Las coníferas son organismos longevos que deben enfrentar una gran cantidad de patógenos y herbívoros a lo largo de su vida, y dependen de un sistema de defensa especializado que a su vez, depende de la acción conjunta de diversos genes, algunos de los cuales se han descrito para géneros de la familia Pinaceae como *Picea*, *Pinus* y *Pseudotsuga*, pero ninguno para *Abies* (Nishimura y Somerville, 2002; Bone-llo *et al.*, 2006; Ralph *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006; González-Martínez *et al.*, 2006; Sturrock *et al.*, 2007).

Existen cuatro grandes familias de genes de defensa que se han descrito en coníferas, éstas son: (1) genes que controlan la composición de la oleorresina como los terpenoides, (2) genes que controlan la producción de proteínas de resistencia TIR-NBS-LRR, (3) genes que controlan las proteínas dirigentes DIR y (4) genes que controlan las proteínas relacionadas con la patogénesis PR (Hamberger *et al.*, 2009).

La secreción de oleorresina, que es una mezcla de terpenoides, constituye una forma de defensa química y mecánica de las coníferas ante el ataque de parásitos (herbívoros y patógenos). Particularmente, cuando el atacante es un herbívoro (insectos descortezadores), los terpenoides actúan como toxinas para el agente invasor, evitan la oviposición y la obtención de alimento, y pueden además, emitir compuestos volátiles que atraen a depredadores de los invasores, una forma de defensa indirecta (Vieira dos Santos *et al.*, 2002; Keeling y Bohlmann, 2006; Letousey *et al.*, 2007; Swarbrick, 2008). Durante el ataque de estos organismos, los genes que regulan la producción de estos metabolitos de defensa son sobre regulados; es decir, aumentan su actividad, de tal manera que se produce una mayor cantidad de terpenoides que el árbol exuda, creando una barrera de defensa física y química en el sitio de ataque (Funk *et al.*, 1994). Los oyame-

GENES DE DEFENSA EN *ABIES RELIGIOSA*

ROSA LAURA HEREDIA-BOBADILLA¹, AMAURY MARTÍN ARZATE-FERNÁNDEZ^{1,5}, GUADALUPE GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ¹, JONNATHAN GUADALUPE SANTILLÁN-BENÍTEZ², DAVID CIBRIÁN-TOVAR³ Y ÁNGEL ROLANDO ENDARA-AGRAMONT⁴

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México

²Centro de Investigación en Ciencias Médicas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México

³División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, México

⁴Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México

⁵Autor para correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx

les presentan un gran número de canales de resina comparados con otras coníferas, estos canales son estructuras multicelulares rodeadas por capas de células epiteliales, la pared de estas células se engrosa y lignifica durante el desarrollo (Lewinson *et al.*, 1991). Es precisamente la lignificación otra respuesta de defensa que es controlada por otra familia de genes: los que controlan la producción de proteínas dirigentes (DIR; Ralph *et al.*, 2006).

Las plantas no tienen un sistema circulatorio que pueda transportar células fagocíticas, pero sí mecanismos de defensa en cada una de sus células; por ejemplo, pueden modificar la composición de sus paredes para evitar la entrada de patógenos, dado que disponen de receptores celulares que reconocen la presencia de moléculas extrañas, o pueden inducir la síntesis de ciertas moléculas de defensa como las proteínas relacionadas con la patogénesis (Nishimura y Somerville, 2002).

Las proteínas DIR están involucradas en la formación de lignina y lignanos, moléculas que forman parte de la

pared celular y tienen propiedades antimicrobianas, antivirales, antioxidantes y citotóxicas; poseen por tanto, capacidad de defensa ante ataques de patógenos. La actividad de estos genes suele ser sobre regulada durante un ataque (Davin and Lewis, 2000; Ralph *et al.*, 2006; Ralph *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007) y pueden actuar en conjunto con otra familia de genes, los genes de resistencia de la familia NBS-LRR.

Las plantas poseen mecanismos de inmunidad innata que les permiten defenderse de ataques. Este tipo de defensa es mediada por receptores celulares especializados que tienen la capacidad de reconocer moléculas no propias (de manera semejante a cómo actúa el sistema de inmunidad innata en animales). Estos receptores, llamados NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat*, por sus siglas en inglés), son codificados por los genes de resistencia (R) y su función en la inmunidad de las plantas es el reconocimiento de moléculas producidas por el agente patógeno, mediante una interacción llamada gen por gen; es decir, interactúan el gen R de la

planta y un gen del patógeno, llamado gen de avirulencia, que reconocerá el receptor NBS-LRR. Esta interacción produce una respuesta llamada hipersensible en la planta, la cual consta de numerosas reacciones en la célula que conducen a la muerte celular (suicidio celular), en el sitio de la infección, y que tiene como objetivo primario impedir el crecimiento y dispersión del patógeno (Meyers *et al.*, 1999; Bogdanov, 2002; Tameling y Joosten, 2007; Caplan *et al.*, 2008). El suicidio celular durante un ataque es regulado por otro tipo de genes, que regulan la producción de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). La familia de genes PR codifican proteínas que se vuelven muy activas durante una infección, su actividad se incrementa en presencia de patógenos como virus, bacterias, hongos, nemátodos, y también por insectos y herbívoros. Estas proteínas se acumulan en el sitio de infección y están directamente asociadas con la resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual es un tipo de resistencia que adquieren los tejidos después de pasar por procesos de muerte celular (respuesta hipersensible), gracias a la acumulación de ácido salicílico y proteínas PR. Existen 17 grupos de genes PR, según su tipo de acción en respuesta a un patógeno (p. ej. la familia PR-3 incluye quitinasas y la PR-9 incluye peroxidasas), la mayoría descritas en plantas de cultivo, en las coníferas se ha descrito solamente la familia PR-10 (Ekramoddoullah *et al.*, 2000; Liu y Ekramoddoullah, 2004; Edreva, 2005; van Loon *et al.*, 2006). Los genes de esta familia codifican proteínas que aumentan su actividad en presencia de hongos, por heridas mecánicas (como las que causan los insectos) o estrés por metales, y en ella están incluidas un grupo particular de proteínas relacionadas con las ribonucleasas (familia PR-10).

El Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT) es un Área Natural Protegida (ANP) formada por bosques de coníferas: pino (*Pinus hartwegii* Lindl., *Pinus*

montezumae Lamb.) y oyamel (*Abies religiosa* (HBK) Schld. & Cham.). El bosque de oyamel forma una comunidad más densa en comparación con los bosques de pino, con un alto volumen de germoplasma y con estratos arbustivos, herbáceos y rastreros que contienen una mayor diversidad biológica, el gran follaje de los oyamel proporciona además un ambiente de sombra y humedad que permite la proliferación de hongos, musgos, helechos y hepáticas (Sánchez-González *et al.*, 2005; Rzedowski, 2006; Sierra, 2009). Esta condición de humedad en el bosque se vuelve negativa cuando se derriban los árboles y se dejan restos o desperdicios dentro del bosque, ya que se favorece la infestación de árboles en pie por hongos u otros organismos que pueden causar enfermedades (Sierra, 2009). El APFFNT enfrenta la tala inmoderada e ilegal, durante la cual, además de extraerse grandes cantidades de árboles con la mejor constitución, se dejan aquellos enfermos o parasitados, lo que fragmenta el hábitat y facilita la dispersión e incidencia de parásitos de las coníferas (Candean y Franco, 2007). El bosque de oyamel en este sitio presenta incidencia de escarabajos descortezadores (*Pseudohylesinus variegatus*) y de muérdagos enanos (*Arceuthobium abietis-religiosae*), este último es, considerado por algunos especialistas, uno de los más destructivos parásitos de coníferas, ya que reduce el crecimiento, la calidad de la madera y producción de semillas; además, predispone al árbol al ataque de otros parásitos, comúnmente descortezadores (Hull y Leonard, 1964; Scharpf y Parmeter, 1982; Maloney y Rizzo, 2002; Cibrián-Tovar, 2007).

Este estudio pretende determinar secuencias específicas de genes de defensa de *Abies religiosa*, las cuales posteriormente puedan ser utilizadas en un estudio de expresión genética de esta especie, para ayudar a integrar un plan de control de muérdago enano y descortezadores con base en la

existencia de distintos tipos de expresión de los genes mencionados. Como primer paso, para poder estudiar la expresión genética de *A. religiosa*, se diseñaron cebadores específicos para esta especie, ya que a la fecha no se han reportado secuencias de genes de resistencia de *A. religiosa*. Para esto, se colectaron acículas de *A. religiosa* en el APFFNT, las colectas se realizaron en sitios donde hay fuertes infestaciones de *Arceuthobium abietis-religiosae* y presencia de *Pseudohylesinus variegatus*, entre los 2,197-3,264 m s.n.m. El tejido se guardó en bolsas de plástico y en hielo hasta su traslado al laboratorio, donde se almacenaron las bolsas con el tejido a -20 °C.

El tejido se lavó con etanol al 70% y posteriormente se extrajo el DNA con el método de CTAB (Zhou *et al.*, 1999). En la base de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), se seleccionaron secuencias de genes de defensa de diferentes especies de coníferas, aquellas que filogenéticamente están más relacionadas con el género *Abies*, de acuerdo a la filogenia propuesta por Wang *et al.* (2000): *Larix*, *Tsuga* y *Pseudotsuga*. Se utilizaron secuencias de mRNA con el fin de evitar, en lo posible, la amplificación de intrones. Se utilizó el programa Primer 3 (Untergasser *et al.*, 2012) para diseñar los cebadores directo e inverso. El primer par de cebadores fue diseñado a partir de la secuencia de mRNA de una abietadieno sintasa de *Abies grandis* (Steele *et al.*, 1998), el segundo se diseñó a partir de una secuencia de mRNA de una proteína DIR de *T. heterophylla*, para el tercero se utilizó la secuencia de mRNA de una PR-10 de *P. menziesii* y, para el cuarto par se utilizó la secuencia mRNA de una NBS-LRR de *L. kaempferi* (Cuadro 1). Todos los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. Se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con DNA de *A. religiosa* y los cebadores diseñados. Las condiciones de cada PCR se estandarizaron

Cuadro 1. Genes relacionados con la defensa de *Abies religiosa*. AS: abietadieno sintasa, DIR: proteína dirigente, PR-10: proteína relacionada con la patogénesis de la familia 10, NBS: proteína de resistencia. Se presentan los cebadores utilizados para amplificar la secuencia de nucleótidos, así como el intervalo y longitud de pares de bases de la proteína traducida.

Nombre del gen	Cebadores	Secuencia de nucleótidos	Intervalo	Longitud (pb)	Traducción (proteína relacionada con la defensa)
AS	5'-cctgtgttgagaaggtggt-3' (Fw) 5'-gatgctgcaacctgtgaga-3' (Rv)	ttgataccttcagattcgcttctctctacatt ggtgaaacgagaatttcctcaggatttgg aaggatgatcttatcacaactctaactcat ctcacaagggtgcagcatcactccaaggg ttcaacatatgtaccctgtagaggttgatgga aacatttaagggtattttatgtgtaaaaagcccc ggccgtcctatttga	104-313	210	MIPSDSLSSSTLVKREFPPGFWKD DLITTLTSSHKVAASLPRVQH MYPVEVGWKHLRLFLLVKSPGRPI
DIR	5'-gctcaatttcaccccagga-3' (Fw) 5'-tacacatcttccctcgtc-3' (Rv)	ctggataacagtttactcctccgggtggg cagagctcagggtacttcttatgacatga agaacaccttcagctcctggcttgattacg ttgtactcaactctacagattacaaggcacc atcacgttctccataccaacccatctctgttg caatggacatga	44-217	174	MDNSFHSLPVGRAQGFYFYD MKNTFSSWLGFTFVLNSTDYKG TITFIPNPSSLQWT
PR-10	5'-ggcaaggttacgctattcca-3' (Fw) 5'-ccttgagggaagtggtgaaa-3' (Rv)	ctaacaaggattagctacgccaaggagc gagtcgatgaaatggacgaggggaagatggt gtaatcattttgtagcgcggttaacagggtg tcatccactcaaggagcggttagatgaaattg acgagggaagatggtgtaa	1-265	272	NKDLATPRSESMKWTRGRW CNHFGSAANRDFIHFKEKRVDE IDEGKMV
NBS	5'-agggggctaactcacactt-3' (Fw) 5'-gagaacgtgatggtgccttt-3' (Rv)	atgtacgatgttacagaggctgatgcctgt cccttttctgttctggcctttggacagccttc gattccagcaacagaagatgaagatatgttaa acaggtgaagcagtggtgaagggttaccactt gccctcaaggagtga	15-318	411	MYDVTADALSFCFWAFGQPSI PATEDEDIVKQVEAVCKGLPLALKE

para cada cebador. Los productos de la amplificación fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizados por medio de tinción con bromuro de etidio. Los productos del PCR se purificaron con el paquete comercial de Sigma-Aldrich GeneElute PCR clean up kit. La secuenciación de los productos de interés se realizó en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Los niveles de similitud de las secuencias obtenidas se analizaron usando el servicio TBLASTX (*Estandar Nucleotide Blast*) del NCBI, y posteriormente mediante el programa Geneious 6.1.6 (Biomatters, Ltd.), que realizó la predicción de la estructura de las proteínas. Después, los resultados de la predicción proteica se analizaron

nuevamente mediante BLASTX, para confirmar que la secuencia proteica deducida tuviera identidad con proteínas de defensa descritas en coníferas.

El término *like gene* generalmente se utiliza para referirse a genes, que en su estructura de nucleótidos, tienen homología o parecido a otros genes de defensa y, con este término, permanecen hasta que se determina su presencia en una sola copia en el genoma de interés y se confirma de forma clara que su expresión cambia con la presencia de un agente invasor, ya sea que dicha expresión aumente o disminuya (Edreva, 2005). Las secuencias obtenidas en este estudio fueron, de acuerdo con la homología y la predicción de proteínas, una abietadieno sintasa *like gene*, una DIR *like*

gene, una PR-10 *like gene* y una NBS-LRR *like gene*. Las secuencias obtenidas se encuentran disponibles en el GeneBank con los números de acceso: JX220514, JX220515, JX220516, y JX220517.

La secuencia del fragmento del gen de la abietadieno sintasa (AS), de acuerdo con la predicción de proteínas, tiene una homología de 96% con la abietadieno sintasa de *Abies grandis* (Cuadro 1). Esta proteína es un componente de la oleorresina, elemento importante durante la defensa contra hongos, insectos y plantas parásitas. Shamound y DeWald (2002) reportaron algunos efectos del ataque de *Arceuthobium americanum* en *Pinus contorta*, y entre estos mencionan excesiva oleorresinosis, necrosis y de-

coloración de la corteza del hospedero. Es posible que el gen de la abietadieno sintasa aumente su expresión durante una infección, puesto que ante un ataque, el árbol secreta un exceso de oleoresina para evitar que el parásito sobreviva y logre penetrar más tejidos, además de que la oleoresina es tóxica y sella la herida causada por el agente invasor.

Con el segundo par de iniciadores se obtuvo una secuencia parecida a un gen DIR, con una homología de nucleótidos del 94% al gen DIR de *Tsuga heterophylla*. La predicción de la estructura de la proteína mostró que la secuencia de *Abies religiosa* contenía un dominio conservado propio de la familia de proteínas dirigentes (DIR). Según el segundo análisis BLASTX, la secuencia de *A. religiosa* obtenida posee un dominio conservado propio estas proteínas. Para la familia Pinaceae se han propuesto dos posibles papeles de las proteínas DIR en la defensa, uno es la producción de metabolitos secundarios en células especializadas conocidas como células parenquimáticas fenólicas del floema secundario y son una respuesta anatómica de algunas coníferas ante ataques por insectos y hongos (Franceschi *et al.*, 2000; Ralph *et al.*, 2006); la otra es que están directamente relacionadas con la producción de lignina para endurecer la pared celular y que constituya una barrera física que impida la entrada de invasores, estos genes aumentan su expresión durante ataques por insectos descortezadores (Ralph *et al.*, 2006).

Con el tercer par se obtuvo una secuencia de nucleótidos homóloga en un 85% a un gen PR-10 de *Pseudotsuga menziesii*, la supuesta proteína predicha corresponde a una proteína relacionada con la patogénesis (PR) de clase ribonucleasa. La acumulación de proteínas PR es una respuesta integral de defensa en las plantas. En *P. menziesii* se ha reportado la sobreexpresión de los genes PR-10 durante la infección producida por el hongo *Phellinus sulphurascens* (Sturrock *et al.*,

2007). La familia PR-10 se caracteriza por poseer actividad ribonucleasa, las ribonucleasas poseen actividad enzimática en procesos celulares de defensa como la muerte celular (Green, 1994; Filipenko *et al.*, 2013).

Con el cuarto par de cebadores se obtuvo una secuencia de nucleótidos 90% homóloga a un gen de resistencia NBS-LRR de *Pinus taeda*; la predicción proteica dio los mismos resultados. Por último, el análisis BLASTX mostró que la secuencia de *Abies religiosa* posee un **dominio NB-ARC**, el cual es una secuencia conservada compartida por las proteínas de las plantas, que al activarse resultan en la muerte celular (Van der Biezen y Jones, 1998). Las proteínas NBS-LRR son un importante componente de la defensa en plantas, contienen una cola de leucinas unida a un núcleo central donde se encuentra el sitio de unión de nucleótidos o dominios NB-ARC, que funcionan como receptores de proteínas de avirulencia del patógeno (van Ooijen *et al.*, 2008). Jermstad *et al.* (2006) reportó que estos genes se sobreexpresan en *P. lambertiana* infectados por el hongo *Cronartium ribicola*, y que una de las formas de defensa en esta interacción hospedero-parásito es la respuesta hipersensible o muerte celular.

Los bosques de *Abies religiosa* en el APFFNT se encuentran bajo diferentes presiones ambientales, una de ellas es el aumento de infestaciones por escarabajos descortezadores y muérdagos enanos, así como sus hongos asociados, por lo que se continuará con este estudio para tratar de encontrar otras secuencias de genes de defensa; por lo pronto, con las secuencias obtenidas en este estudio, se comenzará un análisis de expresión genética que ayude a conocer los mecanismos de defensa del oyamel.

Agradecimientos

Agradecemos ampliamente la ayuda en laboratorio de Carmen Colín Ferrera, el apoyo financiero de la Univer-

sidad Autónoma del Estado de México con el proyecto 2895/2010U y los valiosos comentarios de los revisores.

Literatura citada

- Bogdanove A.J. 2002. Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants. *Plant Molecular Biology* **50**:981-989.
- Bonello P., Gordon T.R., Herms D.A., Wood D.L. y Erbilgin N. 2006. Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: A novel hypothesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**:95-104.
- Candau D.R. y Franco M.S. y 2007. Dinámica y condiciones de vida de la población del Parque Nacional Nevado de Toluca (PNNT) en la generación de presión a los ecosistemas circundantes y de impactos ambientales a través de un sistema de información geográfica. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM* **62**:44-68.
- Caplan J., Padmanabhan M., y Dinesh-Kumar S.P. 2008. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host & Microbe* **3**:126-135.
- Cibrián-Tovar D., Alvarado-Rosales D., García-Díaz S.E. 2007. *Enfermedades Forestales en México*. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo.
- Davin L.B. y Lewis N.G. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignin and lignin biosynthesis. *Plant Physiology* **123**: 453-461.
- Edreva A. 2005. Pathogenesis-Related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology* **31**:105-124.
- Ekrasmoddullah A.K.M., Yu X., Sturrock R., Zamani A. y Taylor D. 2000. Detection and seasonal expression pattern of a pathogenesis-related protein (PR-10) in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) tissues. *Physiologia Plantarum* **110**:240-247.
- Filipenko E.A., Kochetov A.V., Kanayama Y., Malinovsky V.I. y Shumny V.K. 2013. PR-Proteins with ribonuclease activity and plant-resistance against pathogenic fungi. *Russian Journal of Genetics Applied Research* **3**:474-480.
- Franceschi V.R., Krokene P., Krokene T.,

- y Christiansen E. 2000. Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark-beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *American Journal of Botany* **87**:314-326.
- Funk C., Cewinsohn E., Stofer Vogel, B., Steele C.L. y Croteau R. 1994. Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*): Coordinate induction of monoterpene and diterpene cyclases and two cytochrome P450-dependent diterpenoid hydroxylases by stem wounding. *Plant Physiology* **106**:999-1005.
- González-Martínez S.C., Krutovsky K.V. y Neale D.B. 2006. Forest-tree population genomics and adaptive evolution. *New Phytologist* **170**:227-238.
- Green P.J. 1994. The ribonucleases of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**:421-445.
- Hamberger B., Hall D., Yuen M., Oddy C., Hamberger B., Keeling C.I., Ritland C., Ritland K. y Bohlmann J. 2009. Targeted isolation, sequence assembly and characterization of two white spruce (*Picea glauca*) BAC clones for terpenoid synthase and cytochrome P450 genes involved in conifer defense reveal insights into a conifer genome. *BMC Plant Biology* **9**:106.
- Hull R.J. y Leonard O.A. 1964. Physiological aspects of parasitism in mistletoes (*Arceuthobium* and *Phoradendron*). *Plant Physiology* **39**:996-1017.
- Jermstad K.D., Sheppard L.A., Kinloch B.B., Delfino Mix A., Ersoz E.S. Krutovsky K.V. y Neale D.B. 2006. Isolation of a full length CC-NBS-LRR resistance gene analog candidate from sugar pine showing low nucleotide diversity. *Tree Genetics and Genomes* **2**:75-85.
- Jones J.D.G. y Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**:323-329.
- Keeling C.I. y Bohlmann J. 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defense of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist* **170**:657-675.
- Letousey P., De Zélicourt A., Vieira Dos Santos C., Thoiron S., Monteau F., Simier P., Thalouarn P. y Delavault P. 2007. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathology* **56**:536-546.
- Lewinson E., Gijzen M. y Croteau R. 1991. Defense mechanisms of conifers: differences in constitutive and wound induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant Physiology* **96**:44-489.
- Liu J.J. y Ekramoddoullah A.K.M. 2004. Characterization expression and evolution of two novel subfamilies of *Pinus monticola* (Dougl. Ex D. Don) cDNAs encoding pathogenesis-related (PR)-10 proteins. *Tree Physiology* **24**:1337-1385.
- Maloney P.E. y Rizzo D.M. 2002. Dwarf mistletoe-host interactions in mixed-conifer forests in the Sierra Nevada. *Phytopathology* **92**:597-602.
- Meyers B.C., Dickerman A.W., Michelmore R.W., Subramoniam S., Subral B.W. y Young N.D. 1999. Plant disease genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* **20**:317-332.
- Nishimura M. y Somerville S. 2002. Resisting attack. *Science* **295**:2032-2033.
- Ralph S., Park J.Y., Bohlmann J. y Mansfield S.D. 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.
- Ralph S.G., Jancsik S. y Bohlmann J. 2007. Dirigent proteins in conifer defense II: Extended gene discovery, phylogeny, and constitutive and stress-induced gene expression in spruce (*Picea* spp.). *Phytochemistry* **68**:1975-1991.
- Rzedowski J. 2006. *Vegetación de México*. 1ª edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.
- Sánchez-González A., López-Mata L. y Granados-Sánchez D. 2005. Semejanza florística entre los bosques de *Abies religiosa* (HBK) Cham. y Schltdl. de la Faja Volcánica Transmexicana. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM* **56**:62-76.
- Scharpf R.F. y Parmeter J.R.Jr. 1982. *Population Dynamics of Dwarf Mistletoe on Young True Firs in the Central Sierra Nevada, California*. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, United States Department of Agriculture, Forest Service, Berkeley.
- Shamoun S.F. y DeWald L.E. 2002. Management strategies for Dwarf mistletoes: Biological, chemical and genetic approaches. En: Geils B.W., Tovar J.C. y Moody B. *Mistletoes of North American Conifers*, pp. 75-82, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, Sanidad Forestal, SEMARNAT, Canadian Forest Service, Department of Natural Resources Canada, Fort Collins.
- Sierra D.G. 2009. *Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional Nevado de Toluca*. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Geografía, Toluca.
- Steele C.L., Katoh S., Bohlmann J. y Croteau R. 1998. Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*): Differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase genes in response to wounding. *Plant Physiology* **116**:1497-1504.
- Sturrock R.N., Islam M.A. y Ekramoddoullah A.K.M. 2007. Host-pathogen interactions in Douglas-fir seedlings infected by *Phellinus sulphurascens*. *Phytopathology* **97**:1406-1414.
- Swarbrick P.J., Huang K., Liu G., Slate J., Press M.C. y Scholes J.D. 2008. Global patterns of gene expression in rice cultivars undergoing a susceptible or resistant interaction with the parasitic plant *Striga hermonthica*. *New Phytologist* **179**:515-529.
- Tameling W.I.L. y Joosten M.H.A.J. 2007. The diverse roles of NB-LRR proteins in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**:126-134.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. y Rozen S.G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**:e115.
- Van der Biezen E.A. y Jones J. 1998. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology* **8**:226-228.
- van Ooijen G., Mayr G., Kasiem M.M.A., Albrecht M., Cornelissen B.J.C., y Takken F.L.W. 2008. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *Journal of Experimental Botany* **59**:1383-1397.
- van Loon L.C., Rep M. y Pieterse C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**:135-162.
- Vieira dos Santos C., Letousey P., Delavault P. y Thlouarn P. 2002. Defense gene expression analysis of *Arabidop-*

- sis thaliana* parasitized by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology* **93**:451-457.
- Wang X.Q., Tank D.C. y Sang S. 2000. Phylogeny and divergence times in Pinaceae: evidence from three genomes. *Molecular Biology and Evolution* **17**:773-781.
- Zhou Z., Miwa M. y Hogetsu T. 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.
- Zhu L., Zhang X., Tu L., Zeng F., Nie Y. y Guo X. 2007. Isolation and characterization of two novel dirigent-like genes highly induced in cotton (*Gossypium barbadense* and *G. hirsutum*) after infection by *Verticillium dahlia*. *Journal of Plant Pathology* **89**:41-45.

Aceptado: 1 de abril de 2014

Aceptado: 10 de julio de 2014