

VARIACIÓN ISOENZIMÁTICA DE *Pinus hartwegii* LINDL. EN UN GRADIENTE ALTITUDINAL EN MICHOACÁN, MÉXICO

ISOENZYMATIC VARIATION OF *Pinus hartwegii* LINDL. ALONG AN ALTITUDINAL GRADIENT IN MICHOACÁN, MÉXICO

Héctor Viveros-Viveros^{1,2}, Blanca L. Tapia-Olivares³, Cuauhtémoc Sáenz-Romero^{3*}, J. Jesús Vargas-Hernández¹, Javier López-Upton¹, Amalio Santacruz-Varela⁴, Gustavo Ramírez-Valverde⁵

¹Forestal, ⁴Genética, ⁵Estadística, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México ²Instituto de Investigaciones Forestales, Universidad Veracruzana. Parque Ecológico "El Haya", Colonia Benito Juárez, 91070. Xalapa, Veracruz. ³Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH). Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacan. 58880. (csaenzromero@gmail.com).

RESUMEN

Para conocer la variación genética en un gradiente altitudinal y generar lineamientos para la conservación de *Pinus hartwegii* Lindl., se investigó la variación genética isoenzimática entre poblaciones de esta especie a diferentes altitudes en el Parque Nacional Pico de Tancítaro, Michoacán, México. Se recolectaron semillas de cuatro localidades ubicadas a 3000, 3200, 3400 y 3600 m de altitud. Se encontró polimorfismo en 11 de los 12 loci examinados. La heterocigosidad esperada promedio (H_e) fue 0.12. En tres loci existió desequilibrio de Hardy-Weinberg ($p \leq 0.001$), con un déficit de heterocigotos. La diferenciación genética entre poblaciones fue significativa ($F_{ST} = 0.111$). La distancia genética promedio (0.108) fue baja, y el flujo génico ($N_m = 2.0$) fue relativamente bajo. El agrupamiento de las poblaciones separa a la población de 3600 m del resto (a 3400 m) ($p \leq 0.05$). Se sugiere establecer una Unidad de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (UCRGF) a 3600 m de altitud y un tamaño mínimo de población viable (N_e) de 4157 individuos, y otra entre los 3000 y los 3350 m de altitud y un N_e de 3055 árboles.

Palabras clave: *Pinus hartwegii*, conservación de recursos genéticos, diferenciación genética, flujo génico, isoenzimas, variación genética.

INTRODUCCIÓN

Pinus hartwegii Lindl. es una especie confinada a las montañas más altas de México y de América Central, y crece entre 3000 a 4000 m

ABSTRACT

To determine the genetic variation along an altitudinal gradient and generate guidelines for the conservation of *Pinus hartwegii* Lindl., genetic isoenzymatic variation was studied in populations of the species at different altitudes in Pico de Tancítaro National Park, Michoacán, México. Seeds were collected from four locations at altitudes of 3000, 3200, 3400 and 3600 m. Polymorphism was found in 11 of the 12 loci examined. The expected average heterozygosity (H_e) was 0.12. At three loci there was Hardy-Weinberg non equilibrium ($p \leq 0.05$), with a deficit of heterozygotes. Genetic differentiation among populations was significant ($F_{ST} = 0.111$). Average genetic distance (0.108) was low, and gene flow was relatively low ($N_m = 2.0$). Grouping populations separated the 3600 m population from the other three (3000 to 3400 m) ($p \leq 0.05$). It is recommended that a forest genetic resource conservation unit be established at an altitude of 3600 m with a minimum viable population size (N_e) of 4157 individuals, while another should be established between 3000 and 3350 m with N_e of 3055 trees.

Key words: *Pinus hartwegii*, genetic resource conservation, genetic differentiation, gene flow, isoenzymes, genetic variation.

INTRODUCTION

Pinus hartwegii Lindl. is a species whose distribution is limited to the highest mountains of México and Central America, growing at elevations between 3000 and 4000 m (Perry, 1991). It is a species whose great importance lies in its being one of the main components of the

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Noviembre, 2009. Aprobado: Julio, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 723-733. 2010.

de altitud (Perry, 1991). Es una especie de gran importancia por ser uno de los componentes principales de los bosques de las montañas altas en México (Lauer, 1978). Para México se calcula un aumento de la temperatura promedio anual de 1.5 °C para el 2030, 2.3 °C en el 2060 y 3.7 °C en el 2090, y un decremento de la precipitación anual de 6.7 %, 9.0 % y 18.2 % (Sáenz-Romero *et al.*, 2009); además, una disminución del hábitat de *P. hartwegii* hasta en 42 % (Arriaga y Gómez, 2004). El aumento de la temperatura en los 100 años recientes ha causado una reducción de 10.6 % en el crecimiento relativo de la especie (Ricker *et al.*, 2007).

El primer paso de una estrategia de conservación de la diversidad genética es evaluar el estatus y la estructura genética de la especie (Yeh, 2000). Las isoenzimas son los marcadores moleculares más usados para ello en especies forestales (El-Kassaby y Ritland, 1996). A partir de la heterocigosidad estimada con isoenzimas, es posible establecer el tamaño mínimo de población genéticamente viable, lo que permite determinar el tamaño necesario de Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (Sáenz-Romero *et al.*, 2003).

En caracteres cuantitativos con valor adaptativo se ha encontrado un patrón clinal bien definido de variación altitudinal entre poblaciones de *P. hartwegii* en México (Viveros-Viveros *et al.*, 2009). En dos estudios isoenzimáticos en *P. hartwegii* en México se examinó la variación entre y dentro de poblaciones (Solís-Ramos e Iglesias-Andreu, 2001; Iglesias-Andreu y Luna-Rodríguez, 2008), pero no se ha investigado la variación a través de un gradiente altitudinal. En otras especies forestales, usando marcadores neutrales a la selección se ha determinado que es más común encontrar algún patrón de variación asociado a la altitud que la ausencia de un patrón (Ohsawa e Ide, 2007).

La hipótesis del presente trabajo fue que probablemente hay un patrón de variación genética altitudinal, donde las poblaciones de la parte central de la distribución altitudinal de *P. hartwegii* sean las que tengan mayor diversidad genética, mientras las de los extremos altitudinales superior e inferior tengan menor diversidad, ya que ése es el patrón más común (Ohsawa e Ide, 2007).

Los objetivos de esta investigación fueron: 1) cuantificar mediante isoenzimas la diversidad genética en poblaciones de *P. hartwegii* distribuidas en

high mountain forests of Mexico (Lauer, 1978). For Mexico, an increase of 1.5 °C in average annual temperature in the year 2030, 2.3 °C in 2060, and 3.7°C in 2090 has been estimated, with decreases in annual precipitation of 6.7 %, 9.0 % and 18.2 % (Sáenz-Romero *et al.*, 2009). This would mean that the habitat of *P. hartwegii* would be reduced by up to 42 % (Arriaga and Gómez, 2004). The increase in temperature over the last 100 years has already caused a reduction of 10.6 % in the relative growth of the species (Ricker *et al.*, 2007).

The first step in creating a strategy to conserve genetic diversity is to evaluate the status and genetic structure of the species (Yeh, 2000). Isoenzymes are the most commonly used molecular markers for this purpose in forest species (El-Kassaby and Ritland, 1996). From the estimated heterozygosity, it is possible to establish the smallest possible size of a genetically viable population, which would permit us to determine the necessary size of forest genetic resource conservation units (Sáenz-Romero *et al.*, 2003).

In quantitative traits with adaptation value, a well-defined clinal pattern of altitudinal variation has been found among populations of *P. hartwegii* in México (Viveros-Viveros *et al.*, 2009). In two isoenzymatic studies on *P. hartwegii* in México, variation among and within populations was examined (Solís-Ramos and Iglesias-Andreu, 2001; Iglesias-Andreu and Luna-Rodríguez, 2008), but variation along an altitudinal gradient has not been studied. In other forest species, using genetic markers neutral to selection, it has been determined that it is more common to find a pattern of variation associated with altitude than to find no pattern at all (Ohsawa and Ide, 2007).

In this study, we hypothesized that there might be a pattern of altitudinal genetic variation in which the populations of the central part of the altitudinal distribution of *P. hartwegii* would be that with the greatest genetic diversity, while the upper and lower altitudinal extremes would have less diversity, as this is the most common pattern (Ohsawa and Ide, 2007).

The objectives of this study were 1) to quantify, by means of isoenzymes, the genetic diversity in populations of *P. hartwegii* distributed along an altitudinal gradient in the state of Michoacán; 2) to determine the existence of variation associated with the altitudinal gradient in terms of genetic diversity

un gradiente altitudinal del estado de Michoacán; 2) determinar la existencia de variación asociada con el gradiente altitudinal en cuanto a parámetros de diversidad genética; 3) estimar el tamaño de población genéticamente viable necesario para establecer Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

En enero de 2005 se recolectó semilla de polinización libre de *P. hartwegii* en cuatro poblaciones en un gradiente altitudinal (3000, 3200, 3400 y 3600 m) en el Parque Nacional Pico de Tancítaro, estado de Michoacán (Cuadro 1). La definición de población fue relativamente arbitraria: un grupo de individuos en una condición de rodal relativamente homogénea, distribuidos en un rango altitudinal de ± 20 m desde el punto altitudinal designado (3000, 3200, 3400 y 3600 m); esta categoría podría ser considerada por algunos como subpoblación. Las poblaciones mostraron una misma exposición (noreste). En cada población se seleccionaron al azar 19 a 30 árboles, separados al menos 30 m entre ellos. De cada árbol se recolectaron tres a cinco conos y se identificaron por árbol y por población.

Electroforesis de isoenzimas

Se realizó el análisis de electroforesis de isoenzimas en geles de almidón. Se evaluaron 12 loci en total; en ocho loci (*ACP*, *G6P*, *MDH-1*, *MDH-2*, *PGI-1*, *PGI-2*, *6PG-1* y *6PG-2*) se usó la metodología de Yamada y Guries (1989), y en cuatro (*EST*, *GOT*, *LAP* y *PGM*) la de Soltis *et al.* (1983). Los loci de un mismo sistema isoenzimático se denominaron como locus 1 al de mayor movilidad y 2 al de menor movilidad. Para cada locus se denominó como 1 al alelo más común y para los demás alelos del mismo locus se asignó un número sucesivo según su movilidad, de mayor a menor. La interpretación de los patrones de bandeo se realizó usando como referencia la migración de muestras de

parameters; 3) to estimate the size of a genetically viable population necessary to establish forest genetic resource conservation units.

MATERIALS AND METHODS

Genetic material

In January of 2005, open-pollinated *P. hartwegii* seed was collected in four populations along altitudinal gradients (3000, 3200, 3400 and 3600 m) in the Pico de Tancítaro National Park, state of Michoacán (Table 1). The definition of each population was relatively arbitrary: a group of individuals in a relatively homogeneous stand distributed within an altitudinal range of ± 20 m from the designated altitudinal point (3000, 3200, 3400 and 3600 m). This category might be considered a sub-population by some. The populations all showed northeast exposure. In each population 19 to 30 trees were selected at random; the trees were separated by at least 30 m. Three to five cones were collected from each tree and labeled by tree and population.

Isoenzyme electrophoresis

Isoenzyme electrophoresis analysis was done in starch gels. A total of 12 loci were assessed; in eight loci (*ACP*, *G6P*, *MDH-1*, *MDH-2*, *PGI-1*, *PGI-2*, *6PG-1* and *6PG-2*) the methodology of Yamada and Guries (1989) was used, and in four (*EST*, *GOT*, *LAP* and *PGM*) the Soltis *et al.* (1983) method. The loci of a single isoenzyme system were denominated as follows: locus 1 was that of greater mobility, and locus 2 was that of less mobility. For each locus, the most common allele was denominated 1 and the rest of the alleles of the same locus were assigned successive numbers, from greater to lesser, according to their mobility. For the interpretation of the banding patterns, the migration of samples of the monomorphic species *Pinus resinosa* Aiton was used as the reference. The *P. hartwegii* samples consisted of six mega-gametophytes per individual; with this sample size, the probability of error in an identification of heterozygotes as homozygotes is $2 \times 0.5^6 = 0.03$ (Conkle, 1981).

Cuadro 1. Localización geográfica de cuatro poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. muestreadas en el Parque Nacional Pico de Tancítaro, Michoacán, México.

Table 1. Geographic location of four *Pinus hartwegii* Lindl. populations sampled in Pico de Tancítaro National Park, Michoacán, Mexico.

Población	Número de individuos	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (m)
1	29	19° 25.120'	102° 18.750'	3600
2	30	19° 25.128'	102° 18.399'	3400
3	29	19° 26.036'	102° 17.998'	3200
4	19	19° 25.967'	102° 16.972'	3000

Pinus resinosa Aiton, una especie monomórfica. Las muestras de *P. hartwegii* consistieron en seis megagametofitos por cada individuo; con ese tamaño de muestra, la probabilidad de error de una identificación de heterocigotos como homocigotos es: $2 \times 0.5^6 = 0.03$ (Conkle, 1981).

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas, la heterocigosidad observada y esperada, los alelos raros, los alelos privados, la proporción de loci polimórficos (criterio ≤ 0.99) y las diferencias significativas entre la heterocigosidad observada y esperada se estimaron mediante el software Tools for Population Genetic Analysis (Miller, 1997). El número promedio de alelos por locus, y el número efectivo de alelos se obtuvieron mediante el programa POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Se estimó la endogamia total (F_{IT}), la proporción de la diversidad genética total entre poblaciones (F_{ST}) y la endogamia dentro de poblaciones (F_{IS}); los intervalos de confianza al 90 % para los estadísticos de F de Wright se calcularon por la técnica de muestreo con reemplazo (bootstrapping) sobre los loci con 10,000 repeticiones (Miller, 1997). Con el intervalo de confianza para F_{ST} se determinó la existencia de diferenciación genética significativa entre poblaciones. Se estimó el flujo génico como el número de migrantes por generación (N_m) (Slatkin 1987):

$$N_m = ((1/F_{ST}) - 1)/4$$

Para conocer el patrón de diferenciación genética entre poblaciones se estimaron las distancias genéticas entre pares de localidades mediante la distancia modificada de Rogers (Miller, 1997). Con base en la matriz de distancias genéticas, las poblaciones se agruparon usando el método de agrupamiento con promedios no ponderados (UPGMA) (Swofford y Olsen, 1990). Se comparó la frecuencia de alelos entre pares de poblaciones mediante la prueba de probabilidad combinada de Fisher (Miller, 1997). El tamaño efectivo de población genéticamente viable se calculó a partir del valor estimado de heterocigosidad esperada, usando una fórmula de regresión (Sáenz-Romero *et al.*, 2003), obtenida al ajustar un modelo de regresión lineal entre valores de tamaño efectivo de población viable (N_e) y valores de heterocigosidad esperada (H_e) que se desea mantener, considerando una tasa de mutación de 1×10^{-5} con datos de Millar y Libby (1991) para varias especies de coníferas. La fórmula fue:

$$N_e = -984.58 + (36723 H_e)$$

Se evaluó el grado de asociación de la heterocigosidad esperada, la proporción de loci polimórficos y el número promedio de alelos por locus respecto a la elevación de las localidades usando los procedimientos CORR y RES (SAS Institute, 1988).

Statistical analysis

Allele frequency, observed and expected heterozygosity, rare alleles, private alleles, proportion of polymorphs (criteria ≤ 0.99), and significant differences between observed and expected heterozygosity were estimated with the software Tools for Population Genetic Analysis (Miller, 1997). The average number of alleles per locus and the actual number of alleles were obtained using the program POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Total endogamy (F_{IT}), proportion of total genetic diversity among populations (F_{ST}) and endogamy within populations (F_{IS}) were estimated; the confidence intervals at 90 % for the Wright's F-statistics were calculated using the bootstrapping re-sampling technique with replacement on the loci with 10,000 replications (Miller, 1997). With the confidence interval for F_{ST} , the existence of significant genetic differentiation among populations was determined. Gene flow was estimated as the number of migrants per generation (N_m) (Slatkin, 1987):

$$N_m = ((1/F_{ST}) - 1)/4$$

To identify the pattern of genetic differentiation among populations, genetic distances were estimated between pairs of localities using modified Rogers distance (Miller, 1997). Based on the matrix of genetic distances, the populations were grouped using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) (Swofford and Olsen, 1990). Allele frequency was compared between pairs of populations with the Fisher combined probability test (Miller, 1997). The effective size of a genetically viable population was calculated only from the estimated value of expected heterozygosity, using a regression formula (Sáenz-Romero *et al.*, 2003), obtained by adjusting a linear regression model among values of actual viable population size (N_e) and the desired expected heterozygosity (H_e) values, assuming a mutation rate of 1×10^{-5} , with data of Millar and Libby (1991) for several conifer species. The formula was:

$$N_e = -984.58 + (36723 H_e)$$

The degree of association of expected heterozygosity, the proportion of polymorphic loci, and the average number of alleles per locus with respect to the elevation of the locations was estimated using the CORR and RES procedures (SAS Institute, 1988).

Geographic distances between populations were estimated with topographic charts (1:50 000, INEGI, 1998). With these and altitudinal charts, spatial distances between pairs of populations were obtained. The correlation between genetic distances and spatial differences were estimated using the Mantel test (Miller, 1997).

Se estimaron las distancias geográficas entre poblaciones con cartas topográficas (1:50 000, INEGI 1998); con éstas y las altitudinales se obtuvieron las distancias espaciales entre pares de poblaciones. Se estimó la correlación entre las distancias genéticas y las distancias espaciales mediante la prueba de Mantel (Miller, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética dentro de poblaciones

Se encontraron 30 alelos en 12 loci muestreados. El número promedio de alelos por locus y de alelos efectivos por locus de las poblaciones se presentan en el Cuadro 2. El número de alelos por locus (2.5) fue ligeramente menor al de 2.8 al reportado por Solís-Ramos e Iglesias-Andreu (2001) en *P. hartwegii* y cercano al de 2.4 en *P. oocarpa* (Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2003). El promedio de alelos por locus fue 1.9 a nivel de población, valor cercano al de 1.8 en *P. pinceana* Gordon (Ledig *et al.*, 2001).

El análisis conjunto de todas las poblaciones mostró que 11 loci fueron polimórficos (91.7 %) y un locus fue monomórfico (*PGI-1*). En *P. hartwegii*, Solís-Ramos e Iglesias-Andreu (2001) reportan 100 % de loci polimórficos en esterasas (*EST1*, *EST2*, *EST3*, y *EST4*), mientras que Iglesias-Andreu y Luna-Rodríguez (2008) muestran 86 % de loci polimórficos en la misma especie. El mayor número promedio de alelos por locus, el mayor nivel de polimorfismo y el mayor número de alelos privados (3 de un total de 5) se presentaron en la población de mayor altitud (Cuadro 2).

RESULTS AND DISCUSSION

Genetic diversity within populations

In 12 sampled loci, 30 alleles were found. The average number of alleles per locus and actual alleles per locus of the populations are presented in Table 2. The number of alleles per locus (2.5) was slightly less than that of 2.8 reported by Solís-Ramos and Iglesias-Andreu (2001) in *P. hartwegii* and close to the 2.4 reported in *P. oocarpa* (Sáenz-Romero and Tapia-Olivares, 2003). The average number of alleles per locus was 1.9 at the level of population, a value close to that of 1.8 in *P. pinceana* Gordon (Ledig *et al.*, 2001).

The joint analysis of all the populations showed that 11 loci were polymorphic (91.7 %) and one locus was monomorphic (*PGI-1*). In *P. hartwegii*, Solís-Ramos and Iglesias-Andreu (2001) reported 100 % polymorphic loci in esterases (*EST1*, *EST2*, *EST3*, and *EST4*), while Iglesias-Andreu and Luna-Rodríguez (2008) show 86 % polymorphic loci in the same species. The largest average number of alleles per locus, the highest level of polymorphism and the largest number of private alleles (3 of a total of 5) were found in the population from the highest elevation (Table 2).

Expected heterozygosity (H_e) was slightly higher in the populations at the extreme edges of the altitudinal transect than those in the middle, with the highest value in the population at the highest altitude (Table 2). Average H_e was higher than H_o , with significant differences among the three

Cuadro 2. Parámetros de diversidad genética en cuatro poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. muestreadas en un gradiente altitudinal en Michoacán, México.

Table 2. Genetic diversity parameters in four *Pinus hartwegii* Lindl. populations sampled along an altitudinal gradient in Michoacán, México.

Población	N [†]	A [‡]	Ne [§]	Ap ^b	Ar [‡]	H _o ^{††}	H _e ^{‡‡}	P (%) ^{§§}
3000	16.7	1.8	1.2	1	3	0.09	0.13	50.0
3200	26.8	1.7	1.1	1	5	0.06	0.09	41.7
3400	24.0	1.8	1.2	0	6	0.07	0.10	58.3
3600	26.3	2.1	1.2	3	6	0.09	0.14	83.3
Promedio	—	1.9	1.2	1.2	5	0.08	0.12	58.3
Todas las poblaciones	93.8	2.5	1.2			0.08	0.13	91.7

[†]Tamaño de muestra promedio por locus. [‡]Número promedio de alelos por locus. [§]Número efectivo de alelos; ^bNúmero de alelos privados. [‡]Número de alelos raros. ^{††}Heterocigocidad observada. ^{‡‡}Heterocigocidad esperada. ^{§§}Porcentaje de loci polimórficos, criterio ≤ 0.99 . [†]Average sample size per locus. [‡]Average number of alleles per locus. [§]Effective number of alleles; ^bNumber of private alleles. [‡]Number of rare alleles. ^{††}Observed heterozygosity. ^{‡‡}Expected heterozygosity. ^{§§}Percent of polymorphic loci, criterion ≤ 0.99 .

La heterocigosidad esperada (H_e) fue ligeramente mayor en las poblaciones extremas que en las intermedias del transecto altitudinal, con el valor máximo en la población de mayor altitud (Cuadro 2). La H_e promedio fue mayor que la H_o , con diferencias significativas entre ellas en tres de los loci muestreados (*MDH1*, *6PG2* y *PGM*), lo cual indica la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg (Chi-cuadrada, $p \leq 0.0001$) en ellos. Esto sugiere un ligero déficit de heterocigotos, debido posiblemente al efecto de la endogamia o a que las poblaciones en algún momento de su vida atravesaron por un cuello de botella (Ledig *et al.*, 1999; 2001). Algo similar se ha reportado para otras especies de pino con distribución natural restringida como *P. maximartinezii* Rzedowski (Ledig *et al.*, 1999) y *P. pinceana* (Ledig *et al.*, 2001).

Estructura de la diversidad genética

El valor medio del coeficiente de endogamia fue no significativamente diferente de cero, ya que el valor estimado está dentro del intervalo de confianza que incluye al cero (Cuadro 3). La no significancia de F_{IS} sugiere que la mayoría de los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, el valor promedio de F_{IS} es relativamente alto ($F_{IS} = 0.361$), lo que coincide con el déficit de heterocigotos mencionado antes; ambos valores son indicadores de endogamia en estas poblaciones. En este sentido es probable que la amplitud de los intervalos de confianza refleje el número reducido de poblaciones muestreadas (cuatro) y no necesariamente de la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg. En forma similar, el valor estimado promedio de F_{IT} , a pesar de ser relativamente alto (0.438), no fue significativamente diferente de cero porque su intervalo de confianza incluye al cero (Cuadro 3). El valor de F_{IT} indica que a nivel de todas las poblaciones también existen indicios de endogamia.

La diferenciación genética entre poblaciones ($F_{IS} = 0.111$) fue significativamente diferente de cero (el intervalo de confianza no incluye al cero; Cuadro 3). Valores de F_{ST} entre 0.051 y 0.150 indican una moderada diferenciación genética entre poblaciones (Yeh, 2000). En algunas especies de coníferas con distribución restringida o fragmentada como en *P. greggii* Engelm. (Parraguirre-Lezama *et al.*, 2002), se han encontrado valores mayores de diferenciación genética entre poblaciones.

El número promedio de migrantes por generación (N_m) fue 2.002, valor considerado por Hartl y

samplé loci (*MDH1*, *6PG2* and *PGM*), indicating an absence of Hardy-Weinberg equilibrium (Chi-squared, $p \leq 0.0001$). This suggests a slight deficit of heterozygotes, probably due to the effect of endogamy or that the populations at some time in their life went through a bottleneck (Ledig *et al.*, 1999; 2001). A similar phenomenon has been reported for other pine species with restricted natural distribution, such as *P. maximartinezii* Rzedowski (Ledig *et al.*, 1999) and *P. pinceana* (Ledig *et al.*, 2001).

Structure of genetic diversity

The mean value of the coefficient of endogamy was not significantly different from zero, since the estimated value is within the confidence interval, which includes zero (Table 3). The non-significance of F_{IS} suggests that most of the loci are in Hardy-Weinberg equilibrium. The average value of F_{IS} is, however, relatively high ($F_{IS} = 0.361$), coinciding with the deficit of heterozygotes mentioned above; both values are indicative of endogamy in these populations. In this sense, it is likely that the amplitude of the confidence intervals reflects the small number of sampled populations (four) and not necessarily the existence of Hardy-Weinberg equilibrium. In a similar way, the average estimated value of F_{IT} , though relatively high (0.438), was not significantly different from zero because its confidence interval includes zero (Table 3). The F_{IT} value indicates that also at the level of all of the populations there is evidence of endogamy.

Genetic differentiation among populations ($F_{IS} = 0.111$) was significantly different from zero (the confidence interval does not include zero; Table 3). Values of F_{ST} between 0.051 and 0.150 indicate moderate genetic differentiation among populations (Yeh, 2000). In some coniferous species with restricted or fragmented distribution, such as *P. greggii* Engelm. (Parraguirre-Lezama *et al.*, 2002), higher values of genetic differentiation among populations have been found.

The average number of migrants per generation (N_m) was 2.002, a value considered by Hartl and Clark (1989) to be low enough for gene flow to be unable to totally counteract genetic differentiation caused by genetic drift. Compared with other conifers, the value found in our study is lower than the values that are generally reported, which range from 4.6 to 17.2 (Ledig, 1998); it is only close to values estimated for

Clark (1989) suficientemente bajo como para que el flujo génico no pueda contrarrestar totalmente la diferenciación genética causada por la deriva génica. Respecto a otras coníferas, el valor encontrado es menor que la generalidad de valores reportados, que van de 4.6 a 17.2 (Ledig, 1998); sólo es cercano a lo estimado para especies con poblaciones reducidas o fragmentadas, como *P. maximartinezii* (N_m de 1.39 a 2.09) y *P. pinceana* (1.39 a 2.09) (Ledig *et al.*, 2001).

Distancias genéticas

La distancia genética promedio fue 0.108, pero varió desde 0.042 entre las poblaciones de 3200 y 3400 m, hasta 0.166 entre las localidades extremas en el transecto altitudinal (Cuadro 4). Estos valores son mayores a los encontrados en otras coníferas en gradientes altitudinales, como en *P. oocarpa* (Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2003), pero son menores a la de especies de latifoliadas en gradientes similares, como en *Quercus aquifolioides* Rehder & Wilson (Zhang *et al.*, 2006).

La prueba de probabilidad combinada de Fisher mostró que la población de mayor altitud es significativamente diferente ($p \leq 0.05$) de las otras estudiadas, lo que indica una mayor diferenciación genética de esta localidad. En el UPGMA se observa la separación de la población de 3600 m de las otras poblaciones (Figura 1). La mayor diversidad genética de la población de mayor altitud podría deberse a que sus individuos reciben flujo génico de árboles de otras exposiciones, particularmente de la ladera oeste, ya que la parte superior de la montaña es más estrecha y colinda con el parteaguas del volcán, lo que induciría una mayor diferenciación y diversidad genética de esa población en comparación con las de menores altitudes (ubicadas en la ladera este).

Otro elemento que contribuye a la diferenciación de la población de mayor altitud es el elevado número de alelos raros y privados. Ello se debería a los efectos de flujo génico o a los de la selección natural que favorecen la presencia de un mayor número de alelos en frecuencias bajas como un mecanismo de adaptación a ambientes más desfavorables (Kaweciki, 2000; Schaberg *et al.*, 2003). Zhang *et al.* (2006) muestran que el agrupamiento de cinco poblaciones de *Q. aquifolioides* separa la población de mayor altitud (3600 m) de las otras poblaciones (2000, 2400, 2800 y 3200 m).

Cuadro 3. Estadísticos F de Wright calculados para 12 loci polimórficos en *Pinus hartwegii* Lindl. del Pico de Tancítaro, Michoacán, México.

Table 3. Wright's F-statistics calculated for 12 polymorphic loci in *Pinus hartwegii* Lindl. from Pico de Tancítaro, Michoacán, México.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}	N_m
<i>ACP</i>	0.339	0.110	0.412	2.027
<i>G6P</i>	0.337	0.109	0.409	2.039
<i>MDH1</i>	0.321	0.109	0.395	2.037
<i>MDH2</i>	0.336	0.109	0.409	2.046
<i>PGI1</i>	0.331	0.108	0.403	2.069
<i>PGI2</i>	0.339	0.110	0.412	2.023
<i>6PG1</i>	0.408	0.126	0.482	1.736
<i>6PG2</i>	0.249	0.020	0.263	12.505
<i>EST</i>	0.359	0.116	0.433	1.911
<i>GOT</i>	0.392	0.121	0.465	1.813
<i>LAP</i>	0.379	0.121	0.454	1.821
<i>PGM</i>	0.152	0.132	0.264	1.645
Promedio	0.361	0.111	0.438	2.002
Límite superior [†]	0.677	0.256	0.606	
Límite inferior [‡]	-0.004	0.004	-0.008	

[†]90 % de intervalo de confianza con 10 000 repeticiones ♦ 90 % confidence interval with 10 000 replications.

species for reduced or fragmented populations, such as *P. maximartinezii* (N_m between 1.39 and 2.09) and *P. pinceana* (1.39 to 2.09) (Ledig *et al.*, 2001).

Genetic distances

Genetic distance values among pairs of populations averaged 0.108, but it varied from 0.042 between populations from 3200 to 3400 m, up to 0.166 between the extreme localities of the altitudinal transect (Table 4). These values are higher than those found for other conifers along altitudinal gradients, such as *P. oocarpa* (Sáenz-Romero and Tapia-Olivares, 2003), but they are lower than those found in broadleaf species along similar gradients, such as *Quercus aquifolioides* Rehder & Wilson (Zhang *et al.*, 2006).

Fisher's combined probability test showed that the population at the highest altitude is significantly different ($p \leq 0.05$) from the others that were studied, indicating a greater genetic differentiation in this locality. In the UPGMA, it can be observed that the 3600 m population is separated from the other populations (Figure 1). The greater genetic diversity of the population at the highest altitude could be

Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas (arriba de la diagonal) y distancias espaciales (en km, abajo de la diagonal) entre pares de poblaciones en *Pinus hartwegii* Lindl, Michoacán México.

Table 4. Genetic distances matrix (above the diagonal) and spatial distances (in km, below the diagonal) between pairs of *Pinus hartwegii* Lindl populations, Michoacán, México.

Población	3000	3200	3400	3600
3000	—	0.062	0.064	0.166
3200	1.761	—	0.042	0.151
3400	2.779	1.613	—	0.1645
3600	3.330	1.942	0.632	—

Asociación entre variación genética y altitud de la población

La mayor diversidad genética mostrada por la heterocigosidad esperada, proporción de loci polimórficos, número de alelos por locus y número de alelos privados, se encontró en la población de mayor altitud. Este patrón altitudinal coincide con 24 % de los casos analizados por Ohsawa e Ide (2007).

Estructura genética espacial

La prueba de Mantel indica que no hubo asociación significativa entre las distancias espaciales y las genéticas ($R=0.0003$; $p=0.332$) de las poblaciones. Por tanto no hubo un efecto de aislamiento genético por la distancia entre ellas.

Implicaciones para la conservación de la especie

En un estudio en el Pico de Tancítaro con las mismas poblaciones de *P. hartwegii*, basado en caracteres cuantitativos de valor adaptativo, se propuso crear dos Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (UCRGF), una entre 3000 y 3350 m, y la segunda entre 3350 y 3700 m (Viveros-Viveros *et al.*, 2009). Los resultados de la presente investigación apoyan dicha estrategia. En términos de variación isoenzimática, la población ubicada a 3600 m tiene el mayor nivel de diversidad genética, proporción de alelos privados, y diferenciación genética respecto a las poblaciones ubicadas a menor altitud. Para preservar una porción representativa de la diversidad genética actual, es recomendable establecer al menos una UCRGF a 3600 m, y otra a una altitud menor

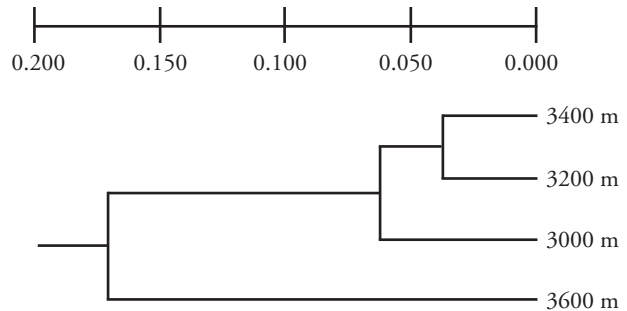


Figura 1. Agrupamiento de UPGMA de cuatro poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. basado en la Distancia Genética de Rogers.

Figure 1. UPGMA grouping of four *Pinus hartwegii* Lindl. populations based on Rogers Genetic Distance.

due to the gene flow that its members receive from trees with other exposures, particularly those on the western side, since the upper part of the mountain is narrower and borders the crest of the volcano. This would induce greater differentiation and genetic diversity of this population compared with those at lower altitudes (located on the eastern side).

Another element that contributes to differentiation of the population at the highest altitude is the large number of rare and private alleles. That would be due to the effects of gene flow or those of natural selection, which favors the presence of a larger number of alleles at low frequencies as a mechanism of adaptation to unfavorable environments (Kawecki, 2000; Schaberg *et al.*, 2003). Zhang *et al.* (2006) show that the grouping of five populations of *Q. aquifolioides* separates the highest altitude population (3600 m) from the other populations (2000, 2400, 2800 and 3200 m).

Association between genetic variation and population altitude

The genetic diversity shown by expected heterozygosity, proportion of polymorphic loci, number of alleles per locus and number of private alleles, was found in the population at the highest altitude. This altitudinal pattern coincides with 24 % of the cases analyzed by Ohsawa and Ide (2007).

Spatial genetic structure

The Mantel test indicates that there was no significant association between spatial and genetic

(3000 a 3350 m). Se estima que la UCRGF de mayor altitud deberá tener un tamaño mínimo de población efectiva viable (N_e) de 4157 individuos, y la de menor altitud una N_e de 3055 árboles.

Sin embargo, de continuar la tendencia actual de calentamiento global (Sáenz-Romero *et al.*, 2009), será necesario realizar una migración asistida hacia altitudes mayores en la misma montaña o en otras montañas. Es decir, recolectar semilla de las poblaciones actuales, producir planta en vivero y hacer plantaciones de conservación *ex situ* en un sitio ubicado aproximadamente a 400 m de mayor altitud, respecto al sitio en donde se recolectó la semilla. Esto permitiría reacoplar las poblaciones al clima para el cual están adaptadas, clima que ocurrirá en el año 2030 aproximadamente a 400 m de mayor altitud de donde ocurre actualmente, según estimaciones para la especie basadas en el Modelo Canadiense de Circulación Global, y el escenario de emisiones A2 (Sáenz-Romero *et al.*, 2009). Las poblaciones de mayor altitud no tendrían a dónde ir en el Pico de Tancítaro, debido a que la altitud máxima es de 3800 m. Por ello, la migración asistida tendría que realizarse a otras montañas o volcanes del Eje Neovolcánico de mayor altitud, como el Iztaccíhuatl, Popocatepetl y Citlaltépetl (Pico de Orizaba). Se podría argumentar que las poblaciones locales de *P. hartwegii* en estos volcanes pudieran sufrir de depresión por exogamia, al recibir el flujo génico de las plantaciones con procedencias foráneas. Sin embargo, debe considerarse que las poblaciones locales también se verán gradualmente desadaptadas debido al cambio climático, y tal desacoplamiento seguramente será un riesgo mayor en el largo plazo.

CONCLUSIONES

Pinus hartwegii en el Parque Nacional Pico de Tancítaro, Michoacán, muestra una moderada, pero estadísticamente significativa, diferenciación genética entre poblaciones, fundamentalmente entre la de mayor altitud (3600 m) con las de 3000, 32000 y 3400 m. La población ubicada a 3600 m tiene la mayor diversidad genética y proporción de alelos privados.

Se propone el establecimiento de dos Unidades de Conservación de los Recursos Genéticos Forestales, una a 3600 m y otra entre 3000 y 3350 m de altitud, con un tamaño mínimo de población efectivo de 4157

distances ($R=0.0003$; $p=0.332$). Therefore, there was no effect of genetic isolation by distance between populations.

Implications for conservation of the species

In a study on Pico de Tancítaro with the same *P. hartwegii* populations, based on quantitative traits of adaptational value, we proposed the creation of two forest genetic resource conservation units (UCRGF), one between 3000 and 3350 m and the second between 3350 and 3700 m (Viveros-Viveros *et al.*, 2009). The results of the present study support this strategy. In terms of isoenzyme variation, the population located at 3600 m is that with the highest levels of genetic diversity, proportion of private alleles, and genetic differentiation compared with the populations located at lower elevations. To preserve a representative portion of the current genetic diversity, it is recommended that at least one UCRGF be established at 3600 m and another at a lower altitude (3000 to 3350 m). We estimate that the higher altitude UCRGF should have a minimum effective viable population size (N_e) of 4157 individuals and that at the lower altitude an N_e of 3055 trees.

However, if the present trend of global warming continues (Sáenz-Romero *et al.*, 2009), it will be necessary to undertake assisted migration toward higher altitudes on the same or other mountains. That is, collect seed from current populations, produce plants in a nursery and create *ex situ* conservation plantations in a site located approximately 400 m higher than the seed collection site. This would permit us to realign the populations to the climate to which they are adapted, a climate that in the year 2030 will appear approximately 400 m above where it presently occurs, according to estimations for the species based on the Canadian General Circulation Model and the scenario of A2 emissions (Sáenz-Romero *et al.*, 2009). Higher altitude populations would not have anywhere to migrate to on Pico de Tancítaro since the summit is 3800 m. For this reason, it would be necessary to assist migration to other high mountains or volcanoes of the Trans-Mexican Volcanic Belt, such as Iztaccíhuatl, Popocatepetl or Citlaltépetl (Pico de Orizaba). It could be argued that local populations of *P. hartwegii* on these volcanoes might suffer depression because of exogamy when they receive gene flow from the

y de 3055 individuos, a fin de preservar la mayor diversidad genética existente en estas poblaciones. Estas medidas de conservación deben acompañarse de estrategias de conservación *ex situ*, como la migración asistida altitudinalmente hacia arriba, sobre todo para la población de mayor altitud, para mitigar los posibles efectos negativos del calentamiento global. La población de 3600 m es la más vulnerable al cambio climático, ya que a pesar de contener la mayor diversidad genética, no podrían migrar hacia arriba en el Pico de Tancítaro cuya altitud máxima es 3800 m.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento vía Fondos Sectoriales de Ciencia Básica (proyecto 2004-C01-47777) y de la Comisión Nacional Forestal (proyecto 2005-C02-14783), y de la Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se agradece la ayuda de Felipe Aguilar, Rafael Echevarría y Reyes Aguilar, Dirección Técnica Forestal de la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, y de Rodrigo Niniz, Víctor H. Cambrón y Miguel A. Silva por su ayuda en la recolecta y obtención de semilla.

LITERATURA CITADA

- Arriaga, L., y L. Gómez. 2004. Posibles efectos del cambio climático en algunos componentes de la biodiversidad de México. *In: Martínez J. y A. Fernández-Bremauntz (comps.). Cambio Climático: una Visión desde México.* Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. México, D. F. pp: 255-265.
- Conkle, M. T. 1981. Isozyme variation and linkage in six conifer specie. *In: Proc. Symp. Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects.* USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep., PSW-48. pp: 11-17.
- El-Kassaby, Y. A., and K. Rittland. 1996. Genetic variation in low elevation Douglas-fir of British Columbia and its relevance to gene conservation. *Biodiversity and Conservation* 5: 779-794.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics.* Massachusetts, Sinauer, 682 p.
- Iglesias-Andreu, L. G., y M. Luna-Rodríguez. 2008. Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México. *Ecosistemas* 17: 115-122.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) 1998. Carta Topográfica 1:50000 Uruapan E13B39 Michoacán. México, INEGI.
- Kawecki, T.J. 2000. Adaptation to marginal habitats: contrasting influence of the dispersal rate on the fate of alleles with small and large effects. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 1315-1320.
- Lauer, W. 1978. Timberline studies in central Mexico. *Artic and Alpine Res.* 10: 383-396.

foreign plantations. It must be considered, however, that the local populations will also become gradually unadapted to the changing climate, and this will surely be a greater risk on the long term.

CONCLUSIONS

Pinus hartwegii in the Pico de Tancítaro National Park, Michoacán, shows moderate, but statistically significant, genetic differentiation among populations, basically between that at the highest altitude (3600 m) and those at 3000, 3200 and 3400 m. The population located at 3600 m has the greatest genetic diversity and proportion of private alleles.

We propose the establishment of forest genetic resource conservation units, one at an altitude of 3600 m and another between 3000 and 3350 m with a minimum effective population size of 4157 and 3055 individuals to conserve the broadest portion possible of the genetic diversity existing in these populations. These conservation measures should be accompanied by *ex situ* conservation strategies, such as assisted migration toward higher altitudes, especially for the population at the highest altitude, to mitigate the possible negative effects of global warming. The population at 3600 m is the most vulnerable to climate change since, in spite of having the greatest genetic diversity, it would not be able to migrate higher up on Pico de Tancítaro because the summit is at 3800 m.

—End of the English version—



- Ledig, F.T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. *In: Richardson, D. M. (ed). Ecology and Biogeography of Pinus.* Cambridge University Press. pp: 251-280.
- Ledig, F. T., M. T. Conkle, B. Bermejo-Velázquez, T. Eguiluz-Piedra, P.D. Hodgskiss, D.R. Johnson, and W.S. Dvorak. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53: 91-99.
- Ledig, F. T., M. A. Capó-Arteaga, P.D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M.T. Conkle, and B. Bermejo-Velázquez. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican pinyon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* 88: 1977-1987.
- Millar, C. I., and W. J. Libby. 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in wides-

- pread species. *In*: Falk, D. A., and K.E. Holsinger (eds). Genetic and Conservation of Rare Plants. Biology and Genetics. Oxford University Press. New York. pp: 149-170.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses [TFPGA] 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author <http://herb.bio.nau.edu/~miller> (consulta: diciembre de 2008).
- Ohsawa, T., and Y. Ide. 2007. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients in mountains. *Global Ecol. and Biogeography* 17: 153-162.
- Parraguirre-Lezama, C., J. J. Vargas-Hernández, P. Ramírez-Vallejo, H. S. Azpíroz-Rivero, y J. Jasso-Mata. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Rev. Fitotec. Mex.* 25: 279-287.
- Perry, J. P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 231 p.
- Ricker, M., G. Gutiérrez-García, and D. C. Daly. 2007. Modeling long-term tree growth curves in response to warming climate: test cases from a subtropical mountain forest and a tropical rainforest in México. *Can. J. For. Res.* 37: 977-989.
- Sáenz-Romero, C., and B.L. Tapia-Olivares. 2003. *Pinus oocarpa* isoenzymatic variation along an altitudinal gradient in Michoacán, México. *Silvae Genet.* 52: 237-240.
- Sáenz-Romero, C., A. Snively, and R. Lindig-Cisneros. 2003. Conservation and restoration of pine forest genetic resources in México. *Silvae Genet.* 52: 233-237.
- Sáenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, N.L. Crookston, P. Duval, R. St-Amant, J. Beaulieu, and B. A. Richardson. 2009. Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Mexico and their use in understanding climate-change impacts on the vegetation. *Climatic Change*. In press. DOI 10.1007/s10584-009-9753-5.
- SAS Institute. 1988. SAS/STAT Users's; release 6.03. SAS Institute. Cary, N.C. 1028 p.
- Schaberg, P. G., G. J. Hawley, D.H. DeHayes, and S. E. Nljensohn. 2003. Silvicultural management and the manipulation of rare alleles. *In*: Beaulieu, J. (ed). *Silviculture and the Conservation of Genetic Resources for Sustainable Forest Management*. Proc. Symp. North American Forest Commission, Forest Genetic Resources and Silviculture Working Groups, and the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). Quebec, Canada. pp: 67-74.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Solís-Ramos., L. Y., y L. G. Iglesias-Andreu. 2001. Variación en la composición isoenzimática en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Pico de Orizaba, Veracruz. *Cuadernos de Biodiversidad* 3: 4-7.
- Soltis, D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow, and G. J. Gastromy. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, and staining schedules. *Am. Ferns J.* 73: 9-27.
- Swofford, D. L., and G. J. Olsen. 1990. Phylogeny reconstruction. *In*: Hillis, D. M., and C. Mortiz (eds). *Molecular Systematics*. Sunderland, Sinauer Associates, MA, USA. pp: 411-501.
- Viveros-Viveros, H., C. Sáenz-Romero, J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, G. Ramírez-Valverde, and A. Santacruz-Varela. 2009. Altitudinal genetic variation in *Pinus hartwegii* Lindl. I. Height growth, shoot phenology and cold damage in seedlings. *For. Ecol. Manag.* 257: 836-842.
- Yamada, M., and R. P. Guries. 1989. Manual for starch gel electrophoresis: new chocolate lovers edition. Staff Paper Series No. 39. Depart. of Forestry, College of Natural Resource, Univ. of Wisconsin-Madison. Madison, WI. 29 p.
- Yeh, F. C. 2000. Population genetics. *In*: Young A., D. Boshier, and T. Boyle (eds). *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. CSIRO Publishing & CABI Publishing. Collingwood, Australia. pp: 21-37.
- Yeh, F. C., R.-C. Yang, and T. Boyle. 1999. POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. Univ. of Alberta & Centre for International Forestry Research. Edmonton, Canada. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/> (consulta: diciembre 2008).
- Zhang, X., H. Korpelainen, and C. Li. 2006. Microsatellite variation of *Quercus aquifolioides* populations at varying altitudes in the Wolong Natural Reserve of China. *Silva Fennica* 40(3): 407-415.