geográfica y ecología del pinabete de Chihuahua (*Picea chihuahuana* Martínez) en México. Dos nuevos registros en el Estado de Nuevo León. 22 p. (inédito).
- NARVAEZ, F., R. 1984. Contribución al conocimiento de la ecología de *Picea chihuahuana* Martínez. Tesis de Licenciatura. UANL. Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, N. L. 100 p.
- NARVAEZ, F., R., J. SANCHEZ C. y A. OLIVAS M. 1983. Distribución y población de *Picea chihuahuana*. INIF-SARH-Centro de Investigaciones Forestales del Norte. Nota técnica No. 6. PR - 02. 10 p.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583 - 590.

- NIEBLING, C. R. y M. T. CONKLE. 1990. Diversity of washoe pine and comparisons with allozymes of ponderosa pine races. *Can. J. For. Res.* 20(3): 298 - 308.
- NIEMBRO, R. A. 1986. Arboles y arbustos útiles de México. Naturales e Introducidos. Limusa. UACH. México. pp. 141.
- NIENSTAEDT, H. 1979. Provenance testing and provenance test results. In: Northeastern area tree improvement short course for field foresters. NE area state and private forestry. USDA-FS. Minnesota. 28 p.
- NIENSTAEDT, H. y A. TEICH. 1971. The genetics of White Spruce. USDA-FS. Res. Pap. WO - 15. 24 p.
- PALACIOS, CH., R. 1977. Estudio palinológico de las floras fósiles del Mioceno Inferior del Norte de Chiapas. En: III Coloquio sobre Paleobotánica y Palinología. INAH. Programa y resúmenes de los trabajos.
- _____. 1985. Estudio palinológico y paleoecológico de las floras fósiles del Mioceno Inferior y principio del Mioceno Medio de la región de Pichucalco, Chiapas. México. Tesis Doctoral (Biología). IPN-ENCB. México. D. F. 261 P.
- PATTERSON, T. F. 1988. A new species of picea (Pinacea) from Nuevo León, México. *SIDA.* 13 (2): 131 - 135.
- PITEL, J. A. y W. M. CHELIAK. 1984. Effect of extraction buffers on characterization of isoenzymes from vegetative tissues of five conifer species: A user's manual. Petawawa National Forestry Institute. Canadian Forestry Service. Department of Agriculture. Information Report. PI-X- 34. 64 p.
- PLANCARTE, B., A. 1990. Manual para el establecimiento y evaluación de ensayos de especies y procedencias. Boletín técnico No. 4. Centro de Genética Forestal, A. C. Chapingo, México. 36 p.
- ROJAS, M., P. 1965. Generalidades sobre la vegetación del Estado de Nuevo León y datos a cerca de su flora. Tesis Doctoral. UNAM. Facultad de Ciencias. Depto. de Biología. México. 124 + 75 p.
- RUDIN, D. 1975. Inheritance of glutamate-oxalate-transaminases (GOT) from needles and endosperms of *Pinus sylvestris*. *Hereditas* 80: 296 - 300.
- RUEDA-GAXIOLA, J. 1967. Contribution à l'étude palynologique et pétrographique du charbon crétacé du Bassin de Sabinas, Coahuila, Mexique. These Docteur de 3me Cycle de Géologie Houillere. Faculté des Sciences de L'Université de Lille. 153 p.
- RUSHFORTH, K. D. 1987. Conifers. Facts on File, Inc. Great Britain. pp. 23 - 152.
- RZEDOWSKI, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México. 413 p.

- RZEDOWSKI, J., L. VELA G. y X. MADRIGAL S. 1977. Algunas consideraciones acerca de la dinámica de los Bosques de Coníferas en México. *Ciencia Forestal*. 2 (5): 15 - 35.
- SAFFORD, L. O. 1974. *Picea*. A. Dietr. Spruce. In: *Seeds of Woody Plants in the United States*. (Schopmeyer, C. S. Tech. Coord.) USDA-FS. Agricultural Handbook No. 450. Washington, D. C. pp. 587 - 597.
- SANCHEZ, C., J. 1984. *Picea chihuahuana*, una conífera en peligro de extinción. *Ciencia Forestal*. 9 (51): 51 - 63.
- SANCHEZ, C., J. y R. NARVAEZ F. 1983. *Picea chihuahuana* Mrtz. Una Conífera en Peligro de Extinción. SARH - INIF - Centro de Investigaciones Forestales del Norte. Nota técnica No. 5 PR - 01. 10 p.
- _____. 1990. Plan integral para la protección y fomento de *Picea chihuahuana* Martínez. In: *Ecosistemas Forestales*. (SARH-INIFAP edit.). Organó de difusión técnica. Vol 1. pp. 37 - 55.
- SARGENT, S. CH. 1965. *Manual of the trees of North America (exclusive of Mexico)*. 2a. ed. Dover publications Inc. New York. Volumen 1. pp. 47 - 50.
- SANTAMOUR, F. S., Jr. 1970. New chromosome counts in *Pinus* and *Picea*. *Silvae Genetica* 9(3): 87 - 88.
- SAX, K., y H. J. SAX. 1933. Chromosome numbers of conifers. *J. Arnold Arbor*. 14: 356 - 375.
- SEARS, P. B. 1955. Palynology in Southern North America. *Bull. Geol. Soc. Amer.* 66(5): 471 - 474.
- SEARS, P. B. y K. H. CLISBY. 1955. Palynology in Southern North America. Part IV: Pleistocene climate in Mexico. *Bull. Geol. Soc. Amer.* 66(5): 521 - 530.
- SHEELER, P. y D. E. BIANCHI. 1987. *Cell and Molecular Biology*. 3rd. ed. John Wiley & Sons Inc. USA.
- SIMPSON, M.J.A. y L.A. WITHERS. 1986. Characterization using isoenzyme electrophoresis: a guide to literature. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 102 p.
- SNEATH, P. H. A. y R. R. SOKAL. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman and Company. USA. 573 p.
- SOLBRIG, O. T. 1980. *Demography and evolution in plant populations*. Botanical monographs. Volume 15. University of California Press.

- STRAUSS, S. H. y M. T. CONKLE. 1986. Segregation, Linkage and diversity of allozymes in Knobcone pine. *Theor. appl. Genet.* 72: 483 - 493.
- SWOFFORD, D. L. y R. B. SELANDER. 1981. BIOSYS-1. Release 1. A computer program for the analysis of allelic variation in genetics. Users Manual. Department of Genetics and Development. University of Illinois. Urbana, Illinois. USA.
- TAYLOR, R. J. y T. F. PATTERSON. 1980. Biosystematics of mexican spruce species and populations. *Taxon* 29(4): 421 - 469.
- TIGERSTEDT, P. M. A. 1973. Studies on isozyme variation in marginal and central populations of *Picea abies*. *Hereditas* 75: 47 - 60.
- TREMBLAY, M. y J. P. SIMON. 1989. Genetic structure of marginal populations of white spruce (*Picea glauca*) at its northern limit of distribution in Nouveau Québec. *Can. J. For. Res.* 19: 1371 - 1379.
- WAGNER, R. P., H. J. BURKE, B. G. SANDERS y R. H. RICHARDSON. 1980. Introduction to Modern Genetics. John Wiley & Sons Inc. USA.
- WRIGHT, J. W. 1955. Species crossability in spruce in relation to distribution and taxonomy. *Forest Science.* 1 (4): 319 - 349.
- _____. 1964. Mejoramiento genético de los árboles forestales. FAO: Estudios de Silvicultura y Productos Forestales. No. 16. Italia, Roma. pp. 203 - 208.
- WRIGHT, S. 1969. Evolution of the genetics of populations. Vol 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago. Chap. 7.
- _____. 1978. Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press. USA. 580 p.
- YEH, F. C. y D. O'MALLEY. 1980. Enzyme variations in natural populations of Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco from British Columbia. 1. Genetic variation patterns in coastal populations. *Silvae Genetica* 29 (3-4): 83 - 92.
- ZOBEL, B. y J. TALBERT, 1984. Applied Forest Tree Improvement. John Wiley and Sons. USA. 505.