

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE  
GUATEMALA

*Facultad de Ciencias y Humanidades*

**Diversidad genética del pino blanco (*Pinus  
ayacahuite* Ehrn.) en el bosque comunal de  
Totonicapán, Guatemala**

Guatemala

2004



**Diversidad genética del pino blanco (*Pinus ayacahuite* Ehrn.)  
en el bosque comunal de Totonicapán, Guatemala**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE  
GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

**Diversidad genética del pino blanco (*Pinus ayacahuite* Ehrn.)  
en el bosque comunal de Totonicapán, Guatemala**

SARA BETHSABE BARRIOS DE LEON

Trabajo de graduación presentado para optar al grado académico de  
Licenciada en Biología

Guatemala  
2004

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
Agradecimientos	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
I. Introducción	1
A. Antecedentes	2
1. Área de estudio	2
2. Descripción botánica de <i>Pinus ayacahuite</i> Ehrn.	5
3. Diversidad genética	8
1) Proteínas, enzimas e isoenzimas	9
2) Electroforesis en geles de almidón	10
B. Justificación	12
C. Objetivos	14
II. Métodos	15
A. Colecta de conos y obtención de semillas	15
B. Obtención de material para electroforesis	16
C. Enzimas y soluciones amortiguadoras utilizadas	17
D. Electroforesis	19
E. Interpretación de geles	19

F. Análisis estadístico	21
III. Resultados	23
A. Colecta de conos	23
1. Descripción de sitios e individuos	23
B. Puesta a punto de la técnica	25
C. Análisis de zimogramas y descripción de frecuencias alélicas obtenidas	26
1. Zimogramas obtenidos y análisis de los mismos	26
2. Índices de polimorfismo y frecuencias alélicas	31
3. Interpretación y evaluación estadística de las seis isoenzimas	34
4. Heterocigosis	35
5. Parámetros de diversidad genética	36
IV. Discusión	37
A. Colecta y manejo de conos y semillas	37
B. Puesta a punto de la técnica	37
C. Variabilidad genética	39
1. Análisis de isoenzimas de los gametofitos	39
a. Valores de P	40
2. Análisis de isoenzimas de los embriones	40
a. Valores de P	41

D. Diversidad genética	41
1. Gametofitos	41
2. Embriones	43
V. Conclusiones	44
VI. Recomendaciones	45
VII. Bibliografía	46
VIII. Glosario	51
IX. ANEXO A. Características del subgénero Haploxyton	54
X. ANEXO B. Sistemas enzimáticos utilizados	55
XI. ANEXO C. Fotografías de sitios de colecta	57
XII. ANEXO D. Fotografías de los patrones de bandas obtenidos para MDH, SKDH, IDH Y 6-PGD	59

## LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Características de localidades muestreadas	15
2. Condiciones de corrida de los sistemas enzimáticos utilizados	18
3. Alelos encontrados para ocho isoenzimas en gametofitos y embriones de <i>Pinus ayacahuite</i> Ehrn.	27
4. Frecuencias alélicas observadas para seis isoenzimas en los gametofitos de pino blanco ( <i>Pinus ayacahuite</i> ) en las seis localidades muestreadas y nivel de significancia de la prueba $\chi^2$ para la heterogeneidad de las mismas ( $p < 0.05$ )	31
5. Frecuencias alélicas observadas para seis isoenzimas en los embriones de pino blanco ( <i>Pinus ayacahuite</i> ) en las seis localidades muestreadas y nivel de significancia de la prueba $\chi^2$ para la heterogeneidad de las mismas ( $p < 0.05$ )	33
6. Diversidad genética ( $H_e$ ) de los gametofitos de <i>P. ayacahuite</i> en las seis localidades muestreadas y valores medios de heterocigosis esperada	35
7. Diversidad genética ( $H_e$ ) de los embriones de <i>P. ayacahuite</i> en las seis localidades muestreadas y valores medios de heterocigosis esperada	35

8. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 isoenzimas en gametofitos de pino blanco ( <i>Pinus ayacahuite</i> )	36
9. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 isoenzimas en embriones de pino blanco ( <i>Pinus ayacahuite</i> )	36
10. Características de las secciones Cembra y Paracembra	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Localización del bosque comunal en el departamento de Totonicapán, Guatemala	3
2. Distribución de <i>Pinus ayacahuite</i> en Mesoamérica (Perry 1991)	6
3. Departamentos de Guatemala en que se pueden encontrar poblaciones de <i>Pinus ayacahuite</i>	7
4. Colecta de 3 a 4 conos verdes en la parte alta de los árboles de <i>Pinus ayacahuite</i>	16
5. Secado de conos en invernadero	16
6. Obtención de material para electroforesis a partir de semillas de <i>Pinus ayacahuite</i> Ehrh.	17
7. Patrón de bandas para la enzima dimérica MDH	20
8. Interpretación de los patrones de bandas para individuos heterocigotos en enzimas monoméricas y diméricas	21
9. Zimograma para la enzima alcohol dehidrogenasa	28
10. Zimograma para la enzima isocitrato dehidrogenasa	28

11. Zimograma de la enzima aconitasa	29
12. Zimograma para la enzima 6-fosfogluconato dehidrogenasa	29
13. Zimograma para la enzima malato dehidrogenasa	30
14. Zimograma para la enzima sikimato dehidrogenasa	30
15. Sitio de muestreo S1 (Salvachán)	57
16. Sitio de muestreo S2 (Pacajá)	57
17. Sitio de muestreo S3 (Chuijolom)	57
18. Sitio de muestreo S4 (Chojolom)	58
19. Sitio de muestreo L2 (Chuipachec)	58
20. Sitio de muestreo L3 (Trojales)	58
21. Patrón de bandas para MDH	59
22. Patrón de bandas para 6-PGD	59
23. Patrón de bandas para SKDH	60
24. Patrón de bandas para IDH	60

## **AGRADECIMIENTOS**

Este estudio se llevó a cabo dentro del proyecto No. 09-01, de la línea FODECYT, financiado por el Consejo de Ciencia y Tecnología de Guatemala, CONCYT.

Agradezco a las siguientes instituciones y personas por su colaboración para la realización del presente estudio:

A la municipalidad del departamento de Totonicapán por permitir realizar la colecta en el bosque comunal de dicho departamento, así como por el apoyo brindado durante la misma.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, ICTA, por facilitar los invernaderos así como las instalaciones y equipo del Banco de Germoplasma para la realización del estudio.

Dra. Silvana Maselli de Sánchez, por su colaboración y apoyo durante el trabajo de laboratorio.

Al Ing. Federico Saquimux por su ayuda durante la colecta y por la información proporcionada durante el desarrollo de este estudio.

## RESUMEN

El bosque comunal de Totonicapán se encuentra ubicado en la Sierra María Tecún y es uno de los últimos reductos del pino blanco (*Pinus ayacahuite* Ehrn.) en el cual se puede encontrar una población extensa del mismo. Esta población de pino se ha conservado a través del tiempo debido al sentido de conservación tradicional de los pobladores del departamento de Totonicapán y a que es el mayor productor de agua del departamento. El pino ayacahuite no es una especie en peligro de extinción, pero sufre de fuertes presiones tanto humanas como climáticas, que pueden provocar su erosión genética. Debido a esto es importante llevar a cabo estudios que indiquen el estado de la salud genética de la especie.

Este estudio es el primero de este tipo que se realiza con esta especie en Guatemala, en él se determinó la diversidad genética y su distribución en el bosque comunal de Totonicapán. Para llevarlo a cabo se utilizó electroforesis de las enzimas ACON, 6-PGD, ADH, IDH, MDH y SKDH en geles de almidón al 9%. Como solución amortiguadora se utilizó Tris-citrato a pH 6.5 y 7.5. Los resultados obtenidos con esta técnica indican que la población de pino ayacahuite de este bosque posee altos índices de polimorfismo y que hay homogeneidad en la distribución de la diversidad genética. La heterocigosidad esperada (0.21-0.27) fue muy superior a la reportada para otras especies de pino (0.16), lo que indica que hay alta diversidad en el área y por lo tanto un buen flujo de genes.

### Palabras Clave

Diversidad genética, heterocigosidad, pino blanco, isoenzima, electroforesis, flujo de genes

## ABSTRACT

Totonicapán's communal forest is located in the María Tecún mountain range and is one of the last places in which is possible to find an extensive population of white pine (*Pinus ayacahuite* Ehrn.). This population of pine has remained across the time due to the sense of traditional conservation of the settlers of Totonicapán's department and to that is the major producer of water of the department. The pine ayacahuite is not a species in danger of extinction, but it suffers strong human and climatic pressures that can provoke it's genetic erosion. Because of that it is important to take studies that indicate the state of the genetic health of the species. This study is the first one of this type that is realized by the *Pinus ayacahuite* Ehrn. in Guatemala, we studied the genetic diversity and it's distribution in Totonicapán's communal forest. In this study there was used isozymes starch electrophoresis for ACON, 6-PGD, ADH, IDH, MDH and SKDH using starch gels at 9% of concentration. As buffer solution we used Tris-citrate pH 6.5 and 7.5. The results obtained with this skill indicate that the population of pine ayacahuite in this forest possesses high indexes of polymorphism and that there is homogeneity in the distribution of the genetic diversity. The obtained heterocigosity (0.21-0.27) was very superior to the reported for other kinds of pine (0.16), which indicates that there is high diversity in the area and therefore a good flow of genes.

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad Totoncapán es el área en donde se conservan los bosques de pino de tierras altas más extensos del país. La persistencia de éstos es notable, teniendo en cuenta que el aumento de la población, la expansión de la agricultura, la explotación forestal y la urbanización han destruido prácticamente todos los bosques densos del altiplano. Actualmente el país tiene una tasa de deforestación del 1.7% (82,000 hectáreas) anual, la cual es una de las más altas de Centro América (FAO 1997). Tanto el reconocimiento del valor económico y social de los bosques de pino blanco, que contribuyó a crear un patrón de uso forestal más conservador que en otras regiones del país, como la producción de agua para el consumo humano, son factores que han influido en dicha persistencia. Sin embargo, lo que fundamentalmente ha favorecido la conservación de estos bosques es la institución de los bosques comunales. Este tipo de organización ha permitido establecer un sistema de vigilancia de las comunidades sobre sus áreas de bosque, que ha impedido que éstas sean invadidas y taladas, como suele ocurrir en propiedad estatal o privada (Fundación Paz Verde 1996).

Cada una de las aldeas, cantones y parcialidades que comparten la propiedad del bosque comunal elige democráticamente un comité para la defensa del bosque. En Totoncapán se ha conservado el bosque comunal de una manera empírica, es decir, cuidando el bosque primario ya existente. Sin embargo, los pobladores de las distintas comunidades se han dado cuenta que este tipo de cuidado no es suficiente y están buscando implementar una forma adecuada de conservación del bosque, sin explotarlo económicamente, cuidando su diversidad genética. Es precisamente esta preocupación por conservar el bosque en óptimo estado, lo que incentivó la realización de este estudio, en el que se determinó la diversidad genética del pino blanco (*Pinus ayacahuite* Ehrn.) en el bosque comunal de Totoncapán.

La diversidad genética de una especie es la base de la capacidad de ésta para adaptarse a los cambios en su medio ambiente. Los recursos genéticos forestales de una región constituyen el pozo total de diversidad genética de ésta, es importante conservar en

buen estado estos recursos para sostener el valor productivo de los bosques así como la vitalidad y salud de los ecosistemas, ya que las poblaciones con poca variación son más vulnerables a las plagas, contaminación y cambios ambientales (URL e ICATA 1987).

El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones, a través del estudio de la cantidad y distribución geográfica de la variabilidad genética de una especie, tal y como se desarrolló en este estudio, puede ser aplicado directa e inmediatamente en conservación. En el caso de especies forestales, puede también utilizarse en los planes de manejo, mejora genética y reforestación. Con este estudio se determinó además de la diversidad genética en el *Pinus ayacahuite* del bosque comunal de Totonicapán, la distribución de la misma. La información generada puede ser utilizada por los pobladores de Totonicapán para priorizar áreas e implementar un adecuado plan de conservación genética del *Pinus ayacahuite* en el bosque comunal.

El pino blanco no está en peligro de extinción, ya que aún se pueden encontrar algunos bosques en otras áreas del país, como en Quetzaltenango y Zacapa por ejemplo (Donahue *et al.* 1991). A pesar de esto, la fragmentación de sus poblaciones y el mal uso de las mismas pueden provocar erosión genética. Es por eso también que el estudio de la estructura genética de las poblaciones es indispensable también para frenar la erosión de los genes de la especie.

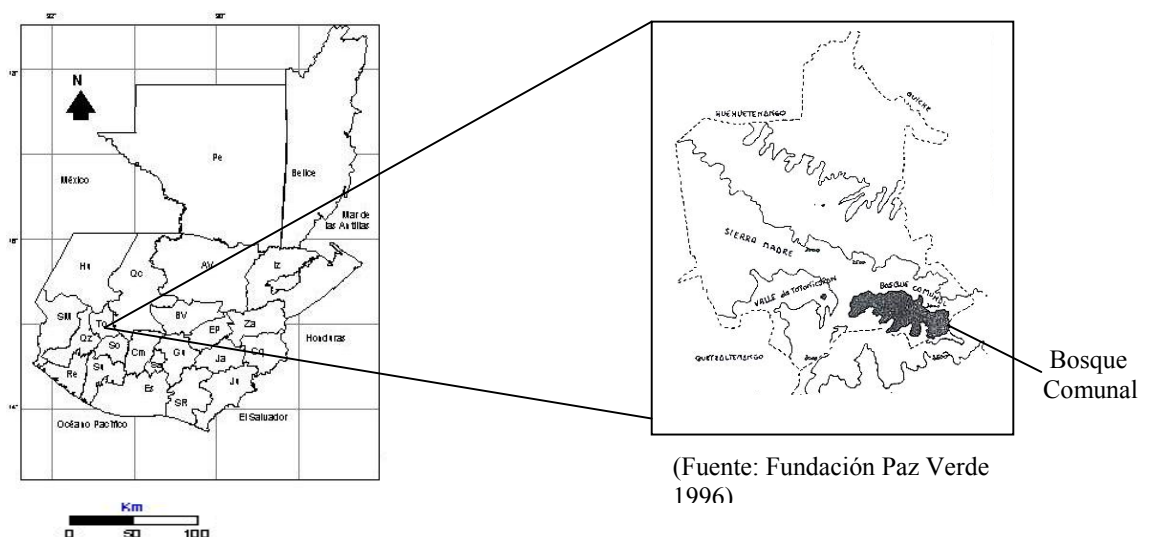
## **A. Antecedentes**

**1. Área de estudio.** El departamento de Totonicapán está situado en el altiplano occidental de Guatemala, en las estribaciones montañosas de la Sierra Madre, llamada Sierra María Tecún. Tiene 1,061 Km<sup>2</sup> de extensión y en 1996 se reportaron 204,419 habitantes, siendo uno de los más densamente poblados del país (265 habitantes/Km<sup>2</sup>). Su red hidrográfica está formada por la cabecera del río Samalá y el curso alto del río Chixoy. Su economía se basa en la agricultura (cereales, hortalizas y frutales) y ganado lanar. Aunque hay una pequeña industria (textil de algodón y lana, serrerías, fabricación

de muebles y alfarería), ésta es de poca importancia en el ingreso económico de la población (Fundación Paz Verde 1996).

En la Sierra María Tecún, a partir de los 3,000 m SNM se encuentra el Bosque Comunal de Totonicapán (figura 1), que tiene una extensión de 211.73 Km<sup>2</sup>, de los cuales entre 150 Km<sup>2</sup> y 160 Km<sup>2</sup> se encuentran en buen estado de conservación. Éste es el reducto más importante de este tipo de bosque en el país. El clima de la sierra no presenta una variación estacional muy marcada, siendo los días cálidos y soleados y las noches frías con temperaturas que pueden bajar hasta  $-4^{\circ}\text{C}$ . Su estación lluviosa va de mayo a octubre y la estación seca abarca los meses de noviembre a abril. La precipitación media es de 1,000 mm anuales aumentando en los puntos de mayor altura, en la parte occidental de la cordillera (Fundación Paz Verde 1996). Los suelos de las laderas de la montaña son de origen volcánico y tienen una capa orgánica muy delgada de composición arcillosa y estructura compacta. En el fondo del valle los suelos aluviales son de origen cuaternario, de piedra pómez, éstos constituyen uno de los suelos más fértiles de todo el altiplano guatemalteco (Fundación Paz Verde 1996).

**Figura 1. Localización del Bosque Comunal en el departamento de Totonicapán, Guatemala.**



(Fuente: Centro de mapeo MERTU, Universidad del Valle de Guatemala)

La vegetación de estas montañas fue originalmente de bosque templado, pero actualmente ésta sólo puede verse en el bosque comunal ya que en el resto del departamento ha sido transformada por la agricultura y los asentamientos humanos. En el bosque comunal pueden distinguirse dos pisos altitudinales: montano y subalpino. El piso montano está compuesto por latifoliadas mixtas, dominando los robles, que han sido paulatinamente sustituidos por matorrales y pinos, que se han adaptado a las condiciones poco profundas del terreno.

El piso superior o subalpino es dominado por coníferas resistentes a las bajas temperaturas siendo las más importantes el pino blanco y el pinabete. La composición del bosque en sus partes altas está bien conservada y en algunos lugares se puede encontrar bosque clímax que representa un estado óptimo de la vegetación natural (Fundación Paz Verde 1996).

El sentido de conservación en este departamento es ejemplar y la ley forestal tradicional de sus ciudadanos, que proviene de la época precolombina, dicta que cada familia puede aprovechar anualmente únicamente dos árboles de sus bosques comunales. La desventaja de esta costumbre está en el aprovechamiento selectivo, ya que los habitantes han elegido los mejores árboles (de fuste recto, gran altura, etc.) provocando empobrecimiento genético (Mittak 1977).

Un estudio hecho en 1981 en el municipio de San Francisco el Alto, Totonicapán (Romero 1981), muestra que el uso más frecuente de la madera es como combustible en forma de leña, que sirve tanto para la cocción de los alimentos como para la calefacción del hogar. En este municipio se reportó que el 81.85% de la leña consumida proviene de los pinos, de los cuales el 64.49% son sacados del bosque comunal, mientras que únicamente el 18.48% proviene de los bosques propios y el 17.2% de bosques aledaños a la población. Esto hace evidente la importancia del bosque comunal en la economía familiar de los habitantes de este municipio (Romero 1981).

**2. Descripción de *Pinus ayacahuite* Ehrn.** El pino ayacahuite, pino blanco mexicano, pinabete o acalorote, pertenece al género *Pinus*, subgénero *Haploxylon* (pinos de madera suave), sección *Cembra* (Perry 1991). La comparación entre secciones puede encontrarse en el anexo 1.

Ordinariamente presenta una altura de 20 a 35 metros, llegando a veces hasta los 45 metros o más (Aguilar 1961). Su tronco es monopodial, recto y cilíndrico cuando crece en bosques poco densos. La corteza es de color gris, relativamente lisa en árboles jóvenes mientras que en los adultos es rugosa y está dividida en escamas pequeñas y rectangulares, color café grisáceo (Farjon y Styles 1997); observándose verdoso-blanquecina en los retoños y cogollos. La corteza joven se puede desprender fácilmente en grandes tiras (Aguilar 1961). La madera es suave de haces rectos, flexible, de color blanco amarillenta, no muy resinosa y muy fácil de trabajar (Aguilar 1961; Perry 1991). Su ramaje es verticilado, ascendente, horizontal, con la cualidad de emitir retoños por corte en las ramas o en el tronco joven (Aguilar 1961). La copa es piramidal o cónica, con ramas que bajan hasta  $\frac{2}{3}$  ó  $\frac{3}{4}$  de la altura del árbol. Presenta hojas en fascículos de 5, raramente de 6, en ramilletes densos y laxos que llegan hasta el final de las últimas ramas, persistiendo durante 2 ó 3 años (Farjon y Styles 1997). Las agujas son color verde azulado, de sección triangular, aserradas, de 10 a 20 cm de largo por 0.8 a 0.9 mm de espesor. En fascículos jóvenes se pueden encontrar vainas deciduas de 1.8 a 2 cm de longitud. Los conos masculinos coronan la terminación proximal de los retoños, siendo ovoides o cilíndricos, de 7 a 10 mm de largo, de color que va desde amarillo hasta anaranjado (Farjon y Styles 1997). Los conos femeninos se encuentran repartidos en el ramaje, solitarios, en pares o tríos, deciduos, colgantes, pueden ser rectos o curvados de forma oblongo-elongada, de 10 a 45 cm de longitud por 7 a 11 cm de diámetro, su color va desde amarillo pálido hasta castaño rojizo, muy resinosos; con escamas de 4.2 a 5.3 cm de longitud por 1.9 a 2.2 cm de ancho (Aguilar 1961), con pedúnculos leñosos que usualmente caen con el cono. Los conos inmaduros son elípticos o cilíndricos, rectos o curvos, morados y se encuentran en la punta de las ramas nuevas. Las semillas se encuentran en pares en la base de las escamas. Son ovales y ligeramente comprimidas lateralmente de 8-15 mm X 6-9 mm, usualmente de color café con manchas negras

(Farjon y Styles 1997), las alas de las semillas son largas y oblicuas con un lado curvo, de color café claro con estriaciones oscuras o café oscuro, con 11-13 cotiledones; aunque en Guatemala presentan 7 cotiledones (Aguilar 1961; Perry 1991).

La dispersión y germinación de semillas del pino ayacahuite ocurre durante los meses de octubre y noviembre. En enero los árboles jóvenes miden de 70 a 100 mm, pero a partir de abril el crecimiento se hace más lento y al final del primer año, los árboles jóvenes no miden más de 300 mm. Esto los hace vulnerables a daño por fuego o por animales. El crecimiento lento es el motivo por el cual hay poco aprovechamiento de árboles criados artificialmente, ya que son necesarios por lo menos 60 años para que un árbol llegue a tener un tamaño en que pueda ser aprovechado comercialmente, para tablonés de construcción o en la fabricación de muebles (Donahue *et al.* 1991).

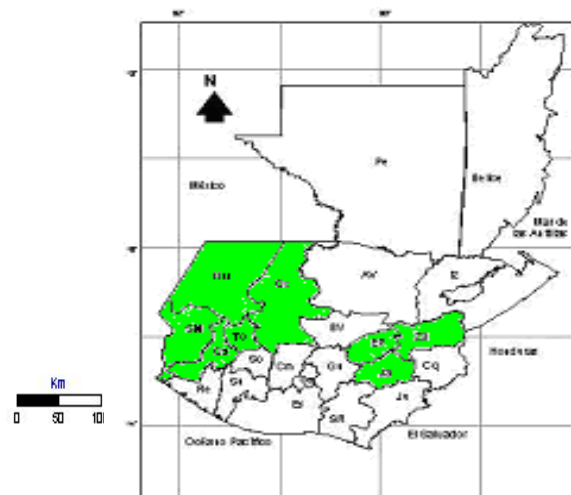
Esta especie se encuentra en el sur de México, Guatemala, El Salvador y Honduras (figura 2), a elevaciones de 1,800 a 3,200 m SNM, pero se encuentra con mayor frecuencia entre los 2,100 y 3,000 m SNM. El rango geográfico para este taxón va desde los 14° hasta los 21° latitud norte y 86° a 101° latitud oeste (figura 2).

**Figura 2. Distribución de *Pinus ayacahuite* en Mesoamérica** (Tomado de Perry 1991).



Según Donahue (1991) en Guatemala el pino ayacahuite se puede encontrar en los departamentos de Huehuetenango, Totonicapán, Quiché, San Marcos, Quetzaltenango, Jalapa, El Progreso y Zacapa (figura 3). Esta especie está restringida a climas fríos y húmedos, requiere de un promedio de 1,200 mm anuales de lluvia y en muchos sitios recibe humedad adicional (de la niebla y rocío) durante la época seca (Donahue *et al.* 1991).

**Figura 3. Departamentos de Guatemala en que se pueden encontrar poblaciones de *Pinus ayacahuite*** (Mapa elaborado por Sara Barrios basada en Donahue *et al.* 1991)



El *Pinus ayacahuite* crece en suelos bien drenados y fértiles, originalmente crecía en prados de tierras altas, pero actualmente su área se ha restringido a cañones rocosos y reductos de subsistencia, ya que los agricultores utilizan las mejores tierras para sus cultivos (Donahue *et al.* 1991). Es raro encontrar áreas grandes donde el pino ayacahuite crezca solo, aunque hay algunas en Chuipachec (Totonicapán), comúnmente esta especie crece asociada con otras coníferas como *Pinus tecunumanii*, *P. pseudostrobus*, *P. rudis*, *Abies guatemalensis* y *Cupressus lusitánica* (Donahue *et al.* 1991).

Debido a que su madera es suave y moldeable, esta especie es utilizada en ebanistería, decoración de interiores, juguetes, artesanías, postes, chapas, encofrados,

papel, muebles finos, etc. También se extrae la resina para la fabricación de aguarrás, ocote y la corteza es utilizada en la curtiembre (Méndez 2002).

**3. Diversidad genética.** El pino blanco, al igual que el resto de organismos, posee características que lo hacen único, estas características son determinadas por un código interno irreplicable que puede ser heredado de padres a hijos. Este código puede sufrir algunas variaciones, pero la mayor parte de su información es conservada a través del tiempo y conforma la genética de la especie.

La diversidad genética de una especie es el resultado de miles de años de selección natural, permite a las poblaciones de plantas y animales permanecer saludables y les da la capacidad de adaptarse a los cambios que suceden en su entorno. En el caso de especies forestales y plantas leñosas, la diversidad genética es necesaria para mantener el potencial de aprovechamiento humano, podría decirse entonces, que la capacidad de los árboles forestales para proveer de bienes y servicios depende del mantenimiento y manejo de sus recursos genéticos. Durante mucho tiempo la diversidad genética no fue estudiada adecuadamente debido a las limitaciones humanas de tiempo, ya que una persona no puede vivir el tiempo suficiente para estudiar cambios en las especies. Esta limitación ha sido superada gracias al descubrimiento de la relación existente entre la herencia y el ADN, lo que ha llevado al desarrollo de técnicas moleculares que permitan hacer estudios genéticos (Halfiter y Ezcurra 2000).

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos, el ADN lleva la información específica para el desarrollo, diferenciación y funcionamiento de los organismos. También es el componente de los genes (unidades de ADN que controlan los caracteres hereditarios) algunos de los cuales (genes estructurales) son los encargados de codificar la información para la síntesis de las proteínas. Los mismos genes se encuentran presentes prácticamente en todas las células nucleadas del organismo, sin embargo, diferentes genes entran en actividad en diferentes etapas del desarrollo (Gardner 1985). Cada secuencia única de

bases del ADN (gen) es traducida en la correspondiente secuencia lineal de aminoácidos, la cual constituye una cadena polipeptídica, capaz de plegarse para constituir las proteínas (Yanofsky 1971). La disposición correcta de la cadena de aminoácidos de una proteína es la tarea principal de los genes en la reproducción y herencia. Cada proteína tiene funciones que dependen de su estructura molecular (Yanofsky 1971).

**1) Proteínas, enzimas e isoenzimas.** Las proteínas son polímeros de aminoácidos. Cada proteína consiste en una o más cadenas polipeptídicas (cadena lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos) que se doblan o pliegan para formar una macromolécula de conformación específica en forma tridimensional, de la cual depende la función de la proteína.

Las enzimas son proteínas que actúan en secuencias organizadas acelerando la velocidad de reacciones en las cuales los nutrientes son degradados y se forman macromoléculas a partir de simples precursores, mientras la energía química es conservada y transformada (Lehninger *et al.* 1993). Las enzimas tienen la capacidad de unirse a sustratos específicos y luego separarse del producto de la misma sin sufrir alteraciones. Debido a su estructura proteica las enzimas pueden variar considerablemente en su estructura sin alterar su actividad. Varias enzimas pueden realizar la misma función, pero tener estructuras moleculares (configuraciones) distintas. Cuando estas enzimas se encuentran en la misma célula, son llamadas isoenzimas (Goss 1973). La formación de isoenzimas envuelve alteraciones en la porción de la proteína que no está directamente asociada con su función enzimática (Goss 1973). Quizás una de las propiedades más significativas de las isoenzimas es que son capaces de reflejar directamente alteraciones en la secuencia del ADN a través de cambios en la composición de los aminoácidos que las conforman. Estos cambios frecuentemente alteran su carga o conformación produciendo un cambio en su movilidad electroforética (Weeden 1989).

Aunque la genética bioquímica ha sido conocida y utilizada por varios años, su aplicación como una herramienta para el estudio de la genética de poblaciones inició hace más o menos 20 años con el desarrollo de las técnicas de electroforesis en gel. Estas

técnicas permiten el estudio de diferentes proteínas sintetizadas bajo el control del ADN (Yndgaard e Ilosjuldsson 1985). Básicamente la electroforesis es una técnica que separa moléculas por su movilidad diferencial a través de un solvente en un campo eléctrico (Becerra y Paredes 2000).

## **2) Electroforesis en geles de almidón (SGE, por sus siglas en inglés).**

Con el avance tecnológico ocurrido en los años 70, el uso de geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas, se demostró la existencia de las isoenzimas. El efecto de una modificación alélica puede ser detectado con certeza, debido a un cambio de movilidad electroforética. Esta sensibilidad electroforética hizo que la técnica haya revolucionado los estudios de diversidad genética en diversas especies (Becerra y Paredes 2000).

La electroforesis en gel (de almidón o poliacrilamida) ha provisto a los investigadores de las herramientas necesarias para detectar la sustitución de hasta un aminoácido en las proteínas (Wallace 1981). Estas diferencias son reveladas cuando los extractos crudos de tejido son sometidos a electroforesis y luego teñidos. El almidón ha sido, durante los últimos 25 años, el medio más utilizado para este tipo de análisis debido a que presenta ventajas tales como bajo costo, facilidad de manejo, buena resolución y la no toxicidad del mismo. Otros medios presentan ventajas como cortos períodos de corrimiento y la capacidad de separar por peso molecular, pero la dificultad de su manejo y toxicidad los hacen medios menos utilizables para el estudio de variabilidad aloenzimática en poblaciones (May 1998).

La SGE consiste en la separación de las enzimas del extracto crudo, en un soporte permeable (almidón o poliacrilamida) bajo la acción de un campo eléctrico seguido de un teñido histoquímico. La separación se realiza mediante la carga eléctrica neta, peso molecular, punto isoeléctrico y/o combinación de estos criterios (separación multidimensional). De este modo se separan enzimas codificadas por genes diferentes o productos de diferentes alelos de un mismo gen (Becerra y Paredes 2000). Aloenzimas (diferentes alelos en un mismo locus) e isoenzimas (distintas formas de una enzima producidas por distintos loci) migran a diferentes velocidades cuando se les aplica, a los

extractos colocados en un gel, una corriente directa y una solución amortiguadora determinadas. La migración de las enzimas en los geles y su separación resulta de la interacción de la corriente eléctrica, pH del gel y pH del electrodo de la cubeta o cámara de electroforesis. La dirección hacia el ánodo o cátodo y la velocidad de migración de las enzimas dependen de su carga eléctrica (Conckle *et al.* 1982).

Las principales características de las isoenzimas incluyen la simplicidad de la técnica, mínima cantidad del material en estudio, bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 loci por especie, ausencia de epistasis e influencias ambientales. La expresión alélica es de tipo codominante, lo que permite establecer comparaciones entre especies y poblaciones de una misma especie (Becerra y Paredes 2000).

Entre sus desventajas se puede incluir el bajo nivel de polimorfismo, especialmente cuando la base genética es estrecha (Becerra y Paredes 2000). Otro aspecto a considerar es que las proteínas pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales. Para aumentar la eficiencia de la técnica ante este factor, deben ser identificados los estados de desarrollo de la planta durante los cuales la proteína es estable. Además, al igual que con las proteínas de reserva, las isoenzimas pueden o no reflejar los cambios genéticos que ocurren en el ADN, además sólo parte del genoma puede ser evaluado debido a que sólo un grupo de genes estructurales están representados en este tipo de proteínas (Becerra y Paredes 2000).

La electroforesis de proteínas se ha vuelto una herramienta estándar y poderosa que permite al investigador examinar a los miembros individuales de una población para detectar diferencias genéticas de los loci individuales que puedan haber (Wallace 1981). Prácticamente cualquier parte de la planta (hojas, tallos, semillas, raíces) puede ser utilizado para electroforesis (Wendel y Weeden 1989). En coníferas las semillas son excelente material para estudios con electroforesis debido a que se pueden trabajar tanto tejidos haploides como diploides (Conckle *et al.* 1982). El endospermo de estas semillas es haploide, así que la electroforesis de este tejido resuelve alelos idénticos a los del gameto femenino de la semilla mientras que la electroforesis de los embriones resuelve la parte diploide de la semilla, por lo tanto la contribución del polen a cada embrión puede ser deducida por la sustracción de los alelos del gametofito del par de alelos del embrión

(Conckle *et al.* 1982). Se necesitan varios sistemas de geles para analizar el número máximo de enzimas. Después de que los geles han sido expuestos a corriente eléctrica son rodajados y teñidos. Las soluciones de tinción que se agregan a las diferentes capas de gel contienen sustratos específicos y las enzimas actúan con éstos para formar productos de reacción que son la base del proceso de teñido. El lugar de las bandas visibles en los geles marca las distancias de migración de enzimas específicas y diferentes bandas en un gel representan a las moléculas funcionalmente emparentadas que difieren en carga eléctrica (isoenzimas) (Conckle *et al.* 1982).

La electroforesis es una técnica de uso común en la genética bioquímica ya que puede facilitar información precisa acerca de la identidad y variabilidad de la o las poblaciones estudiadas. La ventaja de esta técnica en la descripción e investigación de las poblaciones es que la estructura genética de los individuos, a diferencia de su fenotipo, no se ve afectada por el ambiente en que éste se desarrolla. Dos individuos fenotípicamente distintos pueden tener una estructura genética idéntica, por lo tanto, los resultados obtenidos de una electroforesis son indicadores exactos de la salud genética de una población.

## **B. Justificación**

Generalmente las expresiones ecologistas y conservacionistas se refieren a diversidad en especies, pero ésta también existe dentro de las especies ya que la presencia de distintos alelos para cada gen es la fuente de materia prima para el proceso evolutivo (Halffter y Escurra 2000). Según Hamrick, en una especie puede encontrarse mucha o poca variabilidad genética, la cual es medida según la cantidad de alelos diferentes que ésta posea y los caracteres que éstos expresen. Esta diversidad depende de la historia evolutiva de la especie, del nivel de endogamia en la población, su aislamiento reproductivo y de la selección natural. La supervivencia y capacidad de adaptación de las especies frecuentemente están condicionadas por el mantenimiento de la variabilidad genética que les permita cambiar con su entorno (Halffter y Escurra 2000). Por esto

reviste especial importancia el conocimiento del estado en que se encuentra la variabilidad genética dentro de especies que, aunque no estén en peligro de extinción, se enfrentan a una fuerte presión debida a la reducción del tamaño de sus poblaciones y al poco flujo genético que puede darse entre ellas.

Los bosques son los más importantes depositarios de diversidad biológica terrestre, los árboles y plantas leñosas ayudan a mantener la vida de un gran número de otros organismos. Debido a que son de larga vida, generalmente altamente heterocigotos y se deben adaptar distintas condiciones climáticas, muchos árboles forestales han desarrollado mecanismos complejos para mantener una alta diversidad interespecífica.

Para el pino blanco (*Pinus ayacahuite*), como para todas las coníferas, se ha reportado un alto grado de intercambio genético, ya que el aire puede dispersar el polen a grandes distancias. Pero debido a la fuerte depredación a la que se ve sometida la especie y al poco o ningún manejo forestal de sus poblaciones puede estar sufriendo erosión genética.

El bosque comunal de Totonicapán es uno de los últimos sitios donde se puede encontrar una población extensa de pino blanco. Se ha logrado conservar gracias a los esfuerzos llevados a cabo por los pobladores de ese departamento ya que es el parte aguas de las cuencas del departamento de Totonicapán. Sin embargo la mayor parte de los árboles que se pueden ver en este bosque miden más de 20 metros, lo cual sugiere que tienen más de 40 años, y son viejos. Esto sumado a la poca cantidad de brinzales y árboles jóvenes observados, sugiere que no se está dando una efectiva regeneración natural. La municipalidad de Totonicapán tiene un vivero para la reproducción de la especie. Sin embargo este esfuerzo podría causar regeneración selectiva, pues no se ha implementado un plan de conservación o manejo específico y al recoger semilla lo hacen escogiendo los árboles que se ven más saludables sin tener en cuenta las diferencias genéticas de los mismos (Saquimux<sup>1</sup>, conversación personal). Esto se debe, en parte, a la práctica forestal tradicional y en parte al desconocimiento de la composición genética del

---

<sup>1</sup> Ing. Federico Saquimux, ICTA, Gestión y Mercadeo, enero 2003

bosque comunal. Debido a que el bosque es una fuente de leña y el principal productor de agua potable para las comunidades de Totonicapán, es importante mantenerlo saludable ya que su decaimiento o desaparición por cambios en el medio, provocarían graves problemas de abastecimiento de agua para la población.

Con este estudio se determinó, además de la diversidad genética presente en el *Pinus ayacahuite* del bosque comunal de Totonicapán, la distribución de la misma; esto es importante para tener un indicador del potencial de este bosque tanto para evolucionar y adaptarse a los constantes cambios en el ambiente, como para ser aprovechada para llenar las crecientes necesidades humanas. Esta información puede ser empleada de manera inmediata por las comunidades, autoridades municipales, o por el Instituto Nacional de Bosques (INAB), como base para llevar a cabo actividades de desarrollo de planes de manejo forestal que incluyan la conservación de la diversidad genética presente en el bosque y la selección de semillas para la mejora genética o reforestación. El estudio de la estructura genética del pino blanco, empleando electroforesis de isoenzimas es el primero que se hace con esta especie en Guatemala y, por lo tanto, la información que se obtenga podrá servir como base para futuras investigaciones.

## **C. Objetivos**

**1. General.** Estudiar la diversidad genética del *Pinus ayacahuite* en el bosque comunal de Totonicapán.

### **2. Específicos**

- Determinar cuánta diversidad genética existe en el *Pinus ayacahuite* del bosque comunal de Totonicapán y cómo está distribuida.
- Generar información sobre la estructura genética del *Pinus ayacahuite* del bosque comunal de Totonicapán, que pueda contribuir a establecer planes de manejo y conservación de la especie en Guatemala.

## II. MÉTODOS

### A. Colecta de conos y obtención de semillas

Se realizaron dos viajes de campo al bosque comunal de Totonicapán. El primero con el objetivo de establecer los sitios de muestreo y el segundo para realizar la colecta de conos. Los sitios fueron seleccionados en base a diferencias de altura sobre el nivel del mar. Las muestras fueron tomadas cubriendo un rango altitudinal que va desde los 2,800 m SNM hasta los 3,200 m SNM (cuadro 1), abarcando tanto áreas de bosque primario como de secundario. Los árboles a muestrear debían estar separados entre 100 y 200 metros, según lo recomendado tanto para coníferas (Puglisi *et al.* 1999) como para estudios de diversidad genética. Para realizar la colecta de conos fueron contratadas cuatro personas para que se subieran a los árboles y bajaran 3 ó 4 conos verdes de cada uno de ellos (Figura 4). Estos conos fueron colocados en bolsas plásticas debidamente etiquetadas y llevados al sitio en donde se trabajaron. En total se colectaron conos de 85 árboles distintos. Para llevar a cabo la colecta de conos, y por razones de acceso para el personal que la llevó a cabo, los sitios de colecta fueron agrupados dentro del bosque comunal en dos rodales. Estos rodales fueron únicamente una división técnica, pero no geográfica. Al rodal 1 pertenecen las localidades S4 y L2 (cuadro 1) y al rodal 2 pertenecen el resto de las localidades (S1, S2, S3 y L3) (cuadro 1).

**Cuadro 1. Características de localidades muestreadas**

Código	Lugar	No. de individuos muestreados	Latitud	Longitud	Elevación (m SNM)
S1	Salvachán	11	14°54'	91°18'	3000-3100
S2	Pacajá	11	14°54'	91°17' - 91°18'	3150-3250
S3	Chuijolom	10	14°54'	91°18' - 91°19'	3166-3250
S4	Chojolom	11	14°54' - 14°55'	91°19'	3075-3200
L2	Chuipacec	29	14°54' - 14°55'	91°19' - 91°20'	2815-2900
L3	Trojales	13	14°53' - 14°54'	91°16' - 91°7'	3187-3300

Coordenadas medidas con un GPS marca GARMIN modelo GPS II Plus

Los conos fueron secados a la sombra en el invernadero del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) (figura 5), se les tomaron medidas de largo total y ancho. Cuando los conos estuvieron secos y abiertos, se golpearon para que soltaran todas las semillas. Estas semillas fueron colocadas en frascos de vidrio etiquetados, deshidratadas hasta un 7% de humedad y se almacenadas a 5°C en la cámara fría del Banco de Germoplasma del ICTA para su posterior empleo.

**Figura 4. Colecta de 3 ó 4 conos verdes en la parte más alta de los árboles de *P. ayacahuite***



**Figura 5. Secado de conos en invernadero**

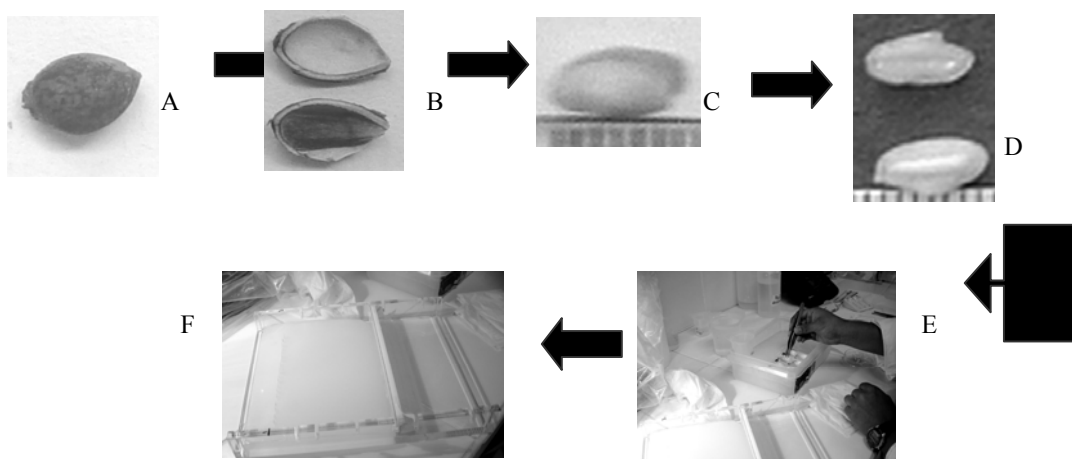


## **B. Obtención de material para la electroforesis en geles de almidón**

De cada árbol se tomaron dos semillas de conos diferentes. De cada semilla se emplearon tanto el gametofito como el embrión. Las semillas presentaban una cubierta dura o testa, que se deriva del integumento del megasporangio (Mirov 1967). Esta cubierta protege a los tejidos internos de daños externos y desecación. A cada semilla se le removió esta cubierta utilizando un bisturí y con la ayuda de un estereoscopio (marca Baush and Lomb, modelo ASZ45L3) y estiletes entomológicos, se le separó el tejido café que cubre el gametofito. Las semillas en este estado se colocaron en cajas Petri con papel filtro (Whatman # 3) humedecido con agua destilada. Las cajas se colocaron en el refrigerador (4°C) durante una noche. De esta manera se logró la hidratación de los tejidos. El día de la corrida se sacaban las semillas del refrigerador, se partían y removían los embriones.

Después de llevar a cabo la disección, los tejidos se colocaron en morteros de porcelana con solución amortiguadora de extracción (fosfato 0.2 M, pH 7.5 reportado por Conckle 1982). Para el gametofito se utilizaron 20 microlitros de solución y para el embrión se utilizaron 10 microlitros. Las muestras fueron maceradas para obtener los extractos que se absorbieron en trocitos de papel filtro Whatman No. 3 de 120 x 4 mm que luego se colocaron en los geles trabajados (figura 6).

**Figura 6. Obtención de material para electroforesis a partir de semillas de *Pinus ayacahuite* Ehrn. A) Semilla intacta, B) Semilla partida mostrando el tejido que recubre al gametofito, C) gametofito desnudo, D) gametofito partido por la mitad, se puede observar en la parte inferior el embrión, E) maceración de embriones gametofitos F) muestras colocadas en un gel de almidón.**



### C. Enzimas y soluciones amortiguadoras utilizadas en la electroforesis

Los sistemas enzimáticos utilizados fueron: alcohol deshidrogenasa (ADH), aconitasa (ACO), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH) y sikimato deshidrogenasa (SKDH) para ver el listado completo de ingredientes refiérase al anexo 1. En el cuadro 2 se pueden observar las condiciones de corrida de cada uno de los sistemas enzimáticos mencionados anteriormente.

**Cuadro 2. Condiciones de corrida de los sistemas enzimáticos. Se utilizó gel de almidón al 9% y 65 mamp de voltaje durante cuatro horas (modificado de Conckle *et al.* 1982).**

<b>Enzima</b>	<b>Solución amortiguadora del gel y la cubeta</b>
Alcohol dehidrogenasa (ADH)	Tris-citrato (pH 6.5)
Aconitasa (ACO)	Tris citrato (pH 6.5)
6-fosfogluconato dehidrogenasa (6PGD)	Tris citrato (pH 7.5)
Malato dehidrogenasa (MDH)	Tris citrato (pH 6.5)
Isocitrato dehidrogenasa (IDH)	Tris citrato (pH 7.5)
Sikimato dehidrogenasa (SKDH)	Tris citrato (pH 7.5)

#### **ADH (Alcohol dehidrogenasa)**

Enzima dimérica, presente en el citosol, interviene en los procesos de fermentación (Kephart 1990).

#### **IDH (Isocitrato dehidrogenasa)**

Enzima dimérica presente en el citosol y plastidios. Interviene en el ciclo del ácido cítrico, mediante la oxidación del ácido isocítrico (Kephart 1990). En la mayoría de las plantas presenta una sola zona de actividad.

#### **ACON (Aconitasa)**

Enzima monomérica presente en el citosol y en las mitocondrias, interviene en el ciclo del ácido cítrico (Kephart 1991).

#### **6-PGD (6-fosfogluconato dehidrogenasa)**

Enzima dimérica presente en el citosol y plastidios. Interviene en la ruta de la fosfato-pentosa (Kephart 1990).

**MDH (Malato dehidrogenasa)**

Enzima dimérica presente en el citosol, mitocondrias y micro orgánulos, interviene en el ciclo de Krebs, en la fotorrespiración y en la fotosíntesis de plantas C-4 (Kephart 1990).

**SKDH (Sikimato dehidrogenasa)**

Enzima monomérica presente en el citosol y plastidios, participa en la síntesis de compuestos aromáticos (Kephart 1990).

**D. Electroforesis**

Se utilizaron geles de almidón de papa para separar las enzimas. Los geles se prepararon siguiendo el protocolo de Conckle 1982 con las siguientes modificaciones: se utilizó solución de almidón al 9%, la cual se dejó gelificar a temperatura ambiente durante toda la noche, cubierta con una hoja de acetato. Para cargar el gel, se cortó una ranura a 3-4 cm de uno de sus extremos y en ella se colocaron los trozos de papel filtro empapados en extracto. Luego se colocó el gel en una cámara de electroforesis marca Fischer modelo FB-SB—2025, dejando la ranura con las muestras en el lado positivo (cátodo) de la cámara. Los tanques de la cámara se llenaron con la solución amortiguadora de corrida. La corrida se realizó a 4°C.

Una vez terminada la corrida, los geles fueron cortados en capas de 1 mm de espesor, estas capas se colocaron en bandejas de tinción y se les agregaron los diferentes reactivos requeridos para la resolución de cada sistema enzimático (Anexo B) Posteriormente las bandejas se colocaron a 37°C en un horno (marca Lab Line modelo Imperial V) durante tres a cuatro horas. Al aparecer bandas teñidas de azul se procedió a tomar una fotografía de cada sistema enzimático revelado y a dibujar los patrones de bandas obtenidos (zimogramas).

**E. Interpretación de los geles**

Una vez realizada la tinción de los geles para las enzimas específicas, se observaron las zonas de actividad enzimática reveladas (Figura 7). El patrón de bandas resultante es

el fenotipo electroforético, el cual usualmente consiste en una o más bandas coloreadas (aloenzimas) para cada individuo analizado.

1. Estructura enzimática. La mayoría de las enzimas son monómeros, dímeros o tetrameros, dependiendo de si funcionan como un sólo polipéptido, o como una enzima de dos o cuatro subunidades (Kephart 1990). Ya que la mayoría de aloenzimas de un sólo gen son heredadas co-dominantemente, las sub-unidades polipeptídicas codificadas por cada alelo son visibles como bandas coloreadas en el gel. Los heterocigotos muestran bandas múltiples (figura 8).

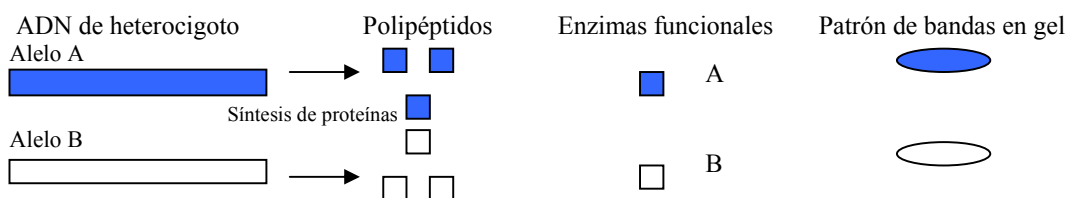
**Figura 7. Patrón de bandas de individuos heterocigotos para la enzima dimérica MDH. Cada una de las columnas representa a un individuo distinto, cada una de las bandas coloreadas es un alelo.**



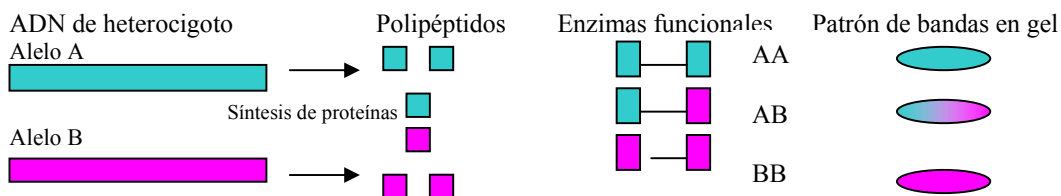
En las enzimas monoméricas (SKDH, ACO) los heterocigotos presentan dos bandas, ya que son producidos dos diferentes polipéptidos capaces de funcionar por separado, cada banda representa un alelo de cada padre. Las enzimas diméricas sólo pueden funcionar si hay dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí, por lo tanto los heterocigotos presentan tres bandas; la banda central es producto de la unión de las dos cadenas de polipéptidos diferentes y se conoce como heterodímero. Las cadenas se pueden unir en tres configuraciones. Cada una de estas uniones, migra a una distancia diferente sobre el gel (figura 8).

**Figura 8. Interpretación de los patrones de bandas para heterocigotos en enzimas monoméricas y diméricas**

### Enzimas monoméricas



### Enzimas diméricas



Todas las enzimas trabajadas en este estudio migraron de ánodo a cátodo, las isoenzimas fueron numeradas de acuerdo a su movilidad. El locus con menor movilidad fue numerado con el número 1 y así sucesivamente.

## F. Análisis estadístico de los resultados

Las frecuencias genéticas fueron calculadas en base a los resultados fenotípicos observados en los zimogramas. Las frecuencias alélicas obtenidas para las diferentes isoenzimas se introdujeron en el programa estadístico GeneStat-PC 3.3 (Lewis 1993), especialmente diseñado para analizar los siguientes parámetros de diversidad genética:

### Índices de polimorfismo

1. Proporción de loci polimórficos
2. Heterocigosis esperada

**Parámetros de diversidad genética**

1. Diversidad genética intrapoblacional
2. Diversidad genética total
3. Coeficiente de diferenciación genética

Los niveles de significancia entre las frecuencias alélicas de las muestras se obtuvieron a partir de la prueba de  $\chi^2$  (chi cuadrado) con el programa EXCEL de Windows 95.

### III. RESULTADOS

#### A. Colecta de conos y obtención de semillas

Para el rodal 1 fueron colectados un total de 40 individuos y para el rodal 2, 45 individuos. De acuerdo a El-Kassaby (1991) se necesitan de 40 a 60 individuos muestreados para obtener estimados confiables en las frecuencias alélicas a nivel de poblaciones. El número de localidades no fue igual en ambos rodales (el rodal 2 posee 4 localidades y el 1 dos localidades). En el sitio L2 (Chuipachec) se muestrearon 29 de los 85 individuos que incluye el estudio, en el resto de localidades fueron muestreados entre 10 y 13 individuos.

Durante el proceso de secado de conos fue necesario cambiarles varias veces la etiqueta debido a que la gran cantidad de resina que segregaron provocó el desprendimiento de la misma. El tiempo de secado fue más largo de lo esperado (4 meses), pero esto pudo deberse a que estaban en la sombra y no directamente bajo el sol. Es probable que secarlos en la sombra y la cantidad de resina que acumularon haya provocado que algunos conos se enmohecieran, haciendo necesario limpiar las semillas y posteriormente colocarlas bajo una lámpara para que se secaran antes de almacenarlas. Muchos de los conos estaban infectados con lepidópteros de la especie *Henricus melanoleucus*, una palomilla que se come las escamas de los conos, pero no las semillas, por lo que su presencia no parece haber afectado significativamente la cantidad de semillas colectadas.

**1. Descripción de los sitios e individuos.** Los sitios de colecta presentaron distintos grados de perturbación, dependiendo de la actividad humana (pastoreo, tala para leña, cultivos, etc) a la que estuvieron sometidos. Estos factores fueron clasificados en alto, cuando la actividad humana desarrollada en el lugar era intensa, moderado, cuando se observaba poca actividad humana y bajo, cuando la actividad humana era casi inexistente. Para observar fotos de los sitios trabajados referirse al anexo C.

**a. Sitio: S1, Salvachán.** Individuos S1-1 hasta S1-11. En esta área el pino blanco crecía en asociación con el pinabete (*Abies guatemalensis*). El factor de perturbación fue moderado. Se colectó en una colina, área boscosa con presencia de sotobosque. La forma de las ramas variaba en algunos individuos. La temperatura al momento de colecta fue de 10°C.

**b. Sitio: S2, Pacajá.** Individuos S2-1 hasta S2-11. En esta área crecía mayormente el pino blanco, con muy escasos individuos de *Abies guatemalensis*. El factor de perturbación fue moderado y provocado por el pastoreo de ovejas. La temperatura al momento de colecta fue de 9°C.

**c. Sitio: S3, Chuijolom.** Individuos S3-1 hasta S3-10. Esta área fue la más húmeda de los sitios de colecta. Se pudo observar como condensaba el agua en las hojas de los pinos por la presencia de niebla. En esta área el pino blanco crecía junto a arbustos y helechos abundantes, así como musgos. Se observaron algunos individuos de *Abies*, (más o menos 1 por cada 100 m<sup>2</sup>) y algunos ejemplares de pino colorado. La temperatura al momento de colecta fue de 9°C. El factor de perturbación fue moderado.

**d. Sitio: S4, Chojolom.** Individuos colectados: S4-1 hasta S4-11. Este sitio abarca el bosque desde el vivero Municipal, hasta el borde de la zona más húmeda (S3). Este sitio no presentó sotobosque hasta llegar cerca del área húmeda, donde empezaban a crecer helechos. En este sitio de muestreo el pino blanco crecía junto a escasos individuos de pinabete (*Abies guatemalensis*).

**e. Sitio: L2, Chuipachec.** Los individuos L2-1 hasta L2-19, fueron colectados en las laderas de la montaña, junto al camino. Esta área presentó un factor de perturbación alto. Se pudo observar la presencia de ranchos y maizales que llegaban hasta la ladera de la montaña, en el borde del bosque comunal, parte del cual ha sido talado para dar lugar a las siembras de maíz. El suelo presenta desgaste y degradación. En este lado de la montaña, el pino blanco crecía junto a ciprés (*Cupressus lusitánica*) en una proporción 50-50%. Los individuos L2-20 y L2-21, fueron colectados muy cerca del vivero del ayuntamiento.

Los individuos L2-22 hasta L2-26 fueron colectados dentro de la ONG CDRO. Los individuos dentro de este bosque tienen manejo y no son parte de un bosque silvestre. Se pudieron observar diferencias morfológicas en los árboles de esta área ya que su corteza era más lisa y la postura de las hojas en la rama era hacia arriba y no hacia abajo como en el resto de individuos colectados en los demás sitios.

Se desconoce la procedencia exacta de las semillas que dieron origen a estos individuos. Se colectaron tres individuos más en la montaña, inmediatamente después de la salida de la ONG, junto al camino (L2-27, 28 y 29).

**f. Sitio: L3, Trojales.** Los individuos L3-1 hasta el L3-8 fueron colectados en lo más alto de la montaña, en donde termina el pino blanco y empieza a crecer el pino colorado (*Pinus rudis*). La relación de especies en la cobertura de este lugar era de 90% de pino colorado y 10% de pino blanco. Esta área mostraba un factor de perturbación bajo, ya que no había presencia o actividad humana. El lugar es bastante frío y con viento. Al medio día la temperatura fue de 7°C. Los árboles aquí fueron más bajos, entre 10-18 m, con edades aproximadas de 40-70 años, excepto el individuo 5 que medía 30 m y tenía aproximadamente 70 años.

El individuo L3-9 fue colectado bajando la montaña, donde el pino blanco fue más abundante, con una relación aproximada del 95% pino blanco y 5% pino colorado. Los individuos L3-10 al L3-13 también fueron colectados montaña abajo, donde la cobertura era del 100% pino blanco.

## **B. Puesta a punto de la técnica**

Durante este período de trabajo se llevaron a cabo ensayos para determinar el porcentaje correcto de almidón a utilizar para la elaboración de los geles, así como el pH correcto para cada sistema enzimático. Se ensayaron los sistemas sugeridos por Conckle (1982). Sin embargo estas condiciones no fueron adecuadas para este estudio debido a que el porcentaje de almidón sugerido era muy alto y los extractos no eran separados de manera eficiente. También se intentó la utilización de semillas germinadas para el

estudio, sin embargo esto no fue posible debido a que se obtuvo solamente el 24.4% de germinación (germinaron 407 de las 1,650 semillas sembradas). Otro inconveniente fue el tiempo necesario para la germinación de las semillas (22-38 días), debido a estos inconvenientes, se optó por utilizar el extracto de semillas sin germinar para la realización del estudio. En total se utilizaron 160 semillas por sistema enzimático.

Se inició el trabajo con ocho enzimas, de las cuales dos (PGM y PGI) fueron eliminadas debido a la poca resolución que presentaron en los diferentes sistemas de soluciones amortiguadoras a distintos pH, la solución amortiguadora de tris-borato a pH 8.3 también fue eliminada ya que ninguna enzima resolvía bien en ella. Los sistemas de Tris-citrato (pH 6.5 para ADH, MDH y ACON y pH 7.5 para IDH, SKDH y 6-PGD) (cuadro 2) resolvieron zimogramas evaluables para los embriones y gametofitos de pino blanco.

Para la elaboración de los geles se ensayaron varios porcentajes de almidón (Sigma 075k7039) para determinar la concentración ideal a utilizar. Los porcentajes probados fueron: 9%, 9.5%, 10%, 11% y 12%. La concentración 9% permitió elaborar geles de buena consistencia y fácil manejo.

## **C. Análisis de zimogramas y descripción de las frecuencias alélicas obtenidas**

**1. Zimogramas obtenidos y análisis de los mismos.** Cinco de las enzimas analizadas (ACO, MDH, SKDH, IDH Y 6-PGD) mostraron zimogramas evaluables, tanto para el tejido de los gametofitos como de los embriones. Sin embargo la enzima ADH no presentó la misma característica ya que muy pocos individuos mostraron zimogramas evaluables en las seis localidades. En el cuadro tres se pueden observar los alelos obtenidos para los diferentes loci en los gametofitos y embriones de los individuos estudiados.

Para los loci *Aco-1*, *Adh-1* e *Idh-1*, que presentaron tres y dos alelos respectivamente, el alelo más frecuente fue el número 1 en todos los sitios; en *Mdh-2* el alelo dos tiene un P= 100%. El locus *Mdh-2* presentó 50% de frecuencia en la distribución de sus dos alelos.

Para *Skdh-1* se obtuvieron resultados similares, pero en los sitios S4 y L2 se detectó la presencia del alelo 3, el cual no se encuentra en los demás sitios. Para el locus *6-pgd-1* se puede observar que la mayor frecuencia la presentó el alelo 3 para todos los sitios, el alelo 1, que aparecen en los sitios S3, S4 y L2, es un alelo raro ya que presentó una frecuencia menor de 0.05 (Alden y Loopstra 1987), mientras que el alelo 2, que se presenta en los mismos sitios, no entra en esta categoría ya que presenta una frecuencia mayor. El alelo 4 únicamente aparece en el sitio L2 con una frecuencia de 0.02, por lo que también es un alelo raro.

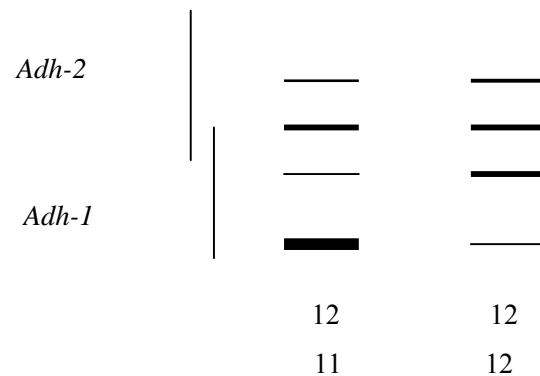
**Cuadro 3. Alelos encontrados para seis isoenzimas en gametofitos y embriones de *Pinus ayacahuite* Ehrn.**

	<b>Gametofitos</b>	<b>Embriones</b>
<i>Aco-1</i>	1,2,3	1,2
<i>Adh-1</i>	1, 2	1,2
<i>Adh-2</i>	1,2	1,2
<i>Mdh-1</i>	1,2	1,2
<i>Mdh-2</i>	2	1,3
<i>Skdh-1</i>	1,2,3	2,3,4
<i>6-pgd-1</i>	1,2,3,4	1,2,3
<i>Idh-1</i>	1,2	1,2

#### ***ADH (Alcohol dehidrogenasa)***

En este estudio ADH presentó dos zonas de actividad (*Adh-1* y *Adh-2*), ambas polimórficas con dos alelos cada una (figura 9). En gametofitos, ADH presentó la misma frecuencia (0.5) en sus dos alelos en los sitios S1, S2, S3, S4 y L3, mientras que en el sitio L2 el alelo 2 presentó una frecuencia mayor. En embriones ADH también presentó 0.5 de frecuencia en ambos alelos para los sitios S1, S2, S4 y L3, mientras que para los sitios L2 y S3 el alelo 1 presentó una frecuencia mayor (0.71).

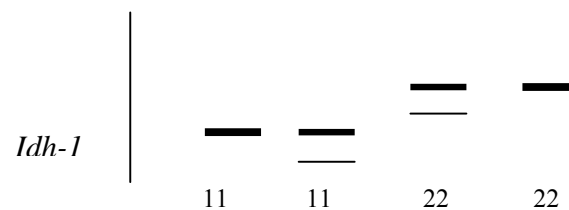
**Figura 9. Zimograma para la enzima alcohol dehidrogenasa**



***IDH (Isocitrato dehidrogenasa)***

Esta enzima presentó una zona de actividad polimórfica con dos alelos (figura 10). Algunos alelos presentaban una banda acompañante. No se pudo observar ningún heterocigoto. El alelo que mostró mayor frecuencia fue el 1 tanto en gametofitos como en embriones.

**Figura 10. Zimograma para la enzima isocitrato dehidrogenasa, las bandas más delgadas indican bandas acompañantes, no representan ningún alelo**



***ACON (Aconitasa)***

La enzima aconitasa presentó una sola zona de actividad con tres alelos (figura 11). En gametofitos *Aco-1* presentó tres alelos, de los cuales el más frecuente fue el número 1 en todas las localidades. El de menor frecuencia fue el alelo 3, que sólo fue encontrado en Chuijolom (S3). En embriones este locus presentó únicamente dos alelos, de los cuales el más frecuente fue el 1 para todas las localidades.

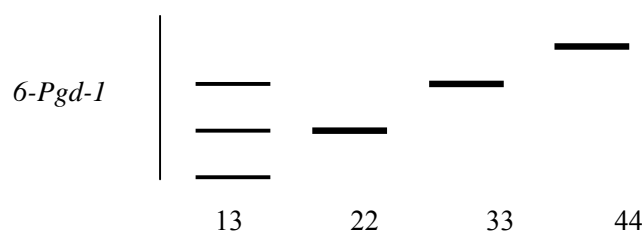
**Figura 11. Zimograma de la enzima aconitasa**



***6-PGD (6-fosfogluconato dehidrogenasa)***

Esta enzima presentó un sólo locus con cuatro alelos (figura 12). En gametofitos este locus presentó cuatro alelos el más frecuente de los cuales fue el alelo 3, el cual se encontró en todas las localidades mientras que los alelos 1 y 2 se presentaron en las localidades S3, S4 y L2; el alelo cuatro se encontró únicamente en el sitio L2. Los alelos 1 y 4 presentaron una frecuencia menor de 0.05. En embriones *6-pgd-1* presentó 3 alelos, siendo el 3 el más frecuente. El alelo 1 se presentó en tres de las seis localidades muestreadas (S2, S3 y L2) con una frecuencia menor de 0.05 en S3 y L2.

**Figura 12. Zimograma para la enzima 6-fosfogluconato dehidrogenasa**

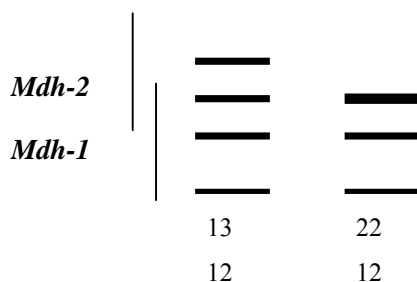


***MDH (Malato dehidrogenasa)***

Esta enzima presentó dos zonas de actividad y tres alelos (figura 13). En gametofitos *Mdh-1* presentó 2 alelos (1 y 2) con la misma frecuencia de ambos en todas

las localidades. *Mdh-2* presentó un sólo alelo (el 2) con una frecuencia de 1 en todas las localidades. En embriones *Mdh-1* presentó dos alelos (1 y 2); *Mdh-2* también presentó dos alelos (1 y 3). En ambos loci la frecuencia de los alelos fue 0.5 para cada uno (anexo D).

**Figura 13. Zimograma para la enzima malato dehidrogenasa**



#### ***SKDH (Sikimato dehidrogenasa)***

SKDH presentó una sola zona de actividad con cuatro alelos (figura 14). En gametofitos *Skdh-1* presentó los alelos 1, 2 y 3. Los alelos 1 y 2 presentaron igual frecuencia (0.45 y 0.47 respectivamente para S4 y L2; 0.5 para el resto de las localidades) en todos los casos. El alelo 3 se encontró solamente en S4 y L2 con frecuencias muy bajas (0.09 y 0.06 respectivamente).

Para embriones el locus *Skdh-1* presentó los alelos 2, 3 y 4, de los cuales el más frecuente fue el 2. El alelo 3 solamente fue encontrado en Chuipachec (L2) con una frecuencia de 0.03 y el alelo 4 se encontró en Trojales (L3) con una frecuencia de 0.07.

**Figura 14. Zimograma para la enzima sikimato dehidrogenasa**



## 2. Índices de Polimorfismo y frecuencias alélicas

Los valores de P son indicativos de los niveles de polimorfismo de una especie, la localidad S3, Chuijolom, presentó el valor más alto para P (83.3%) de las seis localidades, mientras que S1, Salvachán, presentó el valor más bajo (50%) (cuadro 4).

En el cuadro 5 (página 33) se encuentran las frecuencias alélicas obtenidas para los embriones en los diferentes loci. Como se puede observar para *Aco-1* e *Idh-1* se repite el resultado obtenido ya que el alelo con mayor frecuencia es el 1 en todos los sitios, mientras que en el locus *Adh-1* no se da este resultado ya que la frecuencia para cada uno de los dos alelos encontrados es 0.50, dándose una ligera diferencia en S3 y L2 donde el alelo 1 presentó una frecuencia ligeramente mayor que el alelo 2.

**Cuadro 4. Frecuencias alélicas observadas para seis isoenzimas en los gametofitos de *Pinus ayacahuite* en las seis localidades muestreadas y nivel de significancia de la prueba  $X^2$  para la heterogeneidad de las mismas ( $p < 0.05$ ); P(99%) = porcentaje de loci polimórficos**

	S1	S2	S3	S4	L2	L3	$X^2$
<i>Aco-1</i>							
1	0.86	0.9	0.73	0.89	0.82	0.92	ns
2	0.14	0.1	0.20	0.11	0.28	0.08	
3	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	
<i>Adh-1</i>							
1	1.00	1.00	0.9	1.00	0.86	1.00	ns
2	0.00	0.00	0.1	0.00	0.14	0.00	
<i>Adh-2</i>							
1	0.50	0.50	0.50	0.50	0.45	0.50	ns
2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.55	0.50	
<i>Mdh-1</i>							
1	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	ns
2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
<i>Mdh-2</i>							
2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
<i>Skdh-1</i>							
1	0.50	0.50	0.50	0.455	0.47	0.50	ns
2	0.50	0.50	0.50	0.455	0.47	0.50	
3	0.00	0.00	0.00	0.090	0.06	0.00	

	S1	S2	S3	S4	L2	L3	X <sup>2</sup>
<b>6-pgd-1</b>							
<b>1</b>	0.00	0.00	0.033	0.03	0.01	0.00	ns
<b>2</b>	0.00	0.00	0.133	0.05	0.06	0.00	
<b>3</b>	1.00	1.00	0.833	0.92	0.91	1.00	
<b>4</b>	0.00	0.00	0.000	0.00	0.02	0.00	
<b>Idh-1</b>							
<b>1</b>	1.00	0.92	0.95	1.00	1.00	0.95	ns
<b>2</b>	0.00	0.08	0.05	0.00	0.00	0.05	
<b><sup>a</sup>P (99%)</b>	<b>50%</b>	<b>66.7%</b>	<b>83.3%</b>	<b>66.7%</b>	<b>66.7%</b>	<b>66.7%</b>	

<sup>a</sup>: Valores de P calculados sin tomar en cuenta las frecuencias alélicas de la enzima Adh.

ns: diferencias no significativas 1, 2, 3, 4 Número correspondiente a cada alelo

S1 Salvachán S4 Chojolom encontrado

S2 Pacajá L2 Chuipachec

S3 Chuijolom L3 Trojales

En los loci *Adh-2*, *Mdh-1* y *Mdh-2* se encontró una frecuencia de 0.50 para cada uno de los alelos encontrados. *Skdh-1* (con tres alelos) presentó con mayor frecuencia el alelo 2, mientras que los alelos 2 y 3 presentaron una frecuencia menor de 0.05, por lo que entran en la categoría de alelos raros. Marshall y Brown (1975, 1983) definen un alelo como de tipo común cuando su frecuencia dentro de una población es mayor que 10%, en caso contrario el alelo es llamado raro (Ferreira 2007). Lo mismo sucedió con el alelo 1 del locus *6-pgd-1*, el cual fue encontrado en S2, S3 y L2. El locus *6-pgd-1* tiene como alelo más frecuente en todos los sitios, el alelo 3.

Los valores de P (Porcentaje de loci polimórficos) en los embriones no difieren con los valores obtenidos para los gametofitos en las localidades S1, S2, S4 y L3, sin embargo aunque la localidad S3, Chuijolom, presentó el valor más alto para P en los gametofitos, en embriones presenta un valor bajo e igual que el de las localidades mencionadas anteriormente. La localidad S1, Salvachán, sigue presentando el valor más bajo (50%) tanto para gametofitos como para embriones, y L2 presentó un valor de P de 100% en embriones, el más alto obtenido en las seis localidades.

Como se puede observar en los cuadros 4 y 5, hay diferencias en la presencia de alelos entre gametofitos y embriones, este es el caso del alelo 4 en *Skdh-1* y los alelos 1 y 3 en *Mdh-2*, los cuales están presentes en el tejido embrionario pero no en el gametofítico.

**Cuadro 5. Frecuencias alélicas observadas para seis isoenzimas en los embriones de *Pinus ayacahuite* en las seis localidades muestreadas y nivel de significancia de la prueba  $X^2$  para la heterogeneidad de las mismas ( $p < 0.05$ ); P (99%) = porcentaje de loci polimórficos**

	S1	S2	S3	S4	L2	L3	$X^2$
<i>Aco-1</i>							
1	0.81	0.875	0.77	0.82	0.78	0.92	ns
2	0.19	0.125	0.23	0.18	0.22	0.08	
<i>Adh-1</i>							
1	0.50	0.50	0.71	0.50	0.71	0.50	ns
2	0.50	0.50	0.29	0.50	0.29	0.50	
<i>Adh-2</i>							
1	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	ns
2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
<i>Mdh-1</i>							
1	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	ns
2	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
<i>Mdh-2</i>							
1	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	ns
3	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
<i>Skdh-1</i>							
2	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	0.93	ns
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	
<i>6-pgd-1</i>							
1	0.00	0.05	0.04	0.00	0.01	0.00	ns
2	0.00	0.05	0.15	0.06	0.05	0.00	
3	1.00	0.9	0.81	0.94	0.94	1.00	
<i>Idh-1</i>							
1	1.00	1.00	1.00	1.00	0.981	1.00	ns
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.019	0.00	
<b><sup>a</sup>P (99%)</b>	<b>50%</b>	<b>66.7%</b>	<b>66.7%</b>	<b>66.7%</b>	<b>100%</b>	<b>66.7%</b>	

<sup>a</sup>: Valores de P calculados sin tomar en cuenta las frecuencias alélicas de la enzima Adh.

ns: diferencias no significativas.

S1 Salvachán      S4 Chojolom  
 S2 Pacajá        L2 Chuipachec  
 S3 Chuijolom    L3 Trojales

### **3. Interpretación y evaluación estadística de las seis isoenzimas.**

Se obtuvieron las frecuencias alélicas para seis isoenzimas tanto para los tejidos gametofíticos, como para los embriones. Con las frecuencias alélicas obtenidas se hicieron matrices de datos para ambos tejidos tomando en cuenta las seis isoenzimas. Estos datos nos permitieron conocer los alelos presentes en las localidades, así como su distribución. Sin embargo para obtener los parámetros de diversidad ( $H_e$ ,  $H_t$ ,  $J_s$  y otros) se empleó una matriz en donde se eliminaron las frecuencias alélicas obtenidas para la enzima ADH para que el bajo número de individuos analizados (1 en S2; 2 en S1; 3 en S4; 5 en S3, etc.) no interfiriera con los valores reales de  $P$  (número de loci polimórficos) de las seis localidades (Nei 1987); ni en los valores reales de la diversidad genética total ( $H_t$ ) presente en el bosque comunal de Totoncapán.

Un locus es llamado polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es igual o menor que 99%. Este parámetro de referencia fue el empleado para los valores de  $P$  en los gametofitos y embriones estudiados. Nei (1987) menciona que es recomendable emplear un  $P = 100\%$  ya que este valor da un buen parámetro de variación genética dentro de las poblaciones, mientras el número de loci y de individuos sea alto (no menor de 50). En este trabajo se empleó el valor de  $P$  al 99% por ser el más ampliamente utilizado para este tipo de estudios.

Nei (1978) también menciona que para reducir el error en la muestra de heterocigosidad, deben ser examinados un gran número de locus, no un gran número de individuos por locus. En nuestro estudio este requisito no se cumple, sin embargo los resultados obtenidos brindan una base de referencia, que podría ser comprobada en estudios posteriores, empleando un mayor número de individuos o analizando un mayor número de loci. Además el número de la muestra (85 individuos) estudiado, nos permitió estudiar la variación proteica heredada (Mitton 1983) y medir la diversidad genética presente en el *P. ayacahuite* del bosque comunal de Totoncapán. La presencia de los alelos comunes y alelos raros, así como la distribución de los mismos en las seis localidades, confirman que los valores obtenidos para la diversidad genética de la muestra son representativos de la especie para el sitio estudiado.

**4. Heterocigosis.** El valor medio más alto para la heterocigosis esperada en los gametofitos de las seis localidades estudiadas fue el de la localidad S3 (0.4153), y los más bajos fueron en las localidades S1 y L3 (0.2068 y 0.2070 respectivamente). El análisis de varianza no mostró diferencias significativas al nivel de 5% entre las seis localidades (cuadro 6).

**Cuadro 6. Diversidad genética (He) de los gametofitos de *P. ayacahuite* en las seis localidades muestreadas y valores medios de la heterocigosis esperada en el bosque comunal de Totonicapán**

	<i>Aco-1</i>	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	<i>Skdh-1</i>	<i>6-pgd-1</i>	<i>Idh-1</i>	Medias
<b>S1</b>	0.2408	0.5000	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	<b>0.2068</b>
<b>S2</b>	0.1800	0.5000	0.0000	0.5000	0.0000	0.1472	<b>0.2212</b>
<b>S3</b>	0.4222	0.5000	0.0000	0.5000	0.9743	0.0950	<b>0.4153</b>
<b>S4</b>	0.1958	0.5000	0.0000	0.5778	0.1502	0.0000	<b>0.2373</b>
<b>L2</b>	0.2952	0.5000	0.0000	0.5546	0.1678	0.0000	<b>0.2529</b>
<b>L3</b>	0.1472	0.5000	0.0000	0.5000	0.0000	0.950	<b>0.2070</b>

El valor medio más alto para la heterocigosis esperada en los embriones de las seis localidades estudiadas fue el de la localidad S3 (0.2790), y el más bajo fue en las localidades S1 y L3 (0.2180). Sin embargo, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre las seis localidades al nivel de 5%.

**Cuadro 7. Diversidad genética (He) de los embriones de *P. ayacahuite* en las seis localidades muestreadas y valores medios de la heterocigosis esperada en el bosque comunal de Totonicapán**

	<i>Aco-1</i>	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	<i>Skdh-1</i>	<i>6-pgd-1</i>	<i>Idh-1</i>	Medias
<b>S1</b>	0.3078	0.5000	0.5000	0.0000	0.0000	0.0000	<b>0.2180</b>
<b>S2</b>	0.2188	0.5000	0.5000	0.0000	0.1850	0.0000	<b>0.2340</b>
<b>S3</b>	0.3542	0.5000	0.5000	0.0000	0.3198	0.0000	<b>0.2790</b>
<b>S4</b>	0.2952	0.5000	0.5000	0.0000	0.1128	0.0000	<b>0.2347</b>
<b>L2</b>	0.3432	0.5000	0.5000	0.0582	0.1138	0.0373	<b>0.2587</b>
<b>L3</b>	0.1472	0.5000	0.5000	0.1302	0.0000	0.0000	<b>0.2129</b>

**5. Parámetros de diversidad genética.** Los parámetros de diversidad genética empleados, diversidad genética intrapoblacional (Hs), identidad genética intrapoblacional (Js), diversidad genética total (Ht), identidad genética total (Jt), diversidad genética interpoblacional (Dst) y coeficiente de diferenciación entre poblaciones (Gst) (cuadros 8 y 9) permitieron medir la variación dentro y entre las poblaciones estudiadas, así como conocer la distribución de la misma, cuando son comparadas. En este estudio los parámetros que aplican a poblaciones, como el caso de Dst, representan la diversidad genética entre las localidades.

**Cuadro 8. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 isoenzimas en gametofitos de *Pinus ayacahuite***

Loci	Hs	Js	Ht	Jt	Dst	Gst
<i>Aco-1</i>	0.2556	0.7444	0.2548	0.7452	0.0000	0.0000
<i>Mdh-1</i>	0.5132	0.4868	0.5000	0.5000	0.0000	0.0000
<i>Mdh-2</i>	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	*****
<i>Skdh-1</i>	0.5514	0.4486	0.5245	0.4755	0.0000	0.0000
<i>6-pgd-1</i>	0.2220	0.7780	0.3502	0.6498	0.1282	0.3661
<i>Idh-1</i>	0.0566	0.9424	0.0586	0.9414	0.0010	0.0164
<b>Media</b>	<b>0.2666</b>	<b>0.7334</b>	<b>0.2813</b>	<b>0.7187</b>	<b>0.0147</b>	<b>0.0523</b>

Hs: diversidad genética intrapoblacional  
Js: identidad genética intrapoblacional  
Ht: diversidad genética total

Jt: identidad genética total  
Dst: diversidad genética interpoblacional  
Gst: coeficiente de diferenciación entre poblaciones

**Cuadro 9. Parámetros de diversidad genética estudiados para 6 isoenzimas en embriones de *Pinus ayacahuite***

Loci	Hs	Js	Ht	Jt	Dst	Gst
<i>Aco-1</i>	0.2883	0.7117	0.2851	0.7149	0.0000	0.0000
<i>Mdh-1</i>	0.5129	0.4871	0.5022	0.4978	0.0000	0.0000
<i>Mdh-2</i>	0.5129	0.4871	0.5022	0.4978	0.0000	0.0000
<i>Skdh-1</i>	0.0329	0.9671	0.0331	0.9669	0.0002	0.0073
<i>6-pgd-1</i>	0.1259	0.8741	0.1297	0.8703	0.0039	0.0297
<i>Idh-1</i>	0.0064	0.9936	0.0063	0.9937	0.0000	0.0000
<b>Media</b>	<b>0.2466</b>	<b>0.7534</b>	<b>0.2431</b>	<b>0.7569</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>

Hs: diversidad genética intrapoblacional  
Js: identidad genética intrapoblacional  
Ht: diversidad genética total

Jt: identidad genética total  
Dst: diversidad genética interpoblacional  
Gst: coeficiente de diferenciación entre poblaciones

## IV. DISCUSIÓN

### A. Colecta y manejo de conos y semillas

Debido a dificultades técnicas, no fue posible que todas las localidades tuvieran la misma cantidad de individuos colectados ya que para llevar a cabo una colecta representativa, era necesario dejar entre 100 y 200 metros entre los árboles muestreados, además muy pocos árboles conservaban conos verdes y sólo unos cuantos eran accesibles para las personas encargadas del corte. Las principales limitantes fueron la posición de los conos y la altura de los árboles, algunos de los cuales podían medir hasta 60 m, ya que los conos se encontraban en la parte alta de la copa en la punta de las ramas, por lo que las personas encargadas de cortarlos no podían llegar hasta ellos. A pesar de las dificultades el muestreo se llevó a cabo satisfactoriamente, y se logró colectar un promedio de 3 conos por árbol, y fue representativo como se puede observar en los resultados de la diversidad genética obtenidos.

### B. Puesta a punto de la técnica

A pesar de haber basado las condiciones de corrida de los geles en un protocolo específico para coníferas (Conckle *et al* 1982), esta etapa del estudio fue la más larga ya que ninguna de las condiciones especificadas en dicho protocolo fue adecuada para trabajar en nuestro laboratorio. Esto pudo deberse a factores como temperatura y humedad del laboratorio, así como a la calidad del agua destilada utilizada. Uno de los factores que más afectó fue la irregularidad de la corriente eléctrica en el área de trabajo, ya que se podía perder todo un día de preparación de gel o de tinciones por fallas eléctricas o apagones, algunas veces era necesario interrumpir el trabajo y desconectar el equipo para evitar desperfectos en el mismo. Otro factor fue la calidad del almidón utilizado ya que, al parecer, el lote adquirido no presentaba las características óptimas como medio de soporte para la electroforesis. La consistencia de los geles variaba de un día para otro sin que fuera posible lograr consistencia en la misma. Sin embargo, a pesar de las variaciones, los geles obtenidos funcionaban bien como medio de soporte para correr la electroforesis.

Fue necesario experimentar con una amplia gama de pH en las soluciones utilizadas hasta lograr una buena resolución de bandas, sin embargo las enzimas PGM y PGI

tuvieron que descartarse del estudio. PGI fue descartado porque las bandas obtenidas no fueron evaluables y PGM porque no compartía las condiciones de pH con ninguna otra enzima, por lo que no pudo correrse para no desperdiciar recursos.

En los métodos de tinción de los geles también fue necesario realizar varios cambios al protocolo. Esto se debió a que al utilizar las especificaciones indicadas en éste las bandas no se veían claramente. Los cambios realizados se pueden ver en el anexo B. Para este estudio fue necesario aumentar la cantidad de coenzima a todos los sistemas, así como jugar con las cantidades de sustrato ya que algunos sistemas necesitaban menos del indicado (SKDH) y otros un poco más (6-PGD, ADH). También se realizaron cambios en el tiempo de tinción, el cual cambió de las dos horas recomendadas en Conckle 1982, a un rango de tres a cuatro horas para que las bandas se separaran de manera adecuada. Estos cambios pudieron deberse a pequeñas variaciones en la temperatura del horno utilizado.

A pesar que en la literatura se indica que el porcentaje de germinación de esta especie es del 50% y el tiempo de germinación es de 22 a 35 días, al realizar las pruebas en laboratorio, después de 38 días solamente había germinado el 24.4 % de las semillas trabajadas. La tasa de germinación no fue consistente en todos los sitios ya que en algunos germinaron 8-10 semillas mientras que en otros no germinó ninguna. Esto puede explicarse ya que al realizar la disección posterior de semillas sin germinar, se encontró que el 77% de éstas no presentaban ningún tipo de tejido en su interior. La gran cantidad de semillas vacías también resultó ser un limitante al realizar los extractos de embriones ya que en algunos casos no era posible encontrar ni una semilla utilizable en un cono. A pesar de eso fue posible trabajar el mismo número de semillas en todas las isoenzimas. En total se utilizaron 40 semillas por sitio (No. mínimo aceptado para este tipo de estudios, según El-Kassaby). De esos 40 embriones o gametofitos, se tomaron en cuenta para el análisis estadístico los que presentaran bandas evaluables, de lo contrario se excluían del estudio.

La literatura (Mirov 1967) indica que las semillas aumentan su actividad enzimática al hidratarse como preparación para la germinación. Debido a esto se llevaron

a cabo pruebas para determinar si hay alguna diferencia al correr el extracto de semillas secas y semillas hidratadas. Se pudo observar que la actividad enzimática aumentaba cuando el tejido estaba hidratado, lo cual se reflejaba en una mayor claridad de las bandas teñidas, debido a esto todos los geles de trabajo se hicieron con tejido hidratado. Para hidratarlo se llevaba a cabo la disección un día antes de correr el extracto y las semillas se colocaban en papel filtro humedecido con agua destilada durante toda la noche (alrededor de 12 horas). Este tiempo era suficiente para lograr el aumento necesario de actividad enzimática ya que no se observó diferencia en la claridad de las bandas de semillas disectadas un día antes de correr los geles y semillas disectadas dos o tres días antes.

Una característica que se pudo observar durante la disección es la presencia de pequeñas cantidades de resina tanto en el tejido del gametofito como del embrión. De acuerdo a Mirov (1967) una característica de los embriones del género *Pinus* es la presencia de canales resiníferos y células secretorias, lo cual explicaría la presencia de resina en los mismos, sin embargo no se encontró literatura que indique la presencia de estos canales en el tejido del endospermo (gametofito) lo cual podría ser una característica específica de esta especie. No fue posible determinar si la resina interfiere o no en la resolución de bandas en el gel sin embargo la literatura consultada no lo menciona como un problema.

## **C. Variabilidad Genética**

**1. Análisis de isoenzimas de gametofitos.** De las enzimas trabajadas, únicamente MDH presentó múltiples bandas para cada individuo, el resto de las enzimas presentaba una o dos bandas por individuo en la mayoría de los geles analizados, pero todas resultaron ser polimórficas ya que se encontraron varios alelos (hasta cuatro) en ellas.

El nivel de significancia de la prueba  $\chi^2$  para las frecuencias alélicas de los gametófitos (cuadro 4) no mostró diferencias significativas en la distribución de los alelos para ninguna de las seis isoenzimas analizadas en las seis localidades. Esto indica que hay heterogeneidad en la presencia y distribución de todos los alelos estudiados en las

seis localidades y que se llevó a cabo un muestreo significativo ya que se encontraron tanto los genotipos tipo del *P. ayacahuite* del bosque comunal de Totoncapán como alelos raros del mismo. Esto puede afirmarse por la presencia y frecuencia (0.02) del alelo 4 de *6-pgd-1* L2 y del alelo 1 de *6-pgd-1* con una frecuencia de 0.03 en S3, S4 y 0.01 en L2. La presencia y frecuencia (0.09) del alelo 3 en *Aco-1* (presente únicamente en la localidad S3) así como la frecuencia (0.06) del alelo 3 en *Skdh-1* indican que fueron muestreados alelos que están presentes con baja frecuencia en las seis localidades.

**a. Valores de P en gametofitos.** La localidad S3 presentó el valor de P más alto (83.3%) de las seis localidades, mientras que la localidad S1 presentó el valor más bajo (50%). Sin embargo ambos valores son superiores al valor medio de 36.8% aceptado para las especies vegetales (Hamrick 1989). El valor de P con una media de 66.7% para las seis localidades, producto de un análisis donde la muestra es representativa de la diversidad genética, indican que *P. ayacahuite* del Bosque Comunal de Totoncapán tiene altos índices de polimorfismo. Estos resultados concuerdan con los esperados para coníferas (P= 67%) reportados por Hamrick (1989). Valores similares son reportados para otras especies del género *Pinus* que al igual que *P. ayacahuite* combinan características, como poblaciones alógamas y continuas, polen y semillas dispersadas por el viento, que aseguran la continuidad de su diversidad genética (Hamrick 1992).

**2. Análisis de isoenzimas de los embriones.** Los embriones de pino son diploides (2n) por lo que reciben para cada genotipo dado, un alelo de cada uno de los progenitores.

El nivel de significancia de la prueba  $\chi^2$  para las frecuencias alélicas de los embriones (Cuadro 5) no mostró diferencias significativas en la distribución de los alelos para ninguna de las isoenzimas analizadas. Estos resultados indican que la presencia y distribución de todos los alelos estudiados es homogénea y que se muestrearon los alelos comunes distribuidos localmente, así como los raros. Las frecuencias de los alelos raros (según la descripción de Alden y Loopstra 1987) fueron las siguientes: 0.01 para el alelo 1 en *6-Pgd-1*; 0.03 para el alelo 3 en *Skdh-1* y 0.04 para el alelo 1, también en *6-Pgd-1*. La presencia de alelos comunes y raros coincide con los resultados obtenidos para los

gametofitos y confirman el muestreo de la diversidad genética representativa del *P. ayacahuite* del Bosque Comunal de Tonicapán.

Se observaron alelos como el 4 en *Skdh-1* que estaban presentes en los embriones pero no en los gametofitos, esto indica que este alelo proviene del polen. Resultados similares fueron observados para el alelo 2 en *Adh-2* en las localidades S1, S2 y S4. La procedencia de estos alelos puede ser afirmada debido a que en las coníferas no se da triple fecundación para la formación del endospermo, el cual se forma únicamente con tejido materno (Mirov 1967; May 1998; Weeden y Wendel 1989), por lo tanto los alelos no presentes en el tejido del gametofito solamente pueden ser heredados del padre.

La presencia del alelo 1 en *Skdh-1* en los gametofitos, así como su ausencia en los embriones puede explicarse en base a que el alelo 2 es homocigótico en 4 de las seis localidades, por lo que el embrión recibió un alelo 2 del padre y otro de la madre, reiterando una posible segregación Mendeliana de 1:2:1

**a. Valores de P en embriones.** El mismo valor de P (75%) se obtuvo en cuatro localidades S2, S3, S4 y L3, mientras que las localidades S1 y L2 mostraron valores para P = 62.5% y 100% respectivamente. Para todas las localidades los valores de P para los embriones fueron muy superiores al 36.8 % reportado para especies vegetales por Hamrick (1989). Estos valores coinciden con los observados para los gametofitos y reiteran que el *P. ayacahuite* del Bosque Comunal de Tonicapán tiene altos índices de polimorfismo y que la muestra colectada contiene la diversidad genética representativa del *P. ayacahuite* en este bosque.

## **D. Diversidad genética**

**1. Gametofitos.** El valor medio más alto (0.4153) para la heterocigosis esperada (diversidad genética =  $H_e$ ) en los gametofitos de las seis localidades estudiadas fue encontrado en la localidad S3 (cuadro 5). El más bajo observado (0.20068) se encontró en la localidad S1. El análisis de varianza entre los valores medios de las seis localidades no mostró diferencias significativas al nivel 5%. El valor medio aceptado

para este parámetro en especies vegetales es de  $H_e=0.14$  (Hamrick 1989 y Scaltosyiannes *et al.* 1993). Como se puede observar los valores obtenidos en este trabajo (0.2068 y 0.4153) reflejan que la diversidad genética en las seis localidades trabajadas es superior al reportado hasta ahora por Hamrick (1989) y congruente con lo esperado para coníferas.

El valor medio de la diversidad genética total ( $H_t$ ) para los gametofitos fue de 0.2789, siendo muy similar al de la diversidad genética intrapoblacional  $H_s = 0.2666$ . Los parámetros descritos a continuación permitieron conocer cómo está distribuida (dentro de las localidades o entre localidades) esa diversidad genética. En este estudio  $H_s$  representa a la diversidad genética entre las seis localidades. El bajo valor encontrado en la diversidad genética entre poblaciones ( $D_{st}=0.0123$ ) unido a los altos valores de  $H_t$  y  $H_s$  es un indicativo de que la diversidad está situada mayoritariamente en el interior de las mismas (96%) y que únicamente un 4% de la diferencia genética es inter poblacional. Los resultados son congruentes con el tipo de muestreo efectuado, ya que geográficamente las seis localidades forman parte del mismo bosque y su separación obedeció a factores como acceso y comodidad para realizar la colecta de semillas. Las localidades representan diferentes niveles altitudinales dentro del mismo bosque.

La localidad S3 presentó los valores más altos para P (83.3%) y para  $H_e$  (0.4153). Si se toma en cuenta que estos valores fueron obtenidos con una muestra de 15 individuos, comparada con la muestra de 33 individuos para L2 con un P = 75% y  $H_e = 0.2529$ , los resultados indican que la localidad S3 (Chuijolom) es altamente diversa. Ambas localidades presentaron los valores para P y  $H_e$  más altos de las seis estudiadas.

La localidad S3 se caracterizó por ser un lugar muy húmedo, donde la neblina condensa, permitiendo que el agua que queda atrapada en las hojas (Figura 17, anexo C) pueda ser canalizada para su posterior distribución a las poblaciones alrededor del Bosque. Es un área donde abundan los helechos y musgos. La alta diversidad genética que presenta (0.4153), así como su importancia en la conservación de los recursos naturales del bosque, la hacen un área prioritaria para conservación y para selección de semilla. Además las características ambientales del lugar, (humedad, temperatura,

presencia de especies que crecen en ambientes muy húmedos), diferentes a las observadas en las otras cinco localidades, sugieren una influencia ambiental sobre la estructura genética del *P. ayacahuite* en Chuijolom (S3).

**2. Embriones.** El valor medio para la heterocigosis esperada (diversidad genética =  $H_e$ ) en los embriones de las seis localidades estudiadas fue más alto (0.2709) en la localidad S3. El más bajo observado fue de 0.2129 en la localidad L3. El análisis de varianza entre los valores medios de las seis localidades no mostró diferencias significativas al nivel 5%. El valor medio aceptado para este parámetro en especies vegetales es de  $H_e=0.14$  (Hamrick 1989 y Scaltosyiannes *et al.* 1993). Por lo que la diversidad genética de los embriones, al igual que en gametofitos, es superior al reportado por Hamrick (1989). Al igual que para los gametofitos no existen diferencias significativas en los valores de la diversidad genética entre localidades. La distribución de los individuos heterocigotos es homogénea en las seis localidades.

El valor medio de la diversidad genética total ( $H_t$ ) para los embriones fue de 0.2431, siendo muy similar al de la diversidad genética intrapoblacional  $H_s = 0.2466$ . El valor de 0.0 obtenido para  $D_{st}$  en relación a los valores altos de  $H_t$  y  $H_s$  son nuevamente indicativos de que la diversidad está situada totalmente (100 %) en el interior de las seis localidades, ya que el valor de  $G_{st}$  fue también de 0.0.

La localidad L2 presentó un 100% de polimorfismo (P) reiterando lo observado con los gametofitos, en cuanto a que las localidades L2 y S3 son las más diversas genéticamente y que para L2 esta alta diversidad genética, sobre las demás localidades, puede deberse al mayor número de individuos (al menos 16 más que en el resto de localidades) que se colectaron para este sitio. Sin embargo al tratarse del área con mayor perturbación por actividad humana (tala, pastoreo, avance de la frontera agrícola y suelos degradados), esta alta diversidad pudiera verse amenazada (anexo C).

## CONCLUSIONES

1. La electroforesis de isoenzimas en geles de almidón es una herramienta eficaz para el estudio básico de la diversidad genética de una especie.
2. En semillas de pino blanco, la solución amortiguadora de Tris-citrato a pH 6.5 y 7.5 es la más efectiva para emplearse en la electroforesis de las enzimas ADH, ACO, MDH, IDH, SKDH y 6-PGD respectivamente.
3. La frecuencia y distribución de alelos no mostró diferencias significativas entre las seis localidades muestreadas; por lo que la frecuencia y distribución de los alelos dentro del bosque comunal de Tonicapán es homogénea
4. El *P. ayacahuite* del bosque comunal de Tonicapán tiene una alta diversidad genética ( $P \geq 50\%$ ,  $H_e \geq 0.20$ ).
5. Los resultados indican que en el muestreo efectuado (85 individuos) se colectó la diversidad genética representativa del *P. ayacahuite* en el bosque comunal de Tonicapán, ya que se incluyeron tanto los genotipos tipo como los alelos raros.
6. Los altos niveles de polimorfismo y diversidad genética obtenidos, así como la distribución de la diversidad genética de *P. ayacahuite* del bosque comunal de Tonicapán sugieren un buen flujo de genes en este bosque.

## VI. RECOMENDACIONES

Para llevar a cabo estudios como éste es necesario mejorar las condiciones de colecta de conos, equipando adecuadamente a las personas que la llevan a cabo.

Para lograr una buena resolución de las bandas obtenidas en los geles se recomienda hidratar previamente el tejido de las muestras cuyo extracto será sometido a electroforesis.

A pesar de que la diversidad genética del *P. ayacahuite* en el Bosque Comunal de Totonicapán parece estar distribuida homogéneamente, las localidades S3 (Chuijolom) y L2 (Chuipachec) son ligeramente más diversos que el resto de localidades por lo tanto el manejo y conservación de éstas debe ser prioritario para evitar que su diversidad se pierda debido a la presión humana.

Para conservar la diversidad de este bosque, es recomendable establecer un plan de extracción de madera que no sea destructivo, por ejemplo cortar únicamente árboles muy viejos, y que por lo tanto ya no sean productores de semilla, así como impulsar el corte únicamente de ramas para ser convertidas en leña, evitando la tala de ejemplares sanos. De la misma manera se sugiere que para los proyectos de reforestación, tanto los que están en marcha, como los nuevos, sean aprovechadas las semillas de los árboles locales, sobre todo las que puedan ser colectadas en Trojales y Chuipachec.

Es necesario un estudio más amplio de la diversidad genética de la especie, que incluya más poblaciones de *P. ayacahuite* en Guatemala.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, I. 1961. **Pinos de Guatemala**. Ministerio de Agricultura Dirección General Forestal. 32 pp.
- Aguinagalde, I.; F. Llorente y C. Benito. 1997. **Relationships among five populations of European black pine (*Pinus nigra* Arn.) using morphometric and isozyme markers**. *Silvae Genetica* 46(1):1-5.
- Aguirre-Planter, E.; G. Furnier y L. Eguiarte. 2000. **Low levels of genetic variation and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from Southern Mexico and Guatemala**. *American Journal of Botany* 87: 362-371.
- Alden, J. and C. Loopstra. 1987. **Genetic diversity and population structure of *Picea glauca* on an altitudinal gradient in interior Alaska**. *Canadian Journal of Forestry Research*. 17: 1519-1526.
- ASIES. 1993. **Monografía ambiental región sur-occidente**. ASIES, Guatemala. Pp. 90 - 99.
- Becerra, V. y M. Paredes. 2000. **Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética**. *Agricultura Técnica (Chile)* 60(3):270 – 281.
- Brown, A.H.D y D. R. Marshall. 1995. **A basic sampling strategy: theory and practice**. In: *Collecting plant genetic diversity*. (Ed.) L. Guarino, V. Ramanatha Rao and R. Reid.. International Plant Genetic Resources Institute-IPGRI. Rome. Pp 75-91.
- Conckle, M; P, Hodgskiss, L. Nunnally y S. Hunter. 1982. **Starch gel electrophoresis of pine seed: a laboratory manual**. USDA Forest Service General Technical Report PSW-64. Berkeley, California: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station. 30 pp.
- Dixon, M. y E. Webb. 1979. **Enzymes**. 3ra edición. Academic Press, New York. 1116 pp.
- Donahue, J.; W. Dvorak y E. Gutiérrez. 1991. **The distribution, ecology and gene conservation of *Pinus ayacahuite* and *Pinus chiapensis* in Mexico and Central America**. *CAMCORE Bulletin on Tropical Forestry* 8: 1-28.
- El-Kassaby, Y. A. 1991. **Genetic variation within and among conifer populations: review and evaluation of methods**. In: “Biochemical markers in the population genetics of forest trees”. (Ed.) Fineschi, S.; Malvolti, M. E.; Cannata, F. & Hattemer H. H. SPB Academic Publishers. The Hauge, The Netherlands. Pp 6-176.

- Facultad de Agronomía Universidad de San Carlos de Guatemala. 1997. **Bosques Comunales en Guatemala**. Cuadernos Chac. 35 pp.
- FAO. 1997. **Proyecto de información y análisis para el manejo forestal sostenible: integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13 países tropicales en América Latina**. GCP/ RLA. 59 pp.
- Farjon, A. y B.T. Styles. 1997. **Pinus (Pinaceae)**. Flora Neotropica. Monograph 75. The New York Botanical Garden, New York. 291 pp.
- Ferreira, P. 2007. Concepto, construcción y uso de colecciones núcleo (Core collections). 11 pp. Disponible desde Internet en [www.pejibaye.ucr.ac.cr/BancosGermoplasma/BGermoplasma5.htm](http://www.pejibaye.ucr.ac.cr/BancosGermoplasma/BGermoplasma5.htm) (con acceso el 04/08/07)
- Fundación Paz Verde. 1996. **Los Bosques de Totonicapán**. Ediciones Don Quijote SA, Guatemala. 48 pp.
- Gardner, E. 1985. **Principios de genética**. 5 edición. Editorial Limusa, México D.F. 716 pp.
- Gibson, J. P. and J. L. Hamrick. 1990. **Genetic diversity and structure in *Pinus pungens* (Table Mountain pine) populations**. Canadian Journal of Forestry Research. 21: 635-642.
- Goss, Ch. 1972. **Physiology of plants and their cells**. Pergamon Biological Sciences, Pergamon Press Inc. New York. 457 pp.
- Goodman M. y C. Stuber. 1983. **Maize**. In: Isoenzymes in plant genetics and breeding. Part B. (S. D. Tanksley y T. Orton Eds) Elsevier Science Pu. B. V., Amsterdam. Pp: 1-33
- Guarino, L. ; V. R. Rao y R. Reid. 1995. **Collecting plant genetic diversity**. Internacional plant genetic Resources Institute-IPGRI. 748 pp.
- Halffter, G. y E. Ezcurra. 2000. **¿Qué es la biodiversidad?**. La diversidad biológica de Iberoamérica. 16 pp. Disponible desde internet en [www.mesoamerica.org.mx](http://www.mesoamerica.org.mx) (con acceso el 10/1/03)
- Hamrick, J. 1989. **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations**. In: Isozymes in plant biology. (D.E.Soltis y P.S Soltis Eds). Advances in plant sciences series vol 4. DIOSCORIDES PRESS, Portland. 105 pp.
- Hamrick, J., M. Godt y S. Sherman-Broyles. 1992. **Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species**. New Forests 6: 95-124.

- Henríquez, P. 2002. **Glosario de términos útiles para el manejo de los recursos fitogenéticos**. Red Mesoamericana de Recursos Fitogenéticos, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San Salvador. 80 pp.
- Hrazdina, G. y R. Jensen. 1992. **Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways**. *Plant molecular biology* 43:241-267.
- Kephart, S. 1990. **Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques**. *Journal of Botany* 77 (5): 693-712.
- Latta, G. y J. Mitton. 1997. **A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in limber pine (*Pinus flexilis* James)**. *Genetics* 146: 1153-1163.
- Lehninger, A., D. Nelson y M. Cox. 1993. **Principles of biochemistry**. 2da edición. Worth publishers, New York. 1008 pp.
- Lewin, B. 1983. **Genes**. John Wiley & Sons Inc., Canadá. 713 pp.
- Lewis, P. 1993. **GeneStat-PC 3.3**. Department of Statistics North Carolina State University, North Carolina. 13 pp.
- Maselli, S.; F. Pérez García e I. Aguinagalde. 1999. **Evaluation of seed storage conditions and genetic diversity of four crucifers endemic to Spain**. *Annals of Botany* 84: 207-212.
- Maselli, S.; Z. Díaz-Lifante e I. Aguinagalde. 1996. **The Mediterranean populations of *Brassica insularis*: a biodiversity study**. *Biochemical Systematics and Ecology* 24(2): 165-170.
- May, B. 1998. **Starch gel electrophoresis of allozymes**. In: *Molecular genetic analysis of populations, a practical approach* (A. R. Hoelzel Ed.). IRL press, Oxford N.Y. Pp 1-28
- McGilvery, R. 1977. **Conceptos bioquímicos**. Editorial Leverté S.A. Barcelona. 591 pp.
- Méndez, L. 2002. **Evaluación de tres sustratos orgánicos y dos especies de hongos micorrízicos, *Zarcaria bicolor* e *Inocybe* sp. en la formación de ectomicorrizas en *Abies guatemalensis* Rehder y *Pinus ayacahuite* Ehrh. en contenedor**. Tesis de grado Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 63 pp.
- Mirov, N. 1967. **The genus pinus**. The Ronald Press Co. N. 4. 602 pp.

- Mittak, W. 1977. **Fortalecimiento al sector forestal Guatemala, estudios para la reforestación nacional**. Programa de la Naciones Unidas para el desarrollo; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, Guatemala. 67 pp.
- Mitton, J. 1983. **Conifers**. In *Isozymes in plant genetics and breeding*, part B. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 472 pp.
- Namkoong, G. y M. Koshy. 2001. **Application of genetic markers to forest tree species**. Draft report to IPGRI of the project "Developing decision-making strategies on priorities for conservation and use of forest genetic resources. 22 pp.
- Nei, M. 1972. **Genetic distance between populations**. *American nature* 106: 283-292.
- Nei, M. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. Columbian University press, New York. 502 pp.
- Pérez, G. 2001. **Recursos forestales y cambio de uso de la tierra en Guatemala**. Proyecto para el manejo forestal sostenible: Integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13 países tropicales en América Latina. GPC/RLA/BIFC, Santiago de Chile. 30 pp.
- Perry, J. 1991. **The pines of Mexico and Central America**. Timber Press, Portland Oregon. 231 pp.
- Politov, D. V., M. M. Belokon, O. P. Maluchenko, Yu. S. Belokon, V. N. Molozhnikov, L. E. Mejnartowicz y K. V. Krutovskii, 1999 **Genetic evidence of natural hybridization between Siberian stone pine, *Pinus sibirica* Du Tour, and Dwarf Siberian pine, *P. pumila* (Pall.) Regel**. *Forest Genetics* 6(1): 41-48.
- Price, N. y L. Stevens. 1989. **Fundamentals of enzymology**. 2da. edición. Oxford University Press, Oxford. 526 pp.
- Puglisi, S.R., R. Lovreglio, S. Cifarelli & V. Leone. 1999. Allozyme variation in five populations of *Pinus halepensis* Mill. In Southern Italy. *Forest Genetics*. 6(4):241-246.
- Robles Sánchez, R. 1995. **Diccionario genético y fitogenético**. Editorial Trillas, México D.F. 197 pp.
- Romero, L. 1981. **Efecto del problema del *Dendroctonus* con relación a la comunidad: Un caso municipio San Francisco el Alto, Totonicapán**. Tesis de Grado Universidad de San Carlos de Guatemala. 85 pp.

- Scaltsoyiannes, A.; R. Rohr, K. y P. Panetsos. 1994. **Allozyme frequency distributions in five European populations of black pine (*Pinus nigra* Amold)**. *Silvae Genetica* 43 (1): 20-30.
- Schiller, G., L. Korol, E.D. Ungar, A. Zehavi, L. Gil y J. Climent . 1999. **Canary islands pine (*Pinus canariensis* CHR.SM.EX DC.) 1. Differentiation among native populations in their isoenzymes**. *Forest Genetics* 6(4): 257-276.
- URL. 1984. **Perfil ambiental de la República de Guatemala, Tomo II**. Universidad Rafael Landívar (URL), Instituto de Ciencias Ambientales y Tecnología Agrícola (ICATA). URL/USAID-Guatemala-ROCAP Contrato No. 596-0000-C-00-3060-00, Guatemala. 249 pp.
- Villee, C., E. Solomon, C. E. Martin, D. W. Martín, L. R. Berg y P. W. Davis. 1996. **Biología de Villee**. 3ra edición. Interamericana Mc Graw-Hill. México D.F. 1193 pp.
- Wallace, B. 1981. **Basic population genetics**. Columbia University Press, New York. 1688 pp.
- Weeden N. y J. Wendel. 1989. **Genetics in plant isozymes**. In: Advances in plant sciences series vol. 4. (Ed.) D.E.Soltis y P.S Soltis. DIOSCORIDES PRESS, Portland, USA. 105 pp.
- Wendel, J. y N. Weeden. 1989. **Visualization and interpretation of plant isozymes**. In: Isozymes in plant biology. (D.E.Soltis y P.S Soltis Eds). Advances in plant sciences series vol. 4. DIOSCORIDES PRESS. Pórtland, USA. 105 pp.
- Yanofsky, Ch. 1971. **Estructura del gen y estructura de la proteína en la base molecular de la vida**. Editorial Blume, Barcelona. Pp: 264-274.
- Yndgaard, F. y A. Iloskuldsson. 1985. **Electrophoresis: A tool for genebanks**. FAO-IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter 63: 34-40.

## VIII. GLOSARIO

**Alelo:** Forma alternativa de un gen. Los alelos están situados en los correspondientes loci de cromosomas homólogos, tienen diferentes efectos sobre los mismos rasgos o procesos de desarrollo y pueden mutar. Son capaces de afectar el fenotipo cuantitativa y cualitativamente (Robles 1995).

**Alelo raro:** Aquel que aparece en una población con una frecuencia inferior al 5%. En este caso se requieren grandes muestras para la permanencia de este alelo en una población (Henríquez 2002).

**Aloenzimas:** Isozimas (proteínas) cuya síntesis está normalmente controlada por alelos codominantes heredados en proporciones mendelianas monogénicas y que destacan como modelos asociados en electroforesis (Robles 1995).

**Cotiledón:** Hoja modificada del embrión, su función es el almacenamiento y absorción de nutrientes durante la germinación y/o la emergencia de las plantas monocotiledóneas como el maíz, o dicotiledóneas como el frijol (Robles 1995).

**Dímeros:** Isoenzimas cuya estructura cuaternaria activa consiste en la unión de dos polipéptidos (Robles 1995).

**Diversidad Genética:** Se llama así a la suma total de las diferencias genéticas entre especies y dentro de las mismas (Robles 1995).

**Enzima:** Biomolécula protéica o de ARN que cataliza una reacción química específica. Las enzimas son proteínas altamente especializadas que tienen un extraordinario poder catalítico y alto grado de especificidad por sus sustratos, aceleran las reacciones químicas sin alterar el equilibrio de las mismas y disminuyendo la energía de activación (Gardner 1985).

**Erosión genética:** Pérdida de diversidad genética. Pérdida de material genético, incluyendo genes individuales o combinaciones de genes (complejos genéticos), genotipos y especies ([http://www.ipgri.cgiar.org/training/exsitu/web/ab\\_ppal\\_introduccion.htm](http://www.ipgri.cgiar.org/training/exsitu/web/ab_ppal_introduccion.htm))

**Frecuencia genética:** También llamada frecuencia alélica, es la representación de la proporción de un alelo particular en una población reproductivamente activa (Gardner 1985).

**Gen:** Unidad de la herencia, segmento de ADN situado en una posición específica de un determinado cromosoma, que participa en la manifestación fenotípica de un cierto carácter (Henríquez 2002)

**Gen estructural:** Gen que controla la producción real de proteínas determinando la secuencia de aminoácidos (Lewin 1983).

**Genotipo:** Constitución genética manifiesta y latente de un organismo, los individuos con un mismo genotipo engendran descendencias similares (Gardner 1985).

**Isoenzimas:** Múltiples formas moleculares de la misma enzima, resultante de la presencia de más de un gen codificando cada una de estas formas moleculares en el genoma de una especie. Las isoenzimas desempeñan la misma actividad catalítica, pero poseen diferentes propiedades cinéticas y pueden ser separadas por procesos bioquímicos (Henríquez 2002).

**Introgresión:** Es el movimiento de genes de una población a otra a través de la hibridación seguida por el retrocruzamiento. Comúnmente se refiere al movimiento de genes desde una especie a otra o entre subespecies que están aisladas geográficamente (Glosario de genética forestal, <http://www.genfys.slu.se/staff/dagl/Glossaries/Glosario.doc>.)

**Locus-loci:** En el cromosoma, es la posición en que se encuentra un gen específico, puede estar ocupado por cualquiera de los alelos del gen (Lewin 1983).

**Monómeros:** Isoenzimas que poseen una sola cadena polipeptídica como estructura cuaternaria activa.

**Polimorfismo:** Ocurrencia regular y simultánea en la misma población heterocigótica de dos o más tipos distintos de formas. En genética, se llama así a la manutención de dos o más formas de un gen en el mismo locus en las frecuencias más altas que aquellas esperadas por la sola acción de la mutación y migración. Es la ocurrencia de más de un alelo en el mismo locus en una población.

**Proteína:** Compuesto orgánico complejo y grande que consiste en muchas subunidades de aminoácidos enlazadas químicamente por medio de enlaces peptídicos. Son los principales componentes estructurales de las células (Villey 1996).

**Variabilidad genética:** Amplitud de la variación genética existente para una determinada especie. La ocurrencia de diferencias entre individuos es debida a las diferencias existentes en su variabilidad genética. La variabilidad causada por el ambiente se manifiesta como plasticidad, pero toda plasticidad fenotípica es genotípicamente controlada.

La variabilidad genética de una población es principalmente regulada por tres factores: a) la adición de nuevo material genético a través de mutación, migración y recombinación; b) la erosión de esta variabilidad a través de la selección y deriva genética; c) la protección de la variabilidad almacenada (Henríquez 2002)

**Verticilo:** Conjunto de tres o más ramas, hojas, flores y otros órganos, que están en un mismo plano alrededor de un tallo (Robles 1995).

**Zimograma:** Conjunto de bandas pertenecientes al mismo sistema enzimático que se observan en el mismo individuo. Se ha utilizado la palabra banda en vez de isoenzima para indicar que una banda que se observa en un gel, después de llevar a cabo una electroforesis, puede ser una sola isoenzima o la superposición de varias isoenzimas diferentes con igual migración electroforética .

## IX. ANEXOS

### ANEXO A

#### SUBGÉNERO *HAPLOXYLON* O PINOS SUAVES

El subgénero *Haploxyton* se divide en dos secciones: *Cembra* y *Paracembra*. La principal diferencia entre estas secciones es que las escamas de los conos de los pinos que pertenecen a la sección *Cembra* poseen umbo terminal, mientras que las escamas de los pinos que pertenecen a la sección *Paracembra* poseen umbo dorsal (cuadro 10).

**Cuadro 10. Características de las secciones *Cembra* y *Paracembra***

Característica	Sección <i>Cembra</i>	Sección <i>Paracembra</i>
Tamaño	Árboles grandes, de 20-40 m de alto	Árboles pequeños y pobremente formados, de 5-15 m de alto
Tipo de Copa	Generalmente abierta, irregularmente piramidal	Ancha y redondeada
Hojas	Se encuentran en fascículas de 5 y son suaves y flexibles, con vainas deciduas y canales de resina externos	Se encuentran en fascículas de 1-5 y son cortas, duras y erectas, con vainas generalmente curvadas en una roseta decidua
Semillas	Pueden presentar, o no, ala	No presentan ala, con una sola excepción, con cubierta que puede ser desde muy delgada hasta muy gruesa
Hábitat	Usualmente se encuentran a elevaciones de 2,000-3,500 m SNM, crecen en las faldas húmedas y frías de las montañas o en valles altos	Generalmente crecen a elevaciones de 700-2,500 m SNM en las faldas rocosas y áridas de las montañas

La sección *cembra* incluye siete especies:

*P. lambertiana*

*P. flexillis*

*P. strobiformis*

*P. ayacahuite* var. *brachyptera*

*P. ayacahuite* var. *veitchii*

*P. ayacahuite*

*P. chiapensis*

(Perry 1991)

## ANEXO B

### SISTEMAS ENZIMATICOS UTILIZADOS

En los siguientes sistemas se utilizaron 75 ml de Tris-HCl 0.05M, pH 8.0, como solución amortiguadora de teñido.

#### ADH

Reactivo	Volumen	Modificaciones
NAD ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotida)	1 ml	1.2 ml
NBT (azul de nitro tetrazolio)	1 ml	--
PMS (metosulfato de fenazina)	0.5 ml	--
Etanol 95%	1 ml	5 ml

#### MDH

Reactivo	Volumen	Modificaciones
Solución de ácido málico (134.1 g DL-ácido málico, 80g NaOH, 1 litro de agua, ajustar a pH 7 con NaOH 4N)	5 ml	--
NAD	1 ml	1.2 ml
NBT	1 ml	--
PMS	0.5 ml	--

#### IDH

Reactivo	Volumen
DL ácido isocítrico	60 mg
NADP ( $\beta$ -NAD fosfato)	1 ml
Solución de cloruro de magnesio 0.25M	1 ml
NBT	1 ml
PMS	0.5 ml

#### SKDH

Reactivo	Volumen	Modificaciones
Ácido sikimico	75 a 50 mg	50 mg
NADP ( $\beta$ -NAD fosfato)	1 ml	1.2 ml
NBT	1 ml	--
PMS	0.5 ml	--

**6-PGD**

Reactivo	Volumen	Modificaciones
Ácido 6 fosfogluónico	20 mg	22 mg
NADP ( $\beta$ -NAD fosfato)	1 ml	1.2 ml
NBT	1 ml	--
PMS	0.5 ml	--

Para el siguiente sistema se utilizaron 75ml de Tris-HCl 0.2M, pH 8.0, como solución amortiguadora de teñido

**ACON**

Reactivo	Volumen	Modificaciones
Ácido cis-aconítico	150 mg	---
NADP ( $\beta$ -NAD fosfato)	1 ml	1.2 ml
Solución de cloruro de magnesio 1%	1 ml	Se utilizó 1 ml de solución de MgCl 0.25 M
NBT	1 ml	
PMS	0.5 ml	
Isocitrato dehidrogenasa	20 unidades	28 unidades

En todos los casos, los reactivos se agregaron a la correspondiente solución amortiguadora tibia (37°C); luego los geles se incubaron en un horno (en oscuridad) a 37°C.

## ANEXO C

### FOTOGRAFÍAS SITIOS DE COLECTA



**Fig. 15. Localidad S1 (Salvachán)**

En esta localidad la presión humana es moderada y se puede observar la presencia de sotobosque.



**Fig. 16. Localidad S2 (Pacajá)**

En esta área la actividad humana es moderada, sobre todo por pastoreo, se puede observar la presencia de sotobosque.



**Fig. 17. Localidad S3 (Chuijolom)**

Esta localidad presentó alta variabilidad genética, se puede observar la gran humedad que se encontraba en la misma.



**Fig. 18. Localidad S4 (Chojolom)**  
Se puede observar el escaso sotobosque y menor humedad del área.



**Fig. 19. Localidad L2 (Chuipachec)**  
Esta localidad presenta alta presión humana debido a que dentro de ella pueden encontrarse cultivos de maíz.



**Fig. 20. Localidad L3 (Trojales)**  
Fue el sitio más alto muestreado, se puede apreciar la baja densidad de árboles presentes.

## ANEXO D

### GELES OBTENIDOS

Figura 21. Bandas obtenidas para el sistema enzimático MDH. Se obtuvieron dos loci traslapados, ambos heterocigotos. Cada columna representa un individuo distinto y cada banda coloreada un alelo.

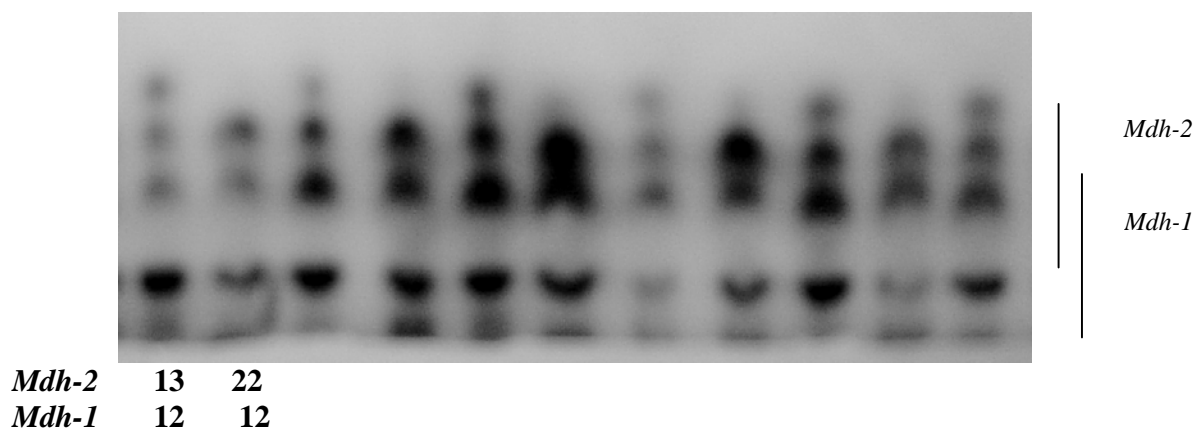
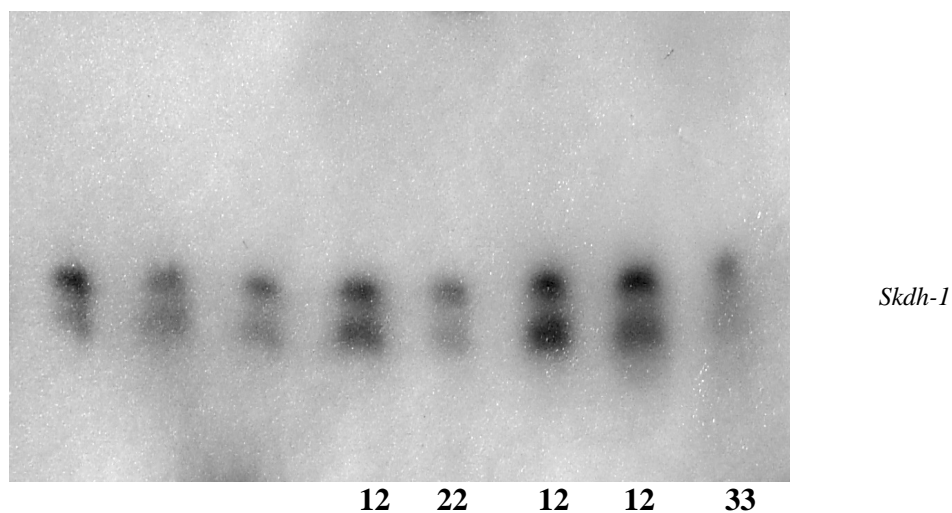


Figura 22. Patrón de bandas obtenido para el sistema enzimático 6-PGD. Se obtuvo un solo locus polimórfico, con cuatro alelos.



**Figura 23. Patrón de bandas obtenido para la enzima SKDH. Se obtuvo un sólo locus polimórfico con cuatro alelos.**



**Figura 24. Patrón de bandas para la enzima IDH. Se obtuvo un solo locus polimórfico con 2 alelos homocigotos. En esta fotografía se puede observar claramente la diferencia de migración del alelo 22 con respecto al 11.**

