









Genes de resistencia inducida en *Pinus hartwegii* (Pinaceae) en el centro de México

Induced resistance defense genes in *Pinus hartwegii* (Pinaceae) in the center of Mexico

Rosa Laura Heredia-Bobadilla¹ , Guadalupe Gutiérrez-González² , David Cibrián-Tovar³ , Angel Rolando Endara-Agramont¹ , María del Carmen Colín-Ferreya⁵ , Amaury Martín Arzate-Fernández^{4,6} 

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: El pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) es la especie de pino que se distribuye a mayor altitud en México, forma comunidades clímax entre 3700 y 4300 m s.n.m. Esta especie se encuentra amenazada por la tala ilegal y un incremento de parásitos como los descortezadores (*Dendroctonus* sp.) y muérdagos enanos (*Arceuthobium* sp.). Esto en parte provoca que las medidas de control y manejo se centren en la remoción de los árboles afectados, cuando en realidad puede tratarse de individuos con una carga genética muy valiosa. El objetivo de este estudio fue identificar y obtener secuencias de genes de defensa y/o resistencia en pinos atacados por estos parásitos. De acuerdo con la bibliografía consultada hasta la elaboración de este trabajo, no hay reportes de este tipo de secuencias para pinos mexicanos.

Métodos: Se obtuvieron secuencias de genes de defensa y resistencia de coníferas filogenéticamente cercanas a *P. hartwegii* y a partir de estas se diseñaron oligonucleótidos, con los cuales se realizaron reacciones de PCR. Los productos obtenidos se secuenciaron y las secuencias obtenidas fueron analizadas para determinar si correspondían a genes de defensa y resistencia propias de esta especie de pino.

Resultados clave: Se logró obtener cuatro secuencias de genes ligados a la defensa y resistencia en coníferas con un nivel de homología entre 93 y 100% con genes de resistencia de otras coníferas, de los géneros *Picea*, *Pinus* y *Pseudotsuga*. Se discute la posible función de estas secuencias en la defensa de *Pinus hartwegii* frente a parásitos como los descortezadores y los muérdagos enanos y se reportan sus claves de acceso en GenBank.

Conclusiones: Las secuencias reportadas podrán ser utilizadas en estudios de expresión genética del pino de las alturas.

Palabras clave: áreas naturales protegidas, bosques de alta montaña, defensa inducida, parásitos, pino de las alturas, resistencia.

Abstract:

Background and Aims: Hartweg's pine (*Pinus hartwegii*) is the pine species distributed at highest altitude in Mexico, forming climax communities between 3700 and 4300 m a.s.l. This species is threatened by illegal logging and an increased presence of bark beetles (*Dendroctonus* sp.) and dwarf mistletoes (*Arceuthobium* sp.) which are parasites. This triggers control and management plans that focus on the removal of affected trees, many of which could be individuals with genetic pools of high value. The objective of this work was to identify sequences of defense and/or resistance genes of parasitized pines, since there are no reported sequences to date for Mexican pines according literature consulted.

Methods: Sequences of defense and resistance genes of conifers phylogenetically close to *Pinus hartwegii* were obtained. From these sequences primers were designed and PCR reactions carried out. Products were sequenced and sequences obtained were analyzed to determine if they correspond to defense and resistance genes of this pine species.

Key results: Four sequences of genes linked to defense and resistance in conifers were obtained with a homology level of 93-100% with conifers of the genus *Picea*, *Pinus* and *Pseudotsuga*. Possible functions of these sequences in *Pinus hartwegii* defense against bark beetles and dwarf mistletoe are discussed and accession numbers in GenBank are reported.

Conclusions: The reported sequences can be used in genetic expression studies of the Hartweg's pine.

Key words: Hartweg's pine, high mountain forests, induced resistance, natural protected areas, parasites, resistance.

Adscripciones en la siguiente página.

⁶Autor para la correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx

Recibido: 21 de noviembre de 2023.

Revisado: 8 de enero de 2024.

Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 21 de marzo de 2024.

Publicado Primero en línea: 5 de junio de 2024.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 131 (2024).

Citar como: Heredia-Bobadilla, R. L. G. Gutiérrez-González, D. Cibrián-Tovar, A. R. Endara-Agramont, M. C. Colín-Ferreya y A. M. Arzate-Fernández. 2024. Genes de resistencia inducida en *Pinus hartwegii* (Pinaceae) en el centro de México. Acta Botanica Mexicana 131: e2282. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm131.2024.2282>



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

e-ISSN: 2448-7589

Introducción

El pino de montaña, *Pinus hartwegii* Lindl., es una especie con distribución restringida a altitudes mayores a 3000 m (forma comunidades clímax entre 3700 y 4300 m s.n.m.), se encuentra en las zonas y picos más altos de México, zonas conocidas también como islas en el cielo (Mastretta-Yañes et al., 2018); por lo tanto, sus poblaciones están fragmentadas y forman razas geográficas con variación regional y aislamiento genético entre ellas (Hernández y De la Isla, 1984; Farjon et al., 1997). Los bosques de *Pinus* L. han pasado por procesos de contacto y separación durante las glaciaciones (Hewitt, 2000; Jin et al., 2021), y han estado en constante coevolución con especies parásitas como muérdagos enanos (*Arceuthobium* M. Bieb.) y descortezadores (*Dendroctonus* Erichson, 1836) (Raffa y Berryman, 1987; Bohlmann y Croteau, 1999; Nickrent et al., 2010; Jones et al., 2016; Okubamichael et al., 2016; Sadowski et al., 2017).

La presencia de especies parásitas es natural, pues forman parte del ecosistema de los bosques templados. Sin embargo, factores como el cambio climático y los disturbios de tipo antropogénico provocan un descontrol en la estructura y dinámica del ecosistema, causando, por ejemplo, que las poblaciones de muérdagos enanos aumenten (Queijeiro-Bolaños et al., 2013; Watson et al., 2022). Con esto, los efectos negativos en los hospederos se vuelven más severos: la formación de “escobas de bruja” (arbustos que forma el muérdago en la copa de sus hospederos), la formación de tumores en las ramas y la reducción de la captación de nutrientes del árbol que hace que su crecimiento en altura y diámetro, así como la producción de semillas, se reduzcan (Geils y Vázquez-Collazo, 2002; Pennings y Callaway, 2002; Barret et al., 2012).

Los árboles poseen un sistema inmune muy particular, es poco conocido como tal, y escasamente estudiado en las coníferas (Dangl y Jones, 2001; Jones y Dangl, 2006; de Wit, 2007; Han, 2019). Los agentes invasores pueden ser desde bacterias, virus y parásitos, hasta herbívoros y

plantas parásitas, y todos deben vencer en primer lugar las defensas constitutivas como la cutícula, la corteza, las espinas y tricomas, o en el caso de las coníferas, la producción de resina que impide la entrada de agentes extraños y sella heridas (Huber et al., 2004). Una vez que vencen estas barreras liberan moléculas efectoras, conocidas también como factores de virulencia, en las células del hospedero para establecerse (Jones y Dangl, 2006; Dangl y McDowell, 2006; Burbano-Figueroa, 2020). Estos factores se liberan en los sitios donde penetró el patógeno o el parásito y funcionan como señales que activan una diversidad de genes de resistencia inducida, que al mismo tiempo desencadenan una red de señalizaciones a nivel celular que inducen la defensa (Dangl y Jones, 2001).

La resistencia se refiere a la capacidad de los árboles para crecer y desarrollarse normalmente aun cuando estén sujetos a algún ataque; a esto se le conoce como resistencia inducida y puede ser vertical u horizontal (Madriz, 2002; Núñez-Farfán et al., 2007; Burbano-Figueroa, 2020). La primera es monogénica y produce dos fenotipos (resistente y susceptible; Callaham, 1966; Zobel y Talber, 1998; Pastorino, 2009), mientras que la resistencia horizontal es poligénica y produce una gradación en su expresión fenotípica (fenotipos con diferentes grados de resistencia y/o susceptibilidad; Pastorino, 2009; Burbano-Figueroa, 2020). La resistencia inducida se activa solo en presencia de patógenos y/o herbívoros e involucra una expresión diferencial de genes y cambios en el metabolismo de la planta. Los mecanismos de inmunidad se activan con la presencia de factores químicos potencialmente dañinos presentes en las células del invasor, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a daños (DAMP). Éstos se unen a proteínas presentes en las células del huésped, llamadas receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que a su vez activarán los genes de defensa de la planta (Jones y Dangl, 2006; Király et al., 2007; Ngou et al., 2022; Song et al., 2021). Los primeros

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 15.5, El Cerrillo Piedras Blancas, 50200 Toluca, Estado de México, México.

²Universidad Tecnológica del Valle de Toluca, Carretera del Departamento de Distrito Federal km. 7.5, 52144 Lerma, Estado de México, México.

³Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, Carretera Federal México-Texcoco km 38.5, 56230 Texcoco, Estado de México, México.

⁴Universidad Autónoma del Estado de México, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Carretera Toluca-Ixtlahuaca km. 15.5, El Cerrillo Piedras Blancas, 50200 Toluca, Estado de México, México.

⁵Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina, Paseo Tollocan 134502, Residencial Colón y Colonia Ciprés, 50120 Toluca, Estado de México, México.

PRR en funcionar son las proteínas de unión de nucleótidos (NBS), codificadas por los genes de resistencia (R), las cuales a su vez pueden activar otras familias de genes de defensa como las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) que se producen solo en presencia de un patógeno, herbivoría o estrés abiótico (Dubey y Singh, 2018; Derevnina et al., 2021). Estas familias de genes de defensa de plantas han sido ampliamente estudiadas en plantas domésticas como tomate, tabaco y arroz (Madriz, 2002; Sudisha et al., 2011), y poco en coníferas (Liu y Ekramoddoullah, 2003; Polyakova et al., 2008). Otras familias de genes como la de las proteínas digerentes (PDIR) y genes que codifican para la producción de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos que forman parte de una de las defensas primarias de las coníferas, la oleoresina, han sido poco más estudiados para este grupo de plantas (Lewinsohn et al., 1991; Ralph et al., 2006; Heredia-Bobadilla et al., 2014; Celedon y Bohlmann, 2019).

Ante este panorama, especies como *P. hartwegii* se vuelven prioritarias para este tipo de estudios. En un estudio sobre la diversidad genética de esta especie en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), se analizaron árboles sin parásitos y parasitados por descortezadores y muérdago enano, reportando que los individuos parasitados poseen niveles ligeramente más altos de diversidad genética (Heredia-Bobadilla et al., 2018). Actualmente, se estima que 37% de las poblaciones de *P. hartwegii* del APFFNT presentan muérdagos enanos (Endara-Agramont et al., 2022) y descortezadores (Endara-Agramont et al., 2023). Esto hace necesario identificar y cuantificar genes de resistencia como una respuesta al ataque de plagas y enfermedades. México es centro de diversidad y endemismos de pinos (Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014), y hasta ahora no existe un plan de manejo que considere la respuesta genética molecular de las coníferas; por ejemplo, la creación de unidades de manejo de poblaciones con mayor o menor resistencia genética.

El objetivo de este trabajo fue identificar genes específicos de *P. hartwegii* que puedan ser utilizados en estudios de expresión genética y con éstos facilitar la selección de genotipos con distintos niveles de resistencia o susceptibilidad. Esto ayudaría a evitar que en los planes de manejo, se corten individuos con carga genética valiosa (resistentes). La expresión de estos genes puede ser estudiada

por técnicas como la creación de librerías genómicas (Liu y Ekramoddoullah, 2007) o la PCR cuantitativa con el uso de proteínas fluorescentes y sondas (Ralph et al., 2006). Sin embargo, para poder realizar alguna de estas técnicas, es necesario contar con secuencias de genes que sirvan como referencias específicas y actualmente no hay secuencias de genes de defensa o resistencia para pinos mexicanos.

Materiales y Métodos

Colecta de material vegetal

La recolecta de material se llevó a cabo en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), Toluca, Estado de México, México, ubicado entre las coordenadas 18°59'31"-19°13'03"N y 99°37'54"-100°09'58"W. Cuenta con una extensión de 53,913 hectáreas y un intervalo altitudinal de 3000-4680 m s.n.m. Es un área dominada por bosques de coníferas (*Pinus* y *Abies* Mill.), latifoliadas (*Quercus* L. y *Alnus* Mill.) y zacatonal alpino (Endara-Agramont et al., 2012; CONANP, 2013). En la región se registran dos tipos de climas: frío con temperatura media anual entre -2 °C y 5 °C y semifrío subhúmedo con temperatura media anual entre -2 °C y 7 °C (CONANP, 2013). Se localiza dentro de los municipios mexiquenses de Zinacantepec, Toluca, Almoloya de Juárez, Tenango del Valle, Villa Guerrero, Calimaya, Temascaltepec y Coatepec Harinas (Fig. 1).

Se recolectaron acículas de individuos de *P. hartwegii* (Fig. 2) atacados por *Arceuthobium globosum* Hawksworth & Wiens, *A. vaginatum* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) J. Presl y *Dendroctonus adjunctus* Blandford, 1897. Se depositaron ejemplares del pino y muérdagos en el Herbario Eizi Matuda de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (CODAGEM, Angel R. Endara-Agramont 250001, 250002 y 250003), acrónimo según Thiers (2024 onwards). Se tomaron acículas de 25 individuos de *P. hartwegii* separados 50 m uno de otro. Todos los árboles presentaban escobas de bruja visibles de uno o de ambos muérdagos en ramas y fuste, así como resinosis y galerías típicas de un ataque de descortezadores. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico con sílica gel para extraer la humedad, y fueron trasladadas en una hielera al laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, donde se conservaron en un ultracongelador (-70°C).



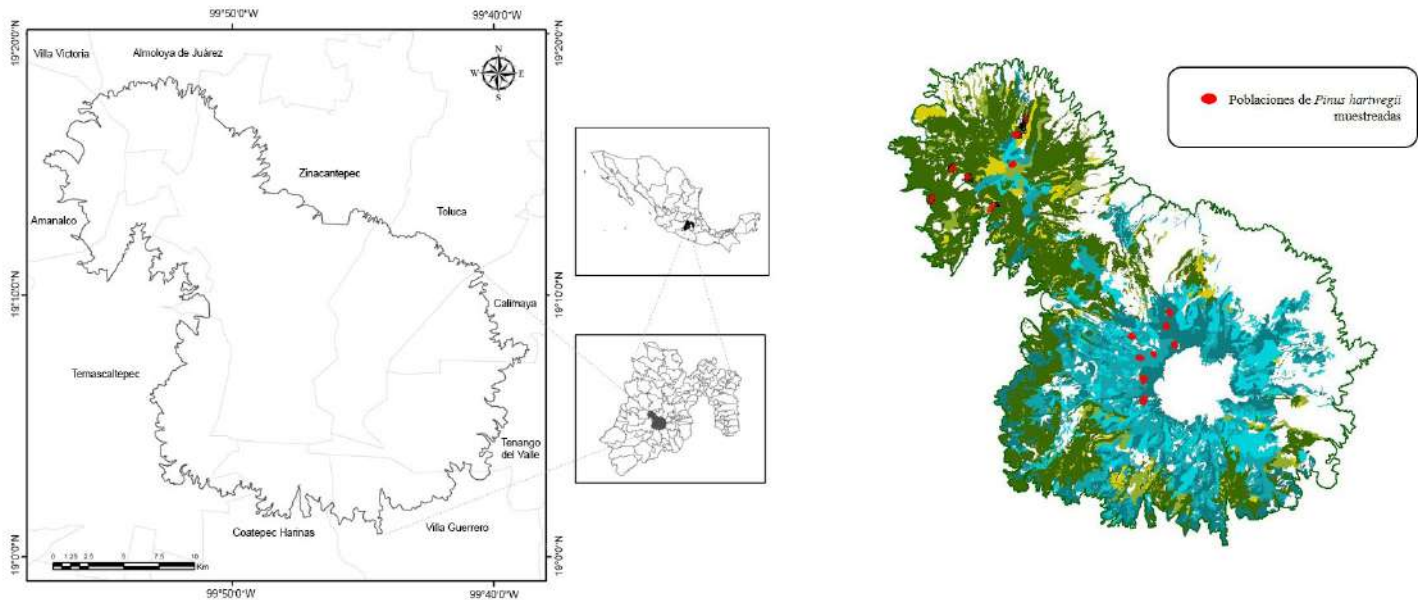


Figura 1: Mapa del área de estudio, Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, México. Se representan las poblaciones muestreadas de *Pinus hartwegii* Lindl. en círculos rojos.

Extracción de DNA y PCR

La extracción de DNA genómico se realizó usando el método de Bromuro de cetil-Trimetil Amonio (CTAB) (Zhou et al., 1999). El DNA se diluyó en una solución buffer Tris-EDTA (TE) hasta 70 μ l y se conservó a -70 °C.

Se hizo un análisis previo de secuencias de genes de resistencia reportados para coníferas de los géneros *Abies*, *Tsuga* (Endl.) Carrière, *Larix* Mill. y *Pinus*, ya que son grupos filogenéticamente cercanos al género *Pinus* (Wang et al., 2000). Se obtuvieron las secuencias de estos genes en GenBank de la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2023). Dichas secuencias se utilizaron para generar cebadores sentido (Fw) y antisentido (Rv) con el programa Primer3 v. 4.1.0 (Kõressaar et al., 2018), y fueron las siguientes: una secuencia del gen RPS18 como referencia o control, terpeno sintasa (TS), dos proteínas relacionadas con la patogénesis (PR): PR-3 y PR-10, y una proteína dirigente PDIR like (Cuadro 1). Una vez sintetizados los cebadores (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se realizaron reacciones de PCR según Heredia-Bobadilla et al. (2014).

Secuenciación y análisis de identidad

Previo a la secuenciación, los productos de PCR fueron purificados mediante el kit GenElute™ PCR Clean-Up de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La secuenciación de los productos se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (FES-Iztacala, UNAM).

Las secuencias se visualizaron con el programa Chromas v. 2.5 (Technelysium, 2023) y con Geneious v. 2022.2 (Dotmatics, 2023). Los niveles de similitud se analizaron mediante la herramienta BLASTn suite y BLASTx de GenBank (NCBI, 2023), y se determinó el grado de homología de las secuencias obtenidas con genes de resistencia y/o defensa.

Resultados

Se obtuvieron cuatro secuencias de genes ligados a la defensa y resistencia. Estos genes han sido reportados para otras especies de coníferas actuando en diversas vías de resistencia y defensa contra especies parásitas (insectos, otras plantas, hongos y bacterias). Las secuencias de es-



Figura 2: *Pinus hartwegii* Lindl. parasitado por *Arceuthobium globosum* Hawksworth & Wien. y *Arceuthobium vaginatum* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) J. Presl en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, México.

Cuadro 1: Secuencias de genes de defensa obtenidas para *Pinus hartwegii* Lindl.

Nombre del gen	Cebadores	Secuencia de nucleótidos 5'---- 3'	Longitud (pb)	Porcentaje de identidad	Traducción (proteína relacionada con la defensa y resistencia)
TS	5'- tgaagggccactatcaggtc -3' (Fw) 5'-caggacactcgaggaagag -3'(Rv)	cctgcgtgtg tgcaaatcca acggaacaag atgtatcaag aggccgtggt aaaggtcagt aaaaactaat tgaacaaga agaatcagaa ataaagatga ctcatcctt caatgactaa tccaatattc cggaatgttc gtagagacac atgtccaatc tcttcctcg agtgcctga	180	99%	PACVQIQRNK MYQEAVVKVSK NLKQEESIEMTHPFNDSNIPE CSRHMSNLFPKRV
PR-3	5'-tgacccttggtggtcaaagt-3' (Fw) 5'-gggatgagttcatgggacac-3' (Rv)	cccagctgtg cttgtgtct catcgtatct ctgatagta taatcagcga ataaaataca gattattgtg caaagaaaag tagcacaagt gctggcgaaa ggccgctcac aggaagttta cctgggtgctg ttccatgtgc agagccaagc gctcctgtgt cccatgaact catccaact ccctggagtc ctccaactc ctcaaagtc cccccaagtc ccccaagtg ctccaagg ccccgggggg gtttcaatc	259	98%	DSKPPRGLWE HLGGLGGTLEEL GGLQGVGMSSWDTGALGSA HGTHPGNFPVSRSLPALVLLFF AQ-SVFYSLIITRDTMSTQAQL
PR-10	5'- gctcaatttcacccaggta -3' (Fw) 5'- tacaccatcttcccctcgtc -3' (Rv)	gggccgggat aaggtgtaca tcaatattat atttcccttc cagtttttc ccctctatgg tttagggggc acttataatg tttttcgtt tatggtctca gtaacaagg attagctac gccaaggagc gagtcgatga aatggacgag gggaagatgg tgtaatcatt ttggtagcgc ggctaacagg gatttcatcc acttcaagga gcggttagat gaaattgacg aggggaagat ggtgtaatga ccaggggaaa aaggggtaaa cg	272	93%	GRDKVYINII FPFQFFPLYGLGG TYNVFRFMVSANKDLATPRS ESMKWTRGRWCNHFSGAA NRDFIHFKERVDEIDEGKMV-- PGEKGVN
PDIR12	5'-agggggctaacctcacactt-3' (Fw) 5'-gagaacgtgatggtgccttt-3' (Rv)	cgccgcacca taggatgatc ggcggtgttc gacgatccca tcaacttga caacaattc cactcccctc cggtggcgag agctcagga tttactttt atgacatgaa gaacactttc agcgcctggc ttgattcac gttgtcctc aactctacag attacaaagg caccatcacg ttctccagct ttgaccacat atattgggtt ttcctatta catgataaaa tgaattgaag atcaaaaag gaactacaac atttctatta cattgacttt ttatgcctaa tggactagtt tgagttgat gtagcttgg caaattgaac cttggtttt tgcatacatg aaagcttga gttcatcagg gaagtgggaa agataacaca agaagtgaat cctcctgatt gaccccccc cattcaatat tctcccttt ctacacgag ctcagagtgc aatcaccaa gtcatgaaga tcagaaagca ccttcccttt ctccagc	507	97%	RRTIGDLAVF DDPITLDNN FHSPVGRAGQGFYFYDM KNTFSAWLGFVFNST YKGTITFSSFDHIYVWFA IT--NELKINKGTTTFSLH- LFMPNGLV-VGW- LGKLNGLFLHT- KLEVHQSGKDNTRSESS- LTPPHSIFLFPFSHELRVQSPKS- RSESTFPFSS

tos genes se depositaron en la base de datos del GenBank (NCBI, 2023) y se puede acceder a ellas con los siguientes identificadores: ON314862, OL639190, OL639191, OL639192.



Las secuencias generadas corresponden a genes que codifican proteínas importantes que participan en la defensa y resistencia genética (Allona et al., 1998; Ralph et al., 2006).

La primera secuencia pertenece a una terpeno sintasa (Cuadro 1), puesto que generó 100% de identidad con la secuencia de un terpeno sintasa de *Pinus elliottii* Engelm. Las secuencias dos y tres pertenecen a la familia de proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PR), una fue la PR-3 con 98% de identidad con una secuencia de la misma familia (PR) de *Pinus taeda* L., y la otra, PR-10 con un porcentaje de identidad de 93% con una secuencia de un gen PR de *Picea abies* (L.) H.Karst (Cuadro 1). La cuarta secuencia pertenece a la familia de Proteínas Dirigentes puesto que se obtuvo un 97% de similitud con una proteína dirigente PDIR12 de *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg. (Cuadro 1).

Finalmente, la secuencia amplificada del gen RPS18 (Fig. 3) obtuvo 100% de similitud con especies genes RPS18 de coníferas.

Discusión

Las plantas son organismos sésiles, lo cual implica que no puedan huir del ataque de depredadores; por lo tanto, han desarrollado un sistema de defensa y resistencia muy sofisticado (Arts y Fiers, 2003; Vivanco et al., 2005). Esto les

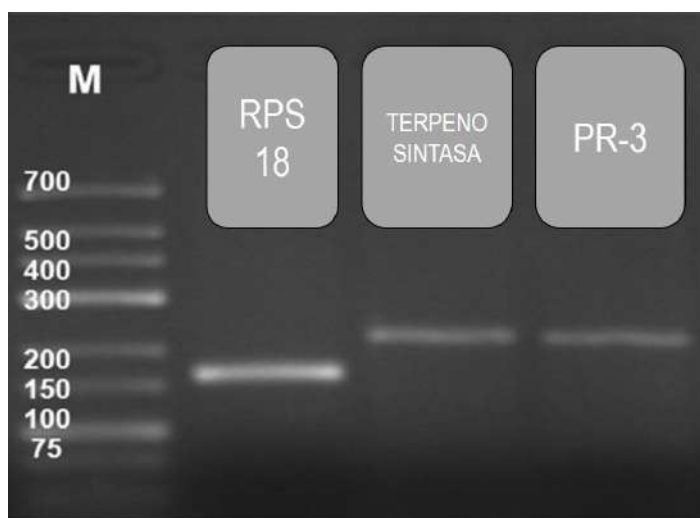


Figura 3: Amplificones del gen de referencia (housekeeping gen) RPS18, terpeno sintasa y PR-3, una quitinasa, de *Pinus hartwegii* Lindl. A la izquierda el marcador de peso molecular mostrando el peso de las bandas en pares de bases.

ha permitido sobrevivir durante millones de años. Uno de los primeros sistemas de defensa es la producción de oleorresina (Lewinsohn et al., 1991), que constituye el primer mecanismo de defensa de las coníferas (Han, 2019), y es regulado por una familia de genes muy conservada entre coníferas, a la cual pertenece la terpeno sintasa (TS) encontrada en este estudio (Keeling y Bohlmann, 2006).

La oleorresina que secretan las coníferas ante el ataque de un herbívoro, un patógeno, o un daño mecánico, se encarga de atrapar a los organismos invasores y sellar las heridas provocadas por estos (Lewinsohn et al., 1993). La oleorresina se produce en estructuras especializadas que se encuentran en todo el árbol. Cuando alguna de estas estructuras se daña por la entrada de insectos, hongos, o plantas parásitas, estos agentes invasores quedan expuestos a la acción de monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos, cuya función es ser tóxicos, frenar el avance a otras partes del árbol, y sellar las heridas causadas por la invasión (Bohlmann y Croteau, 1999; Celedon y Bohlmann, 2019). Todos los terpenos conocidos derivan de las terpenosintasas (TS) y constituyen una de las familias más grandes de genes que intervienen en el metabolismo primario y secundario de las coníferas (Keeling y Bohlmann, 2006). Las TS están altamente relacionadas con la resistencia, pues la cantidad de terpenos presentes en el árbol puede generar resistencia a herbívoros, ya que por un lado los herbívoros pueden elegir qué árbol atacar con base en la cantidad y calidad de terpenos de la resina y, por otro lado, una simple mutación en la cadena de aminoácidos de los genes de los terpenos puede impactar severamente la fisiología de los atacantes (Byun-McKay et al., 2006). Por lo tanto, la resistencia de los pinos está ligada a su perfil de terpenos y este es un campo de estudio muy prometedor, ya que son pocos los estudios al respecto (Keeling y Bohlmann, 2006; Celedon y Bohlmann, 2019).

Una vez que las primeras defensas, es decir, las barreras físicas de los árboles, son superadas por los patógenos o herbívoros, el sistema inmune entra en acción. Las plantas carecen de células móviles para defenderse de un ataque. En vez de esto su sistema inmune recae en la capacidad de cada célula para desencadenar vías de señalización que dirijan la defensa al sitio del ataque, y a su vez a las señales de las células que están siendo atacadas (Dangl y Jones,

2001; Jones y Dangi, 2006; de Wit, 2007). Estas señales activan diferentes familias de genes; una de ellas en la familia PR, que es movilizada ante la presencia de virus, bacterias, hongos, insectos y herbívoros (Edreva, 2005). Actualmente se reconocen 14 familias de genes PR, cada familia tiene una actividad específica frente a los invasores. Por ejemplo, dentro de la familia PR-9 se agrupan las peroxidases cuya función es oxidar residuos fenólicos en compuestos de la pared celular de tejidos infectados por hongos (Veluthakkal y Dasgupta, 2010). En este estudio se reporta la presencia de genes de las familias PR-3 y PR-10. La familia PR-3 agrupa a las proteínas conocidas como quitinasas, las cuales tienen un papel importante para defender a las coníferas ante el ataque de hongos y plantas parásitas (Heredia-Bobadilla et al., 2014). Hidrolizan la quitina presente en la pared celular de los hongos, lo cual se ha reportado para coníferas como *Picea abies* y *Pinus monticola* Douglas ex D. Don infectados por *Pithyium irregulare* Buisman, 1927, *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. y *Ceratobasidion bicorne* J. Eriksson & Ryvarden; también en *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco infectado por *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink y *Phellinus weiri* (Bres.) Gilb. (Veluthakkal y Dasgupta, 2010). La familia PR-10 está conformada por ribonucleasas, cuya función es degradar el RNA de las células invasoras y causar su muerte (Van Loon y Van Strien, 1999; Jain y Kumar, 2015). Se les ha reportado en interacciones conífera-patógeno y conífera-estrés abiótico en *Pseudotsuga menziesii* - *Phellinus weiri*, *Pinus lambertiana* Douglas - resistencia a heladas, y *Pinus monticola* - *Cronartium ribicola* H.A. Dietr. (Ekramoddoullah et al., 2000; Ekramoddoullah, 2004; Veluthakkal y Dasgupta, 2010).

Las proteínas PDIR son consideradas como parte del metabolismo secundario de fenoles y contribuyen a la síntesis de lignina y lignano, dos componentes estructurales de la pared celular vegetal de células parenquimáticas del floema, que durante el ataque de patógenos aumentan su producción para engrosar la pared celular del hospedero y evitar la entrada de estos (Davin y Lewis, 2005; Ralph et al. 2006; Li et al., 2012; Paniagua et al., 2017). Se han caracterizado 19 proteínas DIR en el género *Picea* A.Dietr.; estas se agrupan dentro de dos grupos filogenéticos DIR-a y DIR-b. Al parecer sólo las que pertenecen al grupo de las DIR-a son inducidas por el ataque de insectos y daño mecánico a la

corteza en coníferas; su función es reforzar la pared celular ante un ataque (Davin y Lewis, 2005; Ralph et al., 2006). Los genes que codifican para estas proteínas se activan, según se ha reportado hasta la fecha, en interacciones *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière - *Pissodes strobi* W.D. Peck, 1817, un descortezador, o en *Picea abies* - *Ceratocystis polonica* (Siemaszko) C. Moreau, un hongo. La secuencia obtenida en este estudio, PDIR-12, posee un dominio conservado perteneciente a la súper familia Dirigente (Ralph et al., 2007).

El gen RPS18 es de los más conservados entre coníferas, codifica para una subunidad ribosomal, está compuesta por arreglos en tándem y secuencias espaciadoras y ha sido propuesto para usarse en análisis de expresión como un gen de control ya que su composición entre tipos celulares y eventos ontogénicos no varía (Svingen et al., 2015). Por esto se le utilizó como un control positivo.

El Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca es uno de los principales hábitats de *Pinus hartwegii* dentro de la Faja Volcánica Transmexicana (Farjon et al., 1997; Villanueva et al., 2015). Esta Área Natural Protegida está sujeta a diferentes problemáticas ambientales que constituyen retos para su conservación: la tala (legal e ilegal) y el cambio climático, por ejemplo, provocan disminución de la densidad arbórea y ésta a su vez un aumento de parásitos (Sosa-Díaz et al., 2018; Sáenz-Romero et al., 2020; Endara-Agramont et al., 2022) que en condiciones normales están presentes para regular las poblaciones forestales eliminando árboles viejos o enfermos (Shaw et al., 2004; Weed et al., 2015; Sadowski et al., 2017; del-Val y Sáenz-Romero, 2017).

Las plantas parásitas (*Arceuthobium*), descortezadores (*Dendroctonus*) y hongos de los conos (*Fusarium* Link ex Grey) son algunos de los parásitos que actualmente están representando un riesgo para el pino de las montañas (Arzate-Fernández et al., 2016; Endara-Agramont et al., 2023). Los genes de resistencia que se identificaron son reportados como algunos de los probables genes que se sobregulan frente al ataque precisamente de este tipo de enfermedades y plagas forestales (Heredia-Bobadilla et al., 2014). El gen terpeno sintasa (TS), los genes PR y el gen PDIR pueden representar un primer acercamiento para descifrar los mecanismos de defensa y posible resistencia a parásitos de estos pinos en un área natural protegida, lo cual, a su vez



constituirá una herramienta para conservar esta especie de pino. En este sentido esperamos analizar cómo actúan los sistemas de defensa de *P. hartwegii*, ¿qué genes actúan en la defensa ante plantas parásitas y descortezadores? ¿Hay algún gen que confiera inmunidad? De encontrar este último será un recurso valioso para la conservación.

Conclusiones

Se obtuvieron cuatro secuencias de genes de resistencia en el pino de montaña (*Pinus hartwegii*) con posible actividad frente a hongos, plantas parásitas e insectos descortezadores. El nivel de homología entre las secuencias del pino de montaña y las de otras coníferas encontró una identidad de 93 a 100% con genes de defensa y resistencia. Las secuencias generadas se utilizarán para estudiar los mecanismos de defensa y resistencia de pinos afectados por muérdagos y descortezadores, teniendo como referencia árboles sanos.

Contribución de autores

RHB, GGG, AAF y DCT realizaron la concepción y diseño del trabajo. RHB, GGG, AEA y MCC obtuvieron las muestras en campo y realizaron análisis e interpretación de datos. RHB y GGG redactaron el artículo. RHB, GGG, AAF, AEA, DCT y MCC realizaron la revisión crítica del contenido y aprobaron la versión final.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías con las beca otorgada a RHB (Beca Nacional Posgrado/238317), y por la Universidad Autónoma del Estado de México con el proyecto 2895/2010.

Agradecimientos

A Jonnathan G. Santillán Benítez y al Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) de la Universidad Autónoma del Estado de México por su valiosa asesoría en laboratorio, a los integrantes del laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la UAEMéx, a José Antonio López Sandoval curador del herbario Eizo Matuda de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMéx y a Miriam Alejandra

Rosas Sánchez por su valiosa ayuda en los trabajos de campo, laboratorio y gabinete. A los revisores anónimos y a la editora por ayudar a mejorar la última versión del artículo.

Literatura citada

- Aarts, M. G. M. y M. W. E. J. Fiers. 2003. What drives plant stress genes? Trends in Plant Science 8(3): 99-102. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00006-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00006-2)
- Allona, I., M. Quinn, E. Shoop, K. Swope, S. St. Cyr, J. Carlis, J. Rield, E. Retzel, M. M. Campbell, R. Sederoff y R. W. Whetten. 1998. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences 95(16): 9693-9698. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9693>
- Arzate-Fernández, A. M., G. Gutiérrez-González G. y R. L. Heredia-Bobadilla. 2016. Diversidad genética de dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca: una alternativa de conservación. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 136 pp.
- Barret, T. M., G. Latta, P. E. Hennon, B. N. I. Eskelson y H. Temesgen. 2012. Host-parasite distributions under changing climate: *Tsuga heterophylla* and *Arceuthobium tsugense* in Alaska. Canadian Journal of Forest Research 42(4): 642-656. DOI: <https://doi.org/10.1139/x2012-016>
- Bohlmann, J. y R. Croteau. 1999. Diversity and variability of terpenoid defenses in conifers: molecular genetics, biochemistry and evolution of the terpene synthase gene family in grand fir (*Abies grandis*). In: Chadwick, D. J. y J. A. Goode (eds.). Insect-Plant interactions and induced plant defense, Novartis Foundation. London, UK. 281 pp.
- Burbano-Figueroa, O. 2020. Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. Revista Argentina de Microbiología 52(3): 245-255. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.006>
- Byun-McKay, A., K.-A. Godard, M. Toudefallah, D. M. Martin, R. Alfaro, J. King, J. Bohlmann y A. L. Plant. 2006. Wound-Induced Terpene Synthase Gene Expression in Sitka Spruce That Exhibit Resistance or Susceptibility to Attack by the White Pine Weevil. Plant Physiology 140(3): 1009-1021. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.105.071803>
- Callahan, R. Z. 1966. Nature of resistance of pines to bark beetles. In: Gerhold, H. D., E. J. Schreiner, R. E. McDermott, J. A. Winieski (eds.). Breeding Pest-Resistant Trees. Forest



- Service, U.S. Department of Agriculture Pergamon Press Ltd. London, UK. Pp. 197-201. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-011764-5.50045-6>
- Celedon, J. M. y J. Bohlmann. 2019. Oleoresin defenses in conifers: chemical diversity, terpene synthases, and limitations of oleoresin defense under climate change. *New Phytologist* 224(4): 1444-1463. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.15984>
- CONANP. 2013. Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca. https://simec.conanp.gob.mx/pdf_libro_pm/104_libro_pm.pdf (consultado enero de 2023).
- Dangl, J. L. y J. D. G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411(14): 826-833. DOI: <https://doi.org/10.1038/35081161>
- Dangl, J. L. y J. M. McDowell. 2006. Two modes of pathogen recognition by plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(23): 8575-8576. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0603183103>
- Davin, L. B. y N. G. Lewis. 2005. Lignin primary structures and dirigent sites. *Current Opinion in Biotechnology* 16(4): 407-415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.06.011>
- de Wit, P. J. G. M. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 2726-2732. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7284-7>
- Del-Val, E. y C. Sáenz-Romero. 2017. Insectos descortezadores (Coleoptera: Curculionidae) y cambio climático: problemática actual y perspectivas en los bosques templados. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 20(2): 53-60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.006>
- Derevnina, L., M. P. Contreras, H. Adachi, J. Upton, A. Vergara Cruces, R. Xie, J. Sklenar, F. L. H. Menke, S. T. Mugford, D. MacLean, W. Ma, S. A. Hogenhout, A. Goverse, A. Maqbool, C.-H. Wu y S. Kamoun. 2021. Plant pathogens convergently evolved to counteract redundant nodes of an NLR immune receptor network. *PLOS Biology* 19(8): e3001136. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001136>
- Dotmatics. 2023. Geneious v. 2022.2. GraphPad Software, LLC. Boston, MA, USA. <https://www.geneious.com/>
- Dubey, N. y K. Singh. 2018. Role of NBS-LRR proteins in plant defense. In: Singh, A. y I. K. Singh (eds.). *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Springer. Singapore. 351 pp. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_5
- Edreva, A. 2005. Pathogenesis-Related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology* 31(1-2): 105-124.
- Ekrמודdollah, A. B. M. 2004. Physiology and molecular Biology of a family of pathogenesis-related PR-10 proteins in conifers. *Journal of Crop Improvement* 10(1-2): 267-280. DOI: https://doi.org/10.1300/J411v10n01_11
- Ekrמודdollah, A. K. M., X. Yu, R. Sturrock, A. Zamani y D. Taylor. 2000. Detection and seasonal expression pattern of a pathogenesis-related protein (PR-10) in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) tissues. *Physiologia Plantarum* 110(2): 240-247. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.110214.x>
- Endara-Agramont, A. E., R. L. Heredia-Bobadilla, L. A. García-Almaraz, A. A. Luna-Gil, S. Franco-Maass y V. D. Cibrián-Llenderal. 2022. Factores asociados con la distribución espacial de muérdagos enanos en dos poblaciones de *Pinus hartwegii* del centro de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 93: e935008. DOI: <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2022.93.5008>
- Endara-Agramont, A. E., R. L. Heredia-Bobadilla, L. A. García, A. A. Luna y J. J. Aguirre. 2023. Distribución espacial del descortezador *Dendroctonus adjunctus* Blandford, 1897 (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) en dos bosques de alta montaña del centro de México. *Acta Zoológica Mexicana* 39: 1-17. DOI: <https://doi.org/10.21829/azm.2023.3912569>
- Endara-Agramont, A. E., G. Nava-Bernal, S. Franco-Maass, A. Espinoza-Maya, J. A. B. Ordoñez-Díaz y C. Mallén-Rivera. 2012. Extracción de madera en el Parque Nacional Nevado de Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 3(11): 81-90.
- Farjon, A., J. A. Pérez de la Rosa y B. T. Styles. 1997. Guía de campo de los pinos de México y América Central. Royal Botanic Gardens. Kew, UK. 151 pp.
- Geils, B. W. e I. Vázquez-Collazo. 2002. Loranthaceae and Viscaceae in North America. In: Geils, B. W., J. Cibrián-Tovar y B. Moody (eds.). *Mistletoes of North American Conifers*. USDA Forest Service General Technical Report. Colorado, USA. Pp. 1-8.
- Gernandt, D. S. y J. Pérez de la Rosa. 2014. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 126-133. DOI: <https://doi.org/10.7550/rmb.32195>



- Han, G. Z. 2019. Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytologist* 222(1): 70-83. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.15596>
- Heredia-Bobadilla, R. L., A. M. Arzate-Fernández, G. Gutiérrez-González, J. G. Santillán-Benítez, D. Cibrián-Tovar y A. E. Endara-Agramont. 2014. Genes de defensa en *Abies religiosa*. *Botanical Sciences* 92(4): 623-628. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.130>
- Heredia-Bobadilla, R. L., G. Gutiérrez-González, A. M. Arzate-Fernández y S. Franco-Maass. 2018. Genetic variability of mountain pine (*Pinus hartwegii* Lindl) in the Protection of Flora and Fauna Area Nevado de Toluca. In: El-Esawi, M. (ed.). Genetic diversity in plant species-Characterization and Conservation, InTech Open. London, UK. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79860>
- Hernández, T. T. y M. L. B. De la Isla. 1984. Evolution of damage from oxidizing gases in *Pinus hartwegii* and *Pinus montezumae* var. *lindleyi* on Ajusco (mountain), Federal District (Mexico). *Agrociencia* 56: 183-194.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405(22): 908-913. DOI: <https://doi.org/10.1038/35016000>
- Huber, D. P. W., S. Ralph y J. Bohlmann. 2004. Genomic hardwiring and phenotypic plasticity of terpenoid-based defenses in conifers. *Journal of Chemical Ecology* 30(12): 2399-2418. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-004-7942-2>
- Jain, S. y A. Kumar. 2015. The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. *Advances in Plant & Agriculture Research* 2(7): 305-314. DOI: <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00077>
- Jin, W.-T., D. S. Gernandt, C. Wehenkel, X.-M. Xia, X.-X. Wei y X.-Q. Wang. 2021. Phylogenomic and ecological analyses reveal the spatiotemporal evolution of global pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(20): e20223021181. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.20223021181>
- Jones, J. D. G. y J. L. Dangl. 2006. The plant immune system. *Nature* 444(16): 323-329. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, J. D. G., R. E. Vance y J. L. Dangl. 2016. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 354(6316): aaf6395. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf6395>
- Keeling, C. I. y J. Bohlmann. 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defense of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist* 170(4): 657-675. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01716.x>
- Király, L., B. Barna y Z. Király. 2007. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. *Journal of Phytopathology* 155(7-8): 385-396. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01264.x>
- Köressaar, T., M. Lepamets, L. Kaplinski, K. Raime, R. Andreson y M. Remm. 2018. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics* 34(11): 1937-1938. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty036>
- Lewinsohn, E., M. Gijzen y R. Croteau. 1991. Defense mechanism of conifers: Differences in constitutive and wound induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant Physiology* 96(1): 44-49. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.96.1.44>
- Lewinsohn, E., M. Gijzen, R. M. Muzica, K. Barton y R. Croteau. 1993. Oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*) saplings and mature trees (modulation of this wound response by light and water stresses). *Plant Physiology* 101(3): 1021-1028. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.101.3.1021>
- Li, S. H., N. E. Nagy, A. Hammerbacher, P. Krokene, X. M. Niu, J. Gershenzon y B. Schneider. 2012. Localization of Phenolics in Phloem Parenchyma cells of Norway Spruce (*Picea abies*). *ChemBioChem* 13(18): 2707-2713. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbic.201200547>
- Liu, J. J. y A. K. M. Ekramoddoullah. 2003. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Molecular Genetics and Genomics* 270: 432-441. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0940-1>
- Liu, J. J. y A. K. M. Ekramoddoullah. 2007. The CC-NBS-LRR Subfamily in *Pinus monticola*: targeted identification, gene expression, and genetic linkage with resistance to *Cronartium ribicola*. *Phytopathology* 97(6): 728-736. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0728>
- Madriz, O. K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63: 22-32.
- Mastretta-Yañes, A., A. T. Xue, A. Moreno-Letelier, T. H. Jorgensen, N. Alvarez, D. Piñero y B. C. Emerson. 2018. Long-term in situ



- persistence of biodiversity in tropical sky islands revealed by landscape genomics. *Molecular Ecology* 27(2): 432-448. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.14461>
- NCBI. 2023. GenBank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (consultado junio de 2023).
- Ngou, B. P. M., J. D. G. Jones y P. Ding. 2022. Plant immune networks. *Trends in Plant Science* 27(3): 255-273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.012>
- Nickrent, D. L., V. Malécot, R. Vidal-Russell y J. P. Der. 2010. A revised classification of Santalales. *Taxon* 59(2): 538-558. DOI: <https://doi.org/10.1002/tax.592019>
- Núñez-Farfán, J., J. Fornoni y P. L. Valverde. 2007. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 541-566. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095822>
- Okubamichael, D. Y., M. E. Griffiths y D. Ward. 2016. Host specificity in parasitic plants-perspectives from mistletoes. *AoB Plants* 8: plw069. DOI: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw069>
- Paniagua, C., A. Bilkova, P. Jackson, S. Davravolski, W. Riber, V. Didi, J. Houser, N. Gigli-Bisceglia, M. Wimmerova, E. Budínská, T. Hamman y J. Hejatko. 2017. Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. *Journal of Experimental Botany* 68(13): 3287-3301. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx141>
- Pastorino, M. 2009. Bases genéticas de la resistencia de los árboles a las plagas. In: Villacide, J. M. y J. C. Corley (eds.). *Manejo Integrado de Plagas Forestales*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA. Bariloche, Argentina. 1-14 pp.
- Pennings, S. C. y R. M. Callaway. 2002. Parasitic plants: parallels and contrasts with herbivores. *Oecologia* 131: 479-489. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0923-7>
- Polyakova, G. G., N. V. Pashenova, V. I. Polyakov y G. K. Zrazhevskaya. 2008. Induction of conifer immune responses by pathogenic fungus metabolites. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(4): 456-502. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1021443708040109>
- Queijeiro-Bolaños, M. E., Z. Cano-Santana e I. Castellanos-Vargas. 2013. Does disturbance determines the prevalence of dwarf mistletoe (*Arceuthobium*, Santalales: Viscaceae) in Central Mexico? *Revista Chilena de Historia Natural* 86(2): 181-190. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2013000200007>
- Raffa, K. F. y A. A. Berryman. 1987. Interacting selective pressures in conifer bark-beetle systems: A basis for reciprocal adaptations? *The American Naturalist* 129(2): 234-262. DOI: <https://doi.org/10.1086/284633>
- Ralph, S. G., S. Jancsik y J. Bohlmann. 2007. Dirigent proteins in conifer defense II: Extended gene discovery, phylogeny, and constitutive and stress-induced gene expression in spruce (*Picea* spp.). *Phytochemistry* 68(149): 1975-1991. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.042>
- Ralph, S., J. Y. Park, J. Bohlmann y S. D. Mansfield. 2006. Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp.). *Plant Molecular Biology* 60: 21-40. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2226-y>
- Sadowski, E. M., L. J. Seyfullah, C. A. Wilson, C. L. Calvin y A. R. Schmidt. 2017. Diverse early dwarf mistletoes (*Arceuthobium*), ecological keystones of the Eocene Baltic amber biota. *American Journal of Botany* 104(5): 694-718. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1600390>
- Sáenz-Romero, C., E. Mendoza-Maya, E. Gómez-Pineda, A. Blanco-García, A. R. Endara-Agramont, R. Lindig-Cisneros, J. López-Upton, O. Trejo-Ramírez, C. Wehenkel, D. Cibrián-Tovar, C. Flores-López, A. Plascencia-González y J. J. Vargas-Hernández. 2020. Recent evidence of Mexican temperate forest decline and the need for ex situ conservation, assisted migration, and translocation of species ensembles as adaptive management to face projected climatic change impacts in a megadiverse country. *Canadian Journal of Forest Research* 50(9): 843-854. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjfr-2019-0329>
- Shaw, D. C., D. M. Watson y R. L. Mathiasen. 2004. Comparison of dwarf mistletoes (*Arceuthobium* spp., Viscaceae) in the western United States with mistletoes (*Amyema* spp., Loranthaceae) in Australia-ecological analogs and reciprocal models for ecosystem management. *Australian Journal of Botany* 52(4): 481-498. DOI: <https://doi.org/10.1071/BT03074>
- Song, W., A. Fordener, D. Yu y J. Chai. 2021. Structural biology of plant defense. *New Phytologist* 229(2): 692-711. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16906>
- Sosa-Díaz, L., G. J. Méndez González, A. M. A. García Aranda, S. V. H. Cambrón, Q. J. A. Villareal, G. C. G. Ruiz y J. J. C. Montoya.



2018. Potential distribution of borers, defoliators, barking beetles and mistletoes in coniferous forests of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 9(47): 1-22. DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i47.159>
- Sudisha, J., R. G. Sharathchandra, K. N. Amruthesh, A. Kumar y S. Shetty. 2012. Pathogenesis Related Proteins in plant defense response. In: Mérillon, J. M. y K. G. Ramawat (eds.). *Plant Defense: Biological Control*. Springer Science. Karnataka, India. Pp. 379-402. DOI: <https://doi.org/10.13140/2.1.2445.2163>
- Svingen, T., H. Letting, N. Hadrup, U. Hass y A. M. Vinggaard. 2015. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ* 3: e855; DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.855>
- Technelysium. 2023. Technelysium Pty Ltd, DNA Sequencing Software, Chromas v. 2.5. Brisbane, Australia. <https://technelysium.com.au/wp/contact/>
- Thiers, B. 2024 onwards. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. <https://sweetgum.nybg.org/science/ih/> (consultado marzo de 2024).
- Van Loon, L. C. y E. A. Van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(2): 85-97. DOI: <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0213>
- Veluthakkal, R. y M. G. Dasgupta. 2010. Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. *Trees* 24: 993-1006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0489-7>
- Villanueva-Díaz, J., J. Cerano-Paredes, L. Vázquez-Selem, D. W. Stahle, P. Z. Fulé, L. L. Yocom, O. Franco-Ramos y J. A. Ruiz-Corral. 2015. Red dendrocronológica del pino de altura (*Pinus hartwegii* Lindl.) para estudios dendroclimáticos en el noreste y centro de México, *Investigaciones Geográficas, boletín del Instituto de Geografía* 86: 5-14. DOI: <https://doi.org/10.14350/rig.42003>
- Vivanco, J. M., E. Cosío, V. M. Loyola-Vargas y H. E. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia* 341: 68-75.
- Wang, X. Q., D. C. Tank y T. Sang. 2000. Phylogeny and divergence times in Pinaceae: evidence from three genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17(5): 773-781. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026356>
- Watson, D. M., R. C. McLellan y F. E. Fontúrbel. 2022. Functional roles of parasitic plants in a warming world. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 53: 25-45. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102320-115331>
- Weed, A. S., M. P. Ayres y B. J. Bentz. 2015. Population dynamics of bark beetles. In: Vega, F. E. y R. W. Hofstetter (eds.). *Bark beetles. Biology and Ecology of Native and Invasive Species*. Elsevier. New York, USA. Pp. 157-176. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417156-5.00004-6>
- Zobel, B. y J. Talbert. 1998. *Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales*. Limusa. México, D.F., México. 545 pp.
- Zhou, Z., M. Miwa y T. Hagens. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by Polymorphism of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR). *New Phytologist* 144: 55-63. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00504.x>

