

RESUMEN

Alrededor del mundo las diferentes especies pertenecientes al género *Tilia* han sido utilizadas por sus propiedades medicinales debidas principalmente, a la presencia de compuestos de tipo anisolíticos en las flores, los cuales son útiles para problemas del sueño o ansiedad. Sin embargo, los aspectos de la diversidad o estructura genética de estas especies no han sido estudiados. *Tilia americana* var. *mexicana*, es una variedad endémica de México y se distribuye en gran parte del territorio del país estando registrada en 14 de los 32 estados federativos y principalmente, en bosques de tipo mesófilo y mesófilo de montaña. La *Tilia*, nombre vernacular con el que es conocida, es una especie amenazada debido a la explotación de sus flores, ya que con ellas se prepara el té medicinal y por otras presiones antrópicas a las que se somete la especie tales como la tala, introducción de ganado en los bosques, etc. Adicionalmente, es una especie protegida por la NOM-059 de México, lo que la protege de una explotación indiscriminada. Se propone como hipótesis que la extracción recurrente de flores ha generado un efecto sobre el reclutamiento de la especie, desapareciendo de ellas los rangos etáreos más jóvenes. A largo plazo, esto generaría una reducción en la diversidad genética de las poblaciones y por ende un incremento en la estructura genética de *Tilia*. Una consecuencia producto del proceso antes mencionado, es que ante un escenario de cambio climático el pool génico de la especie reduce las opciones de esta en el futuro. En la presente investigación se evaluó el estado de amenaza actual que presenta la especie a dos niveles, composición etárea de la especie en las comunidades, y la diversidad y estructura genética de la especie. Para ello, se midió el diámetro a la altura del pecho (DAP) de cada individuo muestreado y a partir de estos, se colectó material vegetal para el análisis genético. La diversidad y estructura genética se determinó mediante marcadores de microsatélites: nucleares específicos para la especie (SSR) y de cloroplasto universales (SSRcp). De un total de 12 SSR evaluados se obtuvo polimorfismo en 3 marcadores y para SSRcp de 10 marcadores evaluados 3 de ellos resultaron ser polimórficos. Las comunidades de *Tilia americana* var. *mexicana* mostraron reclutamiento de nuevos individuos y generalmente, se encontraron árboles en estado adulto. En términos de la diversidad y estructura genética, resultaron en una reducción de la diversidad genética entre las comunidades, generando una alta estructuración genética en la especie.

INTRODUCCIÓN

El género *Tilia*, integrado aproximadamente por 20 a 25 especies, pertenece a la familia Malvaceae del orden de las Malvales (APG, 2009). A nivel mundial el género *Tilia* se distribuye en zonas templadas del Hemisferio Norte, precisamente en Europa, parte de Asia y en Norteamérica (zona Norte del continente Americano) (Pigott 2012).

Tilia americana var. *mexicana*, es una especie arbórea de México que se encuentra distribuida en 14 estados de la nación, desde Chihuahua hasta Oaxaca. La CONABIO mediante la norma 59, clasificó a la especie como en Peligro de Extinción para la flora mexicana considerando la explotación por tala o a consecuencia de la deforestación del bosque nativo. Por otra parte, se encuentra expuesta a la cosecha de sus flores utilizadas para fitoterapia (Luna-Vega, 2003; Pérez-Ortega, 2008).

Esta especie forma parte del estrato arbóreo del bosque mesófilo de montaña, tipo de vegetación que cubre menos del 1% del territorio nacional (Pérez-Ortega, 2008), e históricamente ha sido el más perturbado de México (Pavón-Hernández, 2004). Por otra parte, la *tilia* acompaña a otras formaciones arbóreas de relevancia en el país, tal es el caso de bosques de *Quercus*, selva mediana subcaducifolia, selva baja caducifolia y bosque de pino-encino (Luna-Vega, 2003). A pesar de ser una especie catalogada como En Peligro, no ha sido objeto de estudio de aspectos biológicos, es así como a la fecha no existen trabajos que aborden las posibles variaciones genéticas y con ello, la valoración a futuro de esta especie como recurso filogenético.

Por ello, se plantea que aquellas poblaciones de *Tilia americana* var. *mexicana* sometidas a mayor explotación mostrarán menores niveles de reclutamiento de nuevos individuos, así como menor diversidad genética y menores niveles de conectividad via flujo génico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Composición etárea de las localidades

Se muestrearon un total de 16 localidades abarcando la distribución completa de la especie. En cada sitio se midieron los DAP de cada individuo con el objeto de determinar la edad y grado de explotación (tala) de las localidades visitadas. Además, se colectaron hojas para la obtención de AND mediante el método CTAB modificado.

Microsatélites universales de cloroplasto (SSRcp)

Se evaluó un total de 10 SSRcp resultando 3 de ellos polimórficos (cp 2, cp 6 y cp 10), se siguieron las condiciones y programas para las reacciones de amplificación de Weising y Gardner (1999).

Microsatélites nucleares (SSR)

Se evaluaron 10 marcadores microsatélites de núcleo (SSR) y 3 de ellos resultaron polimórficos, se siguieron las condiciones y programas de amplificación de Phuekvilai y Wolff (2013).

Análisis de datos

Se utilizó GenAlex 6.5 en Excell 2003, para obtener el análisis de varianza molecular (AMOVA), Índice de Shannon y polimorfismo (%). Los índices de estructura genética (Gst y Rst o Nst) fueron calculados utilizando Permut software (Petit et al. 2005). La red de haplotipos se obtuvo con Network software.

RESULTADOS Y DISCUSION

La composición etárea de las poblaciones estudiadas se determinó mediante los DAP medidos a cada individuo muestreado (Tabla 1). De acuerdo a lo anterior, las poblaciones de mayor edad son Los Filtros (LF), Atecuaro (ATE), La Peña (LP) ubicados en el Estado de Michoacán; Camino a Oaxaca (CO) en el Estado de Oaxaca, y Sierra de Manantlán (SM) del Estado de Jalisco. Cabe destacar que el mayor número de fustes por árbol coincide con los menores DAP, lo que señala que en dichas localidades a ocurrido la tala de individuos adultos generando la emergencia de rebrotes.

Los análisis AMOVA para ambos grupos de marcadores, SSRcp y SSR, demostraron que el mayor flujo génico ocurre dentro de las poblaciones de *Tilia* (91 y 85 %, respectivamente). En relación, a los flujos génicos entre poblaciones, resultaron ser muy reducidos (9 y 15 %, respectivamente).

Los índices de estructura genética obtenidos resultaron diferentes para los marcadores en estudio. Mientras para SSRcp Gst fue 0.093 y Rst de 0.188; mostrando una escasa estructura genética en cuanto los marcadores de cloroplasto. Los resultados obtenidos con SSR, el Gst fue de 0.183 y Nst de 0.177, siendo indicadores de que existe una alta estructuración genética de las poblaciones de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Cabe señalar que lo anterior tiene una estrecha relación con las características de los marcadores moleculares utilizados en este estudio, debido a que los SSRcp representan las variaciones a nivel del cloroplasto que representa la heredabilidad materna y asociados a la dispersión de semillas. A diferencia de los SSR que están relacionados con el flujo génico asociado a polen.

A partir de los datos de SSRcp se obtuvieron 13 haplotipos, registrándose 4 haplotipos únicos y existe un haplotipo ancestral común a todas las poblaciones (Fig. 1).

Tabla 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizados a los datos de marcadores moleculares de cloroplasto (SSRcp) y nucleares (SSR) obtenidos de *Tilia mexicana* var. *mexicana*

SSRcp							SSR						
Source	df	SS	MS	Est. Var.	%	PhiPT	Source	df	SS	MS	Est. Var.	%	Est
Entre Pops	13	10.876	0.837	0.050	9%	0.086	Entre Pops	10	17.959	1.796	0.085	15%	0.150
Dentro Pops	73	38.733	0.531	0.531	91%	p-value 0.01	Entre Indiv	43	41.486	0.965	0.482	85%	p-value 0.001
Total	86	49.609	0.580	100%			Dentro Indiv	54	0.000	0.000	0.000	0%	
							Total	107	59.444	0.568	100%		

Tabla 1. Diámetros a la altura de pecho (DAP) medidos en *Tilia americana* var. *mexicana*.

Población	DAP	Nº FUSTES	Población	DAP	Nº FUSTES
TM	24.8	2	CA	11.6	4
ATE	39.8	1	RT	12.3	4
SC	2.1	1	NC	16.0	4
LP	39.8	1	SM	26.5	3
CP	12.3	4	LR	6.0	7
LT	6.1	5	EX	8.0	5
CO	63.1	2	MX	14.3	3
			FC	11.2	6

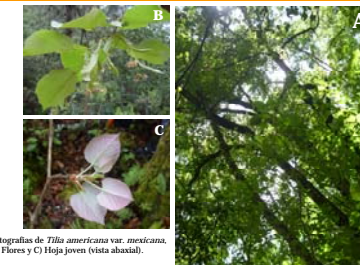


Figura 2. Fotografías de *Tilia americana* var. *mexicana*. A) Copa. B) Flores y C) Hoja joven (vista abaxial).

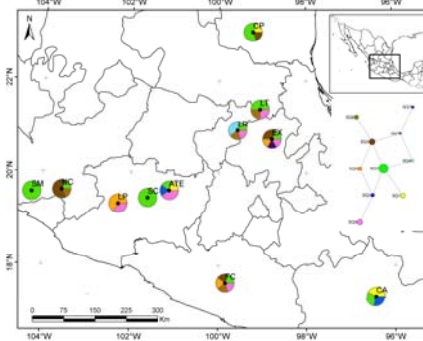


Figura 1. Mapa de distribución de las localidades en estudio y los haplotipos de SSRcp para *Tilia americana* var. *mexicana*.

Tabla 3. Diversidad y estructura genética obtenidos con los marcadores nucleares (SSR) para *Tilia americana* var. *mexicana*.

Población	Estado	Shannon	Dev Est	Polimorfismo
Atecuaro	Michoacán	0.518	0.305	66.67%
Calpulalpan	Oaxaca	0.427	0.215	66.67%
Casa Piedra	Tamaulipas	0.317	0.317	33.33%
Eloxochitlan	Hidalgo	0.652	0.121	100.00%
Filo de Caballos	Querétaro	0.668	0.336	66.67%
La Peña	Michoacán	0.424	0.212	66.67%
Las Ranas	Querétaro	0.558	0.058	100.00%
La Trinidad	San Luis Poto	0.375	0.187	66.67%
Nevaldo Colima	Jalisco	0.289	0.289	33.33%
Santa Clara	Michoacán	0.000	0.000	0.00%
Sierra de Manantlán	Jalisco	0.000	0.000	0.00%
Total		0.384	0.067	54.55%

CONCLUSIONES

Se deja en evidencia la alteración generada por la explotación de la madera de *Tilia americana* var. *mexicana*, debido a que existen poblaciones con DAP muy pequeños. Por otra parte, las localidades con DAP mayores presentan un mayor grado de conservación debido a que se ubican en Reservas Naturales estatales o de particulares, reduciendo con ello la tala en esas zonas, por ejemplo SM.

El escaso flujo génico entre poblaciones se relaciona con el síndrome de polinización de la especie y asociado a la limitada dispersión de las semillas, genera un alto grado de estructuración genética de las poblaciones con un bajo intercambio de genes entre las localidades. Esta condición a largo plazo, podría limitar la permanencia de la especie en el futuro bajo un escenario de cambio climático. Se continuara trabajando en pruebas con los otros marcadores moleculares a fin de completar una matriz de datos más grande que ayude a sustentar lo presentado a la fecha.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la Beca Posdoctoral de la Universidad Nacional Autónoma de México otorgada a A.V. El financiamiento de esta investigación provino de Rufford Foundation (13765-1) y Proyecto PAPIIT IN#203411, titulado "Genética de la conservación de árboles de los bosques templados de México".