

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de la diversidad genética y botánica de
pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) en dos
plantaciones del occidente de Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Eduardo Antonio Monge Castro
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala,
2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de la diversidad genética y botánica de
pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) en dos
plantaciones del occidente de Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Eduardo Antonio Monge Castro
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala,
2022

Vo. Bo.:



PhD. Alejandra Zamora Jerez

Tribunal Examinador:

(f):



PhD. Alejandra Zamora Jerez

(f) :



Lic. Alejandro Vásquez Contreras

(f) :



PhD cand. Jonathan A. Morales Marroquín

Fecha de Aprobación: Guatemala, 07 de noviembre de 2022

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mis papás, por apoyarme desde el inicio de la carrera y siempre ser un pilar en mi vida y un gran ejemplo desde su amor. A mi hermano José, mi modelo a seguir, quien me ha apoyado de manera incondicional a pesar de la distancia y siempre ha buscado lo mejor para mí. A mis primos Kevin, Devi y Bryan, quienes me acompañaron y apoyaron durante los muestreos de mi tesis, y abrieron sus puertas siempre que lo necesité.

A mis amigos. A mis compañeros de carrera, quienes desde el inicio se convirtieron en una segunda familia incondicional donde todos podíamos ser nosotros mismos. En especial agradezco a Samuel, Francisco y Bernie quienes han sido un soporte y brazo derecho durante estos últimos años. A Anthony y Víctor, quien no solo me ayudó en las colectas de las muestras y realización de las imágenes, sino ha estado ahí cuando necesité un apoyo emocional.

A los pinabeteros que me abrieron las puertas. A don Carlos Escobar, quien desde el inicio se mostró entusiasta con la investigación y me brindó todo su conocimiento sin restricciones. Él siempre abrió las puertas de su casa y su finca para que yo pudiera aprender. A don Salvador Pira, quien siempre facilitó mi entrada a Chichavac cuando yo lo necesitaba y puso para mi apoyo a todo el personal que yo requiera.

A mis asesores de tesis. A Ale, quien con su pasión y entrega me inicio en el mundo de la biología molecular y genética; una catedrática excepcional que nunca se limitó para compartir con nosotros todos sus conocimientos tanto en teoría como en laboratorio. A Chus, un gran amigo que me ha apoyado dentro y fuera del salón de clase; por siempre buscar la manera más fácil y práctica para enseñarnos con paciencia, buscando transmitir herramientas nuevas y prácticas para mi formación. A Jonathan, quien con su ejemplo y pasión inspira a seguir creciendo y buscando oportunidades para desarrollarme.

A todas las personas que me apoyaron durante el proceso de la tesis. Al departamento de Biología, en especial a Priscila Juárez, quien siempre estuvo pendiente de las necesidades en el laboratorio; y todos mis catedráticos y catedráticas, quienes durante 5 años entregaron todos sus conocimientos, esfuerzo y dedicación a mi formación profesional. Al departamento de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, quienes siempre me apoyaron no solo con reactivos y protocolos, sino con sus conocimientos y habilidades técnicas de laboratorio para enriquecer mi aprendizaje. Al personal de bodega de los laboratorios, en especial a José por su paciencia y disposición de apoyarnos siempre que lo necesitamos. A Ana Isabel García, quien apoyó siempre desde el herbario para que pudiera realizar y terminar todo el análisis botánico.

A las catedráticas que me inspiraron desde un inicio. Un agradecimiento especial para María Renée Álvarez Ruano y Ana Lucía Dubón Morales. Dos de las mejores catedráticas que con las que tuve la oportunidad de formarme, y quienes me acompañaron desde el planteamiento de la investigación hasta los resultados finales. Les agradezco por siempre poner a su disposición sus conocimientos, retarme a ser una mejor versión de mí para ser mejor científico y enseñarme con su ejemplo la ética profesional.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
LISTADO DE CUADROS	iv
LISTADO DE FIGURAS	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	2
A. <i>Abies guatemalensis</i> Rehder	2
1. Descripción morfológica	2
2. Distribución	3
3. Clasificación taxonómica.....	4
4. Importancia	5
A. Ecológica.....	5
B. Cultural	5
C. Comercial.....	5
5. Amenazas	6
A. Pérdida de los bosques naturales.....	6
B. Plagas y enfermedades	7
C. Regeneración lenta.....	8
D. Tráfico ilegal	8
6. Cultivo de pinabete en Guatemala	9
7. Estado de conservación.....	10
B. Caracterización botánica.....	11
1. Caracterizaciones morfológicas de <i>Abies guatemalensis</i> Rehder	11
C. Caracterización genética	12
1. Caracterizaciones genéticas de <i>Abies guatemalensis</i> Rehder	13
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. OBJETIVOS.....	16
A. General.....	16
B. Específicos.....	16
V. METODOLOGÍA	17

A.	Sitios de estudio	17
1.	Finca El Edén, Palestina de los Altos, Quetzaltenango	17
2.	Finca Caleras Chichavac, Tecpán, Chimaltenango	17
B.	Caracterización fenotípica botánica	19
1.	Colecta de muestra	19
2.	Medición de los descriptores foliares	19
3.	Análisis de datos fenotípicos	21
C.	Caracterización genética	22
1.	Colecta de muestra	22
2.	Extracción de ADN	22
3.	Análisis con marcadores moleculares	23
4.	Análisis de datos	23
VI.	RESULTADOS	25
A.	Caracterización botánica	25
B.	Caracterización genética	28
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
VIII.	CONCLUSIONES	40
IX.	RECOMENDACIONES	42
X.	LITERATURA CITADA	43
XI.	ANEXOS	50

LISTADO DE CUADROS

CUADRO 1. Principales plagas y enfermedades identificadas que afectan las plantaciones y poblaciones de <i>Abies guatemalensis</i> Rehder.	8
CUADRO 2. Sitios de estudio y colecta para la caracterización genética y botánica.....	19
CUADRO 3. Características de los microsatélites desarrollados por Rasmussen <i>et al.</i> (2008) utilizados en este estudio.	23
CUADRO 4. Diversidad genética de 4 loci de microsatélites en tres morfotipos de <i>Abies guatemalensis</i>	28
CUADRO 5. Estadísticos de diversidad genética de tres morfotipos de <i>Abies guatemalensis</i> basado en 4 microsatélites.	29
CUADRO 6. Coeficiente de fijación (F_{st}) entre tres morfotipos de <i>Abies guatemalensis</i> basado en 4 microsatélites.....	29
CUADRO 7. Resultados de la prueba de homocedasticidad de la varianza	54
CUADRO 8. Resultados de la prueba de normalidad	54
CUADRO 9. Método utilizado y resultado obtenido de la prueba t para comparación de dos medias para las variables morfométricas.	55
CUADRO 10. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 7.....	60
CUADRO 11. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 8.....	62
CUADRO 12. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 9.....	64
CUADRO 13. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 15.....	66

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. Ilustración botánica de <i>Abies guatemalensis</i> Rehder	3
FIGURA 2. Distribución potencial de bosques naturales de <i>Abies guatemalensis</i> en Guatemala. 4	
FIGURA 3. Dinámica de la cobertura forestal de Guatemala entre los años 2010-2016.	7
FIGURA 4. Ubicación de las plantaciones de pinabete con fines comerciales y potencial distribución de la especie.	10
FIGURA 5. Distribución del complejo <i>Abies religiosa–hickelii–guatemalensis</i> caracterizado por Strandby <i>et al.</i> 2009	12
FIGURA 6. Finca El Edén, Palestina de los Altos, Quetzaltenango	17
FIGURA 7. Finca Caleras Chichavac, Tecpán, Chimaltenango	18
FIGURA 8. Ubicación de los sitios de estudio.	18
FIGURA 9. Características morfológicas y morfométricas utilizadas para la caracterización botánica de pinabete.....	20
FIGURA 10. Agrupación jerárquica con método de Ward y distancia euclidiana para las variables estandarizadas.....	25
FIGURA 11. Análisis de Componentes Principales (PCA) para los descriptores morfológicos y morfométricos.	26
FIGURA 12. Resultados de la prueba t para la diferencia significativa entre el valor de las mediciones para cada carácter morfológico.....	27
FIGURA 13. Representación de individuos que presentaron características no reportadas en la literatura para <i>A. guatemalensis</i> y sus variedades.....	28
FIGURA 14. Diagrama de análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para los morfotipos de <i>A. guatemalensis</i>	30
FIGURA 15. Identificación de valores atípicos en las mediciones de las características morfométricas.....	53
FIGURA 16. Comparación de las formas del corte transversal de la hoja entre resultados de Strandby <i>et al.</i> (2009) y este estudio.....	56
FIGURA 17. Ejemplo de geles y análisis de presencia ausencia de bandas utilizando el programa GenAnalyzer 19.1	59
FIGURA 18. Curva de los criterios de información bayesianos (BIC) en el análisis del DAPC. 68	
FIGURA 19. Gráfico que muestra las probabilidades de asignación de los individuos a los diferentes grupos del DAPC.	68

RESUMEN

El pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) es una de las especies que presenta alta importancia ecológica, cultural y comercial para Guatemala. Esto llevó a una sobreexplotación del recurso, perdiendo cerca del 95% de los bosques naturales. Una de las estrategias de conservación son las plantaciones voluntarias para satisfacer la demanda del recurso. En dichas plantaciones, los productores son capaces de reconocer más de una variedad de pinabete, las cuales suelen distinguir como *A. guatemalensis* y *A. religiosa*. Sin embargo, no existe información precisa sobre esta distinción ni la diversidad del complejo de *A. guatemalensis* cultivado. Por esto se realizó la caracterización genética y botánica de *A. guatemalensis* provenientes de plantaciones del occidente de Guatemala. Se utilizaron en total 59 árboles clasificados como morfotipo *guatemalensis*, *religiosa* o híbridos. Se midieron un total de 14 características morfológicas y morfométricas; y se utilizaron 4 marcadores microsatélites para determinar diferencia entre los grupos. Los resultados muestran que es posible distinguir dos grupos morfométricos diferentes, incluyendo uno a los morfotipos *guatemalensis* y el segundo a los *religiosa* e híbridos. Sin embargo, no es posible distinguir diferenciación genética entre los grupos. Las diferencias observadas pueden ser explicadas más por factores ambientales que genéticos, mostrando que la variación fenotípica es producto de la alta plasticidad de la especie como respuesta a adaptaciones específicas al medio.

ABSTRACT

The Guatemalan fir (*Abies guatemalensis* Rehder) is one of the species with higher commercial, cultural, and ecological relevance in Guatemala. This led to overexploitation of the resources, losing around 95% of the natural forest. One of the national conservation strategies are the volunteer plantations to supply the demand of the tree. In these plantations, the owners are able to identify more than one variety of the tree, usually named as *A. guatemalensis* and *A. religiosa*. Despite, we do not have information that support this classification nor about the complex of *A. guatemalensis* cultivated. For this reason, the objective was to perform a genetic and botanical characterization of *A. guatemalensis* from two plantations in western Guatemala. A total of 59 trees classified as *guatemalensis*, *religiosa* or hybrid morphotypes were used. To determinate the difference between groups we used 14 morphological and morphometric characteristics and four microsatellites (SSRs) markers. The results shows that it is possible to distinguish two different morphometric groups, one including the *guatemalensis* morphotypes, and other with *religiosa* and hybrids. However, cannot distinguish genetic differentiation between groups. The results suggest the importance of ecological factors, showing that the phenotypic difference is a result of the high plasticity of the specie as a specific adaptation to the environment.

I. INTRODUCCIÓN

El pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) es una especie de conífera neotropical de las tierras altas desde México hasta Honduras (Farjon 2017). Presenta una alta importancia ecológica, (Corrales *et al.* 2015), cultural (Andersen *et al.* 2006) y comercial (Ignosh y Kilgore 2005). Esto llevó a la depredación de la especie, perdiendo cerca del 95% de los bosques naturales (Gardner 2013). Actualmente la amenaza de pérdida de hábitat continua, principalmente por expansión de la frontera agrícola, urbanización, incendios forestales y sobrexplotación del recurso (Andersen *et al.* 2008). A esto se les suma las plagas, la baja tasa de regeneración natural y las necesidades ecológicas que lo hacen un árbol vulnerable a cambio climático (Anderson *et al.* 2018). Por esto, la especie es clasificada como “en peligro de extinción” bajo la lista roja de UICN (Gardner 2013), en la categoría I de la lista CITES (CITES 2013) y en la categoría 1 bajo la lista LEA del CONAP (CONAP 2009).

Esto impulsó la protección nacional del recurso forestal del pinabete a través del Reglamento para el manejo de Plantaciones y Áreas Productoras de semilla de Pinabete y la Estrategia Nacional para la Conservación de Pinabete. Ambos documentos dan la base legal y técnica para promover la conservación *ex situ* e *in situ* por medio de diferentes estrategias. Una de las estrategias más grandes e importantes son las plantaciones voluntarias que satisfacen la demanda de árboles de navidad a fin de año, reduciendo así la presión de tala ilegal en bosques naturales (CONAP 2020). Esta actividad trae beneficios no solo para la especie, sino mejora la calidad de vida de los productores (Ignosh y Kilgore 2005).

La estrategia actual contempla la necesidad de priorizar la investigación que permita una mejor toma de decisiones en los diferentes programas de conservación. Unos de los ejes de investigación necesarios es comprender la diversidad morfológica y genética que se preserva dentro de las plantaciones, entendiendo las fuerzas ambientales y evolutivas que las determinan (Andersen *et al.* 2008, Rasmussen *et al.* 2010). Por esto se realizó la caracterización genética y botánica de *A. guatemalensis* provenientes de dos plantaciones del occidente de Guatemala, como un esfuerzo para comprender mejor a la especie y su conservación fuera de los bosques naturales. Esto a través de comparaciones morfométricas que indican adaptaciones específicas de la especie; y comparaciones genéticas por medio de microsátélites para comprender los procesos de diversidad de los individuos. La inclusión de esta información permitirá comprender y mejorar programas actuales de conservación, para asegurar el manejo, conservación y aprovechamiento adecuado del recurso, sin comprometerlo para las futuras generación.

II. ANTECEDENTES

A. *Abies guatemalensis* Rehder

1. Descripción morfológica

La descripción morfológica de la especie se basa en Standley y Steyermark (1958), Andersen *et al.* (2006), MacVean (2010), Farjon (2017) e INAB (2019). *Abies guatemalensis* se caracteriza por ser perennifolio con una altura entre 40-50 m, y un diámetro entre 1.0-1.5 m. Presenta un crecimiento simétrico con copa piramidal o cónica. La corteza es recta, grisácea en juveniles y café pardo en adulto. Las ramas juveniles son de color marrón rojizo, con escasos tricomas en la base. Las yemas son globulares-ovoides, resinosas y de 5 mm de largo en árboles viejos. Las hojas son aciculares con ápice emarginado u a veces obtuso, solitarias, de 1.5-5.5 cm de largo y de 1.0-2.0 mm de ancho. Crecen en ángulo recto, aparentando estar en un arreglo de dos rangos, casi divaricadas, de forma pectinada. Presentan un color verde lustros en el haz y blanco a plateado en el envés, donde presentan estomas en forma de dos bandas blancas. Las secciones transversales de las hojas muestran dos canales de resina marginales y células hipodérmicas discontinuas bien desarrolladas.

El pinabete es una especie monoica, donde los estróbilos crecen a partir de las yemas de la temporada anterior. Los estróbilos masculinos miden entre 1.5-2.2 cm de largo y 4.5-5.0 cm de ancho, con forma ovalada y presentan hojas escuamiformes. Los estróbilos femeninos son escamosos, de forma cilíndrica y con tamaños entre 8.0 – 12 cm de largo y 4.5-5.0 cm de ancho. Las escamas de las semillas son oblongas a reniformes de 2.7-3 cm de ancho y 1.5-2.2 cm de alto, con el margen superior entero o erosionado-denticulado. Las brácteas están incluidas y son cuneadas-obovadas u oblanceolado, con una cúspide triangular corta de 1.2-1.7 cm de longitud. Por lo general, son la mitad de largo que las escamas. La semilla es cuneada-ovoide, marrón pálido con un tamaño de 8.0-10 mm de largo. Las alas son obovadas, de 1.0-1.5 cm de largo y 1.4-1.5 mm de ancho.

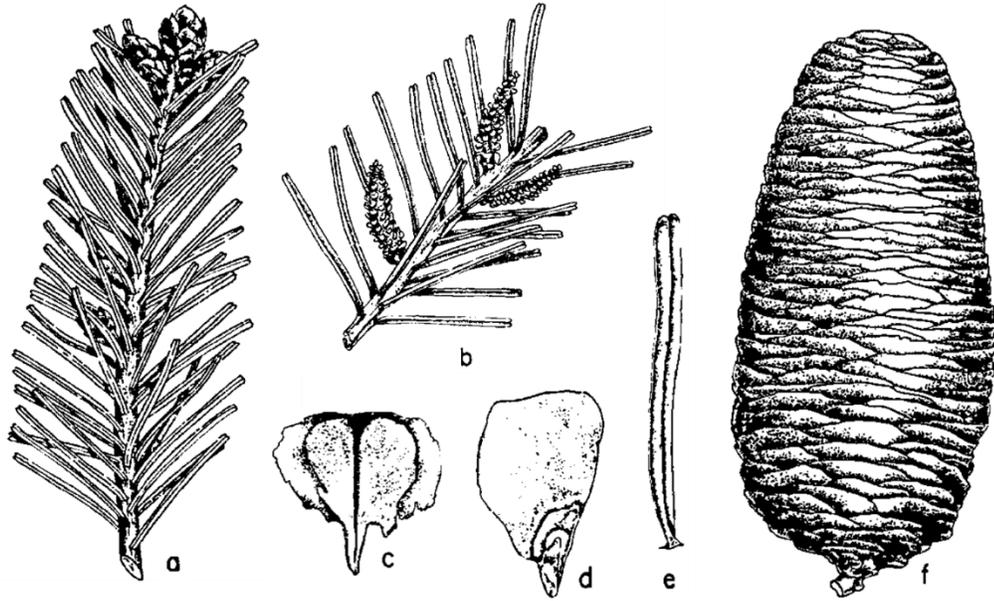


FIGURA 1. Ilustración botánica de *Abies guatemalensis* Rehder. a, Hojas en arreglo casi divaricadas en la rama. b, Amentos estaminados creciendo de la rama. c, Lado interior de la escama de cono. d, Semilla. e, Lado inferior de la acícula. f, cono. Fuente: Standley y Steyermark (1958).

2. Distribución

El género *Abies* se distribuye en las regiones templadas y boreales del hemisferio norte del Neotrópico, principalmente en regiones montañosas (Farjon 2017). *A. guatemalensis* es la especie con la distribución más al sur de todo el género, siendo nativa de las montañas de las tierras altas (2700-3500msn), desde Jalisco, México, pasando por Guatemala y El Salvador, hasta Honduras (Standley y Steyermark 1958, INAB 2019). En Guatemala su distribución es limitada por los requerimientos altitudinales y la depredación humana, abarcando los departamentos de Totonicapán, Huehuetenango, Quiché, Quetzaltenango, San Marcos, Jalapa, Chimaltenango, Chiquimula y Zacapa. En estos bosques *A. guatemalensis* domina menos del 4% del hábitat, siendo más abundantes las especies asociadas al género como: *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltdl, *Pinus hartwegii* Lindl y *Cupressus lusitanica* Mill (MacVean 2010, Andersen *et al.* 2006, Farjon 2017).

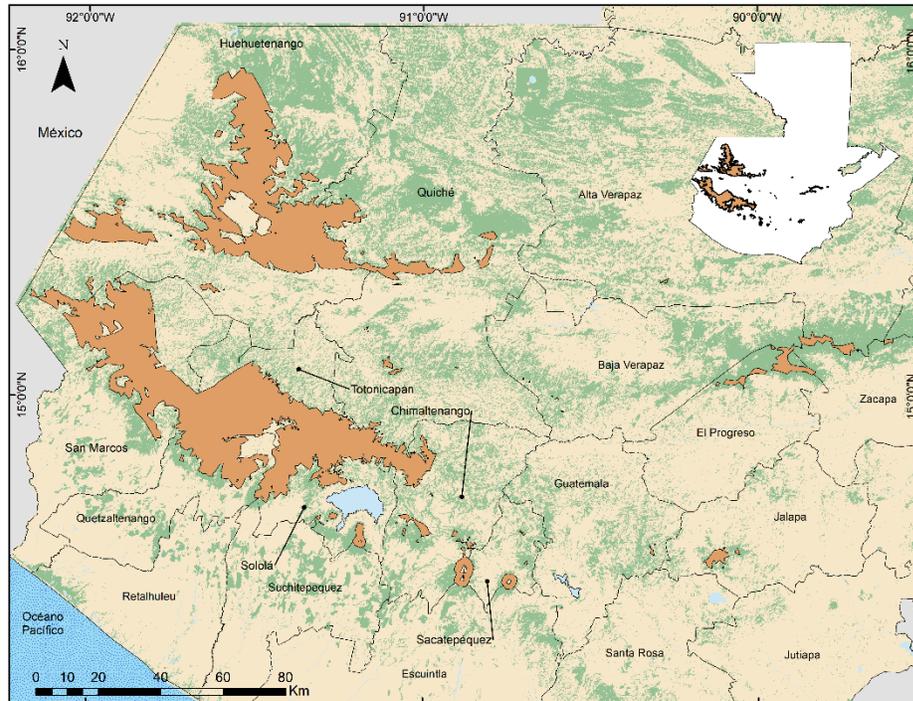


FIGURA 2. Distribución potencial de bosques naturales de *Abies guatemalensis* en Guatemala.

Fuente: Elaboración propia con datos de INAB (2019).

3. Clasificación taxonómica

La historia taxonómica de la especie es compleja, con diversos cambios de especies y subespecies a lo largo de los años (Andersen *et al.* 2006). Hasta 1939 se creía que *A. religiosa* era la única especie del género con una distribución al sur de Estados Unidos, hasta que Rehder describió *A. guatemalensis*. Las principales diferencias utilizadas fueron la presencia de hojas emarginadas, conos más cortos, estróbilos masculinos más largos y brácteas que no se encierra (Rehder 1939). Un año después, Lundell propuso que las poblaciones del volcán Tacaná pertenecían a una especie diferente, *A. tacanensis*. Las principales diferencias es que *A. tacanensis* presenta hojas más apretadas, casi lineales, con márgenes redondeados y con brácteas que superan las escamas y llevan una cúspide pronunciada (Lundell 1940). Sin embargo, en 1948 Martínez propuso que no era una especie diferente sino una variedad, *A. g. var. tacanensis*. De manera similar, este autor describió *A. g. var. jaliscana* para las poblaciones de Jalisco, México (Martínez 1948). En los últimos años se han propuesto otras subespecies en otras poblaciones, como *A. g. var. ixtepejiensis* Silba, de Ixtepeji, México y *A. g. var. tamaulipasensis* Silba con ocurrencia en Tamaulipas en Honduras (Andersen *et al.* 2006).

A pesar de los diversos trabajos y subespecies descritas, actualmente se reconocen únicamente dos variedades, siendo estas: *Abies guatemalensis* Rehd. var. *guatemalensis* y *Abies guatemalensis* Rehd. var. *jaliscana* Martínez. La primera incluye a las especies antes

reconocidas por los sinónimos *A. g. var. tacanensis*, *A. zapotekensis* y *A. g. var. longibracteata*. Por otro lado, en la segunda subespecie ahora se incluye *A. religiosa var. emarginata* y *Abies flinckii* (Farjon 2017).

4. Importancia

a. Ecológica

El pinabete es una de las especies representativas de los bosques montanos subtropicales de coníferas del país (IARNA-URL 2018). La posición geográfica de estos bosques ha producido en ellos las condiciones para albergar altos niveles de diversidad y ser importantes ecorregiones y zonas de endemismo, especialmente de árboles, aves, anfibios y reptiles (Corrales *et al.* 2015). Estos ecosistemas también juegan un rol crítico en el servicio ecosistémico del agua. Las tasas de precipitación permiten regular la cantidad y calidad del agua, contribuyendo a una mejor calidad del recurso (Godínez 2021).

Los bosques naturales de pinabete son reconocidos para el control de la erosión del suelo, el almacenamiento y la purificación del agua para las comunidades aledañas y de aquellas que se encuentran a menor altitud (Anderson *et al.* 2008). También son fuentes significativas para el almacenamiento de carbono. Por ejemplo, se estima que el bosque de coníferas de Momostenango, Totonicapán almacena aproximadamente 221.6 tC/ha, siendo el pinabete la especie dominante y que más contribuye al proceso (CEAB 2011).

b. Cultural

La distribución de los bosques de pinabete está fuertemente asociada a diversos grupos originarios, quienes en su mayoría manejan su conservación (Andersen *et al.* 2006). Ejemplos de esto los departamentos de Huehuetenango, Quiché y Totonicapán donde se encuentran la mayoría de las plantaciones y bosques naturales. Las poblaciones mayoritarias de estos departamentos son comunidades indígenas que pertenecen a 10 grupos étnicos, siendo Q'iche, Mam, Q'anjobal y Chuj las más representativas (Anderson *et al.* 2018, Godínez 2021). Tradicionalmente, estos grupos utilizan el pinabete en la fabricación de artesanías decorativas como dibujos, cruces o adornos; u objetos del uso personal, como muebles, cajas, utensilios de cocina, entre otros. Las hojas son utilizadas con fines decorativos en hogares, áreas ceremoniales, iglesias y cementerios (INAB 2019). En otras regiones la tenencia y manejo comunitario de los bosques son parte de la esencia de “Nuestra Madre”, formando parte esencial del tejido social y cosmovisión de las comunidades (Andersen *et al.* 2006).

c. Comercial

El pinabete ha ido incrementando su valor comercial durante los últimos años, especialmente en la región occidente del país donde es cultivado como árbol de navidad

(INAB 2019). Para 2003, el pinabete dominaba 65% del mercado de árboles de navidad, especialmente por el color, tamaño, aroma forma y precio (INAB 2019). Este porcentaje ha aumentado durante los últimos años, superando a otras especies nacionales e importadas (Martínez 2018, INAB 2019). Esto hace que su cultivo sea una alternativa económicamente eficiente que permite a las comunidades diversificar sus ingresos, siendo compatible con la agricultura tradicional y promoviendo la conservación de la especie y los recursos (Ignosh y Kilgore 2005, vonHedemann y Osborne 2016).

El pinabete también representa una oportunidad económica a través de los programas de incentivos forestales PINPEP, PINFOR y PROBOSQUE. Ocupa el puesto 34 de interés para los proyectos dentro de los programas (vonHedemann y Osborne 2016, INAB 2019). Esta actividad tiene oportunidad de crecimiento. Según el análisis “Oportunidades de restauración del paisaje forestal en Guatemala”, las plantaciones de pinabete en pasto son la actividad económica con un mejor retorno de inversión y más ganancias a largo plazo (MRF 2018). Una de las ventajas de la especie es que permite usar modelos de negocios mixtos para tecnificar la actividad y llegar a un mayor mercado (Martínez 2018).

Durante los últimos años se ha buscado también darle un uso secundario a los pinabetes posterior a su uso como árboles de navidad. Los usos tradicionales incluyen el uso de árboles secos como leña en los hogares, o con fines aromáticos en diferentes recintos (INAB 2019). Un nuevo uso más reciente se dio en 2021 cuando el zoológico nacional La Aurora reutilizó los pinabetes como parte de su programa de enriquecimiento ambiental para los animales, con el fin de estimularlos física y mentalmente (Paredes 2021). Con esto se busca aumentar la cadena de valor de la especie, desde su plantación hasta los usos secundarios de los desechos.

5. Amenazas

a. Pérdida de los bosques naturales

En los últimos 20 años Guatemala ha perdido cerca de un 50% de su cobertura forestal, con una elevación de la tasa promedio de 0.5-1.0% cada año. A pesar de que existe una ganancia debido a los esfuerzos de conservación e implementación de incentivos forestales, la pérdida bruta continúa incrementando. Las principales causas incluyen el avance de la frontera agrícola, urbanización, incendios forestales y sobreexplotación del producto con fines no maderables (INAB, CONAP, UVG y URL 2012).

En el caso del pinabete se ha perdido el 95% del bosque natural en su distribución en los últimos 70 años, reduciéndose de 500 mil hectáreas a 27 mil hectáreas. Se estima que esta tendencia continuará, generando una pérdida considerable del 50% en solo tres generaciones (Gardner 2013). Los bosques remanentes se encuentran fragmentados y con poca o nada conectividad entre ellos, lo que dificulta la capacidad de expansión de la especie (Rasmussen *et al.* 2010). Adicionalmente, el pinabete presenta una alta sensibilidad a los

cambios climáticos para un buen desarrollo. Esto sugiere que será una especie más vulnerable ante el calentamiento global, disminuyendo su distribución natural potencial aún más (Anderson *et al.* 2018).

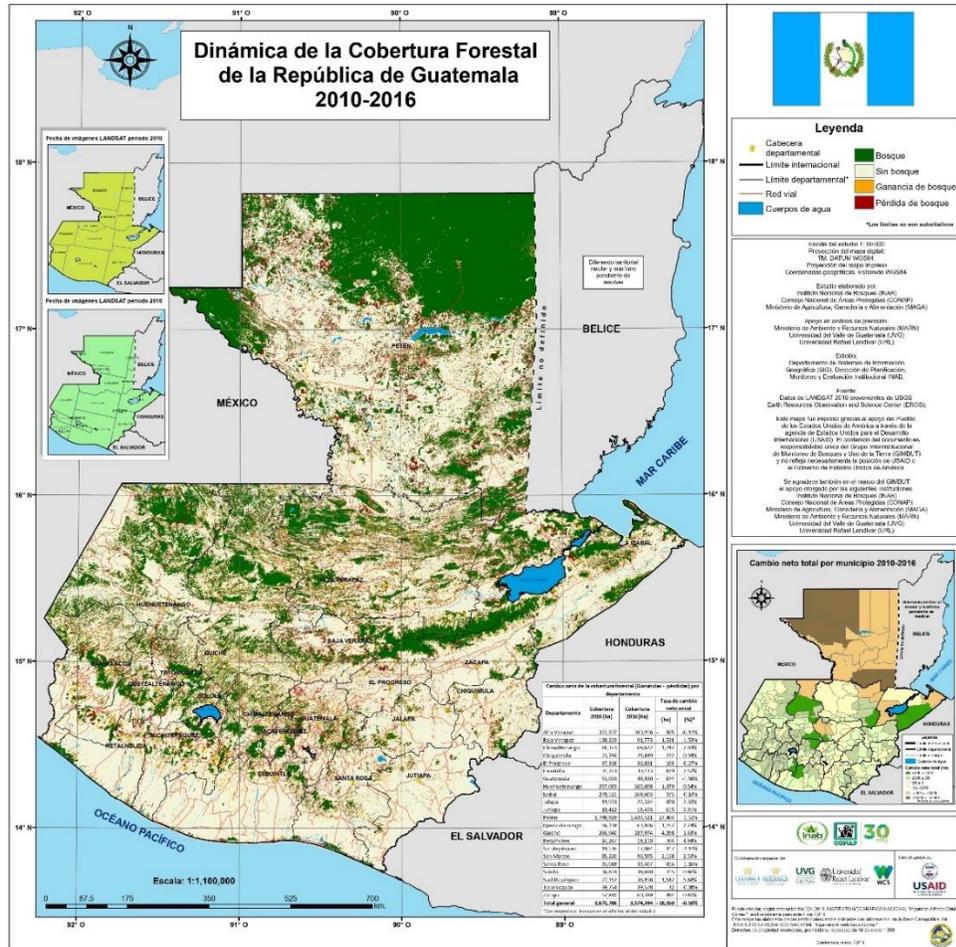


FIGURA 3. Dinámica de la cobertura forestal de Guatemala entre los años 2010-2016. Se registró una pérdida neta de 101, 542 hectáreas de bosque, con una tasa neta de deforestación de 0.50%.

Fuente: GIMBUT, 2016.

b. Plagas y enfermedades

El incremento de las plantaciones fuera de la distribución natural y el establecimiento de sistemas agroforestales en sistemas no óptimos ha resultado en la aparición de hongos, insectos, algas y líquenes que afectan al pinabete (INAB 2019). Las principales plagas y enfermedades se listan a continuación.

CUADRO 1. Principales plagas y enfermedades identificadas que afectan las plantaciones y poblaciones de *Abies guatemalensis* Rehder.

Enfermedad	Patógeno	Taxón	Órgano afectado	Daños
Tizón interno	<i>Alternaria spp.</i> , <i>Cladosporium spp.</i> , y <i>Pestalotia spp.</i>	Hongo	Hojas internas	Decoloración y defoliación de las hojas internas
Pudrición de la raíz	<i>Phytophthora spp.</i>	Hongo	Raíz	Pudriciones severas en las raíces
Podredumbre blanca	<i>Armillaria spp.</i>	Hongo	Haces vasculares	Muerte progresiva del árbol
Fumagina	<i>Capnodium spp.</i>	Hongo	Hojas	Clorosis
Pulgón del pinabete	<i>Mindarus guatemalensis</i>	Áfido	Hojas	Colonias que dan paso a fumagina
Pulgón de la raíz	<i>Prociphilus sp.</i>	Áfido	Raíz	Succión de la sabia desde la raíz

Modificado de: INAB (2018)

La mayoría de las plagas y enfermedades se presentan principalmente en plantaciones con fines comerciales (INAB 2018), y solo el pulgón del pinabete (*Mindarus guatemalensis*) representa un problema en los bosques naturales. Este áfido se encuentra presente en altas densidades, llegando a dañar hasta el 87% de plantaciones y 62% de rodales naturales (Andersen *et al.* 2008).

c. Regeneración lenta

La tasa de regeneración en poblaciones naturales es menor que la densidad de los bosques, es por ello que se considera una amenaza por su alto índice de depredación. Esta tendencia es mayor a latitudes bajas, principalmente por las condiciones climáticas menos favorables y una mayor influencia de actividades humanas, como agricultura y pastoreo intensivo (Kollmann *et al.* 2008). En plantaciones con fines de producción la tasa de germinación de las semillas frescas es entre el 12% a 15%, y de hasta un 2% en semillas no frescas (MacVean 2010). Otros estudios sugieren una germinación aún menor, de 0.8% al 3.8% (Andersen *et al.* 2008). Esto debido a que la regeneración está limitada por la semilla y el sitio específico donde se desarrolla, con necesidades diferentes en cada etapa (Kollmann *et al.* 2008).

d. Tráfico ilegal

El pinabete presenta una alta demanda como árbol de navidad, lo cual ha dado lugar al tráfico ilegal de los productos derivados de sus ramas. Las ramas son extraídas directamente de mayoristas primarios o secundarios, y transformadas en árboles

ensamblados o coronas. Se estima esto genera una ganancia promedio de USD 938.00, valor mayor a otras actividades agrícolas (Andersen *et al.* 2006, 2008). Esta actividad ha ido disminuyendo debido a la promoción de los árboles certificados de las plantaciones, y una mejora en la cadena de producción de estos para lograr suplir con toda la demanda del mercado (INAB 2019).

6. Cultivo de pinabete en Guatemala

Alrededor de 1960, el pinabete se convirtió en la especie más popular para ser utilizada como árbol de navidad (Andersen *et al.* 2006). Esto llevó a un aumento de la tala ilegal de la especie, extrayendo árboles adultos, ramas y plántulas en regeneración. El mercado para el pinabete continuó creciendo, siendo preferido por su color, forma y olor (Andersen *et al.* 2008). Como respuesta a esta demanda, se establecieron las primeras plantaciones de pinabete en 1970 como una estrategia de conservación *ex situ* que asegurara un uso sostenible del recurso y disminuyera la presión sobre los bosques naturales (INAB 2019). Este mecanismo de conservación a través de la domesticación ha demostrado ser una estrategia efectiva para la conservación del pinabete y satisfacer la demanda anual del recurso (Andersen *et al.* 2008).

El cultivo de pinabete en la actualidad va más allá de solamente plantaciones para árboles de navidad, también incluye diversos modelos forestales como plantaciones puras, plantaciones mixtas, sistemas agroforestales, zonas de restauración forestal y zonas de restauración de suelos. La diversificación de los modelos fue posible por los programas de incentivos forestales, logrando para el año 2018 una cantidad de 141.88 ha de pinabete bajo estos esquemas de conservación. Las plantaciones se encuentran principalmente en el occidente de Guatemala, siendo Huehuetenango, Chimaltenango, San Marcos y Quetzaltenango donde se encuentran los principales cultivos (INAB 2019).

En las plantaciones, los productores con más experiencia son capaces de identificar más de una variedad de pinabetes. Principalmente se suelen identificar de dos a tres especies, siendo estas el pinabete (*Abies guatemalensis*), el oyamel (*Abies religiosa*) y el pinabete del Tacaná (*A. g. var. tacanensis*). En algunas plantaciones se identifican otras variedades, las cuales no han sido caracterizadas fenotípicamente o genéticamente (entrevista personal). Sin embargo, no existe un estudio sistemático sobre dicha distinción, por lo que suele no ser incluida para el manejo de los cultivos, siendo todo clasificado y comercializado como pinabete (Andersen *et al.* 2008).

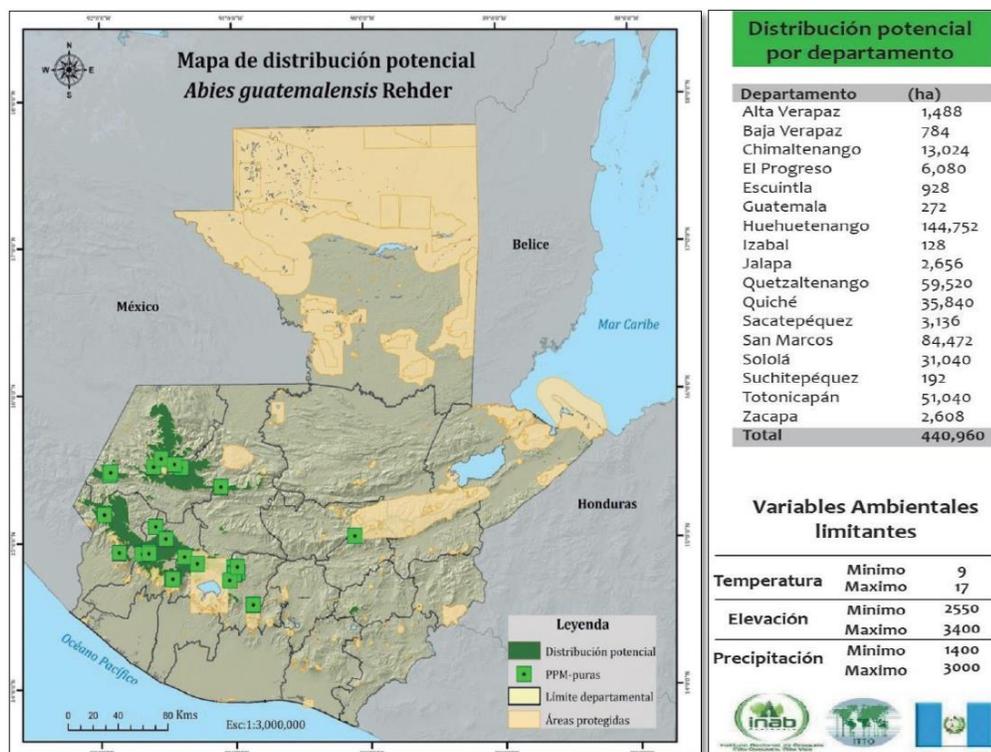


FIGURA 4. Ubicación de las plantaciones de pinabete con fines comerciales y potencial distribución de la especie.

Fuente: INAB (2019).

7. Estado de conservación

A nivel internacional existe el Convenio sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), del cual Guatemala forma parte desde 1980. El pinabete se encuentra protegido bajo la categoría I, la cual incluye las especies con el mayor grado de peligro. Bajo esta protección se prohíbe por completo su comercio internacional, y se autoriza solo la importación con fines no comerciales (CITES 2013). Bajo la Lista Roja de Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza -UICN- la especie se encuentra clasificada en peligro de extinción bajo los criterios A2 y B2, indicando un declive y fragmentación en las poblaciones (Gardner 2013).

A nivel nacional la primera protección se encuentra en el artículo 34 de la Ley forestal (Decreto 101-96), donde se prohíbe por completo el corte de las especies en peligro de extinción que se encuentren en listados nacionales e internacionales. Dicha ley también establece la base legal y requisitos para las plantaciones con fines productivos, y los programas de incentivos forestales para las mismas. Seguido está la Lista de Especies Amenazadas de Guatemala -LEA-, en la cual el pinabete se encuentra en categoría 1, prohibiendo su libre comercialización sin permiso (CONAP 2009). Por último, en 2014 se aprobó el Reglamento para el Manejo de Plantaciones y Áreas Productoras de Semilla de

Pinabete (Acuerdo Gubernativo No. 198-2014), el cual regula el uso comercial de *Abies guatemalensis* Rehder y *Abies religiosa* (Kunth) Schltd. & Cham.

El principal documento para la toma de decisiones a nivel nacional es la Estrategia Nacional para la Conservación del Pinabete, propuesta por primera vez en 1999. Esta estrategia busca ser un instrumento de política que controle la divulgación de información, regule el manejo *In situ* y *Ex situ*, disminuya el mercado ilícito, promueva áreas estratégicas de conservación y promueva la investigación de la especie (CONAP 2020). La estrategia ha sido actualizada en tres ocasiones, siendo la estrategia 2019-2028 la vigente.

B. Caracterización botánica

Las características morfológicas se han utilizado para la descripción de tejidos, células, órganos, formas y la relación entre ellos. Este uso de la morfometría tradicional permitió realizar aproximaciones sobre las relaciones entre los diferentes grupos y crear las relaciones taxonómicas básicas. Esta clasificación se hacía con base en similitudes y diferencias entre los grupos, analizadas de forma lineal lo que daba un análisis limitado de la información (Villalobos-Leiva y Benítez 2020).

Ahora se utilizan estudios multivariados que permiten comprender la forma y variaciones de forma entre especímenes de una sola población o entre especímenes de distintas poblaciones. Esto nos permite probar hipótesis sobre forma y función para comprender cambios del pasado al presente, así como evaluar las causas ambientales y/o geográficas (Laffont 2011). El enfoque más utilizado es el análisis de componentes principales (PCA), que permite identificar las características más distintivas dentro de un conjunto de datos. Esta técnica permite identificar morfoespecies a partir de características distinguibles y comparables entre taxones (Palacio *et al.* 2020, Xu y Bassel 2020).

1. Caracterizaciones morfológicas de *Abies guatemalensis* Rehder

En 2009 Strandby, Christensen y Sørensen realizaron una caracterización morfométrica del complejo de especies *Abies religiosa–hickelii–guatemalensis* provenientes de bosques naturales de Guatemala y México. Utilizando 30 caracteres morfométricos de la hoja y el cono determinaron que es posible distinguir tres grupos diferentes, explicados principalmente por las distancias geográficas entre ellos. Sin embargo, las distribuciones superpuestas y pocas diferencias morfométricas sugieren que no se tratan de especies separadas. Con esto, ellos proponen renombrar a las especies como *A. religiosa* subsp. *religiosa*, *A. religiosa* subsp. *hickelii* (= *A. hickelii* s.str.) y *A. religiosa* subsp. *mexicana* (= *A. guatemalensis*).

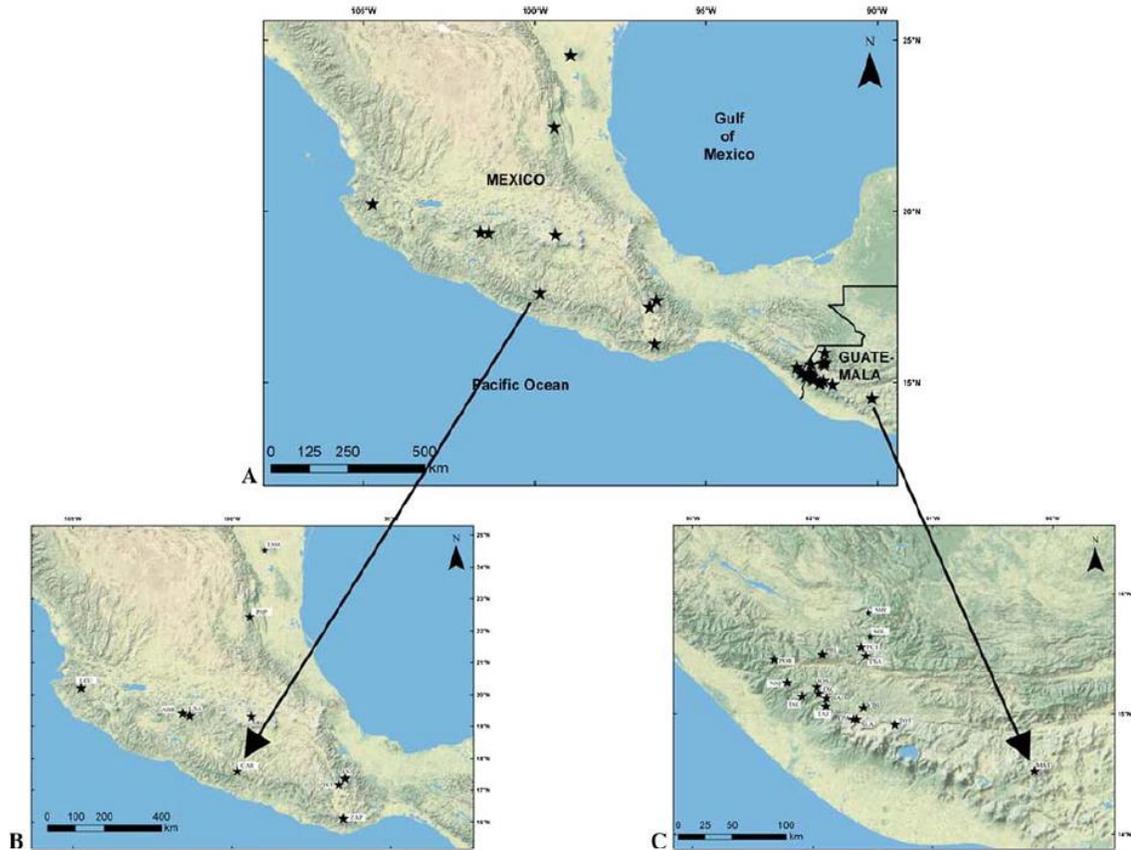


FIGURA 5. Distribución del complejo *Abies religiosa-hickelii-guatemalensis* caracterizado por Strandby *et al.* 2009. (A) Distribución de las poblaciones de *Abies* en México y Guatemala. (B) Poblaciones de México. (C) Poblaciones de Guatemala.

Fuente: Strandby *et al.* 2009

C. Caracterización genética

Las nuevas técnicas moleculares han permitido una mejor caracterización de los recursos genéticos vegetales, lo cual tiene un rol importante en la agricultura, seguridad alimentaria y manejo de bosques (Arif *et al.* 2010). La conservación de este germoplasma de interés requiere un conocimiento profundo y una caracterización la diversidad genética de las especies. Caracterizar la diversidad genética es prioritario ya que determina la identidad de los organismos de interés, resuelve relaciones genéticas entre genotipos y guarda la información de las características de interés para las personas (Mondini *et al.* 2009). La caracterización genética es ventajosa sobre las caracterizaciones morfométricas y bioquímicas al no verse afectada por la influencia ambiental, esta logra identificar características altamente conservadas que son robustas y altamente confiables (Mondini *et al.* 2009, Arif *et al.* 2010).

Uno de los marcadores más utilizados son los microsatélites (*Single Sequence Repeats – SSRs*). Estos son repeticiones cortas de 2 a 9 pares de bases presentes en el

genoma. Estos marcadores son muy utilizados debido a que presentan herencia codominante, alta abundancia en el genoma, extensión de la diversidad alélica, facilidad para ser evaluados en PCR y alta reproducibilidad. Esto permite reconstruir árboles filogenéticos de poblaciones o especies fuertemente relacionadas. Los árboles se construyen a partir de las medidas de la distancia genética basado en datos de frecuencia de alelos, usando diferentes medidas para este propósito (Arif *et al.* 2010).

1. Caracterizaciones genéticas de *Abies guatemalensis* Rehder

El primer estudio con marcadores moleculares para la especie lo realizó Aguirre-Planter y colaboradores (2000), usando isoenzimas para estudiar la diversidad genética entre poblaciones de México y Guatemala. Las poblaciones entre ambos países presentaron bajos niveles de diversidad genética y una alta diferenciación interpoblacional. Años más tarde Rasmussen *et al.* (2010) realizaron un estudio similar utilizando microsatélites. Los autores reportan una sola metapoblación, con dos poblaciones periféricas sin flujo genético. Esto demostró una alta diversidad genética dentro de las poblaciones, pero una baja diferenciación entre poblaciones. En este estudio los autores proponen comenzar a utilizar el taxón *A. religiosa* subsp. *mexicana*, debido a la poca diferenciación entre las poblaciones.

III. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años se ha intensificado la pérdida de bosques por causas antropogénicas, aumentando la preocupación por los recursos forestales y los servicios ecosistémicos que ofrecen (FAO 2020). Esto ha impulsado esfuerzos por comprender la diversidad de las especies y sus procesos ecológicos y evolutivos, en particular de las asociadas a la extinción, y así proponer planes de manejo más integrales (Otto 2018, Ellis 2019). Con esta información se busca plantear estrategias inclusivas e interdisciplinarias que aseguren satisfacer las necesidades de las comunidades e impulsar el desarrollo social, al mismo tiempo que se preservan los remanentes de bosque y restaurar las zonas degradadas (Nelson y Chomitz 2011, Johnson *et al.* 2017).

Un ejemplo de esta situación en Guatemala es el pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder). Esta conífera es endémica de los bosques de las tierras altas desde México, pasando por Guatemala y El Salvador, hasta Honduras (Farjon 2017). Este abeto presenta un valor ecológico (Corrales *et al.* 2015), social (Andersen *et al.* 2006) y comercial (Ignosh y Kilgore 2005) importante, siendo una especie clave para el occidente del país (INAB 2019). Esta demanda llevó a la sobreexplotación de los bosques naturales, perdiendo más del 95% de la cobertura natural y dejando poblaciones fragmentadas y aisladas entre sí (Gardner 2013). Actualmente la presión antropogénica sobre el pinabete persiste, perdiendo cobertura forestal por la urbanización y expansión de la frontera agrícola (Andersen *et al.* 2008, Gardner 2013). Agregado, las demandas climáticas propias de la especie provocan una regeneración lenta, haciéndola vulnerable a extinción por cambio climático (Anderson *et al.* 2018). Todo esto impulsó su clasificación como especie en peligro por la Lista Roja de la UICN (Gardner 2013), bajo categoría I de la lista CITES (CITES 2013) y categoría 1 bajo la lista LEA de CONAP (CONAP 2009).

Por esto se han propuesto programas que aseguren el aprovechamiento sostenible por parte de las personas y la conservación de la especie. Una de las primeras y principales estrategias es la conservación *ex situ* por medio de plantaciones voluntarias y áreas productoras de semilla para el cultivo de pinabete que aseguren satisfacer la demanda durante la época navideña. Con esto se busca disminuir la presión que existe sobre los bosques naturales y satisfacer una demanda del mercado (CONAP 2020). Desde su implementación la estrategia no solo ha permitido recuperar cobertura forestal de la especie (CONAP 2019), sino ha representado una diversificación de las actividades de los productores y un aumento significativo en ingresos económicos y calidad de vida (Ignosh y Kilgore 2005).

En las plantaciones los productores suelen distinguir más de una variedad de árbol, principalmente suelen incluir dos especies, el pinabete (*Abies guatemalensis*) y el oyamel (*Abies religiosa*). Sin embargo, dicha distinción y aceptación de las variedades fenotípicas observables no es incluida para el manejo de los cultivos, siendo todo clasificado y comercializado como pinabete (Andersen *et al.* 2008). La historia taxonómica del pinabete es compleja, siendo reclasificadas en diversas oportunidades y describiendo más de unas subespecies para cada una

de las poblaciones (Andersen *et al.* 2006). Actualmente se reconocen dos variedades distensibles (Farjon 2017). Sin embargo, algunos estudios morfométricos y genéticos sugieren que *A. guatemalensis* debería referirse la subespecie *A. religiosa subs. mexicana*, y no como una especie diferente (Strandby *et al.* 2009, Rasmussen *et al.* 2010).

El comprender la diversidad del complejo de *A. guatemalensis* en las plantaciones permiten mejorar los programas de conservación al incluir información para mantener la diversidad genética, asegurar procesos evolutivos, comprender las necesidades ecológicas y climáticas, identificar riesgos de hibridación, planificar reservas a nivel de ecosistema y proponer mecanismos legales de protección (Ellis 2019). Por esto se realizó la caracterización genética y botánica de *A. guatemalensis* provenientes de plantaciones del occidente de Guatemala, como un esfuerzo para generar información confiable y precisa al respecto el material que se conserva fuera de los bosques naturales. Esto a través de comparaciones morfométricas que aportan información sobre las adaptaciones específicas al medio de cada especie (Xu y Bassel 2020); y genéticas utilizando microsátélites, que proporcionan información sobre los procesos que moldean la diversidad genética de las poblaciones (Arif *et al.* 2010). En conjunto, ambas técnicas se complementan para comprender los esquemas de plantaciones de pinabete y la diversidad genética que se conserva en los mismos. Esto permitirá la mejora de los programas actuales de conservación y planteamiento de nuevas estrategias.

IV. OBJETIVOS

A. General

Caracterizar la diversidad genética y morfológica de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) en dos plantaciones del occidente de Guatemala

B. Específicos

1. Caracterizar los grupos morfométricos de las poblaciones seleccionadas de *A. guatemalensis*.
2. Determinar la diferenciación genética entre las poblaciones seleccionadas de *A. guatemalensis* mediante marcadores microsatélites (SSRs).
3. Comprender los posibles procesos y factores ambientales que expliquen las diferencias fenotípicas y genotípicas entre los pinabetes presentes en plantaciones seleccionadas.

V. METODOLOGÍA

A. Sitios de estudio

El estudio incluyó material vegetal proveniente de dos plantaciones con fines comerciales del occidente de Guatemala.

1. Finca El Edén, Palestina de los Altos, Quetzaltenango

La finca se encuentra localizada en la Aldea El Edén, Palestina de Los Altos, Quetzaltenango ($14^{\circ}57'7.28''N$, $91^{\circ}39'32.02''O$), a una elevación promedio de 2933msnm. La finca se encuentra bajo la administración de Carlos Rudy Escobar Calderón, quien comenzó las actividades de producción en 1989, siendo una de las primeras plantaciones de pinabete podado para árboles de navidad (Benavente 2017). Actualmente cuenta con más de 80 cuerdas de bosque, produciendo alrededor de 500 árboles anuales (Longo y Raquec 2017). La finca cuenta con dos áreas de plantación, el área “A”, con 33 años de producción; y el área “B”, con 15 años de producción. Cada área cuenta con un sistema de plantado y cobertura de dosel diferente.



FIGURA 6. Finca El Edén, Palestina de los Altos, Quetzaltenango. A) Área “A” de plantaciones. B) Área “B” de plantaciones.

Fuente: Archivo personal.

2. Finca Caleras Chichavac, Tecpán, Chimaltenango

Es una finca privada ubicada en el kilómetro 93.5 de la carretera Interamericana, Tecpán, Chimaltenango ($14^{\circ}48'7.10''N$, $90^{\circ}58'59.90''O$), a una elevación de 2561msnm. Los comienzos de la finca datan de 1896 y la casa patronal de 1915. Actualmente, bajo la administración de Salvador Pira, las principales actividades de la finca son la silvicultura, incluyendo las plantaciones de pinabete, roble, pino, cipreses, aguacate, entre otros; y el

ecoturismo. La finca alberga una alta biodiversidad de pinos, abetos y aves, tanto residentes como migratorias (González 2014). Para la producción de pinabete, la finca cuenta con árboles semilleros maduros, mayores a 50 años, que utilizan como fuente de semillas para su propio vivero, obteniendo todo el material únicamente de la finca.

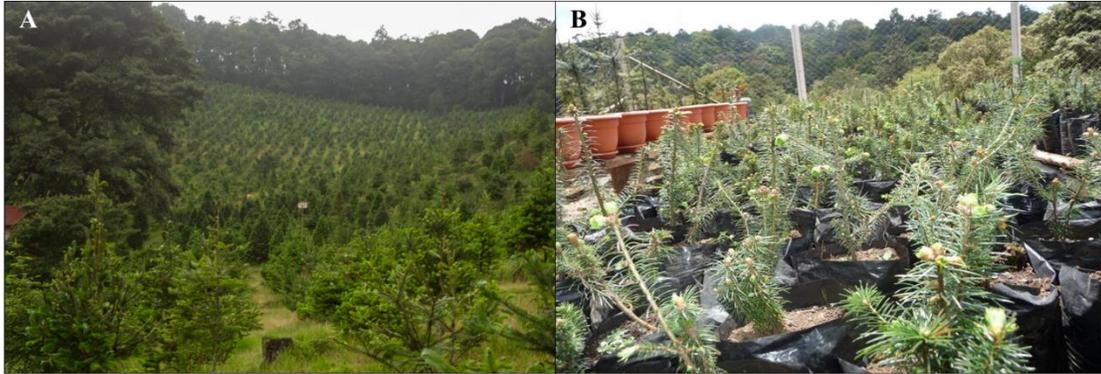


FIGURA 7. Finca Caleras Chichavac, Tecpán, Chimaltenango. B. Área de producción de pinabetes. B) Vivero forestal de la finca.

Fuente: Archivo personal

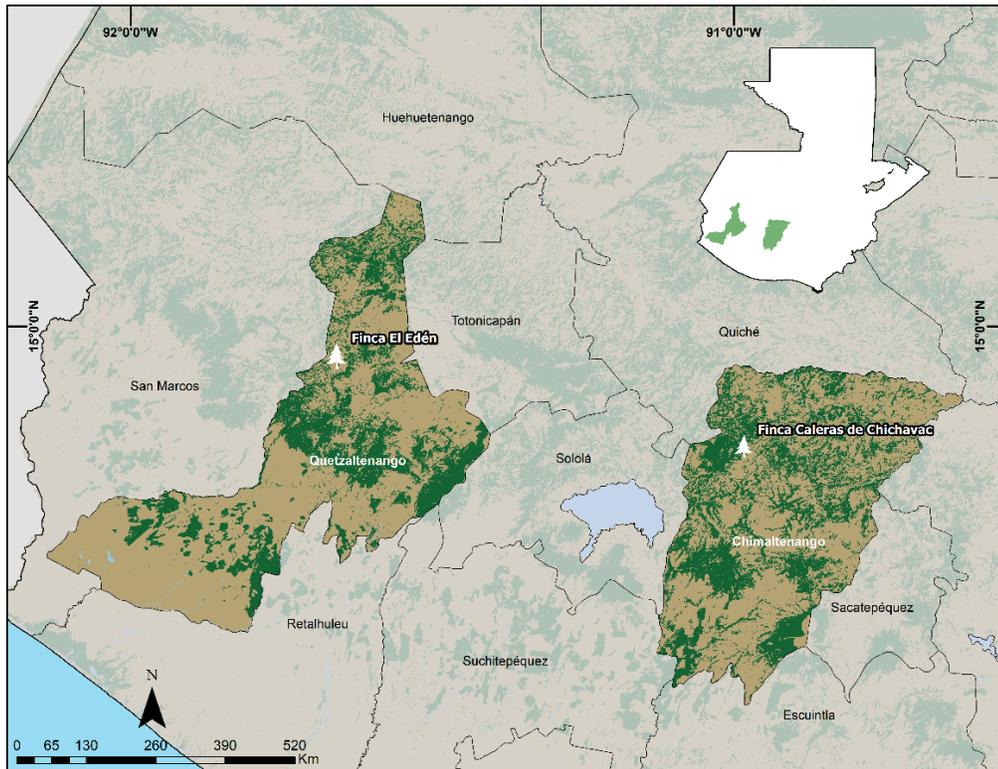


FIGURA 8. Ubicación de los sitios de estudio.

B. Caracterización fenotípica botánica

1. Colecta de muestra

Se colectó material fresco de los individuos identificados como el morfotipo *A. guatemalensis*, morfotipo *A. religiosa* y aquellos individuos que presenten características intermedias o de posibles híbridos. La selección en campo se realizó con base en los descriptores botánicos de la especie y la identificación de los propietarios de ambas fincas. Los nombres y morfotipos se basaron en el sistema actual de los propios productores para clasificar e identificar las variedades, y no con la intención de sugerir que se trata de dos especies diferentes. La intención era tomar 10 muestras de cada variedad en ambas fincas. Sin embargo, este número tuvo que ser reducido debido a una baja frecuencia de algunos morfotipos (Cuadro 2). En total se colectaron 59 árboles entre ambas fincas.

Para cada árbol se colectó 3 ramas que presentaran un crecimiento maduro, las cuales fueron herborizadas y almacenadas en el Herbario UVAL de la Universidad del Valle de Guatemala hasta su análisis. Cada árbol fue marcado y georreferenciado para la posterior colecta de material genético. Tanto a la selección de los árboles como la selección de las ramas se realizó de manera aleatoria a lo largo de las fincas.

CUADRO 2. Sitios de estudio y colecta para la caracterización genética y botánica

Locación	Elevación	Latitud y longitud	Morfotipo	No. individuos colectados
Edén de los Altos	2933msnm	14°57'7.28"N, 91°39'32.02"O	<i>guatemalensis</i>	10
			<i>religiosa</i>	6
			híbridos	6
Calderas de Chichavac	2561msnm	14°48'7.10"N, 90°58'59.90"O	<i>guatemalensis</i>	10
			<i>religiosa</i>	8
			híbridos	8
			semilleros	3

2. Medición de los descriptores foliares

La caracterización botánica se realizó siguiendo la metodología de Strandby, Christensen y Sørensen (2009), junto con otras características adicionales propuestas en este estudio (Fig. 8), para un total de 14 caracteres utilizados. Para cada rama se midieron las características de color (CO) y densidad de las hojas (DEN). Para el color de las hojas se generó una escala de color a partir de fotografías del material colectado, utilizando la herramienta Cuentagotas del programa para edición digital Adobe Photoshop CC 2018 (Fig. 9-D). La densidad se terminó como el número de hojas presentes en 10cm de la rama (Fig. 9-C).

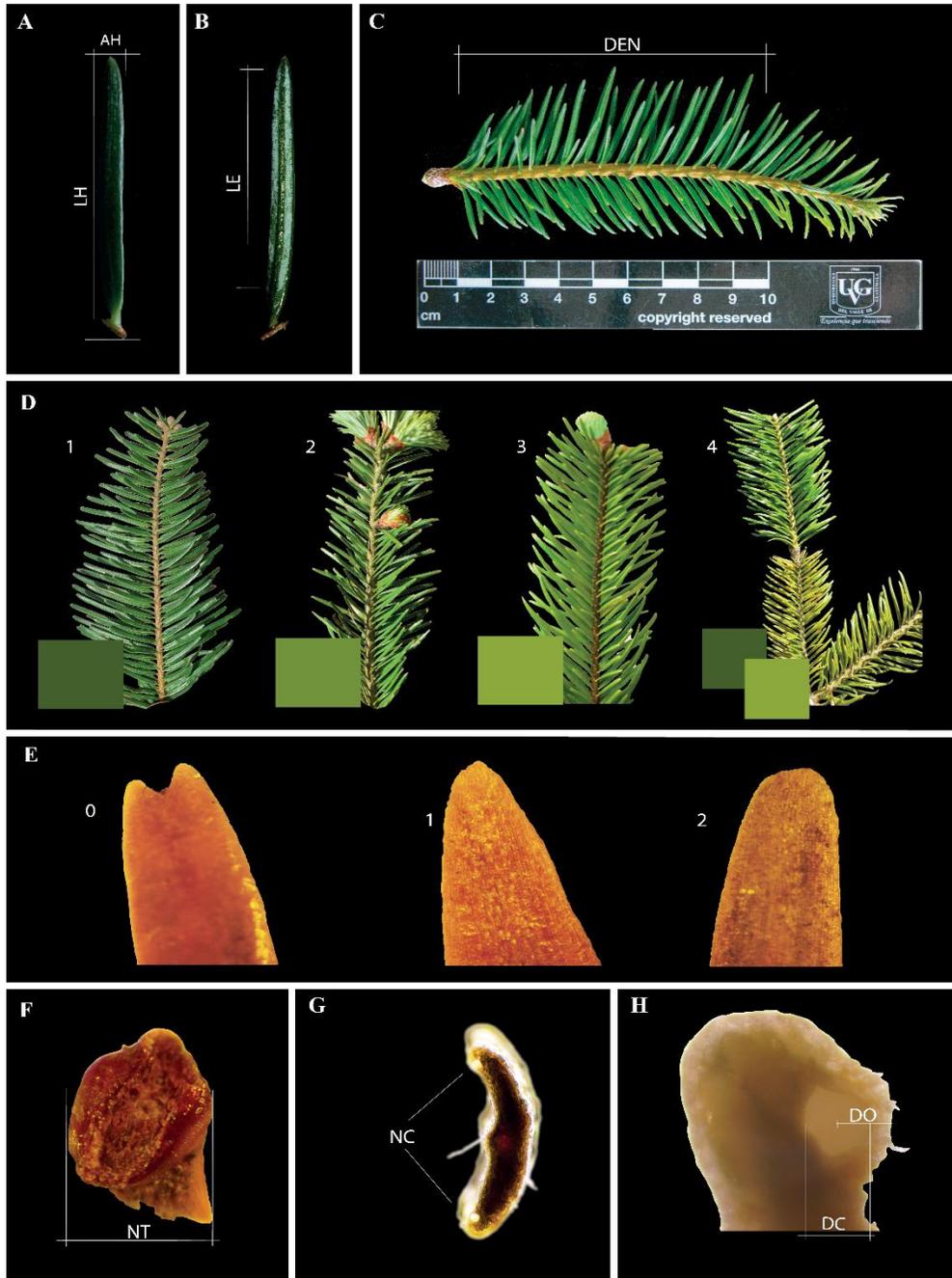


FIGURA 9. Características morfológicas y morfométricas utilizadas para la caracterización botánica de pinabete. Largo de hojas (LH), ancho de la hoja (AH), densidad de las hojas (DEN), forma del ápice (emarginado: 0; agudo: 1; obtuso:2), color de las hojas, largo del haz cubierto por estomas (LE), tamaño del notch (NT), número de conductos de resina (NC), diámetro del conducto (DC), diámetro del conducto de resina a la orilla (DO).

Para las hojas, se seleccionaron 10 hojas aleatoriamente de cada rama y se realizaron las mediciones utilizando un vernier electrónico. Se midieron las características de longitud de las

hojas (LH), ancho de la hoja (AH), espesor de la hoja (EH), espesor de la hoja/ancho de la hoja (EH/ AH), forma del ápice (emarginado: 0; agudo: 1; obtuso:2), largo del haz cubierto por estomas (LE), largo del haz cubierto por estomas / largo de la hoja (LE/LH), tamaño del *notch* (NT) y tamaño del *notch* / espesor de la hoja (NT/GH); (Fig. 9, A-B, E-F).

Para el análisis de los conductos de resina se tomaron aleatoriamente 3 hojas de las analizadas previamente y se realizaron cortes transversales utilizando una hoja de afeitar. Las muestras fueron colocadas en un porta-objetivos sin teñirlas y observadas utilizando una cámara AmScope MU1000 en un microscopio Olympus CX43. Se midieron las características de número de conductos de resina (NC), diámetro del conducto de resina (DC) y distancia del centro del conducto de resina a la orilla de la hoja (DO); (Fig. 9, G-H). Las mediciones se realizaron para cada uno de los conductos de resina presentes en las hojas.

Debido a la falta de conos en las plantaciones, este órgano no fue utilizado para el estudio.

3. Análisis de datos fenotípicos

La comparación de los grupos morfométricos se evaluó por medio de métodos de agrupamiento y métodos de ordenación (Palacio *et al.* 2020). Para comprobar la clasificación *a priori* de los tres morfotipos (*guatemalensis*, *religiosa* y posibles híbridos), se utilizó una agrupación jerárquica con método de Ward y distancia euclidiana con los datos estandarizados, para encontrar grupos algorítmicamente. Estos grupos fueron comprobados posteriormente en un análisis de componentes principales (PCA), con las variables estandarizadas.

A partir del resultado de los análisis de agrupamiento y ordenación, se realizó una prueba t para evaluar si existía diferencia significativa entre el valor de las mediciones para cada carácter morfológico dentro de los grupos encontrados. Previo a realizar la prueba se evaluó la existencia de valores atípicos extremos, el supuesto de homogeneidad por medio de la prueba de Levene y el supuesto de normalidad por medio de una prueba de Shapiro Shapiro–Wilk. Para aquellos datos que no cumplieran con alguno de los supuestos, se utilizó el método de Welch para la evaluación.

Todos los análisis se realizaron en el software R versión 4.0.0 (R Core Team 2020) utilizando las librerías *dendextend* (Galili 2015), *vegan* (Oksanen *et al.* 2017) y *rstatix* (Kassambara 2021).

C. Caracterización genética

1. Colecta de muestra

Para disminuir la cantidad de resina almacenada en las hojas, se colectó únicamente brotes nuevos de los árboles. La colecta se realizó entre los meses de abril y mayo del 2022. Los brotes se almacenaron en bolsas plásticas con gel de sílice y fueron transportados en frío al Laboratorio de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala. Las extracciones de Chichavac se realizaron el mismo día que la muestra fue colectada. Las extracciones de El Edén se realizaron 16 horas posterior a su colecta.

2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo CTAB-Cloroformo de Doyle y Doyle (1990) modificado por Ramírez (2016) con modificaciones para su optimización en hojas.

Se tomó material fresco de los brotes y se maceró en mortero utilizando nitrógeno líquido. El material pulverizado fue agregado a un tubo de 1.5mL junto con 600µL de buffer CTAB 2% precalentado a 65°C y 5µL de proteinasa-K. Posterior a pasar por vórtex 10 segundos, las muestras fueron incubadas a 60°C por 1 hora con agitación constante. Luego se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agregó 500µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se mezclaron las muestras en vórtex por 30 segundos y posterior a ello, se centrifugaron a 15,000rpm durante 10 minutos. Se transfirió aproximadamente 500µL del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5mL, donde se agregó 500µL de etanol absoluto frío y 50µL de acetato de amonio 7.5M. Se mezcló por inversión y se dejó durante mínimo 24 horas a -20°C. Pasado el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 15,000rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante por inversión del tubo y se dejó secando las muestras a temperatura ambiente. Posterior, se agregó 150µL de etanol frío al 70%. Las muestras fueron centrifugadas a 15,000rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante por inversión del tubo y se dejaron las muestras secando en horno a 60°C con agitación constante. El pellet fue resuspendido en 100µL de buffer TE precalentado a 50°C. Posterior, se agregó 150µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y 150µL de fenol. Se mezcló con vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 15,000rpm durante 10 minutos. Se transfirió aproximadamente 400µL del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5mL y se agregó 150µL de etanol absoluto frío y 15µL de acetato de amonio. Las muestras fueron incubadas nuevamente a -20°C durante al menos 24h. Pasado el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 15,000rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 50µL de etanol frío al 70%. Se centrifugó nuevamente a 15,000rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante por inversión del tubo y se dejaron las muestras secando en horno a 60°C con agitación constante. Para finalizar, se resuspendió el pellet en 50µL de buffer TE.

La concentración y pureza del ADN extraído se cuantificó utilizando un NanoDropt, evaluando la absorbancia a 260, 280 y 320 nm, seleccionando las muestras que presentaran un $A_{260}/230 \geq 1.6$ y $A_{260}/230 \geq 1.8$ (Matlock 2015).

3. Análisis con marcadores moleculares

Se utilizaron 4 marcadores microsatélite de *A. guatemalensis* desarrollados por Rasmussen y colaboradores (2008) (Cuadro 3), amplificados por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se seleccionaron los microsatélites que en la literatura reportaron el mayor número de alelos. Los PCR se llevaron a cabo con un volumen final de 10 μ L que consta de 5 μ L GoTaq[®], 2.0 μ L H₂O_{up}, 0.5 μ L primer reverse, 0.5 μ L primer forward y 2.0 μ L de ADN. Las condiciones de amplificación fueron un paso inicial de 95°C por 15min, seguido por 35 ciclos de 94°C 30s, 56°C 90s y 72°C 60s, para un paso final de 60°C, 30s.

CUADRO 3. Características de los microsatélites desarrollados por Rasmussen *et al.* (2008) utilizados en este estudio.

No.	Secuencia (5'-3')	Motivo repetitivo	Tamaño	No. Alelos	Acceso GenBank
Ab07	ACTGGCATTGTCGCATTC CCTCGGAGGACAAGATTTGC	(GT)13	219-257	24	AM980988
Ab08	ATCGAGAGGCCAGGTAGAC GACATAGCTGATAGTGACGCAAC	(GT)20	128-161	16	AM980989
Ab09	AGCTTATTTGCACGCTGAAG TTTTCTTTATGAGAAACCAAGTTCC	(CA)19(TA)3	129-174	15	AM980990
Ab15	AACTAACTCCTATGTGTCAAATATCC GCATGGAGGATAAGTAAAGATGG	(GT)15	239-254	12	AM980992

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10% de 10 x 10 cm, corrido a 160V por dos horas. Los fragmentos de ADN se visualizaron por tinción con nitrato de plata y tamaño fue determinado por análisis de los geles digitalizados utilizando el programa GelAnalyzer 19.1, utilizando la opción de calibración de tamaño de bandas.

4. Análisis de datos

Se registró la presencia/ausencia de las bandas de un tamaño determinado en cada una de las muestras. Para disminuir la probabilidad de error en el cálculo de los parámetros poblaciones y posteriores análisis, se utilizaron únicamente las bandas mayores a 100pb (Wang *et al.* 2021).

Las estimadores poblaciones se calcularon utilizando el programa GenoDive versión 3.06 (Meirmans 2020). Se calcularon los coeficientes específicos de diversidad genética, incluyendo el número observado de alelos (A), número efectivo de alelos (Ae), heterocigosis

observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e), coeficiente de endogamia de Nie (Gis) y el coeficiente de fijación (Fst) entre los tres morfotipos. Otros coeficientes no fueron calculados debido a la presencia de alelos neutros o ausencia de bandas en las muestras.

Posteriormente, para el análisis de la estructura poblacional se realizó un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) utilizando el paquete de R Adegenet 2.1.10 (Jombart y Ahmed 2011), usando el método de k-medias con datos transformados para PCA y el criterio de información bayesiano (BIC) para tener el mejor número de componentes principales PCs (Jombart y Collins 2015).

VI. RESULTADOS

A. Caracterización botánica

Con base en los análisis de agrupamiento y de ordenación, las características morfológicas y morfométricas de los árboles de las plantaciones de pinabete distinguen dos grupos diferentes. El primer grupo incluye a los morfotipos identificados principalmente como *guatemalensis* y el segundo aquellos identificados como *religiosa* e intermedios/híbridos (Fig. 10). A pesar de esto, sí existen individuos que fueron clasificados a priori como un morfotipo, pero que los análisis los clasifican dentro de un grupo diferente (ej. *religiosa* CR5 clasificado junto con *guatemalensis*).

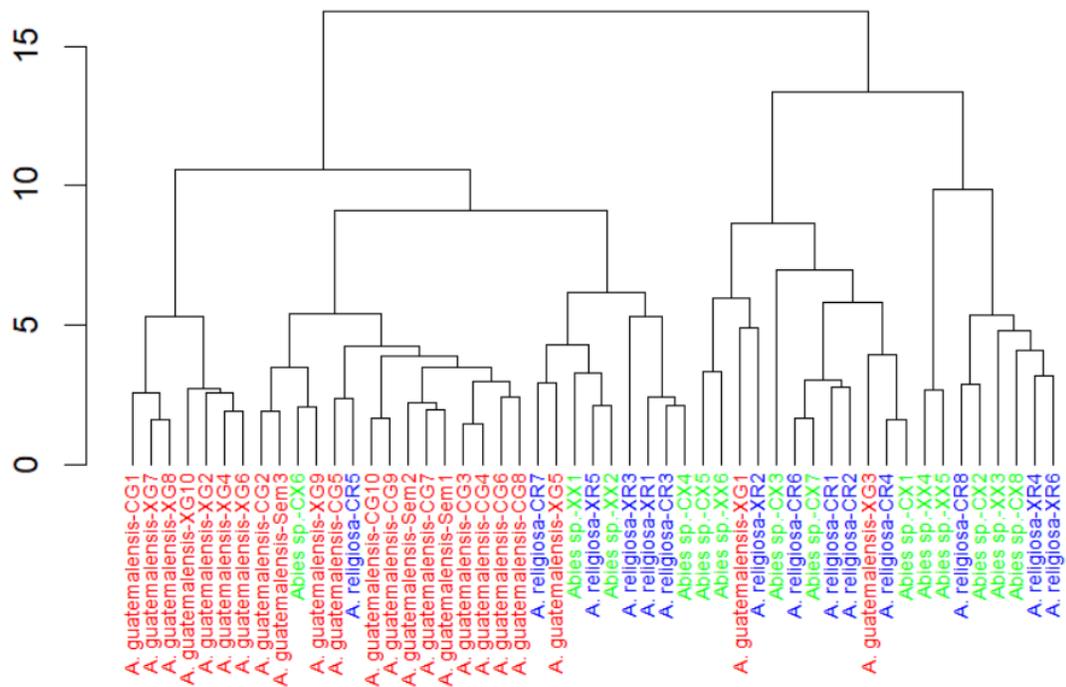


FIGURA 10. Agrupación jerárquica con método de Ward y distancia euclidiana para las variables estandarizadas.

Los resultados del PCA son congruentes y refuerzan los resultados del método de agrupamiento, mostrando la formación de dos grupos, uno que agrupa principalmente al morfotipo *guatemalensis* y un grupo con los morfotipos *religiosa* e híbridos (Fig. 11). Estos grupos son discretos, y no presentan superposición entre ellos o la presencia de individuos que fueran intermedios claros entre ambos.

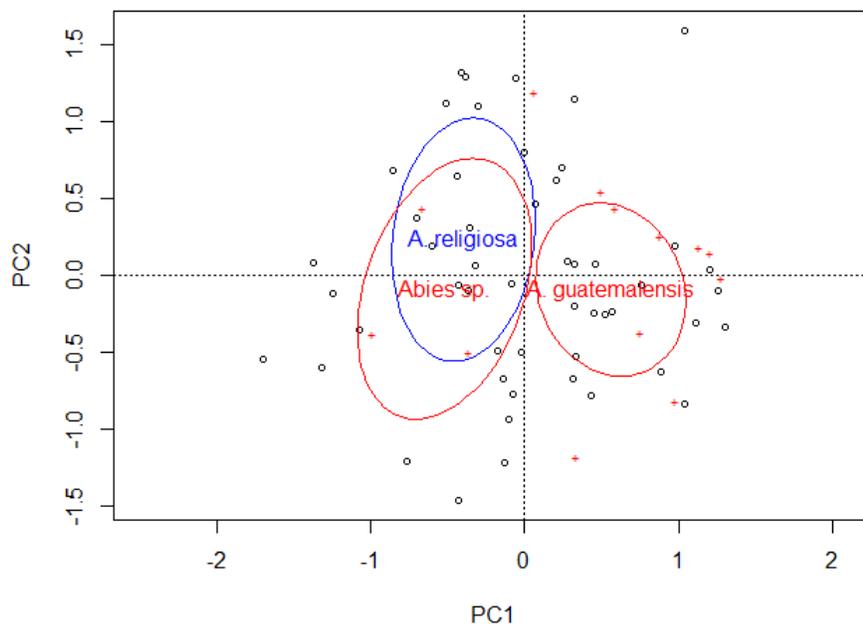


FIGURA 11. Análisis de Componentes Principales (PCA) para los descriptores morfológicos y morfométricos.

De los descriptores morfológicos evaluados, 7 mostraron una diferencia significativa entre ambos grupos (Fig. 12, Anexo 4). Las variables que presentaron diferencia entre los dos grupos fueron densidad de las hojas (DEN), longitud de la hoja (LH), ancho de la hoja (AH), espesor de la hoja (EH), largo del haz cubierto por estomas (LE), largo del haz cubierto por estomas/largo de la hoja (LE/LH) y tamaño del *notch* (NT). Por otro lado, las variables que no presentaron una diferencia significativa entre ambos grupos fueron el espesor de la hoja/ancho de la hoja (EH/AH), tamaño del *notch*/espesor de la hoja (NT/GH), número de conductos de resina (NC), diámetro del conducto de resina (DC) y distancia del centro del conducto de resina a la orilla de la hoja (DO). Debido a que no hubo variación en la forma del ápice, esta característica no fue utilizada para los análisis finales.

Dentro de los individuos estudiados es importante resaltar la presencia de organismos que presentaban características muy diferentes a las descritas en la literatura para la especie y sus variedades. Dentro de las características únicas que presentaron estaban el tamaño y densidad de las hojas (Fig 13-B) o el número y posición de los canales de resina que presentaban (Fig. 13-A).

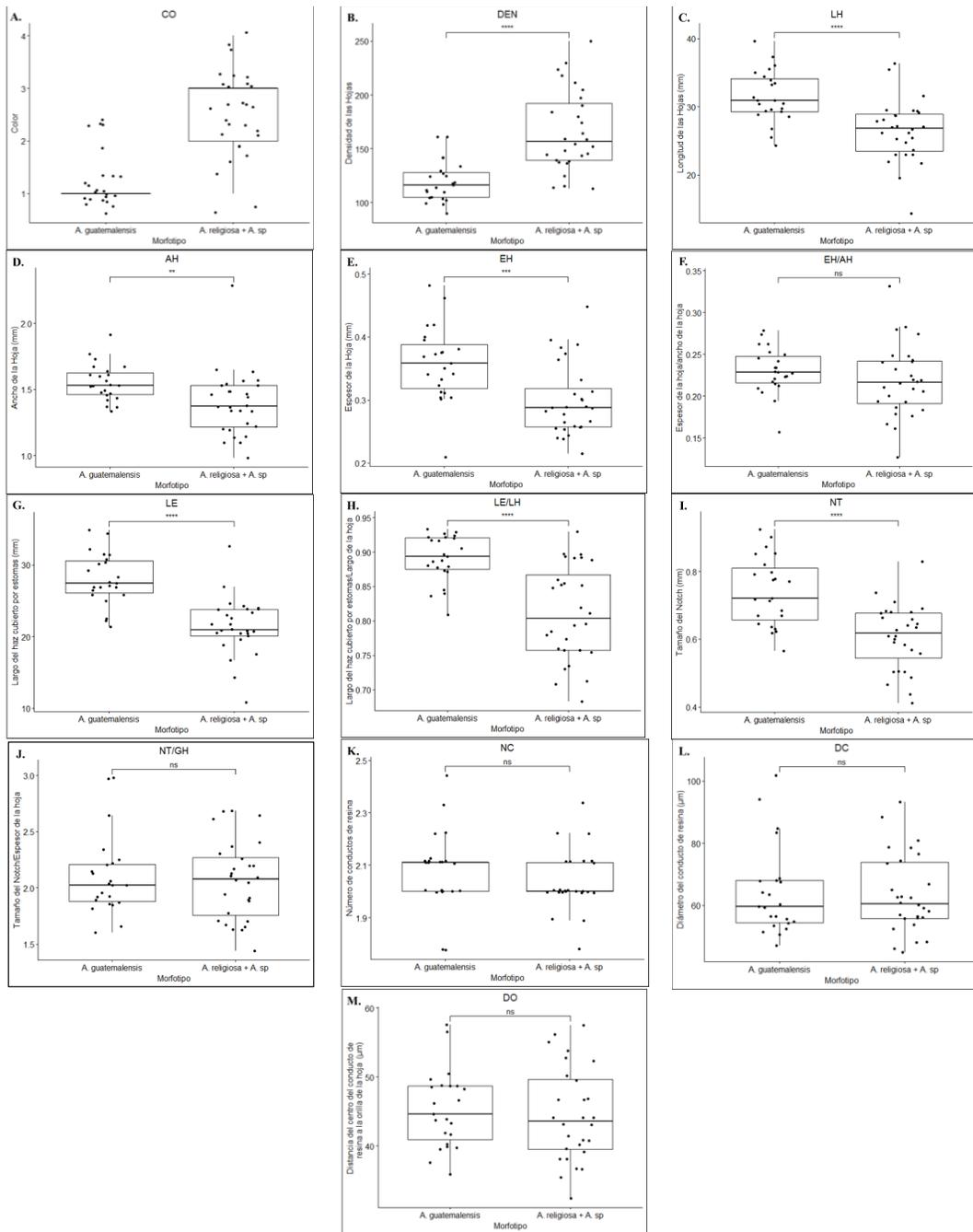


FIGURA 12. Resultados de la prueba t para la diferencia significativa entre el valor de las mediciones para cada carácter morfológico. A) Color (COR), B) Densidad de las hojas (DEN), C) Longitud de las hojas (LH), D) Ancho de las hojas (AH), E) Espesor de la Hoja (EH), F) Espesor de la Hoja/Ancho de la Hoja (EH/AH), G) Largo del haz cubierto por estomas (LE), H) Largo del haz cubierto por estomas/Largo de la Hoja (LE/LH), I) Tamaño del notch (NT), J) Tamaño del notch/Espesor de la Hoja (NT/EH), K) Número de conductos de resina (NC), L) Diámetro del conducto de resina (DC) y M) Distancia del centro del conducto de resina a la orilla de la Hoja (DO). Los asteriscos representan el grado de significancia de la prueba. (ns) p no significativo, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001 y (****) p < 0.0001

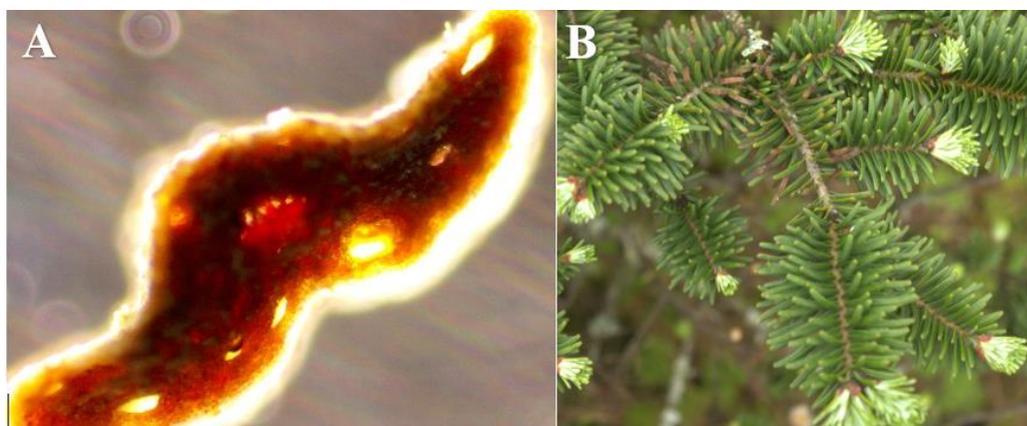


FIGURA 13. Representación de individuos que presentaron características no reportadas en la literatura para *A. guatemalensis* y sus variedades. A. Número y posición de los canales de resina. B. Tamaño y densidad de las hojas.

B. Caracterización genética

Los coeficientes de diversidad genética de los 4 microsatélites se muestran en el Cuadro 4. En total se detectaron 36 alelos en los 50 individuos de los tres morfotipos, con un promedio de 9 alelos por loci. El número efectivo de alelos por locus (A_e) fue de 4.168 a 5.556. El coeficiente de endogamia de Nie por locus (G_{is}) se encuentra entre -0.037 y 0.204. Debido a la alta frecuencia de alelos nulos y datos faltantes (rango de 0.67 a 0.57), no fue posible calcular el grado de polimorfismo (PIC).

CUADRO 4. Diversidad genética de 4 loci de microsatélites en tres morfotipos de *Abies guatemalensis*.

Locus	A	A_e	H_o	H_s	H_t	$H't$	G_{is}
Ab7	7.0	5.556	0.858	0.833	0.840	0.844	-0.030
Ab8	9.0	4.168	0.717	0.775	0.815	0.835	0.074
Ab9	10.0	5.318	0.855	0.825	0.840	0.847	-0.037
Ab15	10.0	4.799	0.646	0.812	0.883	0.918	0.204

A número de alelos, A_e número efectivo de alelos, H_o heterocigosidad observada, H_s heterocigosidad entre poblaciones, H_t heterocigosidad total, $H't$ heterocigosidad total corregida, G_{is} coeficiente de endogamia de Nie.

Los parámetros de la diversidad genética de los tres morfotipos de *A. guatemalensis* basado en 4 marcadores microsatélites se muestra en el Cuadro 5. El promedio de número de alelos (A) y número efectivo de alelos (A_e) fue de 7.666 y 5.160 respectivamente. La heterocigosidad observada (H_o) varió de 0.737 a 0.823, mientras la heterocigosidad entre poblaciones (H_s) de 0.796 a 0.827. El coeficiente de endogamia de Nie (G_{is}) dentro de los individuos, en relación con el resto de morfotipos, fue entre 0.005 a 0.092.

CUADRO 5. Estadísticos de diversidad genética de tres morfotipos de *Abies guatemalensis* basado en 4 microsatélites.

Morfotipo	A	Ae	Ho	Hs	Gis
<i>guatemalensis</i>	7.750	5.602	0.823	0.827	0.005
<i>religiosa</i>	7.750	4.915	0.737	0.812	0.092
híbridos	7.500	4.964	0.748	0.796	0.060

A número de alelos, *Ae* número efectivo de alelos, *Ho* heterocigosidad observada, *Hs* heterocigosidad entre poblaciones, *Gis* coeficiente de endogamia de Nei.

Los coeficientes de fijación par a par entre los morfotipos (F_{st}) se muestran en el Cuadro 6. La diferenciación entre poblaciones fue baja oscilando entre 0.101 y 0.172, alcanzando niveles significativos ($P < 0.01$). El valor más alto de F_{st} se observó entre los morfotipos religiosa e híbridos, mientras el valor más bajo se encontró entre los morfotipos religiosa y guatemalensis.

CUADRO 6. Coeficiente de fijación par a par (F_{st}) entre tres morfotipos de *Abies guatemalensis* basado en 4 microsatélites.

Morfotipo	<i>guatemalensis</i>	<i>religiosa</i>	híbridos
<i>guatemalensis</i>		0.101*	0.104*
<i>religiosa</i>			0.172*
híbridos			

*Significante en $p < 0.01$

El análisis discriminante de componentes principales (DAPC) sugieren la formación de tres grupos (Fig. 14, Anexo 8). El grupo I incluye principalmente los morfotipos *guatemalensis* y *religiosa* de la finca Edén de los altos, así como la mayoría de los morfotipos híbridos de ambas fincas. El grupo II incluye individuos *guatemalensis*, *religiosa* e híbridos provenientes todos de Chichavac. Este grupo también incluye los tres árboles semilleros colectados. Por último, el grupo III incluye la mayoría de los organismos *guatemalensis* y *religiosa* provenientes de Chichavac. Estos resultados sugieren que la formación de grupos puede estar influenciada por factores geográficos.

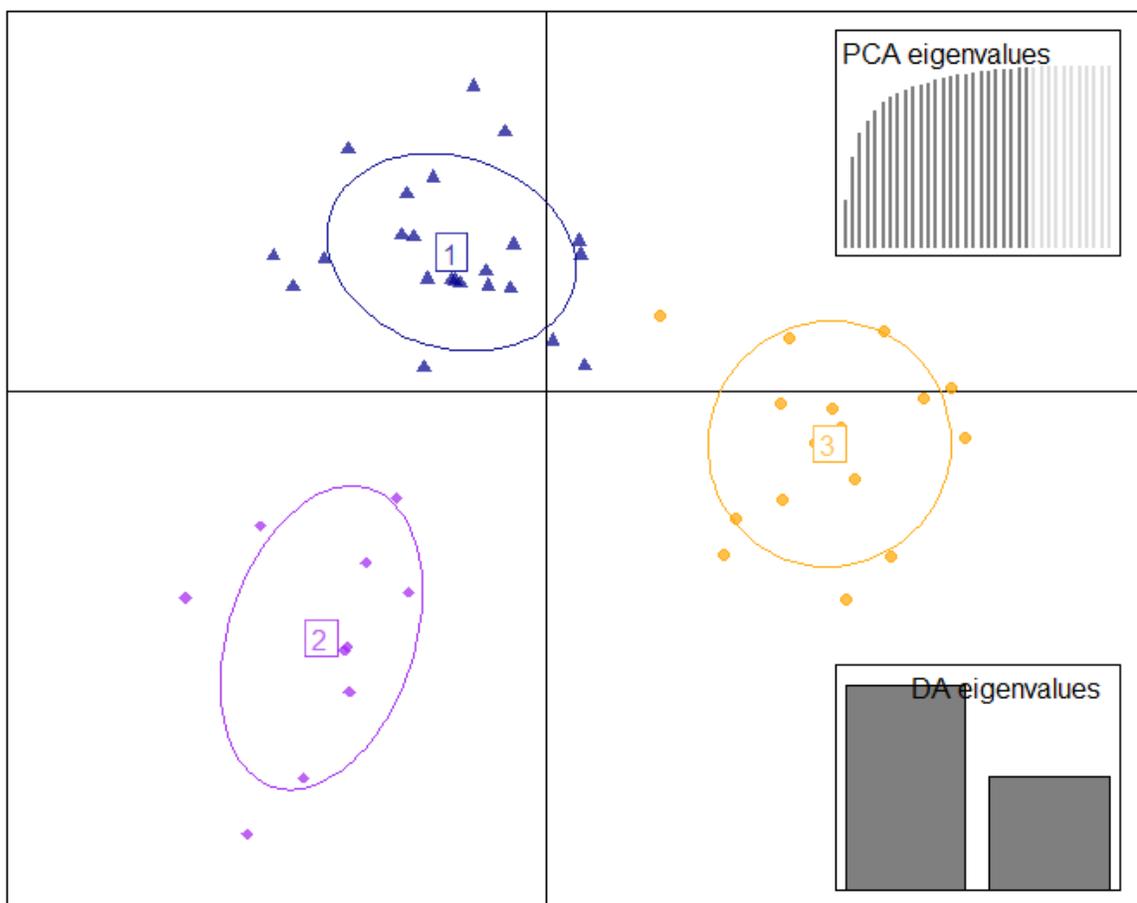


FIGURA 14. Diagrama de análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para los morfotipos de *A. guatemalensis*. Cada ovalo represente un grupo y cada punto coloreado representa un individuo. Los gráficos de dispersión del PCA y DA mostrados en el lado derecho de la gráfica indican los componentes principales (PCs) y número de funciones discriminantes (DAs) para los cálculos.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Clasificación actual

A pesar de las múltiples variedades descritas (Andersen *et al.* 2006), basado en características morfométricas, actualmente se aceptan únicamente dos variedades de *A. guatemalensis*: var. *guatemalensis* y var. *jaliscana*. Las principales diferencias son que *A. g.* var. *guatemalensis* presenta brotes morados, hojas más largas y su distribución abarca desde el sur de México hasta Honduras. Por otro lado, *A. g.* var. *jaliscana*, presenta hojas más cortas, brotes más verdes y se distribuye más al centro de México, en los estados de Jalisco, Michoacán y Nayarit (Farjon 2017). La variedad *guatemalensis* engloba a los sinónimos de *A. tacanensis*, caracterizada por hojas más estrechas y con márgenes redondeados (Lundell 1940); *A. zapotekensis*, caracterizado por hojas más verdes y 2-4 canales de resina (Debreczy y Rácz, morfométricos); y *A. g.* var. *longibracteata*, caracterizada por un tamaño de cono más grande y brácteas más alargadas (Debreczy y Rácz, 1995).

Los resultados morfométricos de este estudio son congruentes con esta clasificación y aportan evidencia que la sustentan la presencia de *A. guatemalensis* y *A. g.* var. *guatemalensis* en las plantaciones del país. El primer grupo del morfotipo “guatemalensis” presenta hojas más grandes, de un verde oscuro y densidad menor (Fig. 12-A-C), característico de *A. guatemalensis* (Standley y Steyermark 1958, MacVean 2010, Farjon 2017 e INAB 2019). El segundo grupo que engloba “religiosa” y los fenotipos intermedios, presenta hojas más cortas, mayor densidad y tonos más claros (Fig. 12-A-C), característico de *A. g.* var. *guatemalensis* (Farjon 2017).

Los resultados también sustentan la necesidad de clasificar las antiguas variedades *tacanensis*, *zapotekensis* y *longibracteata* como una sola variedad. Por ejemplo, una de las principales características de la variedad *zapotekensis* es que presenta 4 canales de resina, mientras las variedades *tacanensis* y *longibracteata* solo dos (Debreczy y Rácz, 1995). Por otro lado, *tacanensis* se distingue más por sus hojas estrechas y apiñadas, dando una apariencia plumosa (Lundell 1940), característica no presente en las otras variedades. Dentro de las plantaciones se encontraron individuos que cumplían con estas características y que anteriormente se habrían clasificado como dos variedades diferentes. Sin embargo, tanto la agrupación jerárquica como el PCA los clasificaron bajo el mismo grupo, comprobando que es posible tratarlos como una variedad.

B. Posibles adaptaciones morfo-fisiológicas

La formación de los dos grupos morfométricos puede explicarse por variaciones ambientales y geográficas locales de crecimientos de los árboles y los semilleros de donde provienen, siendo adaptaciones a medio específicos. En general, cambios en la morfología de la hoja está relacionado a cambios en las funciones fisiológicas como adaptación al medio (Huang *et al.* 2015, Niinemets 2016, Jankowski *et al.* 2017, Cruz-Nicolas *et al.* 2020). El aislamiento de

las poblaciones de pinabetes pudo favorecer una especiación alopátrica, teniendo al clima y elevación como principales barreras, donde cada población desarrolló adaptaciones fisiológicas únicas al medio. Bajo esta hipótesis, los dos grupos encontrados en plantaciones son producto de la plasticidad fenotípica de la especie (Xiaoguo *et al.* 2007, Dörken y Lepetit 2018).

Un primer ejemplo se observa en la longitud y densidad de las hojas, que presentaron diferencias entre los grupos y tendencias contrarias: a mayor longitud de hojas, menor densidad de estas (Fig. 12-B y C). Una reducción del tamaño de las hojas se ha asociado a diferentes ventajas. La primera es la longevidad de la hoja, una menor longitud de la hoja, mayor es la longevidad de esta. Las hojas longevas permiten un mayor secuestro de carbono y nutrientes en la planta, lo cual es ventajoso en ambientes más pobres recursos (Smith *et al.* 2019). Wang y colaboradores (2018) demostraron que en 5 especies de *Pinus*, las hojas más grandes requerían mayor tejido de soporte, aumentado la presión entre la epidermis y el mesófilo, lo que significa una desventaja en ambientes con poca humedad.

A pesar de esto, las hojas grandes continúan presentando ventajas adaptativas, como un mejor intercambio de calor, maximizando las ganancias fotosintéticas y disminuyendo el estrés hídrico y ante el frío (Niinemets 2016). Para compensar la pérdida de estas ventajas, las hojas de menor tamaño aumentan el número de hojas bajo un mecanismo de compensación tamaño/cantidad (Kleiman y Aarssen 2007). Esto se puede observar claramente en la variedad conocida como “*chinita*” (tamaño de hoja: 15.36mm – 39.07mm, densidad: 177-200, Fig. 13-B). Esto también podría explicar las observaciones de algunos productores, quienes resaltan que esta variedad tarda más en secarse y desprenderse del árbol hasta 3 meses después de la tala, a diferencia de los otros árboles, quienes se secan y pierden el follaje al primer mes (E. Monge, comm. personal).

Estas características se relacionan también con el color de las hojas (Fig. 12-A). Un estudio con *Abies religiosa* demostró que los indicadores visuales de las hojas se pueden relacionar con el contenido de clorofila y capacidad fotosintética de las hojas. En general, las hojas más claras son las que presentan un menor contenido de clorofila, una menor capacidad fotosintética y un mayor nivel de estrés (Carbajal-Navarro *et al.* 2020). Este estrés está relacionado principalmente con la falta de agua. En época seca las semillas presentan un estrés hídrico que desarrolla hojas con un menor contenido de clorofila, y por ende son de tonos más claros (Ashraf y Harry 2013). Como mecanismo de compensación a hojas con menor capacidad fotosintética, algunas variedades presentan un mayor número de hojas (Kleiman and Aarssen 2007). Esto se observa en la figura 12-A y 12-B, el grupo con hojas más claras es el grupo con una mayor densidad de hojas.

Otra de las características que sustentan la hipótesis de variaciones por adaptaciones fisiológicas es el espesor de las hojas (Fig. 12-E). El grosor de la hoja está vinculado con el uso del agua y la eficiencia fotosintética, a mayor precipitación, mayor es el espesor de la hoja (Cruz-Nicolas *et al.* 2020). Esto está asociado con una adaptación a climas fríos y puntos de

congelación. Hojas más gruesas presentan un aumento de espesor en las capas celulares, lo que permite un mayor contenido de agua. El agua posee una alta capacidad térmica, lo que reduciría la tasa de congelación de la hoja y evitaría daños a los tejidos (Niinemets 2016). Esta característica pudo ser adquirida en las poblaciones de *A. guatemalensis* que crecían durante los procesos de glaciación e interglaciación del Pleistoceno, como un mecanismo de defensa para disminuir el daño tisular ante el congelamiento (Aguirre-Planter *et al.* 2012, Cruz-Nicolas *et al.* 2020).

Los resultados no muestran una diferencia significativa para ninguno de los rasgos relacionados a los conductos de resina (Fig. 12-K-M). Estudios con una especie del género hermano de *Abies*, *Picea abies*, demostraron que las características de los conductos son altamente conservadas y dependen principalmente de la genética del árbol, más que de la influencia del ambiente. De los factores ambientales, la defensa a la herbívora es quien presentó la influencia más grande (Rosner y Hannrup 2004). Resultados similares se obtuvieron para *Pinus oocarpa*, en donde el tamaño de los conductos de resina entre generaciones no varió, atribuyéndose a factores genéticos (Fabián-Plesníková 2021). En los casos donde se ha encontrado diferencia en el tamaño y número de canales, se relaciona a la defensa contra la herbívora, ya que la presencia de otros canales más pequeños está asociado al transporte de diferentes terpenos que actúan como una primera línea de defensa (Jankowski *et al.* 2017). En el caso de *A. guatemalensis*, no existe una presión ambiental fuerte de defensa contra herbívoros o plagas (INAB 2019), por lo que posiblemente los canales no se han adaptado o modificado entre los individuos.

Existen dos características que no fueron consideradas en este estudio que también se han asociado al estudio de la plasticidad fenotípica en otras especies: la posición del conducto de resina y las características de la epidermis. La mayoría de especies de *Abies* se distingue por una hipodermis bien desarrollada y continua de una sola capa celular. Sin embargo, también se ha encontrado que esta distribución no siempre se conserva entre todos los organismos, habiendo quienes presenten una hipodermis de grupos aislados de cuatro a cinco células lignificadas (Ghimire *et al.* 2015). Este segundo caso podría ser una adaptación ante la altura y la concentración de CO₂ en el medio (Tiwari *et al.* 2013). La posición del conducto suele ser marginal o central (Farjon 2017). Sin embargo, esto podría cambiar como adaptación al clima, sequía o defensa a herbívora (Niinemets 2016, Jankowski *et al.* 2017). Se sugiere hacer estudios con cortes histológicos de la especie para poder distinguir bien las características celulares y poder encontrar adaptaciones a nivel tisular.

La estrategia actual para la conservación del pinabete promueve que las plantaciones obtengan el material para sembrar de los viveros nacionales. A su vez, estos viveros nacionales obtienen las semillas de las poblaciones naturales de todo el país (INAB 2019). Esto dificulta poner a prueba la hipótesis planteada de la plasticidad fenotípica como explicación para la formación de los dos grupos encontrados y su relación con la clasificación actual de la especie, principalmente porque no existe un mecanismo para trazar la población de origen de cada árbol

sembrado y las condiciones de crecimiento de la semilla y la plántula. Sin embargo, existen diversos estudios que demuestran la sensibilidad de la especie al clima, así como de otras coníferas (Huang *et al.* 2015, Niinemets 2016, Jankowski *et al.* 2017, Dörken y Lepetit 2018, Wang 2018).

Un primer estudio demostró que los anillos de crecimiento de las poblaciones de *A. guatemalensis* de las partes altas de los Cuchumatanes eran fuertemente influenciados por la humedad en el crecimiento temprano del árbol, la cual a su vez se determinaba por la precipitación del invierno tardío y la oscilación de temperatura primavera-verano. Usando modelos climáticos y de predicción, los autores también demuestran que este patrón se puede replicar a un nivel regional, demostrando la importancia de la variedad hidroclimática para la especie (Anchukaitis 2012). Resultados similares fueron reportados en otro estudio con poblaciones de pinabetes de 168 años en Totonicapán. Este estudio demuestra periodos de estrés en los árboles más viejos y la formación de anillos falsos que pueden indicar condiciones ambientales subestacionales. Sumado, demuestran que la relación entre la precipitación tardía del verano y el crecimiento de los árboles es significativa, con una relación positiva ante la precipitación y una relación negativa a la temperatura (Anderson *et al.* 2018). Esto demuestra la sensibilidad del crecimiento de la especie ante la humedad y la temperatura, en especial las oscilaciones entre una época y otra.

C. Complejo *Abies religiosa-guatemalensis-hickelii*

Dentro de las características encontradas durante el estudio es importante mencionar la presencia de un árbol con más de seis conductos de resina. *A. guatemalensis* se caracteriza y distingue de otras especies por la presencia de únicamente 2 conductos de resina, y con de 2-4 conductos para la variedad *guatemalensis* (Andersen *et al.* 2006, Farjon 2017). Por esta razón, se esperaba encontrar únicamente de 2 a 4 conductos de resina en los árboles. Sin embargo, se encontró individuos que presentaban hasta 8 conductos de resina (Fig. 13). Este número de conductos de resina es el criterio que suele usarse para la distinción de *A. hickelii*, que presenta de 4 a 12 canales (Farjon 2017).

Una posible explicación es la presencia de posibles híbridos, la cual está altamente documentada en abetos (Hawley y DeHayer 1985, Kormutak y Vookova 2001, Janeček y Koblíha 2007, Aizawa y Iwaizumi 2020). La hibridación de las especies puede causar la aparición de características novedosas que los hagan distinguibles de los parentales (Aizawa y Iwaizumi 2020). Estas características pueden aumentar la vitalidad y aptitudes de las especies, en especial en ambientes de estrés o en la colonización de nuevos nichos, lo que favorece su selección (Kormutak y Vookova 2001). En el caso de los canales de resina, esta característica puede ser una ventaja adaptativa de los híbridos ante patógenos y nuevas plagas resultado de la siembra de pinabetes fuera de la distribución natural (Fritz 1999, INAB 2019).

Otra posible explicación es la presencia de árboles semilleros mal identificados como *A. guatemalensis* y tratándose en realidad de otra especie, como *A. hickelii*. Esta hipótesis se

sustenta en el debate sobre la clasificación del complejo *Abies religiosa-guatemalensis-hickelii*, bajo la cual se clasifica como un solo complejo de especies (Jaramillo-Correra *et al.* 2008, Strandby 2009).

Está aceptado que el género *Abies* en Mesoamérica evolucionó a partir de una serie de migraciones ocurridas entre finales del Oligoceno (hace 24 millones de años) y el Plioceno tardío (hace 2,5 millones de años), formando un solo grupo monofilético conocido como los *abetos mesoamericanos* (Xiaoguo *et al.* 2007). *Abies flinckii* se reconoce como la especie de la primera ola de migración, mientras el complejo *Abies religiosa-guatemalensis-hickelii* como resultado de una segunda migración a través de la Sierra Madre Occidental (Jaramillo-Correra *et al.* 2008, Aguirre-Planter *et al.* 2012). El mtADN y cpADN sugiere que este complejo son solo etapas iniciales de un proceso de especiación interrumpidas por periodos de introgresión, lo que explica porque las tres especies comparten una única genética citoplasmática y nuclear (Aguirre-Planter *et al.* 2012). De manera similar, estudios filogenéticos utilizando regiones repetitivas y no repetitivas del genoma cloroplastidial agruparon a estas tres especies dentro de un solo grupo parafilético, sin formación de grupos claros entre ellos (Jaramillo-Correra *et al.* 2008). Por último, un análisis multivariado de características morfométricos mostró la formación de tres grupos pobremente definidos, explicado principalmente por la distancia geográfica. Sin embargo, debido a la distribución superpuesta y la falta de diferencias morfométricas claras, los autores proponen que no son tres morfoespecies separadas, sino una sola (Strandby 2009).

Bajo esta hipótesis es posible encontrar árboles semilleros en Guatemala presenten características fenotípicas asociadas a *A. religiosa* o *A. hickelii*, como el caso de más de 4 conductos de resina. Otra característica es la forma que adopta el corte transversal de la hoja. En su estudio, Strandby y colaboradores (2009) logran distinguir formas únicas para el corte transversal de cada una de las especies. Esta característica no fue tomada en cuenta en este estudio, pero también es posible distinguir estas tres formas dentro del material utilizado (Anexo 5). Aportar al debate de esta hipótesis está fuera del alcance de este estudio, sin embargo, nuestros resultados junto con los otros estudios si demuestran la necesidad de seguir realizando investigación sobre la relación genotípica y fenotípica entre estas tres especies por medio de estudios filogenéticos que esclarezcan las relaciones entre ellas.

D. Diversidad genética y estructura poblacional

Al respecto la estructura de las poblaciones, los tres morfotipos presentaron una arquitectura genética similar y poca diferenciación entre ellos. Los altos valores del coeficiente heterocigosidad, así como los bajos coeficiente de endogamia (Cuadro 4 y 5), demuestran que existe un gran número de heterocigotos producto del flujo y conexión entre las poblaciones (Rasmussen *et al.* 2010). Como resultado de este contacto, no existe una diferenciación genética fuerte entre los morfotipos, lo que también explica los valores bajos del coeficiente de fijación par a par (Cuadro 6).

Esta falta de diferenciación tiene soporte también en el análisis discriminante de componentes principales (Fig. 14), el cual demuestra que no existe una estructura clara entre poblaciones y sugiere que la división puede deberse más a factores geográficos. En el DAPC, el grupo I incluyó principalmente los árboles de finca El Edén, y grupos II y III los individuos de finca Chichavac, independiente de los morfotipos. Esto indica que los grupos no distinguen entre los tres morfotipos, sino entre el lugar donde el material fue colectado.

El alto grado de conexión entre las poblaciones, así como la consecuente falta de división genética entre morfotipos, puede ser el producto de dos procesos principales. El primero son los procesos evolutivos por los cuales ha pasado la especie. La evidencia palinológica y filogenética sugiere que las coníferas poblaron Mesoamérica durante los máximos glaciales del Pleistoceno, formando grandes bosques continuos. Posteriormente, durante los periodos interglaciares cálidos, las poblaciones se desplazaron verticalmente hacia las montañas y se formaron pequeñas poblaciones fragmentadas aisladas por valles calientes y secos (Xiaoguo *et al.* 2007, Schuster y Bonis 2008, Aguirre-Planter *et al.* 2012). Estos periodos de expansión y posterior fragmentación de las poblaciones moldearon los procesos de evolución y divergencia de *A. guatemalensis* en el país, especialmente a través de la Sierra Madre y su posterior colonización en el Occidente (Jaramillo-Correra *et al.* 2008, Schuster y Bonis 2008). Como resultado de este reciente aislamiento geológico, los bosques actuales son el resultado de una serie de cuellos de botella que han impedido la diferenciación genética de las poblaciones (Premoli *et al.* 2007).

Esta hipótesis se sustenta en otros estudios en poblaciones naturales, los cuales obtuvieron resultados similares. Utilizando isoenzimas, Aguirre-Planter y colaboradores (2000) encontraron una baja diferenciación genética entre poblaciones de Guatemala y México, con un bajo flujo genético y valores de F_{is} que podrían indicar endogamia entre algunas poblaciones. De manera similar, utilizando microsatélites, Rasmussen, Strandby y Kollmann (2010) reportaron una baja diferenciación entre las poblaciones de Guatemala y la existencia de una sola metapoblación. Dentro de ella, los valores de F_{is} indicaron nuevamente endogamia entre algunas poblaciones.

Un segundo proceso que explica la conexión y falta de diferenciación genética entre morfotipos es la intervención humana. Los bosques aislados son los que posteriormente fueron explotados y fragmentados aún más por factores antropogénicos, perdiendo cerca del 95% de bosques naturales (Gardner 2013). Este evento reciente de depredación de la especie indica ser más significativo para la diversidad genética de las especies que los refugios climáticos del Pleistoceno (Premoli *et al.* 2007, Rasmussen *et al.* 2010).

Junto con la sobreexplotación del recurso, también comenzaron los esfuerzos de conservación *ex situ* e *in situ* para la especie. *A. guatemalensis* es una especie con un valor cultural importante para Guatemala, especialmente para los grupos originarios de la región occidental (Andersen *et al.* 2006, Anderson *et al.* 2018, Godínez 2021), por lo cual se puede esperar que la intervención humana provenga desde hace tiempo. Como resultado de estos procesos de cultivo y aprovechamiento humano, la especie podría estar pasando por un proceso de domesticación, siendo los sistemas de cultivo poblaciones incipientemente domesticadas. Bajo esta hipótesis, la selección de características deseables del pinabete (como olor, resistencia,

color, tamaño, entre otros) podría ser otra fuerza evolutiva que moldea a las poblaciones actuales, creando los nuevos fenotipos observados. Estos nuevos fenotipos aún no representan especies diferentes, sin embargo comienzan a presentar características únicas en las plantaciones (Clement *et al.*, 2021).

Los resultados del DAPC aportan soporte a la hipótesis de la influencia de la domesticación del pinabete. Chichavac no participa en el programa nacional de intercambio de semillas, lo que significa que todo el material forestal sembrado proviene únicamente de los árboles de la finca. Estudios sugieren que el género *Abies* es un dispersor de corta distancia (~100m) (Amm *et al.* 2012, Sánchez-Robles *et al.* 2014), lo que provoca que todos los materiales de Chichavac sea producto de la reproducción de los mismos árboles a lo largo de por lo menos tres generaciones (William 2009). Esto provoca que no exista un intercambio ni introducción de nuevos alelos en la finca, lo que podría estar causando un efecto de fijación de ciertos alelos dentro de la finca. Esto podría explicar la división del grupo II y III como los grupos “Chichavac”. Los grupos II y III del DAPC podrían ser el resultado de la selección de las semillas de los árboles con características deseables para maximizar las ganancias de la venta de pinabete como árbol de navidad.

A pesar de no existir diferenciación genética, las poblaciones sí presentan niveles altos de diversidad genética, la cual no está directamente relacionada con la aptitud de la especie ni muestran relación las características fenotípicas que se expresan (Cuadro 4 y 5). Esto fue comprobado inicialmente para los individuos adultos (Rasmussen *et al.* 2010), y los resultados de este estudio demuestran que es similar para organismos jóvenes. En general, el morfotipo *guatemalensis* fue quien presentó una mayor diversidad genética ya que posee un número mayor de alelos efectivos y coeficiente de endogamia es menor. Por otro lado, *religiosa* y los posibles híbridos presentan mayores valores de endogamia. Esto puede indicar estos morfotipos están sobre un proceso reciente de estructuración genética (Clement *et al.*, 2021).

Una importante limitante de este estudio es el tamaño de la muestra y el número de microsatélites utilizados. Estudios han demostrado que el uso de menos de 15 microsatélites conduce a devianaciones en los resultados de coeficiente de diversidad genética y al cálculo de la estructura poblacional y sugiriendo la necesidad de utilizar de 18 a 20 marcadores para tener resultados más precisos (Koskinen 2004, Wang *et al.* 2021). Esta limitante aumenta con el tamaño de muestra. Entre más pequeño es el tamaño de la muestra, se requiere más loci para tener estimaciones genéticas más precisas (Aguirre-Liguori *et al.* 2020). El estudio utilizó un número limitado de muestra con únicamente 4 marcadores microsatélites. Como resultado, la fuerza para detectar una diferenciación genética entre las poblaciones es baja, lo que podría explicar también el por qué no se presentó.

Debido al evidencia de otros estudios sobre la posible estructura poblacional de *A. guatemalensis* y las relaciones del complejo *Abies religiosa-guatemalensis-hickelii*, se recomienda la utilización de otros marcadores moleculares que con una mayor capacidad para detección de estimadores genéticos. En especial se recomienda la utilización de polimorfismos

de nucleótido único (SNP) por medio de mapeo RAD como una alternativa que han demostrado dar mejores intervalos de confianza en los estimadores de la diversidad genética, análisis de agrupamientos más confiable y con mayor poder de separación de grupos y la posibilidad de considerar adaptaciones locales a los análisis (Sunde *et al.* 2020, Zimmerman *et al.* 2020).

E. Implicaciones para la conservación en Guatemala

Dentro de la Estrategia Nacional para la Conservación del Pinabete se proponen tres líneas estratégicas a ser alcanzadas para 2028. La primera línea es la coordinación e incidencia inter-institucional. La segunda línea es la protección, conservación y restauración de las áreas de pinabetes, con el fin que las áreas con presencia de Pinabete se conserven y las degradadas se recuperen (CONAP 2020). Uno de los requisitos para asegurar que los programas funcionen y aseguren la restauración de la especie es comprender sus requerimientos biológicos en diferentes etapas de su crecimiento y asegurar, no solo las generaciones plantadas, sino la viabilidad a largo plazo (Johnson *et al.* 2017). Los resultados de este estudio demuestran la fuerte influencia del medio ambiente en el crecimiento y expresión fenotípica del pinabete. Esto permite evaluar el futuro rango de variabilidad de la especie para identificar regiones geográficas óptimas para los programas de restauración, en especial a la luz de los efectos de cambio climático (Anderson *et al.* 2018). Comprender estos cambios es clave para asegurar ecosistemas forestales más sostenibles y resilientes.

La tercera línea de la estrategia es el fortalecimiento del uso sostenible de la especie. Esta línea busca “fortalecer los eslabones de la cadena productiva del pinabete, a fin de garantizar que el mercado será abastecido con productos y subproductos obtenidos de forma lícita y sostenible” (CONAP 2020). Comprender y obtener información precisa sobre como la hidrología, tipo de suelo, clima, nutrientes y tiempos en los que se cosecha y siempre pinabete puede afectar la expresión fenotípica del mismo, puede permitir la mejora de cada eslabón de la cadena para asegurar que la expresión fenotípica presente las características deseadas por los productos. Por ejemplo, reducir el estrés hídrico de las semillas puede traducirse en árboles con coloraciones más verdes, característica deseable por los productores (Andersen *et al.* 2008, Carbajal-Navarro *et al.* 2020).

La falta de una distinción genética clara entre las poblaciones de pinabetes y la información actual sobre la filogenia en Guatemala, impiden que se pueda hablar de unidades evolutivamente significativas (ESU) para la especie. Por esto es necesario realizar estudios para determinar cuáles son los rasgos de variación genética de importancia adaptativa, quienes conjunto con los datos ecológicos, nos permiten crear programas de manejo más integrales (Crandall *et al.* 2000). Para lograr hacer la integración de estos datos genéticos-ecológicos a los programas, es necesario comprender las presiones selectivas, la herencia no genética y rasgos epigenéticos relevantes (Eizaguirre y Baltazar-Soares 2014). La estrategia no considera ni menciona la necesidad de proteger y asegurar el recurso genético del pinabete ni sus procesos

evolutivos. Este elemento debe ser evaluado y considerado como una nueva línea de acción dentro de la estrategia, en especial por la gran falta de información al respecto.

Por último, los resultados evidencian la urgencia de ordenar los documentos técnicos y legales que protegen a la especie en el país, los cuales son un componente clave en la conservación de las especies (Ellis 2019). Por un lado, el Reglamento para el Manejo de Plantaciones y Áreas Productoras de Semilla de Pinabete (Acuerdo Gubernativo No. 198-2014) incluye a *A. guatemalensis* y *A. religiosa* como las especies que se cosechan y comercian en el país. A pesar de esto, tanto la política actual como la Lista de Especies Amenazadas de Guatemala -LEA- de CONAP, consideran únicamente a *A. guatemalensis* como la especie en el país (CONAP 2009). En ninguno de los tres documentos se menciona la presencia de variedades ni su necesidad de conservación.

La inclusión de todas las posibles especies y variedades de *Abies* bajo un mismo esquema de conservación como *A. guatemalensis* ha tenido sus ventajas al presentar un sentido de identidad nacional con los productores y el mercado, siendo un eje principal en las estrategias (INAB 2019, CONAP 2020). Sin embargo, a nivel legal la falta de certeza sobre las especies y variedades puede presentar vacíos que vulnerabilizan la protección integral del complejo *Abies*, tanto a nivel nacional como internacional. Por esto es vital la revisión no solo taxonómica, sino técnico-legal de la especie, y así crear estrategias y documentos precisos en diferentes aspectos.

VIII. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con la agrupación jerárquica con método de Ward y el análisis de componentes principales (PCA) para los datos botánicos, es posible distinguir dos grupos morfométricos diferente entre sí, y sin superposición entre ellos. El primer grupo incluye a los morfotipos identificados principalmente como *guatemalensis* y el segundo aquellos identificados como *religiosa* e posibles híbridos.
2. De los 14 descriptores morfológicos y morfométricos evaluados, 7 presentaron una diferencia significativa entre los dos grupos mediante la prueba t, siendo estos: densidad de las hojas, longitud de las hojas, ancho de las hojas, espesor de la hoja, largo del haz cubierto por estomas, largo del haz cubierto por estomas/largo de la hoja y tamaño del *notch*.
3. Para los cuatro microsátélites utilizados se reportaron un total de 36 alelos en los 50 individuos de los tres morfotipos, con un promedio de 9 alelos por loci; un número efectivo de alelos por locus de 4.168 a 5.556, una alta heterocigosidad entre 0.815 y 0.0883, y bajos coeficiente de endogamia de Nies entre -0.037 y 0.204.
4. Los parámetros de la diversidad genética de los tres morfotipos reportan un número efectivo de alelos de 7.50, heterocigosidad observada variando de 0.737 a 0.823, y heterocigosidad entre poblaciones de 0.796 a 0.827. El coeficiente de endogamia dentro de los individuos fue bajo, entre 0.005 a 0.092.
5. Los valores de diferenciación genética par a par entre los morfotipos oscilo entre 0.101 y 0.172 indicando una moderada diferenciación genética entre morfotipos. El valor más alto se observó entre los morfotipos *religiosa* e posibles híbridos, mientras al valor más bajo se encontró entre los morfotipos *religiosa* y *guatemalensis*.
6. El análisis discriminante de componentes principales (DAPC) sugieren la formación de tres grupos. El grupo I incluye principalmente los morfotipos *guatemalensis* y *religiosa* de la finca Edén de los altos, así como la mayoría de los morfotipos híbridos de ambas fincas. El grupo II incluye individuos *guatemalensis*, *religiosa* e híbridos provenientes todos de Chichavac. Este grupo también incluye los tres árboles semilleros colectados. Por último, el grupo III incluye la mayoría de los organismos *guatemalensis* y *religiosa* provenientes de Chichavac.
7. El número de alelos, altos coeficientes de heterocigosidad y los bajos coeficientes de endogamia entre los morfotipos demuestran conexión y flujo genético entre las poblaciones, lo que produce poca diferenciación genética entre ellos. Este flujo es producto de los procesos naturales de evolución del complejo *Abies*, así como la posible intervención humana para el aprovechamiento de la especie.

8. De acuerdo con el análisis botánico y genético, las diferencias observadas pueden ser explicadas más por factores ambientales que genéticos. Las variaciones fenotípicas son producto de la alta plasticidad de la especie como respuesta a adaptaciones específicas al medio.

IX. RECOMENDACIONES

1. Ampliar los resultados con estudios histológicos que permitan distinguir con claridad la posición del conducto de resina y características de la epidermis de las hojas, para poder comprender las adaptaciones fisiológicas a nivel celular presentes en *A. guatemalensis*.
2. Realizar estudios controlados de crecimiento de pinabete bajo diferentes condiciones ambientales para determinar las condiciones óptimas que permitan generar fenotipos de interés y así mejorar los procesos de producción y comercialización de la especie.
3. Realizar estudios de hibridación para comprobar la clasificación de los posibles híbridos, así como el grado de hibridación de estos árboles.
4. Aumentar el número de marcadores microsatélites utilizados para la caracterización genética con el fin de confirmar la estructura poblacional y poder identificar individuos con características únicas.
5. Realizar estudios con marcadores polimorfismo de nucleótido único (SNPs), que dan estimaciones más precisas de la diversidad, mayor poder para detección de grupos y permiten evaluar las adaptaciones locales.
6. Aumentar el número de plantaciones evaluadas y el número de árboles seleccionados dentro de cada una, asegurando de 20 a 30 árboles por población.
7. Realizar estudios filogenéticos utilizando marcadores nucleares, mitocondriales y cloroplastidiales en los árboles de las plantaciones y bosques naturales para comprobar la identificación de los individuos como *A. guatemalensis* o identificar la existencia de otras especies cercanas, como *A. religiosa* y *A. hickelii* en Guatemala.

X. LITERATURA CITADA

- Acuerdo Gubernativo No. 198-2014. *Reglamento para el manejo de plantaciones y áreas productoras de semilla de pinabete*. Guatemala, 20 de junio de 2014.
- Aguirre-Liguori, A. et al. 2020. *Evaluation of the Minimum Sampling Design for Population Genomic and Microsatellite Studies: An Analysis Based on Wild Maize*. *Frontiers in Genetics* 11:870. doi: 10.3389/fgene.2020.00870.
- Aguirre-Planter, E. et al. 2000. *Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of Abies from southern Mexico and Guatemala*. *American Journal of Botany* 87(3): 362–371.
- Aguirre-Planter, É. et al. *Phylogeny, diversification rates and species boundaries of Mesoamerican firs (Abies, Pinaceae) in a genus-wide context*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 263–274.
- Aizawa, M. y Iwaizumi, M. 2020. *Natural hybridization and introgression of Abies firma and Abies homolepis along the altitudinal gradient and genetic insights into the origin of Abies umbellata*. *Plant Species Biology* Volume 35(2): 147-157.
- Amm, A. et al. 2012. *Improving the estimation of landscape scale seed dispersal by integrating seedling recruitment*. *Annals of Forest Science*, 69:845–856.
- Anchukaitis, K. 2012. *Annual chronology and climate response in Abies guatemalensis Rehder (Pinaceae) in Central America*. *The Holocene*: 1-8. DOI: 10.1177/0959683612455548
- Andersen, U.S. et al. 2006. *Conservation and utilisation of Abies guatemalensis Rehder (Pinaceae) – an endangered endemic conifer in Central America*. *Biodiversity and Conservation* 15:3131–3151.
- Andersen, U.S. et al. 2008. *Conservation through utilization: a case study of the Vulnerable Abies guatemalensis in Guatemala*. *Oryx*, 42(2): 206–213.
- Anderson, T.G. et al. 2018. *Climate Sensitivity and Potential Vulnerability of Guatemalan Fir (Abies guatemalensis) Forests in Totonicapán, Guatemala*. *Journal of Latin American Geography*, 17(1): 222-247.
- Arif, IA. et al. 2010. *A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity*. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 2079-2096.
- Ashraf, M. y Harris, PJC. 2013. *Photosynthesis under stressful environments: An overview*. *Photosynthetica* 51 (2): 163-190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.

- Benavente, C. 2017. *Ya están en venta los pinabetes en diferentes puntos del país*. Noticias Green [Guatemala]. 25 de noviembre, URL: <https://noticiasgreenpress.com/2017/11/25/ya-estan-en-venta-los-pinabetes-en-diferentes-puntos-del-pais/>
- Carbajal-Navarro, A. *et al.* 2020. *Relationship between chlorophyll content and needle color of Abies religiosa Kunth, Schltdl. et Cham*. Revista Fitotecnia Mexicana 43(2): 233 – 237.
- Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad [CEAB]. 2011. *Dinámica de Cobertura Forestal 2001–2006 e Inventario de Carbono de la Parcialidad Vicentes, San Vicente Buenabaj, Momostenango, Totonicapán*. Universidad del Valle de Guatemala, Ciudad de Guatemala: 20 pp.
- CITES. 2013. *Apéndices I, II y III*. Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres.
- Clement, C. *et al.* 2021. *Disentangling Domestication from Food Production Systems in the Neotropics*. Quaternary 4, 4.
- CONAP. 2009. *Lista de Especies Amenazadas de Guatemala -LEA- y Listado de Especies de flora y Fauna Silvestre CITES de Guatemala*. Documento Técnico 67 (02-2009). Guatemala, CONAP, 58 p.
- CONAP. 2020. *Estrategia Nacional para la Conservación del Pinabete Abies guatemalensis Rehder 2019 – 2028*. Documento técnico No. 06-2020. Guatemala.
- Core Team (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Corrales, L.; Bouroncle, C. y Zamora, JC. 2015. *Chapter 1: An overview of forest biomes and ecoregions of Central America*. En: Chiabai, A. [ed.] *Climate Change Impacts on Tropical Forest in Central America*. Earthscan from Routledge, Estados Unidos. Pp. 17-38
- Crandall, K. A; Bininda-Emonds, O., Mace, G. y Wayne, R. 2000. *Considering evolutionary processes in conservation biology*. Trends in Ecology & Evolution, 15(7), 290–295. doi:10.1016/s0169-5347(00)01876-0
- Decreto No. 101-96. *Ley Forestal*. Guatemala, 2 de diciembre de 1996.
- Dörken, V. y Lepetit, B. 2018. *Morpho-anatomical and physiological differences between sun and shade leaves in Abies alba Mill. (Pinaceae, Coniferales): a combined approach*.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus, 12: 13-15.
- Eizaguirre, C. y Baltazar-Soares, M. 2014. *Evolutionary conservation—evaluating the adaptive potential of species*. En: Wildey, J. *Evolutionary Applications* [ed.]. ISSN 1752-4571

- Ellis, EC. Evolution: *Biodiversity in the Anthropocene*. Current Biology 29: R829–R850.
- Fabián-Plesníková, J. *et al.* 2021. *Heritability and characteristics of resin ducts in Pinus oocarpa stems in Michoacán, Mexico*. IAWA Journal 42(3) :258-278.
- FAO. 2020. *Global Forest Resources Assessment 2020 – Main report*. Rome. 165 pp.
- Farjon, A. 2017. *A handbook of the world's conifers*. Brill, Boston. 1153 pp.
- Fritz, R. 1999. *Resistance of Hybrid Plants to Herbivores: Genes, Environment, or Both?*. Ecology 80(2): 382-391
- Galili T (2015). *dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering*. Bioinformatics. doi:10.1093/bioinformatics/btv428
- Gardner, M. 2013. *Abies guatemalensis var. guatemalensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T46186032A2795168.
- Ghimire, B. *et al.* 2015. *Comparative leaf anatomy of some species of Abies and Picea (Pinaceae)*. Acta Botanica Brasilica 29(3): 346-353. 2015. doi: 10.1590/0102-33062014abb0009.
- Godínez, S. 2021. *Diversidad de árboles en cuatro etapas de sucesión ecológica del bosque tropical montano nuboso del altiplano occidental de Guatemala*. Ciencia, Tecnología y Salud, 8(1): 24-42.
- González, AL. 2014. *Descanso campestre*. Prensa Libre [Guatemala]. 21 de diciembre, URL: <https://www.prensalibre.com/revista-d/finca-caleras-chichavac-chimaltenango-posada-rural-ecoturismo-0-1267673316/>
- Grupo Interinstitucional de Monitoreo de Bosques y Uso de la Tierra [GIMBUT]. 2016. *Dinámica de Cobertura Forestal 2010-2016*. Guatemala: Autor. Pág. 3
- Hawley, G. y DeHayes, D. 1985. *Hybridization among several North American first. II. Hybrid verification*. Canadian Journal of Forest Research 15: 50-55.
- Huang, Y. *et al.* 2015. *Genetic structure of needle morphological and anatomical traits of Pinus yunnanensis*. Journal of Forestry Research 27(1): 13–25. doi:10.1007/s11676-015-0133.
- Ignosh, JP. y Kilgore, MA. 2005. *Pinabete - One Opportunity Toward the Sustainable Development of the Guatemalan Highlands*. Staff Paper Series No. 185. Department of Forest Resources, University of Minnesota. 89 pp.
- INAB, CONAP, UVG y URL. 2012. *Mapa de cobertura forestal de Guatemala 2010 y dinámica de la cobertura forestal 2006-2010*. Guatemala, Autor. 111 pp.

- Instituto de Investigación y Proyección sobre Ambiente Natural y Sociedad de la Universidad Rafael Landívar [IARNA-URL]. 2018. *Ecosistemas de Guatemala basado en el sistema de clasificación de zonas de vida*. Autor, Guatemala. 122 pp.
- Instituto Nacional de Bosques [INAB]. 2008. *Manual de campo para el manejo sanitario de plantaciones de Pinabete*. Guatemala: Instituto Nacional de Bosques. 30 pp.
- Instituto Nacional de Bosques [INAB]. 2019. *Paquete Tecnológico Forestal para Pinabete Abies guatemalensis Rehder*, versión 1.0. Departamento de Investigación Forestal, Guatemala. 58 p.
- Janeček, V. y Koblíha, J. 2007. *Spontaneous hybrids within the genus Abies – growth and development*. Journal of Forest Science 53(5): 193–203.
- Jankowski, A. 2017. *Cold adaptation drives variability in needle structure and anatomy in Pinus sylvestris L. along a 1,900 km temperate–boreal transect*. Functional Ecology 31:2212–2223.
- Jaramillo-Correra, J. et al. 2008. *Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus Abies (Pinaceae) in southern México and Guatemala*. Molecular Ecology 17: 2476–2490.
- Johnson, CN. et al. 2017. *Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene*. Science, 356(6335): 270–275.
- Jombart, T. y Ahmed, I. 2011. *adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data*. Bioinformatics, 1;27(21):3070-1.
- Jombart, T. y Collins, C. 2015. *A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.0*. Imperial College London, MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling.
- Kassambara, A. 2021. *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests*. <https://rpkgs.datanovia.com/rstatix/>.
- Kleiman, D. y Aarssen, L. 2007. *The leaf size/number trade-off in trees*. Journal of Ecology 95: 376–382.
- Kollmann, J. et al. 2008. *Factors limiting regeneration of an endangered conifer in the highlands of Guatemala*. Journal for Nature Conservation, 16: 146–156.
- Kormutak, A. y Vookova, B. 2001. *Early growth characteristics of some Abies hybrids*. En Muller-Starck y Schubert [eds.]. Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions. Springer Science. Pp. 331-338.
- Koskinen, M et al. 2004. *The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective*. Hereditas 141: 61-67.

- Laffont, R. *et al.* 2011. *Biodiversity and evolution in the light of morphometrics: From patterns to processes*. *Comptes Rendus Palevol*, 10: 133–142.
- Longo, MJ. y Raquec, P. 2017. *De Xela hasta Villa Nueva: un pinabete tarda 5 años desde que crece hasta que hace feliz a una familia en Navidad*. Prensa Libre [Guatemala]. 13 de diciembre, URL: <https://www.prensalibre.com/ciudades/de-xela-hasta-villa-nueva-un-pinabete-tarda-5-aos-desde-que-crece-hasta-que-hace-feliz-a-una-familia-en-navidad/>
- López-Reyes, A. *et al.* 2015. *Morphological, Molecular, and Ecological Divergence in Pinus douglasiana and P. maximinoi*. *Systematic Botany*, 40(3): pp. 658–670.
- Lundell, C. L. 1940. *Trees from the Mountains of Mexico*. *The American Midland Naturalist* 23(1): 175-176.
- MacVean A.L. 2010. *Abies guatemalensis Rehder*. En: Vozzo, J.A. (ed.). *Manual de Semillas de Árboles Tropicales, Parte II: Descripción de Especies*. Servicio Forestal del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Estados Unidos. Pp. 253-254.
- Martínez, JV. 2018. *Modelo de negocio de restauración productiva de Abies guatemalensis Rehder utilizando plantas nodrizas para su establecimiento*. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 5(2): 182-188.
- Martínez, M. 1948. *Los Abies mexicanos*. *Anales del Instituto de Biología* 19: 11 – 104.
- Meirmans, P. 2020. *Genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids*. *Molecular Ecology Resources*, 20(4): 1126–1131.
- Mesa Nacional de Restauración del Paisaje Forestal de Guatemala [MRF]. 2018. *Oportunidades de restauración del paisaje forestal en Guatemala*. Guatemala, Autor. 44 pp.
- Mondini, L. *et al.* 2009. *Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools*. *Diversity*, 1(1): 19-35.
- Nelson A. y Chomitz KM. 2011. *Effectiveness of Strict vs. Multiple Use Protected Areas in Reducing Tropical Forest Fires: A Global Analysis Using Matching Methods*. *PLoS ONE* 6(8): e22722.
- Niinemets, Ü. 2016. *Does the touch of cold make evergreen leaves tougher?* *Tree Physiology* 36: 267–272.
- Oksanen, F.J., *et al.* (2017). *Vegan: Community Ecology Package*. R package Version 2.4-3. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Otto, SP. 2018 *Adaptation, speciation and extinction in the Anthropocene*. *Proceedings of the Royal Society* 285: 20182047.

- Palacio, FX.; Apodaca, MJ. Y Crisci, JV. 2020. *Análisis multivariado para datos biológicos: teoría y su aplicación utilizando el lenguaje R*. Fundación de Historia Natural Félix de Azara, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 268 pp.
- Paredes, L. 2021. Zoológico *La aurora recibió más de 500 pinabetes*. El Periódico [Guatemala]. 08 de enero de 2021, URL: <https://elperiodico.com.gt/nacionales/2021/01/08/zoologico-la-aurora-recibio-mas-de-500-pinabetes/>.
- Premoli, AC. *et al.* 2007. *Patterns of Genetic Variation in Tree Species and their Implications for Conservation*. En: Newton AC. [eds] *Biodiversity Loss and Conservation in Fragmented Forest Landscapes: The Forests of Montane Mexico and Temperate South America*. London, UK: CAB International. Pp. 120-157
- Ramírez, M.J. 2016. *Elaboración de un protocolo eficiente y económico para extracción de ADN de semillas de Abies guatemalensis mediante la comparación y modificación de dos protocolos de extracción para: tejido vegetal general y semillas de pinabete (Abies spp.) del Mediterráneo*. Trabajo de Graduación de Licenciatura, Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala. 68 pp.
- Rasmussen, K.K. *et al.* 2008. *Microsatellite markers for the endangered fir Abies guatemalensis (Pinaceae)*. *Molecular Ecology Resources*, 8(6): 1307-1309.
- Rasmussen, K.K.; Strandby, S. y Kollmann, J. 2010. *Highgenetic diversity within but limited differentiation among populations of the vulnerable Guatemalan fir*. *Journal of Tropical Forest Science*, 22(3): 247–259.
- Rehder, A. 1939. *The firs of Mexico and Guatemala*. *Journal of the Arnold Arboretum* 20(3): 281-287.
- Rosner, S. y Hannrup, B. 2004. *Resin canal traits relevant for constitutive resistance of Norway spruce against bark beetles: environmental and genetic variability*. *Forest Ecology and Management*, 200(1-3), 77–87. doi:10.1016/j.foreco.2004.06.025
- Sánchez-Robles, J. *et al.* 2014. *Effects of tree architecture on pollen dispersal and mating patterns in Abies pinsapo Boiss. (Pinaceae)*. *Molecular Ecology*, 23(24):6165-78.
- Schuster, J. y Bonis, S. 2008. *Capítulo 1: Biodiversidad de Guatemala en relación con su historia geológica y biogeografía*. En: CONAP [ed.] *Guatemala y su biodiversidad: Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico*. Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Oficina Técnica de Biodiversidad. Guatemala, Guatemala: Pp. 21-47.
- Smith, L. *et al.* 2019. *Leaf longevity in temperate evergreen species is related to phylogeny and leaf size*. *Oecologia*. doi:10.1007/s00442-019-04492-z
- Standley, P. C. y Steyermark, J. A. 1958. *Abies guatemalensis*. *Flora of Guatemala*. *Fieldiana, Botany*, 24 37–40.

- Strandby, U; Christensen, K.I. y Sørensen, M. 2009. *A morphometric study of the Abies religiosa–hickelii–guatemalensis complex (Pinaceae) in Guatemala and Mexico*. *Plant Systematics and Evolution*, 280: 59–76.
- Sunde, J et al. 2020. *Comparing the Performance of Microsatellites and RADseq in Population Genetic Studies: Analysis of Data for Pike (Esox lucius) and a Synthesis of Previous Studies*. *Frontiers in Genetics* 11:218. doi: 10.3389/fgene.2020.00218
- Tiwari SP et al. 2013. *Comparative morphological, epidermal, and anatomical studies of Pinus roxburghii needles at different altitudes in the North-West Indian Himalayas*. *Turkish Journal of Botany* 37: 65-73.
- Villalobos-Leiva, A. y Benítez, HA. 2020. *Morfometría geométrica y sus nuevas aplicaciones en ecología y biología evolutiva. Parte 2*. *International Journal of Morphology*, 38(6):1818-1836.
- vonHedemann, N. y Osborne, T. 2016. *State Forestry Incentives and Community Stewardship: A Political Ecology of Payments and Compensation for Ecosystem Services in Guatemala's Highlands*. *Journal of Latin American Geography*, 15(1): 32-110.
- Wang, H. et al. 2021. *Impact of different numbers of microsatellite markers on population genetic results using SLAF-seq data for Rhododendron species*. *Scientific Reports* 11:8597.
- Wang, N. et al. 2018. *Anatomical changes with needle length are correlated with leaf structural and physiological traits across five Pinus species*. *Plant, Cell and Environment*. DOI: 10.1111/pce.13516
- Williams, G. 2009. *An Overview of the Conifer Life Cycle*. En: *Conifer Reproductive Biology*. Springer Science. Estados Unidos: Pp. 25-26.
- Xiaoguo, X; Ming, C. y Zhekun, Z. 2007. *Fossil history and modern distribution of the genus Abies (Pinaceae)*. *Frontiers of Forestry in China* 2(4): 355–365.
- Xu, H. y Bassel, GW. 2020. *Linking Genes to Shape in Plants Using Morphometrics*. *Annual Review of Genetics*, 54(1): 14:17.
- Zimmerman et al. 2020. *An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern*. *BMC Genomics* 21: 382.

ANEXO 2. Protocolo optimizado a partir de Ramírez (2016) para la extracción de ADN de brotes de material foliar de pinabete.

0. Precalentar el buffer de extracción CTAB a 65°C.
1. Homogenizar con nitrógeno líquido utilizando un mortero previamente autoclaveado.
2. Agregar 600µL CTAB precalentado. Vórtex por 10 segundos.
3. Agregar 5µL de proteinasa-K.
4. Incubar a 60°C por 1 hora.
5. Dejar enfriar las muestras en una gradilla previamente refrigerada. Esperar 5 min o hasta que alcancen la temperatura ambiente.
6. Agregar 500µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Vórtex por 30 segundos.
7. Centrifugar a 15,000 rpm por 10 min. Si no se observa una buena separación de las fases, centrifugar por más tiempo.
8. Transferir el sobrenadante (aprox. 500µL), a tubo nuevo de 1.5ml. Si se toca la interfase, regresar lo colectado al tubo y centrifugar nuevamente.
9. Agregar al sobrenadante 500µl (1 volumen) de Isopropanol frío y 50µL (1/10 de volumen) de acetato de amonio 7.5M. Vórtex por 30 segundos.
10. Mezclar por inversión e incubar a -20°C mínimo 20 minutos. En este paso se pueden dejar las muestras por varios días.
11. Centrifugar a 15,000 rpm por 10 min.
12. Descartar el sobrenadante por inversión del tubo.
13. Lavar el pellet con 150µl de etanol 70% frío.
14. Centrifugar a 15,000 rpm durante 5 min.
15. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado al aire o en el horno con *shaker* a 60°C.
16. Re suspender el pellet en 100µl de buffer TE precalentado a 50°C y 6µl ARNasa. Vórtex y *quick spin* por 10 segundos.
17. Incubar por 30 minutos a 37°C.
18. Agregar 150µl cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
19. Agregar 150µl Fenol.
20. Vórtex por 30 segundos.
21. Centrifugar a 15,000rpm por 10 minutos.
22. Transferir sobrenadante a nuevo tubo con 150uL isopropanol con 15µl acetato de amonio.
23. Incubar -20°C mínimo 20 minutos. En este paso se pueden dejar las muestras por varios días.
24. Centrifugar a 15,000 rpm por 10 min. Descartar sobrenadante.
25. Agregar 50µl etanol 70% frío.
26. Centrifugar a 15,000rpm por 10 minutos.
27. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado al aire o en el horno con *shaker* a 60°C.
28. Resuspender en 50µL buffer TE.

ANEXO 3. Valores de cantidad y calidad del ADN extraído.

Finca El Edén, Palestina de los Altos, Quetzaltenango							
No.	Concentración (ng/μL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A380)	No.	Concentración (ng/μL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A380)
1.	77.4	2.75	0.42	12.	329.3	2.09	1.04
2.	132.3	2.14	0.69	13.	182.4	2.41	0.73
3.	462.5	2.01	1.75	14.	433.0	2.12	2.10
4.	203.4	1.67	2.29	15.	219.8	2.07	1.97
5.	91.9	1.98	2.07	16.	266.5	2.12	1.53
6.	338.1	2.19	1.13	17.	213.9	2.49	0.68
7.	160.8	2.18	0.97	18.	363.8	2.12	1.48
8.	145.6	2.07	2.34	19.	31.1	1.98	2.23
9.	192.9	2.23	0.91	20.	500.3	2.2	1.21
10.	-	-	-	21.	377.9	2.13	1.24
11.	1,212.6	2.10	2.38	22.	11.3	1.99	3.61
Finca Caleras Chichavac, Tecpán, Chimaltenango							
No.	Concentración (ng/μL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A380)	No.	Concentración (ng/μL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A380)
1.	416.8	2.19	1.45	16.	200.4	1.63	0.16
2.	1.67.4	1.46	0.28	17.	296.4	1.95	0.94
3.	21.7	1.7	2.34	18.	679.0	2.15	1.61
4.	261.9	1.9	0.97	19.	59.1	2.02	0.63
5.	537.0	2.02	1.45	20.	269.1	1.85	1.31
6.	319.1	1.84	0.98	21.	222.8	2.03	0.7
7.	64.0	1.58	1.66	22.	337.7	1.79	1.17
8.	448.1	2.03	1.27	23.	243.9	1.73	1.51
9.	171.1	1.91	0.87	24.	21.2	1.84	2.44
10.	368.0	2.22	0.77	25.	194.6	1.87	0.86
11.	41.1	1.51	1.42	26.	163.4	1.89	0.87
12.	80.2	1.78	0.94	27.	551.2	1.93	1.87
13.	12.9	1.43	1.01	28.	395.6	1.99	2.05
14.	2.74.6	1.98	0.93	29.	109.1	2.06	1.00
15.	198.4	1.74	1.39				

ANEXO 4. Resultados de los supuestos del modelo y prueba t para comparación de dos medias.

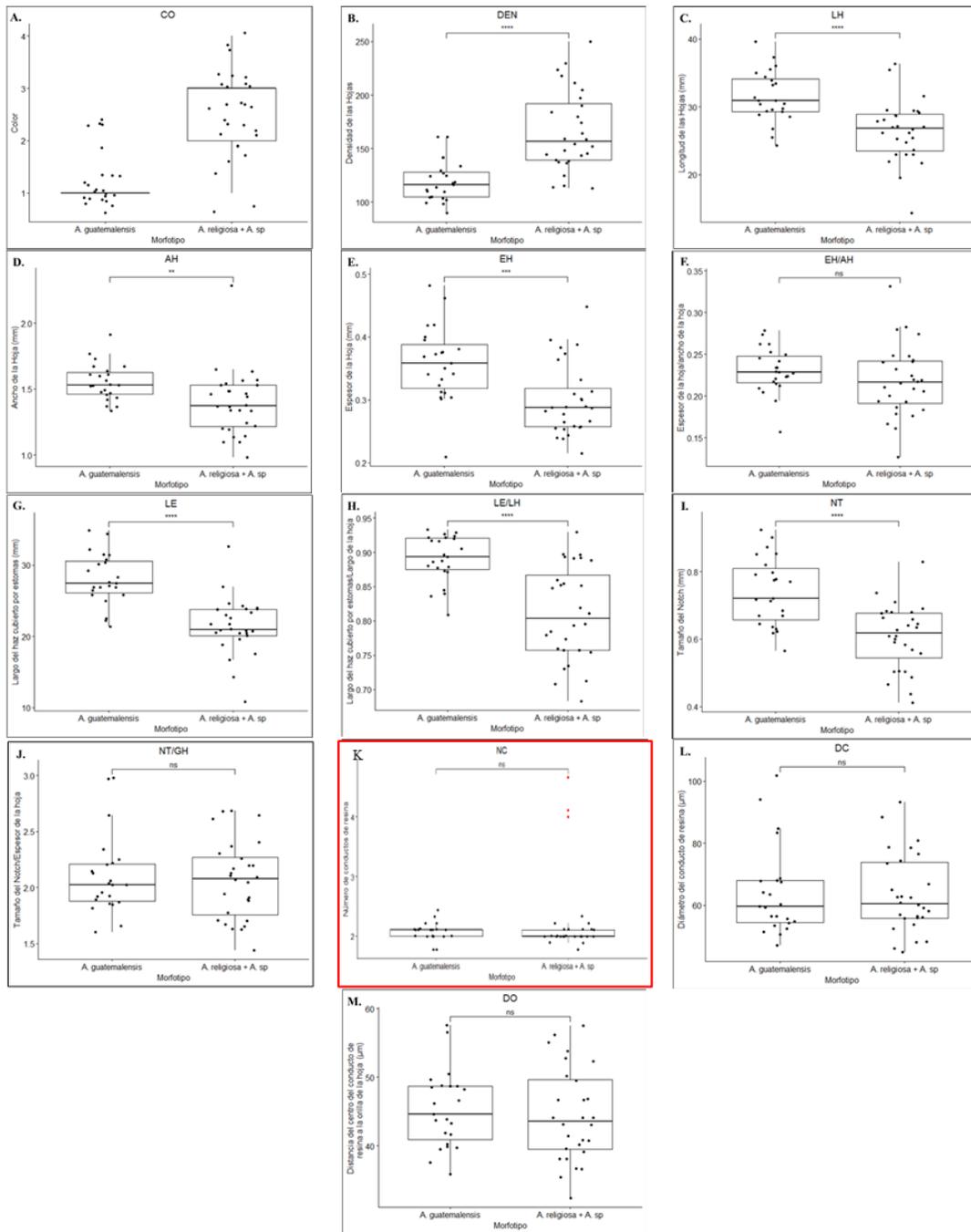


FIGURA 15. Identificación de valores atípicos en las mediciones de las características morfométricas. La línea roja representa las características que presentaron datos atípicos (puntos rojos), los cuales fueron excluido de la prueba t para comparación de medias.

CUADRO 7. Resultados de la prueba de homocedasticidad de la varianza

Característica	Valor F	Valor p
Longitud de las hojas (mm)	0.1483	0.7018
Densidad de las hojas	8.0007	0.006756
Ancho (mm)	3.1202	0.08355
Espesor (mm)	0.0398	0.8427
Espesor/Ancho (mm)	3.2096	0.07939
Estomas	0.014	0.9063
Estomas/Largo	16.188	0.0001981
Notch	0.3289	0.569
Notch/Grosor	0.3428	0.5609
Número de conductos	1.0854	0.3029
Diámetro conductos	0.016	0.8999
Distancia al centro	1.0318	0.3147

Valores en **negrilla** son aquellos que no cumplen con el supuesto de homocedasticidad.

CUADRO 8. Resultados de la prueba de normalidad

Grupo	Característica	Estadístico	Valor p
<i>A. guatemalensis</i>	Longitud de las hojas (mm)	0.981	0.929
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Longitud de las hojas (mm)	0.963	0.410
<i>A. guatemalensis</i>	Densidad de las hojas	0.966	0.568
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Densidad de las hojas	0.897	0.0220
<i>A. guatemalensis</i>	Ancho de la hoja (mm)	0.967	0.611
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Ancho de la hoja (mm)	0.884	0.00498
<i>A. guatemalensis</i>	Espesor de la hoja (mm)	0.968	0.638
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Espesor de la hoja (mm)	0.908	0.0180
<i>A. guatemalensis</i>	Espesor/Ancho (mm)	0.966	0.591
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Espesor/Ancho (mm)	0.979	0.838
<i>A. guatemalensis</i>	Estomas (mm)	0.971	0.720
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Estomas (mm)	0.930	0.0615
<i>A. guatemalensis</i>	Estoma/Largo	0.919	0.0637
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Estoma/Largo	0.953	0.229
<i>A. guatemalensis</i>	Notch	0.964	0.551
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Notch	0.973	0.650
<i>A. guatemalensis</i>	Notch/Grosro	0.870	0.00639
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Notch/Grosro	0.959	0.328
<i>A. guatemalensis</i>	Número de conductor	0.897	0.0220
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Número de conductor	0.865	0.00339
<i>A. guatemalensis</i>	Diámetro conductos	0.853	0.00305
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Diámetro conductos	0.941	0.115
<i>A. guatemalensis</i>	Distancia al centro	0.959	0.447
<i>A. religiosa</i> + <i>A. sp.</i>	Distancia al centro	0.962	0.384

Valores en **negrilla** son aquellos que no cumplen con el supuesto de normalidad.

CUADRO 9. Método utilizado y resultado obtenido de la prueba t para comparación de dos medias para las variables morfométricas.

Característica	Método	LCI	UCI	df	Valor t	Valor p
Longitud de las hojas	t	2.705946	7.443872	49	4.305	7.977e-05
Densidad de la hoja	Welch	-63.24650	-30.49573	41.382	-5.7789	8.66e-07
Ancho de las hojas	Welch	0.0455483	0.2689807	43.694	2.8376	0.006867
Espesor de la hoja	Welch	0.02641123	0.09201320	46.51	3.6326	0.0006979
Ancho/Espesor	t	-0.0076894	0.0320619	46.331	1.2339	0.2235
Estomas	t	4.502217	8.792050	49	6.2277	1.042e-07
Estoma/Largo	Welch	0.04983503	0.10965184	40.959	5.3848	3.238e-06
Notch	t	0.07800122	0.18955364	49	4.8199	1.431e-05
Notch/Grosor	Welch	-0.1605480	0.2381906	46.781	0.39178	0.697
Número de conductos	Welch	-0.0351712	0.1198572	41.394	1.1029	0.2765
Diámetro conducto	Welch	-7.003786	8.395654	44.486	0.1821	0.8563
Distancia al centro	t	-2.732050	4.371137	49	0.46372	0.6449

Valores en **negrilla** son aquellos que no presentan una diferencia significativa. Intervalo de confianza del 95% inferior (LCI) y superior (UCI).

ANEXO 4. Comparación de las formas del corte transversal de la hoja entre resultados de Strandby *et al.* (2009) y este estudio.



FIGURA 16. Comparación de las formas del corte transversal de la hoja entre resultados de Strandby *et al.* (2009) y este estudio. En la parte superior se encuentra tres formas diferentes de cortes transversales encontrados en las plantaciones de pinabete utilizadas en este estudio. En la parte de inferior son las ilustraciones de los cortes transversales encontrados en las poblaciones de *A. hickelii* y *A. guatemalensis* en el estudio de Strandby *et al.* (2009). La primera ilustración es de la población de Ixtlán de Juárez (Oaxaca, México), la de en medio de San Vicente Buenabaj (Quetzaltenango) y la tercera de Carrizal del Bravo (Guerrero) (Ver Strandby *et al.* 2009, Cuadro 2 y Figura 11).

ANEXO 5. Protocolo para la generación de geles de poliacrilamida 10%.

I. Soluciones

- A. Buffer SB 20X (pH 8, 1L).** Mezclar 8 g de NaOH, 47 g de ácido bórico en 900 mL de agua destilado, en intervalos de 30 mL. Aforar a 1L. Almacenar a 4°C.
- B. APS 10% (10 mL).** Pesar 0.1 g de persulfato de amonio, agregar 900 uL de agua destilada y agitar hasta que se disuelva. Almacenar en alícuotas de 50 uL a -20°C.
- C. Tiosulfato de sodio 10% (1 mL).** Pesar 0.1g de tiosulfato de sodio, agregar 900 uL de agua destilada y agitar hasta que se disuelva. Almacenar a -20°C.
- D. Solución de tinción (1L).** Mezclar 1 g de nitrato de plata, 1.5mL de formaldehído 37% en 1L de agua destilada. Cambiar cada mes y almacenarla en un recipiente forrado con papel aluminio.
- E. Solución de fijación (150mL).** Mezclar 15 mL de ácido acético glacial con 145 mL de agua destilada. Preparar al momento de usarse.
- F. Solución de revelado (150mL).** Mezclar 4.5 g de carbonato de sodio, 225uL de formaldehído 37% y 7.8 uL de tiosulfato de sodio 10% en 150 mL de agua destilada. Preparar en el momento de utilizar y almacenar a 4°C.

II. Procedimiento

1. Lavar las placas de vidrio de la cámara con detergente Nolon al 1% y una esponja suave. Enjuagar con agua y posteriormente con agua desmineralizada y etanol al 95%. Dejar escurrir hasta que estén secas por completo.
2. Armar la cámara de polimerización. Alinear el vidrio espaciados con el vidrio corto. Colocar los dos vidrios alineados con el vidrio corto hasta el frente dentro de una abrazadera verde, luego cerrar la abrazadero con los extremos para prensar los vidrios. Color la abrazadera en el soporte de fundición, apretando con el gancho.
3. Preparar la solución de poliacrilamida al 10%, mezclando 6.6mL de agua destilada, 2.5 mL de Buffer SB 5X, 3mL de acrilamida, 20uL de TEMED y 20uL de APS. Esta solución rinde para dos geles de 10cm.
4. Agitar la solución e inmediatamente verterla entre el vidrio espaciador y el vidrio corto, evitar la formación de burbujas de aire. Si se forman burbujas de aire, sacarlas con leves golpes a la parte del vidrio con burbujas.
5. Agregar 3uL de TEMED em cada extremo de los vidrios e introducir los peines evitando la formación de burbujas de aire.

6. Dejar polimerizar por 30 minutos. Si se observa la pérdida de solución por los extremos, rellenar con más solución con la ayuda de una pipeta de 1000 uL.
7. Amar la cámara de electroforesis. Agregar buffer de corrida (Buffer SB 1X). Este buffer puede ser reutilizado hasta un máximo de 5 corridas.
8. Remover los peines.
9. Colocar un 1mL de Loading Buffer en muestras de parafina.
10. Mezclar 4 uL de la muestra con 1 uL de loading buffer y cargar en el gel.
11. Cargar 2 uL de escalera molecular en un pozo vacío.
12. Cerrar la cámara por completo, verificando que el ánodo y cátodo se encuentren en la posición adecuada.
13. Conectar a una fuente de poder, verificando la polaridad de ellos cables.
14. Realizar la corrida del gel a 160V por 1 hora, o según el tamaño de los productos esperados.
15. Al terminar la electroforesis, apagar la fuente de poder, desconectar las terminaciones eléctricas, remover la tapa y secar el sistema armado.
16. Separar los vidrios y despegar el gel utilizando los espaciadores.
17. Colocar el gel en un recipiente con 150mL de solución de fijación y agitarlo por 20 minutos.
18. Recuperar la solución de fijación en un Erlenmeyer.
19. Realizar tres lavados con agua desmineralizada por dos minutos cada uno.
20. Agregar aproximadamente 150 mL de solución de tinción y agitar por 20 minutos.
21. Recuperar la solución de tinción en el recipiente de almacenamiento de la solución.
22. Lavar con agua desmineralizada por 10 segundos.
23. Agregar 150 mL de solución de revelado a 4°C y agitar hasta que aparezcan bandas.
24. Al observar bandas con la intensidad deseada, verter la solución de fijación utilizada al inicio de la tinción para detener la reacción. Agitar hasta que se neutralice.
25. Sumergir el papel filtro dentro de la solución para coleccionar el gel. Después de un minuto colocar el papel acetato sobre el gel.
26. Escanear los gels, guardarlos, envueltos en papel, en bolsas herméticas, para su posterior análisis.

Anexo 6. Ejemplo de geles y análisis de presencia ausencia de bandas utilizando el programa GenAnalyzer 19.1

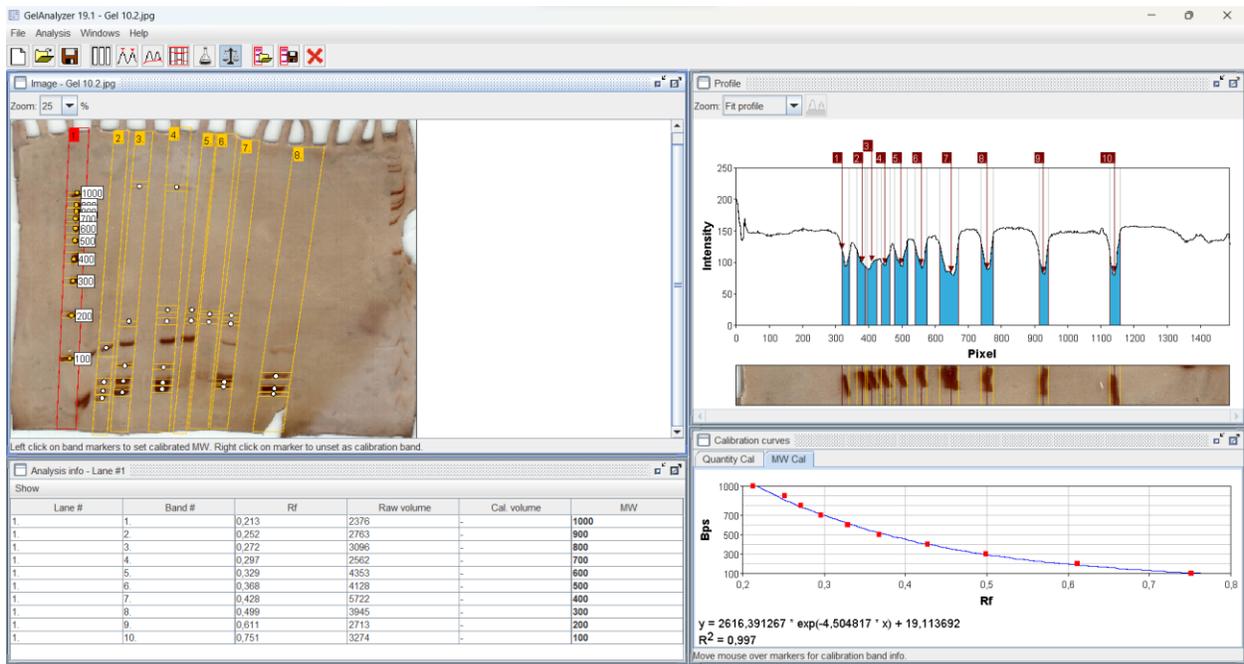


FIGURA 17. Ejemplo de geles y análisis de presencia ausencia de bandas utilizando el programa GenAnalyzer 19.1

ANEXO 7. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites utilizada para la caracterización genética.

CUADRO 10. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 7.

Muestra	Tamaño de banda							
	409	365	321	343	480	174	252	300
CG1	1	1	1	1	1	1	1	0
CG2	1	1	1	0	0	1	1	0
CG3	1	1	1	0	0	1	1	0
CG4	1	1	1	1	1	1	1	0
CG5	2	1	0	0	0	1	1	0
CG6	0	1	0	0	1	1	1	0
CG7	1	0	0	0	0	1	0	0
CG8	0	1	1	0	0	1	0	0
CG9	1	1	0	0	1	1	1	0
CG10	1	1	0	0	0	1	1	0
XG1	1	1	1	1	0	0	0	0
XG2	1	1	0	1	1	1	0	0
XG3	0	0	0	1	0	0	0	0
XG4	1	1	0	0	0	0	1	0
XG5	1	1	0	1	0	0	1	0
XG6	1	1	1	1	0	1	1	0
XG7	1	1	1	1	0	1	1	0
XG8	1	0	0	1	1	1	1	0
XG9	0	0	1	1	0	0	0	0
CR1	1	0	0	0	0	0	0	0
CR2	1	0	0	0	0	0	0	0
CR3	1	1	0	0	1	1	0	0
CR4	0	0	0	0	0	0	0	0
CR5	1	1	0	0	0	1	1	1
CR6	0	1	0	1	0	0	0	0
CR7	1	1	0	0	0	1	0	1

CUADRO 10. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 7 (continuación)

CR8	1	1	0	0	0	1	1	1
XR1	1	1	0	0	0	0	1	1
XR2	0	0	1	0	0	0	1	0
XR3	1	1	0	0	1	0	1	0
XR4	1	1	0	0	1	0	1	1
XR5	1	0	0	0	0	0	1	1
XR6	1	0	1	0	0	0	1	0
CX1	1	0	0	0	0	1	0	0
CX2	1	0	1	1	0	0	0	0
CX3	1	0	1	0	0	0	0	0
CX4	1	0	1	1	0	0	0	0
CX5	1	0	0	1	0	0	0	0
CX6	1	0	0	1	0	1	0	0
CX7	0	0	1	1	0	1	0	0
CX8	1	0	1	1	0	1	0	0
XX1	1	1	0	0	0	0	1	0
XX2	0	1	1	0	0	0	1	0
XX3	0	1	1	0	1	0	1	0
XX4	1	1	1	1	1	1	1	1
XX5	0	1	1	0	0	1	1	1
XX6	0	0	1	0	0	1	1	0
Sem1	1	1	1	1	1	1	0	0
Sem2	1	1	1	1	1	1	1	0
Sem3	1	1	0	1	1	0	1	0

CUADRO 11. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 8 (continuación)

XR2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
XR3	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XR4	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XR5	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XR6	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX2	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
CX3	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
CX4	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
CX5	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
CX6	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
CX7	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX8	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XX1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XX2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XX3	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
XX4	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
XX5	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
XX6	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Sem1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Sem2	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Sem3	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1

CUADRO 12. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 9 (continuación)

XR2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
XR3	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
XR4	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XR5	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XR6	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
CX2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
CX3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
CX4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
CX5	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
CX6	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
CX7	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX8	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XX1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XX2	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
XX3	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
XX4	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
XX5	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
XX6	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sem1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Sem2	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Sem3	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

CUADRO 13. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 15.

Muestra	Tamaño de banda											
	20	59	217	285	300-325	350	398	480	447	554	896	1043
CG1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
CG2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
CG3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
CG4	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
CG5	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
CG6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
CG7	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
CG8	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
CG9	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
CG10	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
XG1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
XG2	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
XG3	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
XG4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
XG5	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
XG6	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
XG7	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
XG8	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
XG9	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
CR1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CR2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
CR3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CR4	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
CR5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CR6	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
CR7	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
CR8	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1
XR1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1

CUADRO 13. Matriz de presencia/ausencia de tamaños de bandas de microsatélites para el marcador Ab 15 (continuación)

XR2	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
XR3	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
XR4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
XR5	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
XR6	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
CX1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
CX2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
CX3	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
CX4	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
CX5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
CX6	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
CX7	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
CX8	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
XX1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XX2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XX3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
XX4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
XX5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
XX6	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Sem1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
Sem2	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
Sem3	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0

Anexo 8. Resultados del Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) para tres morfotipos de *A. guatemalensis* utilizando 4 marcadores microsatélites.

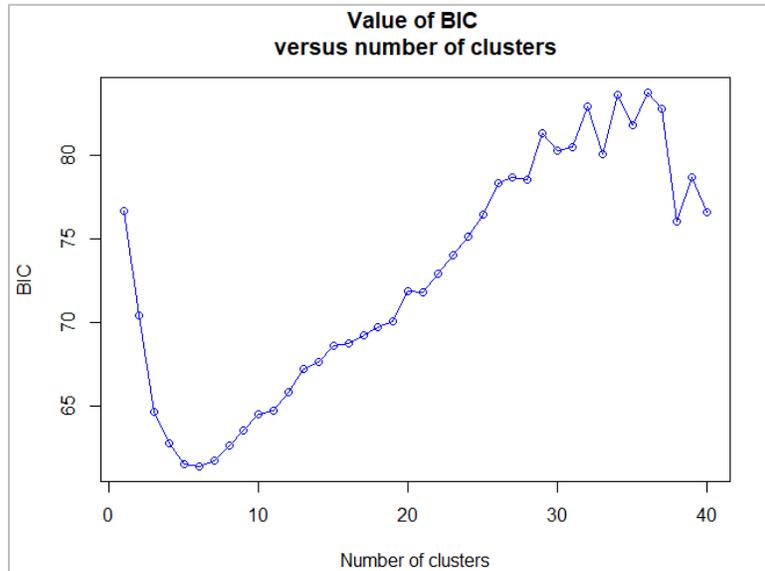


FIGURA 18. Curva de los criterios de información bayesianos (BIC) en el análisis del DAPC.

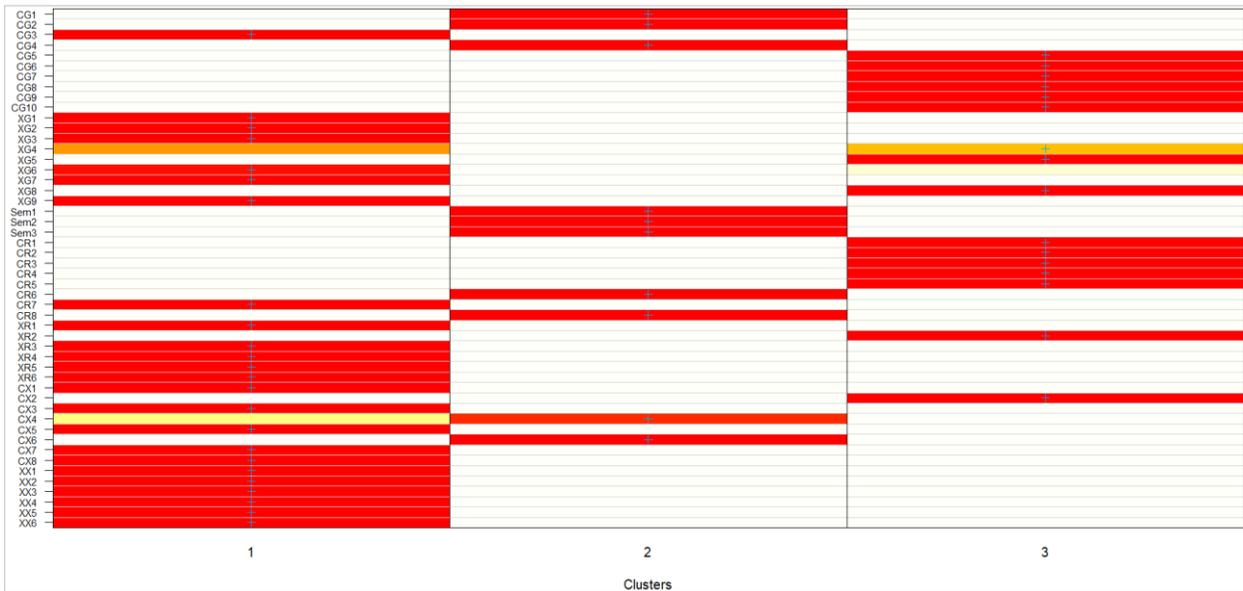


FIGURA 19. Gráfico que muestra las probabilidades de asignación de los individuos a los diferentes grupos del DAPC. *CG* Chichavac *guatemalensis*, *XG* Edén *guatemalensis*, *Sem* árboles semilleros, *CR* Chichavac religiosa, *XR* Edén religiosa, *CX* Chichavac híbridos, *XX* Edén híbridos.