



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA "PRESIDENTE JUÁREZ"

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

Variación y estructura genética en una especie de pino de
distribución restringida y en peligro de extinción:

Pinus rzedowskii Madrigal Et Caballero

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

ING. FÁTIMA LÓPEZ LÓPEZ

DIRECTORA:

DRA. PATRICIA DELGADO VALERIO

CO-DIRECTOR:

DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

URUAPAN, MICHOACÁN. FEBRERO 2016 .



DEDICATORIA

*A mi hermosa familia, motor incansable e irremplazable de mi vida, ejemplo de fortaleza y
unidad.*

*A mis comité evaluador, autores intelectuales de mi interés y curiosidad por la investigación,
motivos de logros y crecimiento personal.*

A ti Adrian, que motivaste mi fascinación por los puros y que siempre estás a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto "Aproximación molecular para la evaluación genética de áreas productoras de semillas y de conservación en especies del género Pinus" clave 2012-C01-176167" de P. Delgado.

Al CONACYT por haberme otorgado la beca 509891/286278 para llevar a cabo mis estudios de maestría.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco, UNAM Campus Morelia) y al Instituto de Ecología (UNAM), instituciones en las que he fraguado mi formación profesional y donde he tenido la oportunidad de convivir con personas de lo más lindas de las que siempre recibí su apoyo y motivación desde el primer momento de iniciar la maestría: Dres. Patricia Delgado Valerio y Antonio González Rodríguez mis segundos Papás y responsables de mi gusto por la genética de poblaciones y las coníferas; Josi, Monte, Chilas, Daniel, Ulises y Pato, cómplices de travesías en campo; Maricela M. M., Yola, Agus, Sonia, Isabel, Vicky, días y tardes en el laboratorio; Nando, Ricky, Ricardo, Chacho, puros ejemplos a seguir; Dr. Daniel Piñero, Dra. Ale Vázquez y Laura que siempre me tuvieron mucha paciencia; siempre ocupan un espacio en mi pensar diario.

En el trayecto también tuve la dicha de conocer a personas que con su energía motivaron cada paso, amigos y compañeros de desvelos discutiendo la importancia de cada proyecto: Fany, Carlos, Issac, Karen, Cristina, Jenni, César, Rodrigo, Yola y una infinidad de personas que tendría que escribir otro tanto de tesis para poder mencionarlas a todas.

Gracias.

Índice

CONTENIDO	Pág.
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Índice	iii
Lista de cuadros	iv
Lista de figuras	v
Resumen	vi
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	3
1.1 GENÉTICA DE POBLACIONES	3
Variación genética	4
Estructura genética	4
Influencia de las fuerzas evolutivas	5
1.2 PROCESOS DEMOGRÁFICOS IMPLICADOS EN LA EXTINCIÓN DE ESPECIES	5
Cuellos de botella	6
Fragmentación del hábitat	7
1.3 MARCADORES MOLECULARES	7
1.4 ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN PINOS MEXICANOS	8
1.5 EL GÉNERO <i>PINUS</i> EN MÉXICO	11
1.6 DESCRIPCIÓN DE <i>Pinus rzedowskii</i> MADRIGAL ET CABALLERO	12
Especie: Sistemática y taxonomía	12
Características morfológicas	13
Distribución geográfica	15
1.7 HIPÓTESIS	17
1.8 OBJETIVOS	17
Capítulo 2. Materiales y Métodos	18
2.1 ÁREA DE ESTUDIO Y COLECTA DE MATERIAL	18
2.2 EXTRACCIÓN DE ADN	20
2.3 AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	20
2.4 ANÁLISIS DE DATOS	23
Variación genética	23
Estructura genética	24
Demografía histórica	25
Capítulo 3. Resultados	27
3.1 VARIACIÓN GENÉTICA	27
3.2 ESTRUCTURA GENÉTICA	29
3.3 PATRÓN DE FLUJO GENÉTICO	32
3.4. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA	35
Capítulo 4. Discusión	37
Variación genética	37
Diferenciación genética y flujo genético	41
Demografía histórica	43
Recomendaciones para la conservación	44
Capítulo 5. Conclusiones	46
Literatura citada	47
Anexo	56

Lista de cuadros		Página
Cuadro 1.	Clasificación taxonómica de <i>Pinus rzedowskii</i> de acuerdo a estudios moleculares.	13
Cuadro 2.	Referencias geográficas de las poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i> . Tamaños estimados de las poblaciones (Delgado <i>et al.</i> , 1999; Delgado <i>et al.</i> , 2015).	18
Cuadro 3.	Microsatélites ensayados en <i>Pinus rzedowskii</i> . En negritas los que resultaron polimórficos y con amplificación consistente.	22
Cuadro 4.	Estimadores de la variación genética obtenidos en 13 poblaciones de <i>P. rzedowskii</i> .	28
Cuadro 5.	Índice de fijación para 13 poblaciones de <i>P. rzedowskii</i> , obtenido con base a una prueba de Fisher con 10000 permutaciones (MC) (Weir y Cockerham, 1984). Los campos con un guion (-) indican que no se logró hacer la estimación debido a la presencia de genotipos con los mismos alelos, o a la presencia de genotipos diferentes con una frecuencia baja (Rousset 2008).	29
Cuadro 6.	Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los cinco loci estudiados.	30
Cuadro 7.	Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i>	30
Cuadro 8.	Matriz de distancias geográficas (km lineales; debajo de la diagonal) y flujo genético (Nm ; arriba de la diagonal), entre pares de poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i> .	33
Cuadro 9.	Estimación de la tasa efectiva de migración (M) entre poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i> .	34
Cuadro 10.	Resultados del análisis de Bottleneck realizado con cinco SSRn para las poblaciones de <i>P. rzedowskii</i> en negritas los valores significativos.	35
Cuadro 11.	Comparación de diferentes marcadores (isoenzimas, microsatélites de cloroplasto (SSRcp) y microsatélites nucleares (SSRn) para especies de pinos	38

Lista de figuras		Página
Figura 1.	Fotografía de árboles de <i>P. rzedowskii</i> de las poblaciones La Alberca y El Huarache.	14
Figura 2.	Imágenes de algunas poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i> colectadas entre noviembre-diciembre (2012) y enero-marzo (2013).	16
Figura 3.	Mapa de la localización geográfica de las poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i> y poblados de referencia cercanos a los sitios.	19
Figura 4.	Ubicación, muestreo y toma de datos en tres poblaciones de <i>P. rzedowskii</i> (PVA11, HUA12 y AGU6).	19
Figura 5.	Fotografías de <i>P. rzedowskii</i> y recolecta de acículas.	20
Figura 6.	Electroforesis en geles de agarosa al 0.5 % para ADN total. A) El Fresno y B) La Alberca.	20
Figura 7.	Reconocimiento del tamaño de los fragmentos para <i>P. rzedowskii</i> en geles de poliacrilamida. A y B muestran la amplificación mediante PCR de RPS34b para dos de las 13 poblaciones de la especie.	22
Figura 8.	Electroferogramas analizados mediante el programa Peak Scanner. La identificación de alelos se realizó a partir del color del fluoróforo: A y B verde (RPS34b) y negro (RPS2), C y D verde (RPS50) y azul (RPS18), y lectura del tamaño en pares de bases.	23
Figura 9.	Frecuencias alélicas por población por locus analizado.	27
Figura 10.	Agrupamiento del análisis bayesiano de acuerdo a distancias geográficas y genéticas de las poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i> .	31
Figura 11.	Pertenencia de las poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i> a cada grupo genético de acuerdo al software STRUCTURE.	32
Figura 12.	Representación gráfica del análisis de aislamiento por distancia entre pares de poblaciones de <i>Pinus rzedowskii</i> .	33
Figura 13.	Representación de las tasas de migración con valores superiores a 1.8 entre las poblaciones de <i>P. rzedowskii</i> . Las flechas indican la dirección de la migración.	34
Figura 14.	Frecuencias de la distribución de clases de alelos obtenidas con la prueba de Shift, para la detección de cuellos de botella (Luikart <i>et al.</i> , 1998), en siete poblaciones de <i>P. rzedowskii</i> .	36

RESUMEN

Pinus rzedowskii es una especie endémica de México, distribuida en la Sierra de Coalcomán, Michoacán. Las condiciones de fragmentación, restricción del hábitat y tamaño pequeño de las poblaciones son características que la han llevado a ser catalogada en peligro de extinción. Actualmente se tienen identificadas 17 poblaciones que presentan un patrón de distribución Norte, Centro y Sur. La especie presenta caracteres morfológicos y anatómicos tanto del subgénero *Strobis* como del subgénero *Pinus* por lo que su estudio a nivel molecular es de gran importancia biológica y evolutiva. En este trabajo se usaron cinco marcadores moleculares microsatélites nucleares (SSRn) para analizar la variabilidad y la estructura genética de la especie. Se extrajo ADN de 13 poblaciones y se amplificó el ADN de 4 a 48 individuos. Los tamaños de los fragmentos fueron obtenidos con un secuenciador automático y verificados con el programa Peak Scanner. Se obtuvo un total de 35 alelos para los cinco loci usados (RPS2, RPS34b, RPS18, RPS50 y RPS84). Se encontró una variabilidad genética alta con valores de heterocigosis observada mayores a los esperados ($H_o=0.714$ $p=0.23$, $H_e=0.568$ $p=0.10$), una estructura genética baja ($F_{ST}=0.065$, $p=0.000$) y un valor de F_{IS} negativo (-0.244 , $p=0.050$). El análisis de agrupación bayesiana formó seis grupos, de los cuales dos grupos forman parte de la zona norte de la distribución de la especie, la zona centro con tres grupos genéticos compartiendo uno de los grupos con la zona norte, y la zona sur con un grupo completamente diferenciado. El análisis de estructuración genética formó tres grupos, éstos se encuentran distribuidos de manera muy heterogénea dentro de las poblaciones, además están presentes en todas las poblaciones en proporciones muy similares, mostrando un patrón de distribución similar al resultado del análisis bayesiano. El análisis de la demografía histórica revela cuellos de botella recientes para siete de las poblaciones las cuales presentan los tamaños poblacionales más pequeños ($N_e=147$ a 46). Lo anterior sugiere que históricamente la especie estuvo conformada por una gran población, la cual se fragmentó y se encuentra en proceso de diferenciación genética entre y dentro de los fragmentos (poblaciones), debido probablemente a una dinámica de reducción (cuellos de botella) reciente del tamaño de algunas poblaciones e incremento (colonización o expansión) de otras.

Palabras clave: *Pinus rzedowskii*, SSRN, variación genética, estructura genética, cuellos de botella.

ABSTRACT

Pinus rzedowskii is an endemic species of Mexico, distributed in the Saw of Coalcomán, Michoacán. The conditions of fragmentation, restriction of the habitat and small population size are characteristics that have led her to being catalogued endangered. Currently there are identified 17 populations who present a North, Center and South distribution pattern. The species presents morphologic and anatomical characters of the subgenus *Strobus* and for the subgenus *Pinus* too, so their study at molecular level is of great biological and evolutionary significance. In this work there were used five molecular nuclear microsatellites marking (SSRn) to analyze the variability and the genetic structure of the species. There was extracted 13 DNA of the populations and was amplified the DNA from 4 to 48 individuals. The sizes of the fragments were obtained by an automatic sequencer and revised with the Peak Scanner program. A total of 35 alleles was obtained for the five used loci (RPS2, RPS34b, RPS18, RPS50 and RPS84). A high genetic variability with heterocigosis rates higher than expected were found ($H_o=0.714$ $p=0.23$, $H_e=0.568$ $p=0.10$), a genetic low structure ($F_{st} = 0.065$, $p = 0.000$) and a negative value of F_{is} (-0.244 , $p=0.050$). The Bayesian analysis grouping formed six groups, of which two groups form part of the north zone of the species distribution, the center zone with 3 genetic groups sharing one of the north group and the south zone with a completely differentiated group. The analysis of genetic structure formed three groups, these are distributed in a very heterogeneous way inside the populations, also they are present in all the populations in similar proportions, showing a similar distribution pattern to the result of the Bayesian analysis. The analysis of historical demography reveals recent bottlenecks for seven of the populations which have smaller population size ($N_e = 147-46$). This suggests that historically the species consisted of a large population, which is fragmented and is in the process of genetic differentiation among and within the fragments (populations), probably due to a dynamic reduction (bottlenecks) recent size of some populations and increased (colonization or expansion) of others.

Key words: Pinus rzedowskii, SSRn, genetic variation, genetic structure, bottlenecks.

INTRODUCCIÓN

Las condiciones biogeográficas, geológicas, orográficas y climatológicas de México han fomentado la diversificación de muchos linajes de plantas y animales. Entre ellos se encuentra el género *Pinus*, del cual México cuenta con el mayor número de especies del mundo (Delgado, 1999). De acuerdo a Perry (1991) en México hay 72 especies, variedades y formas de este género, distribuidas en una amplia gama de condiciones ambientales. Varias de estas especies son endémicas a México y están representadas por poblaciones muy pequeñas y algunas de ellas se encuentran en peligro de desaparecer local o globalmente (Delgado, 1999).

En general, el reconocimiento de especies en peligro de extinción tiene que ver con procesos demográficos y genéticos los cuales están relacionados con el aislamiento geográfico, el tamaño pequeño de las poblaciones y la fragmentación de las mismas (Lande, 1993). El aislamiento geográfico puede conducir a la divergencia de las poblaciones a través de procesos como la deriva génica y la mutación (Karhu *et al.*, 2005). Las fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones pueden disminuir su tamaño efectivo y resultar en la pérdida de variación genética y provocar un aumento de los niveles de endogamia, resultando en la extinción de especies (Wright, 1965). Y por su parte, la fragmentación provoca la pérdida de continuidad de un ecosistema y produce cambios importantes en la estructura de las poblaciones afectando su funcionamiento (Saunders *et al.*, 1991).

Una de las áreas de investigación que estudia los procesos genéticos que influyen en la extinción de una especie es la genética de poblaciones que trata de analizar la genética del proceso evolutivo. Fundamentalmente persigue dos objetivos: 1) evaluar los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones, a partir de las frecuencias alélicas y de las frecuencias de los genotipos y 2) analizar esta variación en términos de las llamadas fuerzas evolutivas (Hedrick, 1983). La llamada Ley del equilibrio Hardy-Weinberg predice la relación entre las frecuencias alélicas y las genotípicas suponiendo la ausencia de cualquier fuerza evolutiva (Hedrick, 1983).

De esta manera, uno de los enfoques de la genética de poblaciones es estudiar el efecto que tienen las fuerzas evolutivas sobre el equilibrio Hardy-Weinberg (Eguiarte, 1990). Por ejemplo, cuando las poblaciones son pequeñas o han sufrido fragmentación, los niveles de variación y estructura genética dependen mucho de la deriva génica (pérdida de heterocigotos, fijación de alelos y diferenciación entre poblaciones; Wright, 1965; Hedrick 1983; Hartl y Clark, 1989). Además, la genética de poblaciones nos permite estimar otros parámetros como el nivel de endogamia (F) y el tamaño efectivo (N_e) de las poblaciones (Hartl y Clark, 1989). Eguiarte (1990) menciona que si se mantienen menos individuos de los que se necesitan para mantener un tamaño efectivo viable, el nivel de endogamia va a tender a aumentar. Por lo tanto, conocer cómo está distribuida la variación genética y su estructura es esencial tanto para entender los mecanismos de evolución que actúan en las poblaciones como para desarrollar programas de manejo y conservación de los recursos naturales de una manera más adecuada (Franklin, 1980; Clegg y Brown, 1983).

Bajo este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar cómo está distribuida la variación genética entre y dentro de las poblaciones de *Pinus rzedowskii* y el grado de estructuración genética de la especie con el uso de marcadores moleculares, específicamente microsatélites nucleares. Esta especie es un sistema de estudio muy interesante de analizar debido a que i) es una especie endémica de México y considerada en peligro de extinción (NOM-059-SEMARNAT 2010), ii) tiene una distribución restringida al Sur-Oeste de la Sierra de Coalcomán, Michoacán, y iii) está representada por 12 poblaciones con tamaños censales pequeños (Delgado *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2012). Además, las poblaciones se encuentran fragmentadas espacial y ecológicamente, ya que se establecen en fragmentos o parches de suelo de tipo calizo muy particulares (Delgado *et al.*, 1999). Por tanto, los resultados que se generen aportarán información más clara sobre la historia evolutiva de esta especie, así como información de utilidad para definir estrategias de manejo y conservación.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones es una disciplina que proporciona información acerca de los procesos históricos y evolutivos que dan lugar a la estructura y composición genética de las poblaciones a partir de conocer las frecuencias alélicas y genotípicas, así como inferir aspectos demográficos que permiten conocer como ha sido su dinámica. Una de las premisas fundamentales de este tipo de estudios es que los genotipos de las poblaciones no se encuentran distribuidos al azar sino que presentan una estructura temporal y espacial (Hartl y Clark 1989). La genética de poblaciones se fundamenta en la teoría del equilibrio Hardy-Weinberg, la cual muestra que dentro de una población con reproducción sexual y con apareamiento aleatorio, se establece un equilibrio de las frecuencias alélicas, donde las frecuencias de cada alelo permanecen constantes de generación en generación (Hedrick, 1983). Para que el equilibrio Hardy-Weinberg se cumpla, es necesario que las poblaciones tengan un tamaño censal muy grande, que las generaciones no se traslapen, que los organismos tengan condición diploide, sean igualmente fértiles y viables, que los apareamientos sean al azar y que todos los individuos sean competentes para dejar descendencia.

El grado en el que las frecuencias alélicas o genotípicas se desvíen del equilibrio genético (Hardy-Weinberg) permite conocer los procesos o factores evolutivos que actúan en las poblaciones, tales como selección, migración, deriva génica, mutación o procesos de endogamia. Así, se pueden contestar diferentes preguntas relacionadas, por ejemplo, con los niveles de diversidad genética, con la determinación de las relaciones de parentesco entre individuos, con el origen poblacional de individuos migrantes, con los sistemas de apareamiento, con las interacciones interespecíficas, o con la caracterización de patrones espaciales de dispersión y competencia (Robledo *et al.*, 2006).

Variación genética

La variación genética o diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como el conjunto de las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El conocimiento de la diversidad genética de una especie puede ser utilizado en varias vertientes: a) evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales provocados por las actividades humanas conscientes o inconscientes, b) evaluar los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos que disminuyen nuestra capacidad de sobrevivencia como sociedad y como especie, c) conocer la riqueza genética de la nación y su distribución geográfica, d) planear las estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos, e) entender la forma, velocidad y causas de la pérdida de la diversidad genética, f) evaluar los riesgos de introducción de enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre poblaciones, especies nativas y recursos genéticos de plantas animales y humanos (Piñero *et al.*, 2008).

Estructura genética

La estructura genética trata de explicar la manera en que está distribuida la variación genética entre individuos, dentro de poblaciones y entre poblaciones de una especie. La variación genética puede aparecer espacialmente estructurada a diferentes escalas: población, subpoblación o entre grupos de individuos próximos (Escudero *et al.*, 2003). La distribución de la variación genética se ve influenciada, no sólo por la acción de fuerzas evolutivas tales como la selección natural, la migración y la deriva genética, sino también, por procesos demográficos y sucesos históricos, que pueden influir sobre el grado de expansión, contracción y fragmentación de las poblaciones, el aislamiento en refugios y la recolonización de las especies (Hewitt 1996; Beaumont, 1999; Storz y Beaumont, 2002).

Influencia de las fuerzas evolutivas

La deriva genética tiene una gran influencia en el cambio de las frecuencias alélicas en poblaciones pequeñas. La deriva génica produce cambios aleatorios en las frecuencias alélicas de generación en generación, lo que puede llevar a la disminución de la variación genética por la fijación de alelos y al incremento en la diferenciación entre las poblaciones (Eguiarte, 1999; Hartl y Clark, 1989). En contraste con la deriva genética, el flujo génico aumenta la variabilidad genética de una población, ya que se trata de la introducción de genes de una población a otra. Este intercambio de genes entre poblaciones puede ayudar a aumentar las posibilidades de las poblaciones resistan los cambios del entorno y a integrar poblaciones para evitar su divergencia (Eguiarte, 1990). Otra de las fuerzas evolutivas es la mutación, la cual aumenta la diversidad genética al alterar la secuencia de ADN y ser heredable en las siguientes generaciones. Aunque la tasa de cambio en las frecuencia génicas por mutación es muy baja, ésta es la causa última de toda la variación genética que se encuentra en las poblaciones y especies (Futuyma, 1989). La selección natural consiste en la supervivencia y reproducción diferencial de las distintas variantes génicas. Si los cambios que se producen por mutación son beneficiosos, entonces los alelos nuevos tenderán a prevalecer al ser seleccionados en la población. Hay tres tipos de selección natural, con efectos distintos sobre la diversidad genética: a) direccional, donde disminuye la diversidad, b) equilibrante, donde se mantiene la diversidad y los heterocigotos tienen la mayor adecuación, de manera que la selección favorece el mantenimiento de alelos múltiples y c) dependiente de la frecuencia, en cuyo caso se mantiene la diversidad y la adecuación depende del alelo o de la frecuencia genotípica, y cambia con el tiempo (Eguiarte, 1999).

1.2. PROCESOS DEMOGRÁFICOS IMPLICADOS EN LA EXTINCIÓN DE ESPECIES

Uno de los procesos que resulta del efecto de algunas de las fuerzas evolutivas es la endogamia, ya que provoca una desviación en las frecuencias genotípicas de las poblaciones con respecto a las esperadas en el equilibrio Hardy-Weinberg, al promover el incremento en la frecuencia de homócigos y un descenso paralelo en la

frecuencia de heterócigos. En este sentido, es posible cuantificar el nivel de endogamia (F) de una población en virtud de sus efectos (UAM, 2011). Entonces, una población endógama es aquella en la que la probabilidad de que un individuo sea autóctigo (con un alelo idéntico por descendencia) es mayor debido al apareamiento entre parientes y se estima a través del coeficiente de endogamia (F) (Hartl y Clark, 1989). Este coeficiente es también una medida de la diferenciación con respecto a las proporciones panmícticas: $F=1-H_{obs}/H_{esp}$ (índice de fijación) donde: H_{obs} es la heterocigosis observada y H_{esp} es la heterocigosis esperada (Futuyma, 1998; Hartl y Clark, 1989; Sweigart *et al.*, 1999).

Los efectos genéticos de la endogamia en las poblaciones son: 1) la redistribución de genes del estado heterócigo al homócigo sin alterar las frecuencias alélicas, 2) aumento de la probabilidad de expresión de alelos deletéreos, 3) disminución de la variabilidad genética, y 4) disminución del tamaño efectivo de la población (Eguiarte y Piñero, 1990; Kelley y Waller, 2002; Viard *et al.*, 1996).

Cuellos de botella

En genética de poblaciones un cuello de botella es la disminución de la variación genética por descenso del tamaño de las poblaciones en el pasado y como resultado, las generaciones posteriores al cuello de botella presentarán una baja variabilidad genética, además de que también cambia la proporción de alelos que se presentaba antes del cuello de botella (Gilpin y Soulé, 1986). En algunos casos, los cuellos de botella en las poblaciones de plantas son conocidos por reducir la variabilidad genética, purgar mutaciones deletéreas y reducir la depresión por endogamia, promoviendo así la evolución de la autofertilización (Charlesworth y Charlesworth, 1995; Lande y Schemske, 1985). Los patrones que generan los cuellos de botella en la variación genética dependen de su duración, magnitud y el tiempo que haya transcurrido desde que ocurrieron. Además, pueden incrementar la estocasticidad demográfica, la tasa de consanguinidad, la pérdida de variación genética y la fijación de alelos deletéreos, lo que conlleva a reducir la probabilidad de supervivencia de las poblaciones (Luikart y Cornuet, 1998).

Fragmentación del hábitat

Un factor que puede tener gran importancia sobre la estabilidad de las especies es la fragmentación del hábitat, ya que afecta la estructura genética de las poblaciones debido a la disminución del flujo genético por la ruptura de la continuidad de las poblaciones y la reducción del número de individuos incrementando la deriva genética (Young *et al.*, 1996). Entonces, si la diversidad genética está en función de la continuidad o la discontinuidad geográfica, las poblaciones que presenten barreras geográficas ya sea de distancia o físicas, estarán más diferenciadas que las poblaciones con una distribución continua. Además, en poblaciones fragmentadas la diversidad genética es menor dentro de los fragmentos, como se ha demostrado en varias especies tropicales (Pautasso, 2009). Si estos hechos se producen en poblaciones pequeñas y además en especies de distribución restringida, la pérdida de variabilidad genética y la endogamia pueden disminuir la capacidad de adaptación de las especies los posibles cambios ambientales reduciéndose las probabilidades de sobrevivencia de la población (Herguedas *et al.*, 2009).

1.3. MARCADORES MOLECULARES

Los avances de la biología molecular han permitido desarrollar una gran variedad de marcadores moleculares, como son las isoenzimas, los RFLPs (polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción), los RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar) y SSRs (secuencias simples repetidas, o microsatélites), y modelos teóricos para su estudio, los que han sido aplicados tanto al estudio de procesos ecológicos como evolutivos (Delgado y Piñero, 2008). Los marcadores moleculares permiten seleccionar a los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés y gracias a su empleo ha sido posible mejorar muchas especies que son la base de la alimentación del mundo (Nuez y Carrillo, 2000).

Los estudios genéticos basados en marcadores moleculares son cruciales para dilucidar unidades de manejo apropiadas para especies endémicas y raras (Rachmat *et al.*, 2012). En los últimos diez años, los microsatélites (SSRs) han tomado ventaja

sobre los otros marcadores, ya que son altamente polimórficos, codominantes y compatibles con la teoría de la genética de poblaciones (Schaal *et al.*, 1998; Petit *et al.* 2005). Además, se pueden obtener de diferentes estructuras celulares (ADN nuclear y citoplasmático). Por ello, el uso de microsatélites es ampliamente recomendable para estudios de diversidad genética intrapoblacional. En general, los microsatélites tienen tasas de mutación altas (entre 10^{-5} y 10^{-3} por generación), resultando en una diversidad alélica alta (Jarne y Lagoda, 1996).

Los microsatelites nucleares (SSRn) son marcadores que se segregan de manera Mendeliana y son codominantes por lo que se pueden reconocer los genotipos homocigos y heterocigos de una población. El ADN nuclear, al ser heredado biparentalmente, permite obtener información particular sobre los tamaños efectivos y los niveles de endogamia tanto de los árboles padre como de las semillas. Además, todo el desarrollo teórico de la genética de poblaciones puede ser aplicado para estos marcadores (Pollock *et al.*, 1998).

1.4. ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN PINOS MEXICANOS

Para especies de pinos existen muchos trabajos sobre la variabilidad genética que se han desarrollado desde la década de los 70's, con el uso de isoenzimas y otros marcadores moleculares (RFLPs, RAPDs, ISSRs, SSRs), tanto con especies de distribución amplia como restringida (Newton *et al.*, 2002; Walter y Epperson, 2005). A continuación se mencionan algunos de los trabajos desarrollados en México para especies de pinos con distribución restringida.

En 2002, Moreno estudió el sistema de apareamiento y la variación genética de *Pinus maximartinezii* Rzed, a partir de individuos adultos, juveniles y 9 familias, con aproximadamente 10 embriones cada una. Con el uso de cuatro loci de SSRn, obtuvo un nivel de variación genética intermedia ($H_e= 0.269$), con una variación importante en las tasas de entrecruzamiento entre familias ($tm=0.964$; $d.s.= 0.489$). La autora

concluyó que la mayoría de los miembros de la familia son hermanos completos y sugiere que el número de árboles fuente de polen es reducido.

Por su parte, Rentería (2002), estudió la variabilidad genética de siete poblaciones de *P. nelsonii* Shaw con SSRn, encontrando un valor de variabilidad genética intermedio ($H_e = 0.263$) y baja estructura genética ($R_{ST} = 0.021$). Los resultados indican que las poblaciones mantienen valores de diversidad genética muy similares debido al flujo genético alto (> 1.5 migrantes por generación). Probablemente la dispersión de las semillas de esta especie sea muy eficiente, lo cual ha permitido la homogenización de la diversidad genética.

Roman (2004) probó varios microsatélites nucleares desarrollados en *Pinus strobus* Martínez (Echt *et al.*, 1996 y Rajora *et al.*, 2000) en varias especies y variedades del complejo ayacahuite de México (*Pinus chiapensis* Martínez, *Pinus ayacahuite*, *Pinus strobiformis* Sudw. y *Pinus flexilis* James), reportando seis microsatélites; cuatro de ellos simples (RPS2, RPS12, RPS50, RPS39) y dos compuestos (RPS25 y RPS60). Los resultados mostraron variación en el número y la frecuencia de los alelos en cada taxa. Se identificaron un total de 69 alelos para los seis loci, con un intervalo de 101 a 269 pares de bases. El locus con el mayor número de alelos fue RPS12 (22) y el locus con menor número de alelos fue RPS60 (8).

Más recientemente, Delgado *et al.* (2011) estudiaron las dos únicas poblaciones naturales de *P. caribae* var. *hondurensis* Morelet distribuidas en México, con el uso de seis SSRn. Encontraron valores intermedios de variación genética, con niveles significativos de endogamia ($F_{IS} = 0.123$) y con una diferenciación genética baja ($R_{ST} = 0.033$). Los resultados sugieren eventos históricos de fragmentación y disminución del tamaño de las poblaciones, las cuales probablemente ocurrieron entre los 8,100 a 35,000 años atrás.

En *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw, específicamente para la única población natural localizada del estado de Michoacán, López (2012) analizó la diversidad

genética y el sistema de apareamiento. Obtuvo un valor promedio de heterocigosis observada menor a la esperada ($H_o=0.509$ y $H_e= 0.664$), un índice de endogamia no significativo ($F= 0.125$). Para el análisis de paternidad estimó las tasas de polinización cruzada multilocus ($tm= 0.96$), unilocus ($ts= 0.94$), la endogamia biparental ($tm-ts= 0.03$), la correlación entre miembros de una misma familia ($rt= 0.904$) y la paternidad correlacionada ($rp= 0.032$). Los resultados indican que para esa población existe un tipo de apareamiento predominantemente de entrecruzamiento y donación de polen de árboles externos a la familia.

Delgado et al. (1999) analizaron aspectos demográficos y genéticos de *Pinus rzedowskii*. Describen una estructura de edades no uniforme, con una mayor presencia de árboles adultos mayores a 50 años, con un reclutamiento deficiente y producción muy baja de conos femeninos. En el análisis de la variación genética con el uso de isoenzimas encontraron un promedio de variación genética alto ($H_e= 0.219$), y una estructura genética marcada entre las poblaciones ($F_{ST}= 0.175$). Proponen un escenario evolutivo donde la especie estuvo conformada por una gran población que se fragmentó, dejando poblaciones pequeñas, en las que se han fijado por deriva genética diferentes variantes alélicas.

Figuroa (en preparación) hizo estimaciones de la variación genética para diez poblaciones de *Pinus rzedowskii* con el uso de microsatélites de cloroplasto. Obtuvo 19 haplotipos, los cuales se comparten entre la mayoría de las poblaciones, con una diversidad haplotípica promedio de 0.73. El menor valor de diversidad haplotípica lo presentaron las poblaciones Chiqueritos y La Soledad ($H= 0.200$) ubicadas en la parte norte de la distribución de la especie, y el mayor valor de diversidad se encontró en las poblaciones de La Aguacatera ($H= 0.742$) y El Fresno ($H= 0.621$), ubicadas en la parte central de su distribución. El valor promedio es alto pero comparable a otros estudios de pinos con distribución restringida como *P. pinceana* ($H= 0.824$; Escalante, 2001) y *Pinus nelsonii* ($H= 0.728$; Cuenca, 2001).

En general, se ha observado un patrón de variación y diferenciación genética más altos en las especies de coníferas mexicanas que en otras especies distribuidas en EUA y Europa (Ledig *et al.*, 1998).

1.5. EL GÉNERO *Pinus* EN MÉXICO

A nivel mundial, la riqueza aproximada de especies de pinos es de 111 especies (Price *et al.*, 1998). En Norteamérica se reconocen tres regiones de alta diversidad de especies de pinos: 1) México, 2) California y 3) sureste de EUA (Farjon y Styles, 1997). En especial, las especies de pinos de México llegan hasta EUA, Canadá y en América Central hasta Nicaragua. En México y América Central se localizan alrededor de 46 especies de pinos, con diversas variedades y formas, lo que convierte a México en un centro secundario de diversidad del género *Pinus* al contar con cerca de 42% de las especies y un porcentaje mayor al 55 % de endemismos de éste género, distribuidos en un intervalo muy amplio de condiciones ambientales (Perry *et al.*, 1998; Perry, 1991).

Estos árboles son distintivos de los sistemas montañosos, de los que se reconocen cinco regiones principales (Sánchez-González, 2008) de distribución que difieren muy poco con las descritas por Eguiluz-Piedra (1985). I) Baja California Norte y Sur, II) Sierra Madre Occidental, III) Sierra Madre Oriental, IV) Faja Volcánica Transmexicana (FVT) y V) Sierra Madre del Sur. De acuerdo con la revisión de Sánchez-González (2008), en México se pueden identificar dos probables centros de diversidad y evolución del género *Pinus*. El primero conformado por la FVT (región IV), con extensiones hacia el noroeste y sureste, a través de la Sierra Madre Occidental (II), Sierra Madre Oriental (III) y Sierra Madre del Sur (V), con las que comparte 17, 19 y 17 taxa, respectivamente. La mayoría de las entidades federativas de la República Mexicana dentro de la región IV, poseen entre 11 y 18 taxa, y sólo Aguascalientes, Colima y Guanajuato poseen menos de diez especies. El 70% de los pinos de este primer centro de diversidad son mexicanos *sensu stricto* y es el área de distribución principal de tres especies, *P. devoniana*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, desde la

cual pudieron dispersarse hacia otras regiones de México y Centroamérica (Farjon y Styles, 1997). El segundo centro de diversidad (regiones II y III), se caracteriza por los endemismos locales, originados en pequeñas montañas de las planicies áridas y semiáridas. Los eventos geológicos en el Cretácico tardío-Terciario temprano, que generaron el patrón de montañas separadas por llanuras, aunado al cambio climático relacionado con la desertización durante el Mioceno, favorecieron la migración de pinos desde las Montañas Rocosas y su diversificación posterior en esta región de México (Axelrod, 1986; Farjon y Styles, 1997).

Para México se han reportado al menos 26 especies endémicas que equivalen al 55% del total de especies presentes en el país (Sánchez-González, 2008). Actualmente al menos nueve de estas especies endémicas se encuentran amenazadas o en peligro de extinción o en una categoría de riesgo de acuerdo con la NOM-059 SEMARNAT 2010 y son: *Pinus culminicola* Andresen et Beaman, *Pinus jaliscana* Pérez de la Rosa, *Pinus johannis* Passini, *Pinus lagunae* Passini, *Pinus martinezii* Martínez, *Pinus maximartinezii* Rzedowskii, *Pinus nelsonii* Shaw, *Pinus pinceana* Gord y *Pinus rzedowskii* Madrigal et Caballero. Particularmente, esta última especie es muy interesante de analizar debido a que además de ser endémica, restringida a una pequeña área del estado de Michoacán y estar catalogada en peligro de extinción, presenta un alto grado de fragmentación de las poblaciones debido a las condiciones topográficas (pendientes mayores a 90°) y edáficas (suelos calizos y poco profundos) en las que se establece (Delgado *et al.*, 1999). Además, esta especie es considerada como relictual ya que presenta caracteres morfológicos y anatómicos compartidos entre los dos subgéneros que conforman el género *Pinus* (*Strobus* y *Pinus*) (Madrigal 1986).

1.6. DESCRIPCIÓN DE *Pinus rzedowskii* MADRIGAL ET CABALLERO

Especie: Sistemática y taxonomía

Pinus rzedowskii fue descubierta en 1966, y descrita en 1986 por X. Madrigal y M. Caballero. Taxonómicamente *P. rzedowskii*, está clasificada dentro del subgénero

Strobis o *Haploxylon* (pinos blandos) que agrupa a todas las especies que contienen un haz vascular en las hojas. Los primeros trabajos que se realizaron con base en caracteres anatómicos, morfológicos y bioquímicos, ubican a la especie dentro de un subgrupo que presenta una combinación inusual de estas características (*P. maximartinezii*, *P. rzedowskii*, *P. pinceana* y *P. nelsonii*), las que además son consideradas como un grupo de especies relictuales y de distribución restringida (Perry 1991, Farjon y Styles 1997). Estudios moleculares recientes realizados con diferentes regiones del ADN, agrupan a *P. rzedowskii* en la subsección *Cembroides*, sección *Parrya* separándola del linaje de *P. nelsonii* (Liston *et al.*, 1999; Gernand *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Pinus rzedowskii* de acuerdo a estudios moleculares.

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
División	Espermatofita
Subdivisión	Gimnospermae
Orden	Coniferales
Familia	Pinaceae
Género	<i>Pinus</i>
Subgenero	<i>Strobis</i>
Sección	<i>Parrya</i>
Subsección	<i>Cembroides</i>
Especie	<i>Pinus rzedowskii</i> Madrigal et Caballero

Características morfológicas

Los árboles de *Pinus rzedowskii* llegan a crecer de 15 a 30 m, su copa es irregular y poco compacta, el diámetro de su fuste generalmente es de 60 cm y tiene corteza oscura de 3 a 6 cm de espesor. Tiene hojas cortas en fascículos de 3 y 4 acículas verde cenicientas o glaucas, de ápice agudo y márgenes aserrados. Los

estomas están dispuestos en 2, 3 y 4 hileras en cada una de las caras. La hipodermis es homomorfa, constituida por dos hileras casi continuas de células, con ligeros engrosamientos en las caras internas. Las vainas son pronto caedizas de base no decurrente, de color amarillento en las hojas jóvenes y castaño oscuro en las adultas. Los estróbilos masculinos son de color violáceo, de 1 cm de longitud por 3-4 mm de ancho. Por su parte, los estróbilos femeninos maduran al segundo año después de su fecundación, son caedizos, oblongos, ligeramente colgantes, simétricos y pedunculados; la longitud del cono llega a ser de 10 a 15 cm y el diámetro oscila entre 6 y 8.5 cm en su parte media cuando están abiertos. Las escamas son duras y rígidas, cóncavas en su cara interior y convexa en la exterior, de color ocre en ambas caras hasta el nivel del umbo, el cual está cubierto de resina ambarina. El umbo dorsal de forma tetragonal, de 15-22 mm de ancho y de 13-20 mm de longitud. Apófisis saliente de forma subpiramidal, de color ocre brillante, claramente aquillada transversalmente. Cúspide no protuberante, de color café oscuro que lleva en su extremo una espina dirigida hacia abajo. Las escamas de la parte central del cono miden de 3 a 5 cm de largo y 2.5 cm de ancho; el ápice de las escamas es irregular, terminando en ángulo obtuso. Se encuentran dos semillas en la base interior de cada escama, con una ala articulada que mide de 2 a 3.5 cm de largo por 1- 1.3 cm de ancho. Las alas son adnadas de color café claro, brillante y translúcido. Las semillas son de color café oscuro, de testa delgada, de 8 a 10 mm de longitud y 4 a 5 mm de ancho; la cubierta seminal interna es de color café claro (Perry, 1991; Delgado, 1997; Fig. 1).



Figura 1. Fotografía de un árbol de *P. rzedowskii* de las poblaciones La Alberca y El Huarache.

Pinus rzedowskii vive en bosques de pino-encino y en las cercanías de las poblaciones de la especie encontramos asociación principalmente con *Pinus pseudostrobus* Lind, *P. montezumae* Lamb, *P. lausonii* Roetzl, *P. leiophylla* Schl, *P. michoacana* Mtz, *P. herrerae* Mtz y *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. Et Cham, además de algunas especies de *Quercus* (Delgado, 1997).

Distribución geográfica

Madrigal (1986) indica que la especie se distribuye en una pequeña área del Suroeste del estado de Michoacán en la Sierra de Coalcomán, conformada por tres poblaciones. Posteriormente Delgado *et al.* (1999) reportan nueve poblaciones más y sugiere la existencia de más poblaciones distribuidas al sur del límite reportado. A nivel de poblaciones existe escasa información relacionada con su dinámica ecológica y evolutiva, y solo se ha reportado formalmente el trabajo de Delgado *et al.* (1999), descrito en el apartado anterior.

El área de estudio forma parte de la Sierra Madre del Sur en el estado de Michoacán y pertenece al Municipio de Coalcomán. Está comprendida entre las coordenadas geográficas 102° 47' 21" y 102° 55' 39" de longitud Oeste y 18° 44' 14" y 18° 48' 24" de latitud Norte con un superficie de 1600 ha aproximadamente (Delgado, 1997). La región se caracteriza por la existencia de 9 tipos de suelo (regosol, cambisol, luvisol, feozem, vertisol, litosol, renzima y solonchat), lo cual indica una gran variación de condiciones topográficas, geológicas y climáticas (Unidad de Administración Forestal No-10, 1991). Resulta interesante mencionar que las poblaciones de *Pinus rzedowskii* se han encontrado únicamente en suelos de tipo cambisol, y la característica de éste tipo de suelo es que son suelos muy poco desarrollados, con acumulación de materiales como la arcilla, el carbonato de calcio, fierro y manganeso (Delgado, 1997).



Figura 2. Imágenes de algunas poblaciones de *Pinus rzedowskii* colectadas entre noviembre-diciembre (2012) y enero-marzo (2013).

1.7. HIPÓTESIS

Pinus rzedowskii es una especie representada por pocos individuos y poblaciones, de distribución restringida y catalogada en peligro de extinción, por lo que genéticamente contiene bajos niveles de variación y estructura genética. Presenta una dinámica de reducción (cuellos de botella recientes) e incremento (expansión) de sus poblaciones.

1.8. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar los niveles de variación y estructura genética de las poblaciones de *Pinus rzedowskii* y analizar los posibles procesos demográficos que dieron origen a la distribución de la variación genética de esta especie.

Objetivos particulares

- Evaluar los niveles de variación genética, endogamia y el tamaño efectivo de las poblaciones de *P. rzedowskii*.
- Estimar el grado de diferenciación genética intra- e inter-poblacional.
- Determinar las tasas de migración y la existencia de un patrón de aislamiento por distancia entre las poblaciones de *P. rzedowskii*.
- Probar la hipótesis de cuellos de botella recientes en las poblaciones de *P. rzedowskii*.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. ÁREA DE ESTUDIO Y COLECTA DE MATERIAL

Pinus rzedowskii se encuentra ubicado entre los municipios de Aguililla y Coalcomán de Vázquez Pallares, Michoacán, entre las coordenadas 18°50'24.0"-18°41'38.2" de latitud Norte y 102°58'04.2"-103°00'32.2" de longitud Oeste. Para este estudio se inspeccionaron ocho de las 12 poblaciones reportadas por Madrigal (1969) y Delgado *et al.* (1999), y con la ayuda de la gente local se logró ubicar seis nuevos sitios los cuales se reportan como nuevos registros, dos de los cuales se distribuyen más al sur que las poblaciones anteriores (Cuadro 2, Figs. 3, 4 y 5). De las 18 poblaciones se trabajó con un total de 13, para las que se registraron las coordenadas geográficas y la altitud con un posicionador geográfico o GPS.

Cuadro 2. Referencias geográficas de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*. Tamaños estimados de las poblaciones (Delgado *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2015)

Población/Abreviación	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud (msnm)	Número de individuos
1. El Durazno (DUR1)	18°50'24.0"	102°58'04.2"	2089	16
2. Chiqueritos (CHI2)	18°49.17'17"	102°55'35.7"	2416	60-70
3. La Soledad (SOL3)	18°47'40"	102°58'17"	2032	9
4. Jesús Ortíz* (JO4)	18°42' 2.8"	103°00' 38.2"	2344	1500
5. La Magueyera* ((MA5)	18°41'44.9"	103°00'23.1"	2340	2000
6. La Aguacatera (AG6)	18°41'10.5"	103°00'34.1"	1714	500
7. El Fresno (FRE7)	18°40'30.8"	102°59'4.0"	2308	3500
8. La Alberca (ALB8)	18°39'9.3"	103°00'11.8"	2141	2000
9. La Carretilla* (CAR9)	18°39'10.2"	102°58'24.4"	2129	300
10. Vaca Pinta (VP10)	18°39'56"	102°58'31"	2449	200
11. P. Varaloso (PVA11)	18°41'8.9"	102°58'41.4"	2394	200
12. El Huarache* (HUA12)	18°27'42.9"	103°01'37.5"	1631	3000
13. La Canoyita* (CAN13)	18°28'30.9"	103°00'7.9"	2252	150
14. Las Tabernas (TAB14)	18°45'40"	102°59'02"	2300	1
15. La Tepamera* (TEP15)	18°41'00.3"	103°01'15.3"	1625	2
16. El Varaloso (VAR16)	18°41'09"	102°58'48"	2480	50-60
17. El Pinabete (PIN17)	18°39'59"	103°00'24"	2340	150

* Nuevos registros.

Cada población fue definida como un grupo de individuos, separados por una barrera geográfica que podría ser factor de diferenciación respecto a otros grupos de individuos de la misma especie y a una distancia geográfica relativamente corta tomando en cuenta su condición de endémica, distribución restringida y condición

ecológica (en peligro de extinción) (Cuadro 2). El muestreo de las poblaciones se realizó de tres maneras (Delgado *et al.* 1999): transectos altitudinales, al azar en cuatro puntos y uno central (en los sitios con mayor densidad de individuos), y muestreo de todos los individuos en poblaciones con tamaño censal menor a 20 individuos.

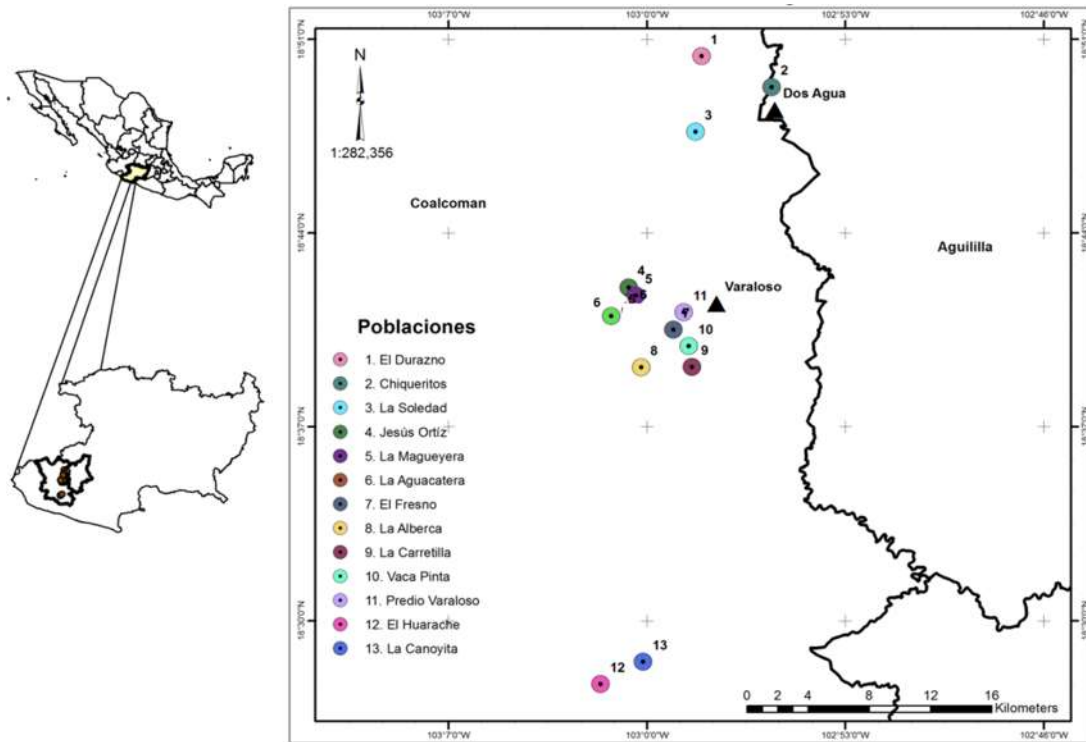


Figura 3. Mapa de la localización geográfica de las poblaciones de *Pinus rzedowskii* y poblados de referencia cercanos a los sitios.



Figura 4. Ubicación, muestreo y toma de datos en tres poblaciones de *P. rzedowskii* (PVA11, HUA12 y AGU6).



Figura 5. Fotografías de *P. rzedowzkii* y recolecta de acículas.

2.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Se obtuvo ADN genómico de 5 a 25 individuos por población utilizando el método Miniprep CTAB 2X modificado por Vázquez-Lobo (1996); utilizando el buffer de extracción preparado con Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), CTAB 2 %, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM y β -Mercaptoetanol 1 %. Para verificar la calidad de la extracción del ADN total, se elaboraron geles de agarosa al 0.5 %. La electroforesis se realizó en una cámara Mini Sub Cell GT de BIORAD a 120 V durante 15 minutos (Fig. 6). Posterior a la electroforesis los geles se visualizaron en un transiluminador (Bio Imaging Systems) de luz ultravioleta a 254 nm.

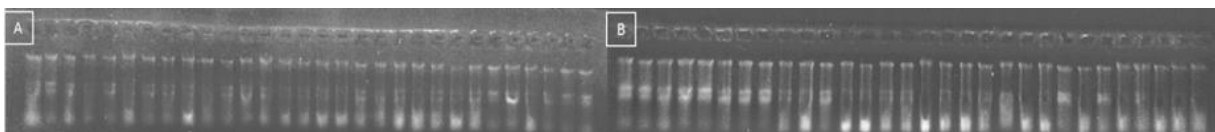


Figura 6. Electroforesis en geles de agarosa al 0.5 % para ADN total. A) El Fresno y B) La Alberca.

2.3. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES

Se ensayaron diez microsatélites nucleares, siete son derivados de *Pinus strobus* (RPS34b, RPS2, RPS18, RPS25b, RPS50, RPS84 y RPS12; Echt *et al*, 1996) y tres de *Pinus taeda* (ptTX3013, ptTX2123, ptTX2146; Elsik *et al*, 2000; cuadro 2). La

amplificación se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones de reacción y amplificación utilizadas fueron modificadas a partir de las propuestas por Karhu y Williams (2000). La mezcla de reacción para cada individuo consistió en 2.5 uL de Buffer Tris (1M, pH 9), 2.0 uL de dNTPs (4X, 100 mM), 0.5 uL de primer Forward (10 uM), 0.5 de primer Reverse (10 uM), 11.3 uL de agua destilada, 3.0 uL de MgCl₂ (50 mM), 0.2 uL de Taq plimerasa (1U) y 3.0 uL de ADN (30 ng/uL) para obtener reacciones de 23 uL. El programa de amplificación fue el mismo para todos los microsatélites, solo varió en la temperatura de alineamiento la cual es específica para cada microsatélite y se hizo en un termociclador C1000™ Thermal Cycler de BIO-RAD usando el siguiente protocolo: 1) desnaturalización inicial a 94° C por un minuto, dos ciclos a 94° C por un minuto, 60° C por un minuto y 72° C por 35 segundos; 2) 45 segundos a 94° C, 45 segundos a la temperatura de alineamiento específica para cada microsatélite y disminuyendo 0.5° C durante 20 ciclos hasta bajar 10° C, extensión a 72° C durante 45 segundos; 3) comprende 20 ciclos durante los cuales ocurre una desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, 30 segundos a la temperatura final de alineamiento y una extensión por un minuto a 72° C; 4) extensión final a 72° C durante 5 minutos y finalmente una disminución de la temperatura a 4° C. La amplificación de los fragmentos se verificó mediante electroforesis con bromuro de etidio 200 mM en geles de agarosa al 2 % utilizando una cámara horizontal Wide mini-sub Cell GT, de BIORAD (Fig. 7).

Para seleccionar los loci polimórficos, se elaboraron geles de poliacrilamida desnaturalizante al 6 % (8 M Urea) los cuales fueron procesados en una cámara de secuenciación manual a 54 W y teñidos con nitrato de plata mediante el protocolo propuesto por Ecth et al. (1996). La determinación del tamaño de los fragmentos se hizo visualmente con la ayuda de un marcador de 10 pares de bases como referencia (Fig. 7). Se seleccionaron cinco microsatélites que mostraron polimorfismo y amplificación consistentes, los cuales fueron marcados con fluorescencia y se amplificaron con todas las muestras de las 13 poblaciones.

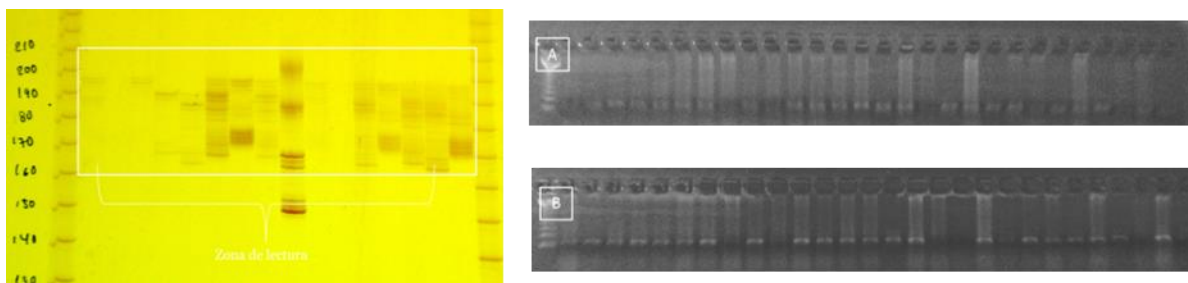


Figura 7. Reconocimiento del tamaño de los fragmentos para *P. rzedowskii* en geles de poliacrilamida. A y B muestran la amplificación mediante PCR de RPS34b para dos de las 13 poblaciones de la especie.

Cuadro 3. Microsatélites ensayados en *Pinus rzedowskii*. En negritas los que resultaron polimórficos y con amplificación consistente.

Locus	Motivo de repetición	Secuencia de los oligos	Tm °C	Tamaño (pb)
RPS2	(AC) ₁₅	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA TGGAGGCTATCACGTATGCACC	55	142-169
RPS12	(AC) ₁₇	TCAATGTGGAGATGGTGATT ACTTCTGACCTAACCAGAAACC	57	147-198
RPS18	(AC) ₁₄	TTTCTAATCAGTGTGCGCTACAT CACCGCTGCCCTATTTTACA	55	140-144
RPS34b	(AC) ₁₄	CAGTGTCTCTTATCACAGCG GCACTATAATGAAATAGCGCA	55	123-133
RPS25b	(AC) ₁₇ AG(AT) ₉	CACATATGGCAGAACACACA GATCGTCGCACTATCGAAC	55	125-129
RPS50	(AC) ₁₇	CCCAGAAATCTGTTTTAGAGC ACACATGAAATGTCAGAATGC	55	135-145
RPS84	(CT) ₁₀ (AC) ₁₁	CCTTTGGTCATTGTATTTTTGGAC CTTCCTTTTCCTTCTTGCTCCAC	52	145-183
ptTx2123	(AGC) ₈	GAAGAACCCACAAACACAAG GGGCAAGAATTCAATGATAA	57	191-201
ptTX3013	(GTT) ₁₀	GCTTCTCCATTAATAATTCTA TCAAAATTGTTTCGTAACCTC	63	125-145
ptTX2146	(GCT) ₄ GCC(GCT) ₇ GCC(GCT) ₈	CCTGGGGATTTGGATTGGGTATTTG ATATTTTCCTTGCCCTTCCAGACA	57	162-192

Las muestras amplificadas se procesaron en un secuenciador ABI Prism Hitachi en el Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco, UNAM campus Morelia) y los tamaños de los fragmentos fueron calculados con el programa Peak Scanner ver. 1.1 (ABI 2006; Fig. 8).

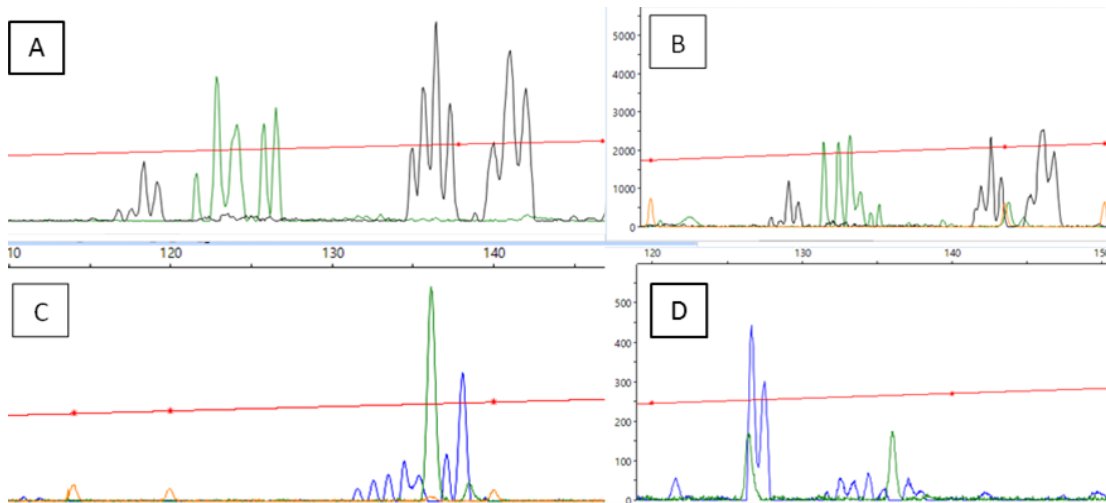


Figura 8. Electroferogramas analizados mediante el programa Peak Scanner. La identificación de alelos se realizó a partir del color del fluoróforo: A y B verde (RPS34b) y negro (RPS2), C y D verde (RPS50) y azul (RPS18), y lectura del tamaño en pares de bases.

2.4. ANÁLISIS DE DATOS

Con los tamaños de los fragmentos obtenidos se hizo una base de datos y una prueba para detectar la presencia de alelos nulos mediante el programa FREENA 2.0 (Chapuis y Estoup, 2007), el cual reveló una baja frecuencia de éstos, solo el micro RPS18 presentó valores de frecuencia entre 0.1 y 0.2 para tres poblaciones (AGU, MAG y FRE), el resto de las frecuencias de alelos nulos fueron muy bajas (menores a 0.0001). A partir de los obtenidos se estimaron la variación y estructura genética e información sobre la historia demográfica de las poblaciones de la especie.

Variación genética

Los estimadores e índices de la variación genética evaluados fueron: el número total de alelos por población (n), el número promedio de alelos por locus (A), la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e). Todas las estimaciones se obtuvieron con el programa Arlequín Ver. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). El índice de endogamia (F) se estimó de acuerdo con Wright (1965), y su significancia con una prueba de Fisher con 10000 iteraciones (Markov Chain Montec Carlo; MCMC) (Weir y

Cockerham 1984; Weir 1996), implementada en el programa GENEPOP Ver 4.4 (Rousset, 2008).

Estructura genética

Para calcular el nivel de estructuración genética de la especie se hicieron tres aproximaciones, la primera se trató de un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) en tres niveles: entre poblaciones (V_a-F_{ST}), entre individuos (V_b-F_{IS}) y dentro de individuos (V_c-F_{IT}), con el uso de ambos estadísticos F_{ST} y R_{ST} . A diferencia de la F_{ST} que asume un modelo de alelos infinitos (Infinite allele model, IAM), R_{ST} asume un modelo de mutación paso por paso (Stepwise mutation model, SMM), que considera que cuando los microsatélites mutan, ellos solo ganan o pierden una repetición. Esto implica que los dos alelos que se diferencian por una repetición están más estrechamente relacionados (tienen un ancestro común más reciente) de los alelos que se diferencian por muchas repeticiones (Freeland, 2005; Williams et al., 2000). Los análisis se hicieron con el programa Arlequin v 3.5 (Excoffier et al., 2005).

La segunda aproximación usó inferencia bayesiana para identificar grupos con una sub-estructura genética asociada a su distribución geográfica (Corander *et al.*, 2003). El análisis se hizo a dos niveles; un agrupamiento a nivel de individuos y el otro a nivel de poblaciones. Para ambos análisis se probaron de 2 a 13 grupos (k) con 30 réplicas, y se seleccionó el grupo con el logaritmo natural de verosimilitud ("logml") menor. En el caso de la agrupación genética de las poblaciones, se indicó *a priori* cada grupo (total de 13 poblaciones). Los análisis se hicieron con el programa BAPS v. 6; Corander *et al.*, 2003).

Para la tercera aproximación se utilizó el programa STRUCTURE v. 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Para el análisis se usó un modelo de mezcla o admixture y el modelo de frecuencias correlacionadas para calcular la probabilidad de pertenencia a un grupo genético (Falush et al., 2003). El rango de posibles grupos fue de 2 a 14 y 10 iteraciones, con un burn-in inicial de 50000 y 100 000 repeticiones de MCMC (Markov Chain Monte Carlo). El valor óptimo de K que se seleccionó fue a partir del valor máximo del logaritmo de la probabilidad posterior de los datos [$\ln \Pr(X|K)$] para un

valor de K determinado. El valor más bajo de K que mejor explica la estructura poblacional se tomó como la solución más idónea de acuerdo a Pritchard et al. (2000). Éste programa además permite hacer pruebas de asignación de la ancestría de los genotipos. Estima la proporción de ancestría de los genotipos que presentan los individuos sin información a priori de las poblaciones a las que pertenecen, y son ubicados en el grupo con la máxima probabilidad de ancestría (Evanno 2005).

Se realizó un análisis de aislamiento por distancia (Slatkin, 1993), el cual examina la relación del flujo genético con la distancia geográfica entre pares de poblaciones. La significancia se obtuvo mediante una prueba de Mantel con 1000 permutaciones (Rohlf 1993). Finalmente el tamaño efectivo de las poblaciones (N_e) y la tasa efectiva de migración ($M_R=N_em$) se estimaron con un procedimiento de máxima verosimilitud asumiendo una tasa de mutación (u) de 10^{-3} por generación (Boys et al., 2005), con el uso del programa Migrate ver 3.0 (Berli, 2008). El N_e fue calculado como $\theta/4 \times 10^{-3}$, donde $\theta = 4N_eu$, y M_R como m/u , donde m es la tasa de migrantes por generación entre poblaciones (Berli 2006).

Demografía histórica

A partir de los datos obtenidos, se hicieron inferencias para detectar la existencia de cuellos de botella recientes con el programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1996). Se asume que cuando una población experimenta un cuello de botella reciente, se presenta una reducción en el número de alelos y de la heterocigosis (Cornuet y Luikart, 1996). La heterocigosis observada (H_E) debe ser teóricamente menor a la heterocigosidad esperada (H_{Eq}) en equilibrio entre mutación y deriva (Piry et al., 1999; Cornuet y Luikart 1996; Luikart *et al.*, 1998). Se hicieron tres tipos de pruebas: prueba de signos, prueba de diferencias estandarizadas (Cornuet y Luikart 1996; Luikart *et al.*, 1998) y prueba de Wicolxon (Luikart *et al.*, 1998). También se usó el método gráfico de “Distorsión de la distribución de las frecuencias alélicas” (Luikart *et al.*, 1998). La reducción o pérdida de las clases de frecuencias de alelos o “shifts” pueden ser detectadas al comparar la distribución de alelos en una población con relación a la distribución que se esperaría en equilibrio

entre mutación y deriva génica (Maruyama y Fuerts 1985; Luikart *et al.*, 1998). Los análisis se realizaron asumiendo tres modelos de mutación; por pasos (SSM; Kimura y Ohta 1978), de alelos infinitos (IAM) y de mutación de dos fases (TPM, Two Phase Model; Garza y Williamson 2001) que asume que pueden ocurrir mutaciones por pasos y también mutaciones de mayor magnitud (Di Rienzo *et al.* 1994).

Capítulo 3. Resultados

3.1. VARIACIÓN GENÉTICA

Se obtuvo un total de 35 alelos para los cinco loci usados, siendo RPS84 el más variable con 8 alelos, seguido de los loci RPS2 y RPS34b, ambos con 7 alelos, el RPS18 con 6 y el RPS50 con 4 alelos (Fig. 9; Anexo 1). Solo se presentó un locus monomórfico para una población (RPS50, en CAN13).

La población con el mayor número de alelos para todos los loci fue La Alberca con 24, mientras que el menor valor lo obtuvo la población 13CAN con 12 alelos. El promedio del número de alelos por locus (A) fue de 2.36. Las poblaciones que presentaron alelos únicos fueron CAN13 en el locus RPS2 (alelo de 171 pb), HUA12 en el RPS84 (161 pb), FRE7 en el locus RPS18 (162 pb), ALB8 en RPS84 y RPS50 (165 y 128 pb respectivamente) y CHI2 en RPS84 (171 pb).

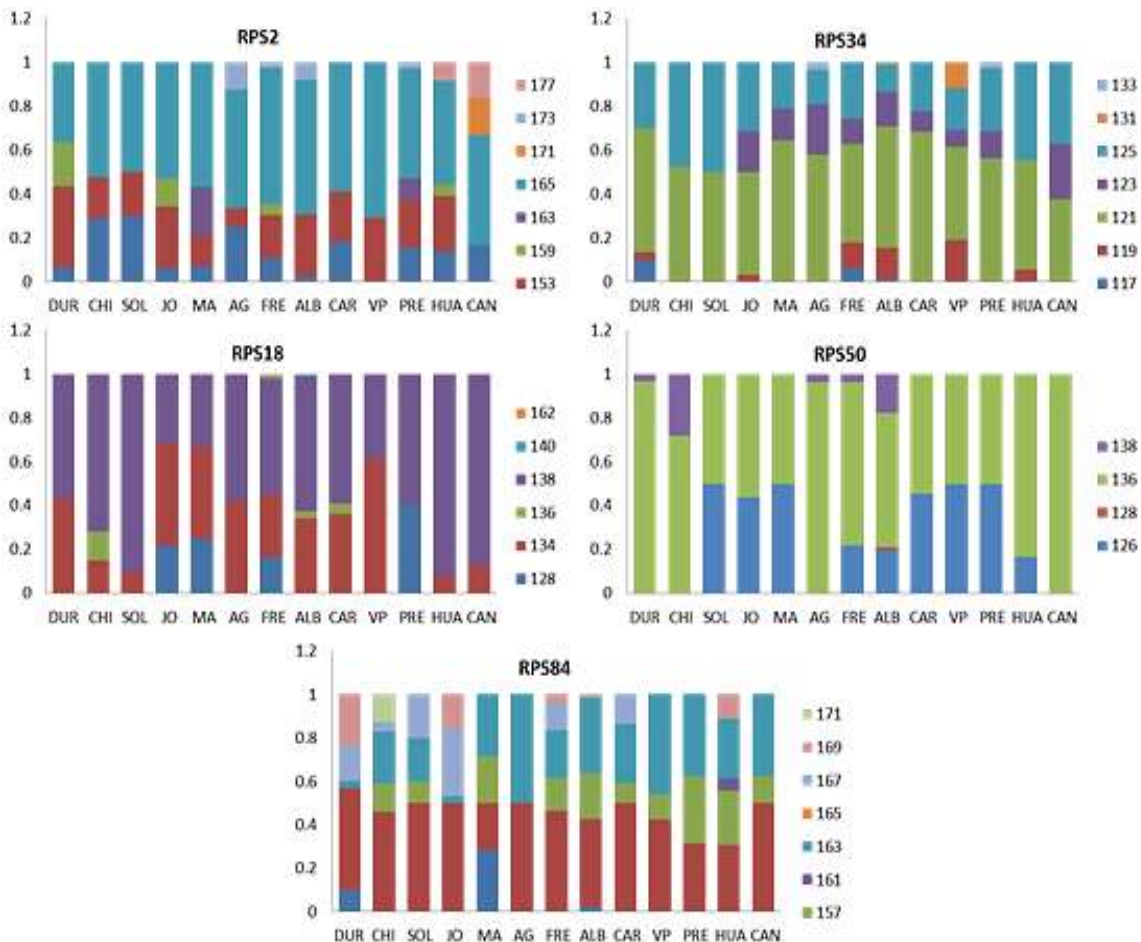


Figura 9. Frecuencias alélicas por población por locus analizado.

En general en todas las poblaciones la heterocigosis promedio observada fue mayor que la heterocigosis esperada, con un promedio de H_o de 0.714 y H_e de 0.568. El valor de heterocigosis observada más alto se presentó en la población SOL3 ($H_o=0.840$) y el más bajo en MA5 ($H_o=0.642$), la cual también presentó el valor más alto de heterocigosis esperada ($H_e=0.653$) y la de menor valor fue AG6 ($H_e=0.473$).

Cuadro 4. Estimadores de la variación genética obtenidos en 13 poblaciones de *P. rzedowskii*.

Población	N	n	A	Ae	Ho	He	F	θ (4Nu)	Ne
1 El Durazno	15	17	3.4	2.3	0.720	0.519	-0.406***	0.589	147
2. Chiqueritos	23	15	3	2.2	0.712	0.543	-0.316***	0.532	133
3. La Soledad	5	13	2.6	2.1	0.840	0.546	-0.647	0.209	52
4. Jesús Ortiz*	16	17	3.4	2.5	0.825	0.623	-0.337***	0.674	168
5. La Magueyera*	7	16	3.2	2.6	0.642	0.653	-0.028	0.608	152
6. La Aguacatera	13	14	2.8	2.0	0.660	0.473	-0.419*	0.204	51
7. El Fresno	39	23	4.6	2.6	0.670	0.603	-0.112***	1.582	395
8. La Alberca	48	24	4.8	2.4	0.658	0.585	-0.122***	1.927	482
9. La Carretilla*	11	15	3	2.2	0.690	0.566	-0.233	0.892	223
10. Vaca Pinta	13	14	2.8	2.3	0.747	0.563	-0.344**	0.325	81
11. Predio Varaloso	16	16	3.2	2.4	0.700	0.599	-0.174*	0.477	119
12. El Huarache*	18	17	3.4	2.3	0.677	0.497	-0.378**	0.382	95
13. La Canoyita*	4	12	2.4	2.1	0.750	0.619	-0.257	0.183	46
Promedio		16.38	3.27		0.714	0.568	-0.244		165

N= número de individuos, n=número de alelos, A= promedio de alelos por locus, Ae= promedio del número de alelos efectivos, Ho= Heterocigosis observada, He= Heterocigosis esperada, F= índice de endogamia, $\theta(4Nu)$ = valor de Theta a partir de MIGRATE, Ne= Tamaño efectivo. Valor de P (*= 0.01, **= 0.001 ***= 0.001).

El valor global del índice de endogamia fue alto, negativo ($F= -0.244$) y significativo, con un intervalo que va de -0.028 en la población SOL3 a -0.647 en MA5 (Cuadro 4).

En nueve de 13 poblaciones (excepto SOL3, MA5, CAR9 y CAN13) se presentó un exceso de heterocigos en todos los loci con diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$). El locus que más se desvió del equilibrio Hardy-Weinberg con valores negativos fue RPS84 ($P<0.000$), y las poblaciones que presentaron el mayor número de loci con diferencias significativas (cuatro de cinco loci) fueron ALB8, FRE7, CHI2 y JO4 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Índice de fijación para 13 poblaciones de *P. rzedowskii*, obtenido con base a una prueba de Fisher con 10000 permutaciones (MC) (Weir y Cockerham, 1984). Los campos con un guión (-) indican que no se logró hacer la estimación debido a la presencia de genotipos con los mismos alelos, o a la presencia de genotipos diferentes con una frecuencia baja (Rousset 2008).

LOCUS	POBLACIÓN												
	Dur1	Chi2	Sol3	Jo4	Ma5	Ag6	Fre7	Alb8	Car9	Vp10	PVA11	Hua12	Can13
RPS2	-0.428*	-	0.538	-0.49*	0.127	-0.440	-0.341	-0.433**	-	-0.375	-0.090	-	-0.333
RPS34b	-0.237	-	-1.00	-0.424*	0.250	-0.269	-0.229*	-0.074	-	-0.123	-0.138	-	0.000
RPS18	-	0.143**	-	0.436	0.318	-0.063	0.551***	0.346**	0.508	0.384	0.380	-0.062	-
RPS50	-	0.270	-1.00	-0.764**	-1.00	-	-0.146*	-0.009**	-	-1.00***	-0.475	-0.172	-
RPS84	-	-0.350*	-	-	0.117	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.324**	-	0.428	0.573***	1.00***	0.385***	0.385***	0.385***	0.507	0.659**	0.481*	-0.305*	-0.600

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

El promedio del tamaño efectivo (N_e) fue relativamente grande (164 individuos). El menor valor se presentó en la población CAN13 ($N_e= 46$) y el mayor valor en la población ALB8 ($N_e= 482$), seguido de la población FRE7 ($N_e= 395$). Los resultados sugieren que históricamente la especie no ha disminuido de manera importante el número de individuos que contribuyen a su reproducción.

3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA

El Análisis de Varianza Molecular entre y dentro de las poblaciones para cada locus indica que la mayor variación se encuentra dentro de las poblaciones. El locus que presentó un mayor porcentaje de variación dentro de las poblaciones (98 %) fue el RPS2, mientras que el locus con el menor porcentaje de variación fue RPS50 con un 87 %. El porcentaje de variación entre poblaciones va de 0.018 (RPS2) a 0.195 (RPS18) lo que refleja que las poblaciones de la especie son genéticamente muy parecidas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los cinco loci estudiados.

Locus	Entre poblaciones				Dentro de poblaciones				F_{ST}
	G.L.	S. C	Comp. de variación	% de variación	G.L.	S.C.	Comp. de variación	% de variación	
RPS2	13	6.303	0.005	1.884	422	128.517	0.304	98.115	0.018***
RPS34b	13	8.339	0.010	3.205	442	137.202	0.310	96.794	0.032***
RPS18	13	22.055	0.045	16.305	440	105.043	0.234	83.6944	0.163***
RPS50	13	21.831	0.04	19.515	440	84.236	0.191	80.484	0.195***
RPS84	13	11.623	0.017	4.765	442	151.330	0.342	95.234	0.047***

G.L.= Grados de libertad, S.C.= Suma de Cuadrados, ***valor de P al 0.0001.

De manera similar, el análisis con todos los loci refleja que la mayor proporción de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (94.1 %) y solo 5.9 % se encuentra entre las poblaciones (Cuadro 7). La diferenciación genética asumiendo el modelo de mutación de alelos infinitos (IAM) indica un valor bajo pero significativo ($F_{ST}= 0.065$; $p < 0.0001$), el cual fue relativamente más alto que el obtenido con el modelo de mutación por pasos (SMM) ($R_{ST}= 0.047$, $p < 0.0001$).

Cuadro 7. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las poblaciones de *Pinus rzedowskii*

Fuente de variación	Grados de Libertad	S.C.	Componentes de varianza	% de variación	(IAM)
Entre poblaciones	12	51.755	0.09719 Va	6.58	0.065 F_{ST}^{***}
Entre individuos dentro de poblaciones	215	224.302	-0.33692 Vb	-22.81	-0.244 F_{IS}
Dentro de individuos	228	391.500	1.71711 Vc	116.23	0.162 F_{IT}^{***}
Total	455	667.557	1.47738		

G.L.= Grados de libertad, S.C.= Suma de Cuadrados, F_{ST} = Diferenciación genética entre poblaciones asumiendo el modelo de mutación de alelos infinitos F_{IS} =Diferenciación genética entre individuos dentro de poblaciones F_{IT} = Diferenciación genética dentro de individuos, *** valor de P al 0.0001.

El análisis de BAPS formó cinco grupos genéticos, ilustrados en la figura 10. La formación de los grupos es de la siguiente manera: Las poblaciones Dur1, SOL3, FRE7 y J04 forman un grupo genético identificado por el color rosa. MA5 y PVA11 tienen el color verde, AG6, ALB8, CAR9 y VP10 están identificados por el color azul, en amarillo

las poblaciones HUA12 y CA13 y solo CHI2 está identificado con el color rojo. Esta aproximación nos indica que las poblaciones de la distribución norte son muy parecidas genéticamente a las poblaciones de la distribución centro y que en conjunto, éstas son diferentes de las más sureñas.

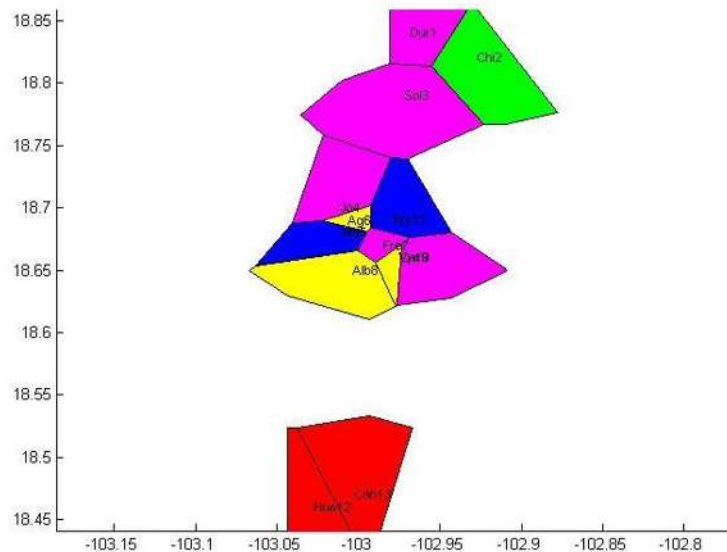


Figura 10. Agrupamiento del análisis bayesiano de acuerdo a distancias geográficas y genéticas de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

Para la tercera aproximación considerando la ancestría de cada población e individuo se formaron tres grupos genéticos identificados con color azul, verde y rojo (Fig. 11). Éste análisis reveló la proporción de pertenencia de los individuos dentro de una población a un grupo genético en particular y en general, se puede notar que no existe un patrón claro de estructura genética a pesar de la formación de tres grupos éstos se encuentran distribuidos de manera muy heterogénea dentro de las poblaciones además de que los tres grupos genéticos detectados están presentes en todas las poblaciones en proporciones muy similares.

De acuerdo al porcentaje de pertenencia a un grupo, el grupo K1 o verde predomina en las poblaciones DUR1, SOL3, J04, FRE7, CAR9 y HUA12; en el grupo K2

(azul) predominan las poblaciones CHI2, AG6, ALB8 y CAN13, mientras que en el grupo K3 (rojo) predomina en las poblaciones MA5, VP10y PVA11.

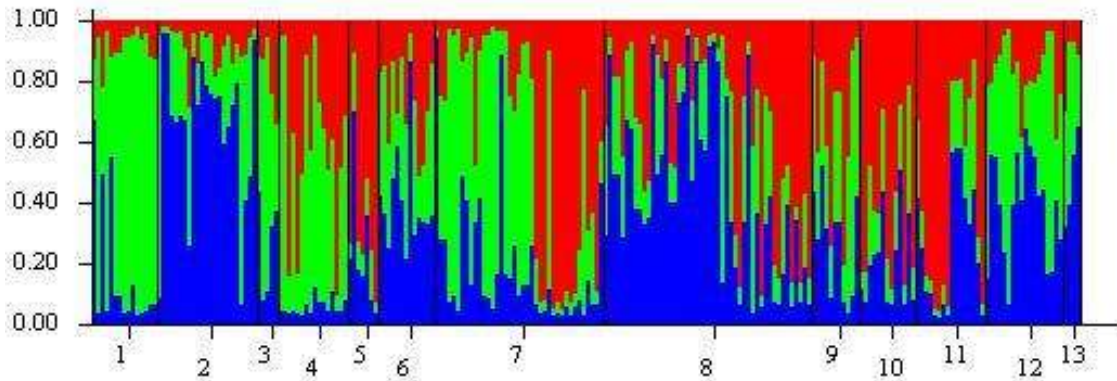


Figura 11. Pertenencia de las poblaciones de *Pinus rzedowskii* a cada grupo genético de acuerdo al software STRUCTURE.

3.3. PATRÓN DE FLUJO GENÉTICO

En cuanto a las distancias geográficas entre las poblaciones de la especie las más distantes están separadas por 42.2 km lineales, que son las poblaciones DUR1 y HUA12, mientras que las más cercanas son JO4 y MA5 separadas solo por 0.7 km lineales (Cuadro 8). Para todos los pares de poblaciones se estimaron niveles altos de flujo genético ($Nm > 2.0$). El mayor valor se presentó entre las poblaciones SOL3 y CAR9, y AG6 y 13CAN con valores infinitos, y el menor Nm entre 1DUR1 y PVA11 (2.554) (Cuadro 8).

No se presentó un patrón de aislamiento por distancia. El coeficiente de correlación fue bajo ($r = 0.022$) y no significativo ($P = 0.440$). Este resultado indica que para *P. rzedowskii* la distancia geográfica entre poblaciones no es el principal factor de diferenciación genética.

Cuadro 8. Matriz de distancias geográficas (km lineales; debajo de la diagonal) y flujo genético (Nm ; arriba de la diagonal), entre pares de poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

	Dur	Chi	Sol	Jo	Ma	Ag	Fre	Alb	Car	Vp	Va	Hua	Can
Dur	0	6.2	4.1	6.9	3.4	6.1	10.6	5.9	5.7	3.1	2.5	5.8	8.8
Chi	4.9	0	17.3	3.6	3.8	6.7	10.9	8.7	7.8	3.0	4.5	16.3	93.9
Sol	5.08	5.6	0	8.3	6.7	3.7	18.1	9	inf	5.1	22	38.5	14.7
Jo	16.1	16.1	11.3	0	15.5	3.7	16.8	6.3	23.1	9.9	5.3	3.2	3.8
Ma	16.5	16.3	11.6	0.7	0	3.8	15	13.6	61.1	23	38.2	3.5	3.5
Ag	17.5	17.4	12.6	1.7	1.2	0	12.1	11.1	7.6	4.2	3.2	5	inf
Fre	18.2	17.4	13.3	4	3.3	2.8	0	30.5	50	10.5	19.1	10.6	47.6
Alb	21	20.4	16.1	5.4	4.8	3.7	3.3	0	41.8	13.8	7.2	8.2	12.6
Car	21	19.7	16	6.9	6.2	5.4	3	3.2	0	30.9	12.7	7	7.7
Vp	19	18.1	14.4	5.4	4.7	4	1.5	3.4	1.8	0	5	3	3.1
Va	17	16	12.2	3.8	3.2	3.3	1.3	4.6	4.1	2.3	0	6.2	5.8
Hua	42.2	41.3	37.3	26.6	26.2	24.8	24.1	21.2	21.6	23.2	25.4	0	inf
Can	40.5	39.2	35.5	25	24.5	23.3	22.3	19.7	19.7	21.4	23.5	3.1	0

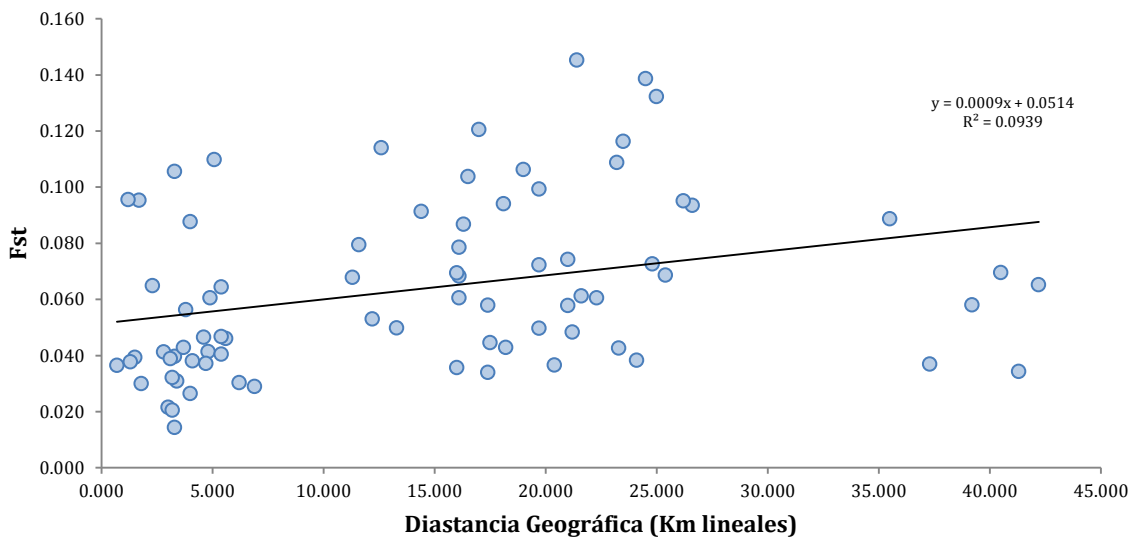


Figura 12. Representación gráfica del análisis de aislamiento por distancia entre pares de poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

Con el programa MIGRATE se obtuvieron tasas de migración entre todas las poblaciones que van de 0.254 unidades hasta 2.698 (Cuadro 9). La mayor tasa de migración se presenta entre las poblaciones de la zona centro como fue de FRE7 hacia JO4 (2.698), AG6 hacia PVA11 (2.273), así como entre poblaciones del centro y norte, como FRE7 hacia SOL3 y DUR1 (2.069 y 2.024 respectivamente), entre poblaciones del centro y sur AG6 hacia CAN13 (2.184) y entre las poblaciones del norte de CHI2

hacia SOL3 (2.64) y DUR1 (2.49). Por lo que la mayor tasa de migración ha sido entre las poblaciones de la zona centro y de estas hacia las poblaciones del norte o sur de la distribución de la especie (Fig. 13).

Cuadro 9. Estimación de la tasa efectiva de migración (M) entre poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

Pobl.	M+ (m/θ)												
	Dur	Chi	Sol	JO	Mag	Agu	Fre	Alb	Car	Vp	Var	Hua	Can
1Dur	-	1.123	1.283	1.003	0.722	0.241	0.321	0.602	0.602	0.682	0.521	1.404	0.521
2Chiq	2.490	-	2.642	0.762	0.457	0.356	0.762	1.067	0.966	1.372	0.254	0.762	0.762
3Sol	0.480	0.960	-	0.432	0.576	0.432	0.432	0.480	1.775	1.152	0.480	1.871	1.008
4JO	0.372	1.719	1.579	-	0.929	0.790	0.883	1.347	0.650	1.579	0.883	0.790	0.697
5Mag	1.250	0.573	0.521	1.042	-	0.781	0.729	0.417	1.563	1.094	1.250	0.729	1.302
6Agu	0.957	0.299	0.419	0.538	0.957	-	0.778	1.376	0.658	0.897	2.273	1.436	0.778
7Fre	2.024	0.854	2.069	2.698	1.034	0.944	-	1.259	1.709	1.214	1.439	0.360	2.563
8Alb	1.039	0.598	0.976	0.755	1.259	1.668	1.448	-	1.637	1.227	1.196	0.409	0.189
9Car	1.373	0.503	2.63	1.464	0.595	0.412	1.236	0.961	-	1.922	0.549	0.732	1.190
10VP	0.663	1.089	0.994	0.426	0.710	1.089	0.805	1.373	0.710	-	1.042	0.663	0.900
11Var	1.320	0.950	0.528	0.950	1.426	1.162	0.792	1.901	0.370	0.581	-	1.478	1.848
12Hua	0.720	0.576	1.680	0.336	0.480	0.624	0.768	0.864	1.056	1.152	1.488	-	1.248
13Cano	1.197	1.268	0.986	1.620	1.197	2.184	0.845	1.620	1.761	0.563	1.550	1.338	-

θ representa el tamaño de la población, M es la tasa de migración por generación. (+) Población receptora.

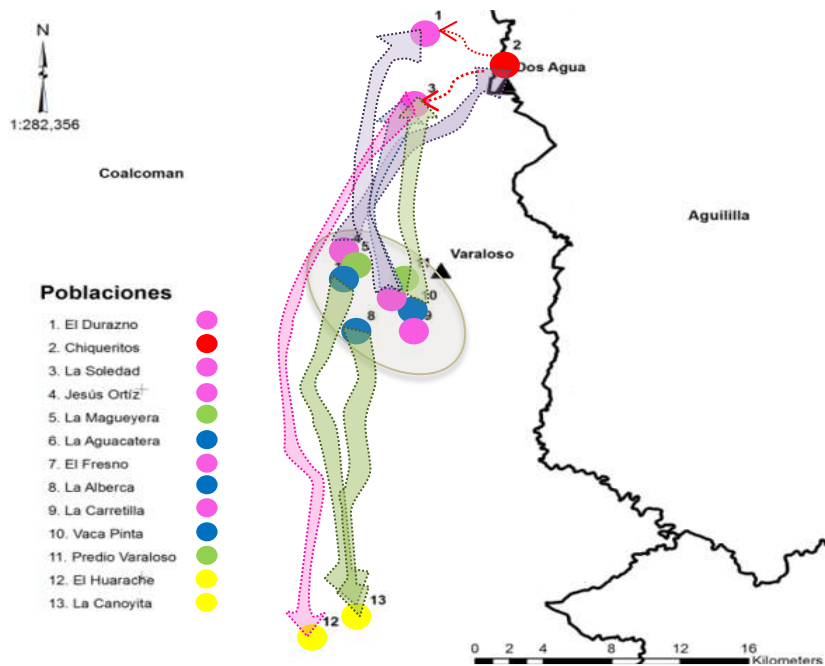


Figura 13. Representación de las tasas de migración con valores superiores a 1.8 entre las poblaciones de *P. rzedowskii*. Las flechas indican la dirección de la migración.

3.4. DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

Los resultados del análisis de Bottleneck con el modelo de mutación IAM y con las tres pruebas estadísticas presentaron para la mayoría de los loci valores de heterocigosis observada (H_E) menores que la heterocigosidad esperada bajo equilibrio mutación-deriva (H_{Eq}) (Tabla 4). Se obtuvieron valores significativos para siete poblaciones con el uso de la prueba Wilcoxon. Las otras dos pruebas; de signos y de diferencias estandarizadas, presentaron cinco y seis poblaciones con valores significativos de manera respectiva. Los loci con valores significativos para la mayoría de las poblaciones fueron el RPS50 y RPS84.

Cuadro 10. Resultados del análisis de Bottleneck realizado con cinco SSRn para las poblaciones de *P. rzedowskii*. Los números resaltados en negro indican los valores significativos ($P < 0.05$).

Pobl.	Prueba de signos			Prueba de diferencias estandarizadas			Prueba de Wilcoxon		
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM
1DUR	0.199	0.605	0.394	0.093	0.309	0.452	0.156	0.625	1.000
2CHI	0.032	0.246	0.256	0.004	0.032	0.062	0.031	0.062	0.093
3SOL	0.285	0.195	0.470	0.070	0.159	0.174	0.093	0.218	0.812
4JO	0.052	0.058	0.615	0.005	0.037	0.071	0.312	0.312	0.312
5MA	0.050	0.309	0.663	0.010	0.051	0.079	0.015	0.093	0.156
6AGU	0.202	0.557	0.442	0.071	0.221	0.327	0.156	0.218	1.000
7FRE	0.064	0.327	0.317	0.055	0.457	0.268	0.031	0.062	0.312
8ALB	0.059	0.099	0.010	0.094	0.303	0.062	0.031	0.062	0.312
9CAR	0.039	0.305	0.334	0.024	0.118	0.171	0.031	0.062	0.093
10VP	0.035	0.040	0.048	0.001	0.011	0.016	0.031	0.031	0.031
11PRE	0.032	0.050	0.593	0.002	0.027	0.044	0.031	0.031	0.156
12HUA	0.221	0.256	0.613	0.090	0.267	0.378	0.093	0.218	0.625
13CAN	0.595	0.581	0.518	0.474	0.384	0.335	1.00	1.00	0.875

El análisis de distorsión de las frecuencias alélicas (Shift) presentó cuatro clases de alelos con frecuencias alélicas medias (0.3-0.7), así como una frecuencia menor de 0.3 para ocho de 10 alelos en las siete poblaciones que presentaron valores significativos de presencia de cuellos de botella (CHI2, MA5, FRE7, ALB8, CAR9, VP10 Y PVA11). La población CAR9 contiene el mayor número de alelos dentro de la clase de alelos con frecuencias bajas menores a 0.3 (Fig. 14). Todas las poblaciones presentan espacios o gaps en donde no existen clases de frecuencias alélicas; la población CHI en las clases 4, 7, 9 y 10, MA5, ALB8 y CAR9 en las clases 8, 9 y 10, FRE7 en las clases 4, 9

y 10, y VP10 en 9 y 10, mientras que PRE7 los presenta en las clases 7, 8, 9 y 10. Los resultados indican que estas siete poblaciones han presentado evento de contracción recientes, con una disminución y pérdida de variantes alélicas.

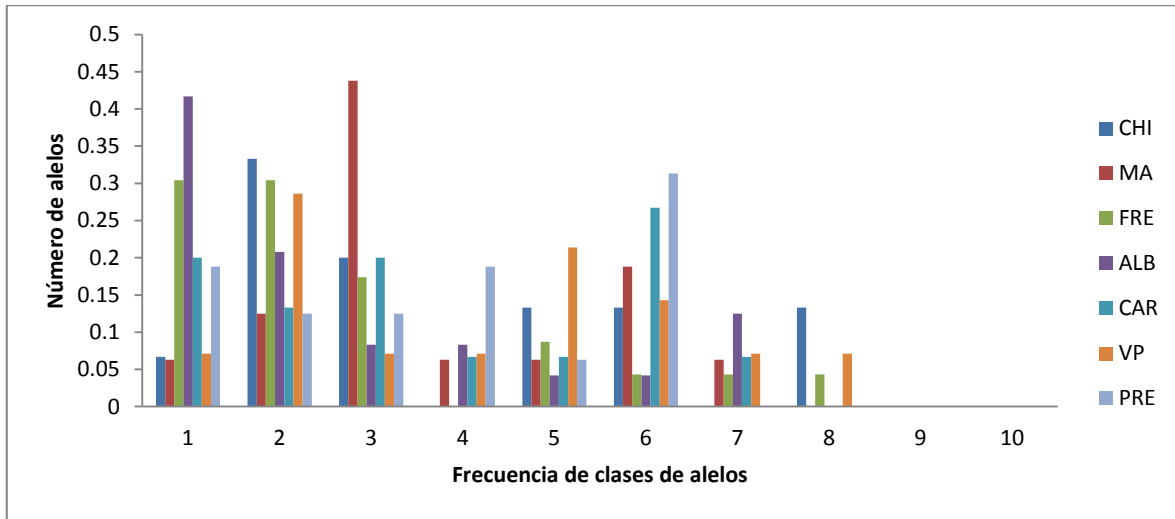


Figura 14. Frecuencias de la distribución de clases de alelos obtenidas con la prueba de Shift, para la detección de cuellos de botella (Luikart *et al.*, 1998), en siete poblaciones de *P. rzedowskii*.

Capítulo 4. Discusión

Variación genética

A pesar del carácter de especie restringida y en peligro de extinción, *Pinus rzedowskii* presenta niveles de variación genética altos (32 alelos en promedio, H_o de 0.714 y H_e de 0.568), los cuales se encuentran dentro del intervalo reportado para especies de pinos en general (Ledig *et al.*, 1999; Delgado y Piñero, 2002) y para especies de pinos de distribución restringida con el uso de diferentes tipos de marcadores moleculares (ver Cuadro 11). El valor de H_e es superior al reportado por Delgado *et al.* (1999) para la misma especie con el uso de 14 isoenzimas ($H_e= 0.219$). Esto se debe comúnmente a que los SSRn detectan una mayor cantidad de polimorfismos y tienen una mayor resolución al proporcionar información directa de la variabilidad que existe en el ADN (Shaal *et al.*, 1991; Avise 1994).

También a diferencia del estudio mencionado, donde la heterocigosis observada fue menor a la esperada, en el presente trabajo la heterocigosis observada ($H_o= 0.714$) es superior a la esperada ($H_e= 0.568$), donde todos los loci se desvían significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg ($P<0.05$) para la mayoría de las poblaciones (excepto en la MA5, CAR9 y CAN13). Estos resultados sugieren que en *P. rzedowskii* la variación genética es mayor a la que teóricamente se esperaría si los apareamientos fueran al azar (Hartl y Clark, 1989).

Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en especies con sistemas de entrecruzamiento como las coníferas y en particular para especies de *Pinus* (Strauss 1986; Rajora *et al.*, 1997; Ledig *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2002; Kamal *et al.*, 2007; Cabrera-Toledo *et al.*, 2008; Cruz-Nicolás *et al.*, 2011). Un ejemplo interesante es el estudio realizado por Moreno (2002) con el uso de tres microsatélites nucleares (SSRn) en *P. maximartinezii*, una especie de pino de distribución restringida y en peligro de extinción. Se obtuvo un valor promedio superior de heterocigosis observada a la esperada en dos de los tres loci que usó, PtTX3013 ($H_o= 0.342$ y $H_e= 0.302$) y RPS34b ($H_o= 0.600$ y $H_e 0.462$), y para este último locus las diferencias fueron significativas ($P= 0.006$). El SSRn RPS34b, también se usó en el presente estudio, por tanto el patrón se repite, donde la H_e (0.781) fue mayor a la

H_o (0.591) y los valores fueron significativos para cuatro poblaciones (ver Cuadro 5). Moreno (2002) sugiere que para *P. maximartinezii* probablemente se presenten procesos de depresión por endogamia, donde la selección actúa en contra de los genotipos homocigos (Williams *et al.*, 2000). Para *Pseudotsuga menziesii* también se obtuvieron resultados similares con el uso de 15 loci isoenzimáticos, se encontraron valores bajos de heterocigosis observada y esperada, y un índice de endogamia negativo y significativo ($F_{IS} = -0.068$), sugiriendo nuevamente al efecto de la depresión por endogamia como el principal factor (Cruz-Nicolás *et al.*, 2011).

Cuadro 11. Comparación de diferentes marcadores (isoenzimas, microsatélites de cloroplasto (SSRcp) y microsatélites nucleares (SSRn) para especies de pinos

Marcador	H_E	F_{ST}	Referencia
Isoenzimas			
<i>P. resinosa</i>	0	-	Walter y Epperson 2005
<i>P. pinceana</i>	0.374	0.247	Molina-Freaner et al. 2001
<i>P. ayacahuite var. Strobiformis</i>	0.154	0.08	Matheson et al 1989
<i>P. ayacahuite</i>	0.154	0.22	Matheson et al 1989
<i>P. strobus</i>	0.195	0.059	Rajora et al (1998)
<i>P. rzedowskii</i>	0.220	0.175	Delgado et al 1999
<i>P. pinceana</i>	0.174	0.152	Ledig et al 2001
<i>P. maximartinezii</i>	0.137	-	Delgado, 2002
<i>P. maximartinezii</i>	0.122	-	Ledig et al 1999
<i>P. culminicola</i>	0.389	0.075	Martínez 2001
<i>P. johannis</i>	0.245	0.062	García et al 2014
SSRcp			
<i>P. resinosa</i>	0.120	0.560	Boys et al 2005
<i>P. pinceana</i>	0.827	-	Escalante 2001
<i>P. pinceana</i>	0.521	0.930	Cuenca 2001
<i>P. nelsonii</i>	0.264	0.047	Cuenca et al 2003
<i>P. rzedowskii</i>	0.166	0.054	Delgado et al 1999
<i>P. maximartinezii</i>	0	-	Delgado y Piñero 2002
<i>P. johaniis</i>	0.271	0.213	Delgado et al 2015
<i>P. culminicola</i>	0.164	0.202	Delgado et al 2015
SSRn			
<i>P. resinosa</i>	0.510	0.320	Boys et al. (2005)
<i>P. ayacahuite var. Veitchii</i>	0.709	0.336	López. (2012)
<i>P. nelsonii</i>	0.073	0.046	Rentería. (2002)
<i>P. maximartinezii</i>	0.269	0.215	Moreno. (2002)
<i>P. strobus</i>	0.635	0.083	Vicram et al (2014)
<i>P. strobus</i>	0.531	0.033	Mandák et al (2013)
<i>P. cembra</i>	0.537	0.052	Dzialuk et al. (2014)
<i>P. culminicola</i>	0.516	0.207	Delgado et al. (2015)
<i>P. johannis</i>	0.489	0.127	Delgado et al. (2015)
<i>P. rzedowskii</i>	0.568	0.058	Este estudio

En el caso de *P. rzedowskii*, con un status demográfico similar a las especies mencionadas de distribución restringida y con tamaños poblacionales reducidos, el exceso de heterocigos encontrados permite sugerir la existencia de depresión por endogamia, donde la selección podría estar actuando en contra de alelos deletéreos (purga alélica) y por ello verse favorecidos los genotipos heterocigos.

Como se reportó en el apartado de resultados el índice de endogamia fue alto y negativo ($F_{IS} = -0.244$), donde el efecto de la endogamia y de la deriva genética no son muy fuertes, indicando un efecto importante de la selección en la historia evolutiva de esta especie. Los microsatélites usados no detectaron un número alto de genotipos homocigos y por tanto valores altos de endogamia, como los obtenidos con isoenzimas ($F_{IS} = 0.405$; Delgado *et al.*, 1999), al contrario, se presentaron valores significativos de exceso de heterocigos. Estos resultados permiten suponer que por sobrevivencia, *P. rzedowskii* probablemente está generando una fuerte depresión endogámica, donde la selección actúa a favor del heterocigo para el mantenimiento de la variabilidad genética.

La depresión endogámica ha sido estudiada por décadas pero hasta la fecha no existe un consenso sobre los mecanismos genéticos de este fenómeno. La depresión endogámica es manifestada como una depresión o disminución en la adecuación de los individuos con una menor tasa de crecimiento, viabilidad, estabilidad del desarrollo, fecundidad y fertilidad (Charlesworth, 1987; Mitton, 1993). Cuando este proceso se presenta la selección puede actuar purgando los alelos deletéreos que se manifiestan en los genotipos homocigos, donde los genotipos heterocigos (que podrían contener un alelo recesivo deletéreo) son los que sobreviven en las siguientes generaciones. La depresión por endogamia y la homocigosis disminuyen al paso del tiempo, donde teóricamente se espera una mayor heterocigosis en el estado adulto que en juveniles, plántulas y/o semillas (Mitton, 1993; Ritland, 1990).

Sin embargo, para poder probar esta hipótesis es necesario usar un mayor número de loci, para que se pueda detectar una asociación entre los niveles de heterocigosis y la adecuación de los individuos (mayor a 10 SSRn; Beaumont y Nichols, 1996; Excoffier *et al.*, 2009). Asimismo, realizar estudios de paternidad y de entrecruzamiento con muestras de individuos de diferentes estadios del ciclo de vida

(e. g., semillas, plántulas, juveniles y adultos), para probar si la presencia de individuos heterocigos aumenta en las diferentes categorías del ciclo de vida como se ha observado en varias especies de plantas, como es el caso de las coníferas (Eguiarte *et al.*, 1992; Morgante *et al.*, 1991; Ledig *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2002; Cabrera-Toledo *et al.*, 2008; Cruz-Nicolás *et al.*, 2011).

No obstante a ello, podemos considerar que la baja densidad de las poblaciones, los tamaños pequeños y su aislamiento geográfico, podrían estar influyendo en la reproducción de esta especie, donde probablemente existen pocos individuos reproductivos. Los tamaños efectivos (N_e) estimados fueron relativamente grandes (46 a 482), dado que la estimación indirecta que se usó se basa precisamente en la estimación de Theta ($N_e = \theta/4N\mu$) a partir de los datos obtenidos, lo que refleja mayormente a los individuos heterocigos resultado probablemente de la selección en contra del homocigo, y no considera a los individuos homocigos presentes antes de su acción (e. g., en las semillas o plántulas), por lo que la estimación del N_e genera valores aparentemente grandes. Estos resultados también pueden sustentar la hipótesis de depresión por endogamia, donde la selección en contra del homocigo hace que existan más genotipos heterocigos y estos incrementen los tamaños efectivos. Esto es, en otras palabras, que aunque existan pocos individuos reproductivos, su progenie con genotipos heterocigos son los que están subsistiendo en las siguientes generaciones.

El trabajo realizado por Castilleja (2015), sobre producción de semillas para los individuos de *P. rzedwzkii* estudiados en este trabajo pero que presentaron conos (solo 21 árboles), obtiene un índice de endogamia de 0.79 (valores del índice cercanos a 1.0 indican valores altos de endogamia), una eficiencia de semillas sumamente baja (18.25%) con 81.4% de semillas vacías y germinación del 5% (18 plántulas), demostrando que esta especie presenta niveles de depresión endogámica importantes en las etapas de semilla y plántula. También para *P. maximartinezii*, Moreno (2002) observó una alta cantidad de semillas vanas (con el embrión completamente destruido o con semillas vacías) y en *P. mensiezii*, la alta proporción de semillas vacías observadas fue parcialmente atribuido al aborto de óvulos asociado a la autopolinización en las poblaciones de menor tamaño (Mapula-Larreta *et al.*, 2007).

Este tipo de resultados permiten sugerir un patrón de adaptación de varias especies de coníferas mexicanas con distribución restringida, donde el efecto de la depresión por endogamia acciona los procesos de selección temprana como una estrategia de sobrevivencia y que en *P. rzedowskii* podría explicar parcialmente los altos niveles de variación genética observados.

Diferenciación genética y flujo genético

La diferenciación genética en *P. rzedowskii* no fue marcada como la obtenida por Delgado et al. (1999) con el uso de isoenzimas ($F_{ST}= 0.175$), pero fue significativa ($F_{ST}= 0.065$, $P < 0.0001$). Los valores se encuentran dentro del intervalo obtenido para especies de coníferas con el uso de isoenzimas ($F_{ST} = 0.127$) y microsatélites ($F_{ST} = 0.087$) (Delgado y Piñero, 2008). Sin embargo son de los valores más bajos que se han obtenido con el uso de SSRn, como en *P. nelsonii* y *P. strobus* (ver cuadro 11).

De las dos aproximaciones que se usaron para inferir grupos genéticos de poblaciones asociadas a la distribución geográfica (Structure y BAPS), el análisis de BAPS presenta un patrón más claro; dos grupos forman parte de la zona norte de la distribución de la especie, la zona centro con tres grupos genéticos compartiendo uno de los grupos con la zona norte y la zona sur con un grupo completamente diferenciado. Esto es, las poblaciones de la distribución norte son más parecidas genéticamente a las poblaciones de la distribución centro, y ambos grupos son diferentes del grupo conformado por las dos poblaciones más sureñas.

Este agrupamiento es muy heterogéneo para las poblaciones de las zonas norte y centro, algunas poblaciones más cercanas son similares genéticamente (DUR1 y SOL3 o FRE7 vs PVA11) y otras no (CHI2 vs DUR1 y SOL3) y viceversa, poblaciones que son alejadas geográficamente son genéticamente similares (DUR1 vs CAR9 o FRE7). En las poblaciones que se encuentran cerca pero que son diferentes genéticamente las condiciones topográficas podrían estar actuando como barreras naturales de flujo genético (Delgado *et al.*, 1999). Por ejemplo la población CHI2 y DUR1 de la zona norte, pertenecen a dos grupos genéticos diferentes, y aunque se encuentren distribuidas muy cerca existen barreras físicas como son acantilados que pueden estar limitando el flujo genético entre ellas.

Otro factor que puede influir en la diferenciación de estas poblaciones puede ser la escasa presencia de individuos reproductivos, por ejemplo en la población CHI2, solo se observó la presencia de 10 árboles adultos (entre 30-60 años), los demás árboles son juveniles (<15 años) y solo se observaron dos árboles con presencia de conos (40 y 60 años). Por tanto, la producción de polen podría provenir de pocos individuos, generando una diferenciación genética entre esta población con relación a otras poblaciones cercanas. Delgado *et al.* 1999, reporta solo 35 árboles con producción de conos para el año 1995 para las zonas norte y centro, y Castilleja (2015), 21 árboles para las tres zonas, lo cual soporta la idea de que para esta especie son pocos los árboles que contribuyen a su reproducción.

Para el caso en donde existe una similitud genética entre poblaciones alejadas geográficamente, como FRE7 del centro con SOL3 y DUR1 de la zona norte, los niveles de flujo genético son altos, donde el mayor Nm se presenta entre las poblaciones de la zona centro-norte como CAR9 y SOL3, y centro-sur como AG6 y CAN13, ambos con valores infinitos de Nm (Cuadro 8). Dada esta heterogeneidad en los niveles de Nm entre poblaciones cercanas o alejadas geográficamente, no se presentó un patrón de aislamiento por distancia significativo. Particularmente, debido a los niveles altos de Nm que se estimaron entre dos de las poblaciones de la zona norte (SOL3 y DUR1) con la población FRE7 de la zona centro y entre la población SOL3 de la zona norte con la población HUA12 de la zona sur. En general y aunque el Nm es muy heterogéneo, existe un intercambio mayor a 1.5, por lo que la diferenciación genética no es muy fuerte. Las tasas efectivas de migración más altas se presentaron entre las poblaciones de la zona centro y de estas poblaciones hacia las de las zonas norte y/o sur. Sin embargo, también fue muy heterogénea con valores bajos (0.254 entre CHI2 y PVA11), hasta muy altos (2.698 entre FRE7 y JO4).

En el estudio realizado por Delgado *et al.* (1999) con isoenzimas para la especie, también encontraron similitudes genéticas entre poblaciones alejadas geográficamente, y/o diferencias genéticas entre poblaciones cercanas. Por ejemplo, la población CHI2 al igual que en este estudio, presentó una mayor similitud con las poblaciones centrales como FRE7, indicando por tanto un mayor Nm entre ellas, que con la población SOL3 distribuida en la misma zona norte. Este resultado fue

corroborado en el presente estudio, donde una de las tasas de migración más altas se presentó de la población FRE7 hacia CHI3 (ver Cuadro 9 y Fig. 13).

Las causas más probables de esta heterogeneidad tienen que ver con las condiciones ecológicas y ambientales de los sitios (históricos y actuales) como son eventos geológicos, incendios y deforestación, que aíslan a las poblaciones, disminuyen su densidad, e impiden el flujo genético entre ellas. Durante las exploraciones fue posible observar disturbios como tala, huellas de incendios forestales y cambio de uso de suelo, (e. g., en la poblaciones SOL3, MAG5 y CAN13). Por lo que otro factor importante en el aislamiento de las poblaciones pueden ser los incendios, que disminuyen la posibilidad de incrementar el número de individuos tanto de plántulas como juveniles e individuos reproductivos (Perry 1991).

Por otro lado, para esta especie se ha sugerido que existe una asincronía floral, que podría estar influyendo en los sistemas reproductivos, donde la especie presente largos periodos de reproducción por alguna de las dos vías, ya sea por autofecundación o por fecundación cruzada, y que promueva en un tiempo determinado el aumento o disminución de la variación genética de las poblaciones (Delgado, 1997). La asincronía floral, podría estar afectando la cantidad de individuos que producen estructuras reproductivas, los cuales parecen ser muy escasos o la producción o liberación de polen en épocas en donde los estróbilos femeninos no se encuentran receptivos. No se ha observado durante varios años un número importante de individuos reproductivos (e. g., > 100), ni un año semillero (Sapián com. pers. 1997; Moreno, com. pers. 2013). Además los pocos árboles reproductivos que se han registrado (21 a 35) han presentado una producción escasa de conos femeninos (< a 100 conos/ árbol) (Perry, 1991; Delgado, 1997; Castilleja, 2015). Por tanto, se puede considerar que para esta especie el comportamiento reproductivo podría ser un factor importante que ha influido en la variación y estructura genética observada.

Demografía histórica

La presencia de cuellos de botella para siete de 13 poblaciones, sugieren que han disminuido su tamaño efectivo recientemente, por lo que aún conservan variantes

genéticas y niveles adecuados de variabilidad genética de manera diferencial, con pérdida de alelos en algunas poblaciones o con frecuencias bajas, pero conservando el acervo genético de la especie (ver Fig. 14). Interesantemente, la mayoría de las poblaciones que presentan un tamaño censal y N_e menor son las que presentaron valores significativos de contracción de sus poblaciones (< 0.02 ; e. g., CHI3, CAR9 y VP10). Mientras que para las poblaciones más grandes los valores no fueron significativos (e. g., ALB y HUA), las cuales podrían encontrarse en proceso de expansión (Delgado *et al.*, 1999, 2002).

Aunque estos resultados deben tomarse con cuidado, dado que es recomendable hacer este tipo de análisis con un mayor número de loci (por lo menos 10 loci; Cornuet y Luikart, 1996; Luikart *et al.*, 1998), es plausible considerar una posible hipótesis evolutiva, donde probablemente *P. rzedowskii* está experimentando una dinámica metapoblacional muy compleja, influenciada por los sistemas reproductivos, por las diferencias en la densidad y tamaño de sus poblaciones y por el grado de aislamiento geográfico, topográfico y ambiental que presentan (e. g., restringidas a sitios rocosos, con suelos calizos y poco desarrollados).

Finalmente, los resultados de este trabajo apoyan uno de los dos escenarios evolutivos sugeridos para la especie por Delgado *et al.* (1999), donde plantean que *P. rzedowskii*, en el pasado pudo estar representado por una gran población central la cual se fragmentó en varios parches debido a eventos geológicos que sucedieron en el pasado, probablemente durante el Pleistoceno (Millar, 1998). Esta época tuvo la mayor influencia para la diversificación de muchas especies de plantas en México, lo que se ha corroborado para diferentes especies de coníferas (Axelrod, 1986; Farjon y Styles 1997; Gernandt, 2005, 2013; Gernandt y Pérez de la Rosa, 2014).

Recomendaciones para la conservación

Con el panorama obtenido en este estudio sobresalen algunas consideraciones puntuales que deben de contemplarse para su conservación:

Poner énfasis en conservar la variación genética y tamaño censal de las poblaciones grandes como 7ALB y 12HUA ya que presentan valores de variabilidad genética altos, además de que aparentemente no presentan cuellos de botella

recientes. Para éste fin, en vista de que la producción de conos y semillas y el porcentaje de germinación de estas es tan bajo (Castilleja 2015), podría considerarse la aplicación de métodos reproductivos como el cultivo *in vitro* y de ser exitoso entonces repoblar las zonas de crecimiento natural de la especie empezando por las poblaciones que presentan valores significativos para los cuellos de botella y en las que no se presenta regeneración.

Un punto más a tomar en cuenta es establecer plantaciones de la especie con fines de huerto semillero a partir de material de las poblaciones genotípica y fenotípicamente mejor conformadas, que permita a largo plazo mantener e incrementar el tamaño de las poblaciones sin afectar de manera negativa el acervo genético.

Capítulo 5. Conclusiones

Los microsatelites utilizados resultaron adecuados para el análisis de la diversidad genética de *Pinus rzedowskii*, sin embargo es necesario aumentar el número de éstos para corroborar los resultados y determinar de manera más fina la variación genética.

A pesar de las condiciones de fragmentación, aislamiento y tamaño pequeño de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*, la especie presenta una variación genética alta, que podría no corresponder a una riqueza genética sino más bien al efecto que está ocasionando un proceso de selección de caracteres que favorecen su adaptación y supervivencia.

Al evaluar el grado de estructuración genética de las poblaciones se observa la formación de tres grupos genéticos que geográficamente no corresponden a un patrón de distribución de las poblaciones, sino que deja claro que la especie no se ha diversificado genéticamente a pesar de la fragmentación que presentan sus poblaciones, apoyando la hipótesis de Delgado (1997) que anteriormente era una población grande que se fragmentó por eventos naturales.

Los resultados del análisis de cuellos de botella revela la existencia de éstos para el caso de las poblaciones con tamaños censales pequeños.

Es muy importante encontrar opciones de manejo adecuado para la especie y repoblar las zonas de distribución natural. Una de las sugerencias es la propagación *in vitro* ya que estudios realizados en la especie han demostrado que el porcentaje de germinación y sobrevivencia de la especie es muy baja.

Literatura Citada

- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York. 511 p.
- Axelrod, D. I. 1986. Cenozoic history of some western American pines. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 73:565-641.
- Beaumont, M. A. 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics* 153, 2013-2029.
- Beaumont, M. A. y Nichols, R. A. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263, 1619-1626.
- Berli, P. 2006. Comparison of Bayesian and maximum likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, 22, 341-345.
- Berli, P., 2008. MIGRATE documentation (version 3.0). Technical Report. <http://popgen.sc.fsu.edu>.
- Boys J., M. Cherry y D. Selvadurai. 2005. Microsatellite analysis genetically distinct populations of red pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *American Journal of Botany* 92:833-841.
- Cabrera-Toledo, D., J. González-Astorga y A. P. Vovides. 2008. Heterozygote excess in ancient populations of the critically endangered *Dioon caputoi* (Zamiaceae, Cycadales) from central Mexico. *Botanical Journal of the Linnean*.
- Casilleja, S. P. 2015. Éxito reproductivo y comportamiento de progenies en dos especies de pino endémicas de México: *Pinus rzedowskii* y *Pinus ayacahuite* var. *veichii*. Programa Institucional de Maestría en Ciencia Bológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de Maestría. 94 pp.
- Chapuis, M.P., Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24:621-631.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu Rev Ecol Syst* 18:237-268.
- Charlesworth, D., y Charlesworth, B. 1995. Quantitative genetics in plants: the effect of the breeding system on genetic variability. *Evolution* 49(5): 911-920.
- Clegg M. T., A. H. D. Brown y P.R. Whitfeld. 1984. Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: implications for genetic conservation. *Genet. Res.* In press.
- Corander, J., Waldmann, P. y M. J. Sillanpää. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163: 367-374.
- Cornuet, J. M. y G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two test for detecting

- recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Cruz-Nicolás, Jorge, Vargas-Hernández, J. Jesús, Ramírez-Vallejo, Porfirio, y López-Upton, Javier. (2011). Genetic diversity and differentiation of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco populations in México. *Revista fitotecnia mexicana*, 34(4), 233-240.
- Cuenca A. 2001. Variación y estructura genética de una especie de pino endémica de México (*Pinus nelsonii* Shaw.). Bachelor in Science Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. 99 pp.
- Cuenca A., A.E. Escalante y D. Piñero. 2003. Long distance colonization, isolation by distancia, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSR). *Molecular Ecology* 12:2087-2097.
- Delgado P., D. Piñero., A. Chaos., N. Perez y E. Alvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 86: 669-676.
- Delgado, V. P., A. Cuenca, A. E. Escalante, F. Molina-Freaner y D. Piñero. 2002. Estructura genética de pinos: consecuencias evolutivas y para la conservación. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 27-37.
- Delgado, V. P. 1997. Estructura genética y demográfica de una especie del género *Pinus* (*Pinus rzedowskii*) endémica de Michoacán, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Delgado, V. P. y D. Piñero. 2008. Marcadores moleculares, variación genética y filogeografía en árboles forestales. *Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México*. 15:1-19.
- Delgado, V. P., Piñero D., Rentería M., Moreno A., Jardón L. y Rebolledo V. 2010. Uso de microsatélites de cloroplasto y nucleares para estudios de diversidad genética en pinos: protocolos y métodos de análisis. Editores, Patricia Delgado y Daniel Piñero. Fondo Editorial Morevallado SRL de CV. ISBN: 9786077687405.
- Delgado, V. P., Piñero D, Jardón L. y F. Chi-May. 2011. Genetic variation and demographic contraction of the remnant populations of Mexican Caribbean pine (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*: Pinaceae). *Annals of Forest Science*. 68: 121-128.
- Delgado, V.P., Rebolledo, V. García, J. Flores, C. Piñero, D. Vázquez, L.A. 2015. Aproximación molecular para la evaluación genética de áreas productoras de semillas y de conservación en especies del género *Pinus*. Informe Técnico; CONAFOR-CO1-176167.

- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC. y Valdes AM. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 3166-3170.
- Dzialuk A, Chybicki I, Gout R, Mączka T, Fleischer P, Konrad H, Curtu AL, Sofletea N. y Valadon A. 2014. No reduction in genetic diversity of Swiss stone pine (*Pinus cembra* L.) in Tatra Mountains despite high fragmentation and small population size. *Conserv Genet.* doi: 10.1007/s10592-014-0628-6
- Echt, C. S., P, May Marquardt, M. Hseih, y R. Zahorchak. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 39: 1102-1108.
- Eguiarte. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm, en los Tuxtlas, Veracruz. Tesis Doctoral. Centro de Ecología UNAM. México D.F. 190pp.
- Eguiarte, L., Pérez Nasser, N. y Piñero, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): Implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- Eguiarte, L. E., F. J. Nunez, C. A. Dominguez y C. Cordero. 1999. Biología evolutiva de la reproducción de las plantas. En: J. Nunez Farfan y L. E. Eguiarte [comp.]. *La evolucion biologica*. UNAM, Conabio, Mexico.
- Eguiarte F. L. y Piñero D. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias* No. Especial 4: 34-47.
- Eguiluz, P. T. 1985. Descripción botánica de los pinos mexicanos. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 45p
- Elsik C. G. V. T. Minihan, S. E. Hall, A. M. Scarpa y C. G. Williams. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43: 550-555.
- Excoffier, L. Laval G. y Schneider S. 2005. Arlequin, ver 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47-50.
- Excoffier, L., T. Hofer y M. Foll. 2009. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity* 103: 285-298.
- Escalante A. E. 2001. Estructura genética de poblaciones de *Pinus pinceana* G. Gordon & Glendinning usando como marcadores moleculares microsátélites de cloroplasto (cpSSR's). Bachelor in Sciences Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. 95 pp.
- Escudero, A., Iriando J. M. y Torres M. E. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool plant conservation. *Biol conserve*. 113, 351-365.
- Evanno G., Regnault S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using

- the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Falush D., Stephens M. y Pritchard J. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 164, 1567–1587.
- Farjon, A. F. y B. T. Styles. 1997. *Flora Neotropica, Pinus (Pinaceae)*. The New York Botanical Garden. Nueva York.
- Franklin I. R. 1980. Evolutionary changes in small populations. Pp. 135-150.
- Freeland, J. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley y Sons, Ltd. Engand. 388 p.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates. Sunderland Mass. P.p. 763.
- García G. V., C.Ramirez H., C. Flores L. y J. López U. 2014. Diversidad y estructura genética de *Pinus johannis*. *Agrociencia*, 48(8): 863-873.
- Garza J. C. y Williamson E. G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10(2):305–318
- Gernandt D. S., Geada L. G. y Ortiz G.S. Liston A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54: 29-42.
- Gernandt, D.S. y J.A. Pérez de laRosa. 2014. Biodiversidadde Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 126-133.
- Gilpin, M.E. & Soulé, M.E. 1986. Minimum viable populations: processes of species extinctions. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity* (ed. by M.E. Soulé), pp. 19–34. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hartl D. L. y Clark. 1989. *Principles of Populations Genetics*. 2do Sinauer Associates, Inc., Sunderland, M.A.
- Hedrick P. W. 1983. *Genetics of populations*. Van Nostrand Reinhold Co., Nueva York.
- Hernández-León S, Gernandt D. S., Pérez de la Rosa J.A. y Jardón-Barbolla L. 2013. Phylogenetic Relationships and Species Delimitation in *Pinus* Section *Trifoliae* Inferred from Plastid DNA. *PLoS ONE* 8(7): e70501. doi:10.1371/journal.pone.0070501
- Hewitt G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247–276.
- Jarne, P. y P. J. L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11:424–429.
- Karhu A, Vogl C, Moran G.F., Bell J.C. y Savolainen O. 2005. Analysis of microsatellite variation in *Pinus radiata* reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks. *J Evol Biol* 19:167-175.

- Keller L. F. y D. M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*. 17:230-241.
- Kimura, M. y Ohta. 1978. *Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 75 (6):2868-2872.
- Lande R. 1993. Risk of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *Am Nat* 142:911-927.
- Lande R. y D. W. Shemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39:24-40.
- Ledig, F. T., J. J. Vargas-Hernández y K. H. Johnsen. 1998. *The Conservation of Forest Genetic Resources, Case Histories from Canada, Mexico and The United States*. *Journal of Forestry*, 96 (1):31-41.
- Ledig, F. T., M. T. Conkle, B. Bermejo, T. Eguiluz, P. Hodgskiss, D. R. Johnson, y W. S. Dvorak. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53(1): 91-99.
- Ledig, F. T., M. A. Capó-Arteaga, P. D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. T. Conkle, y B. Bermejo-Velázquez. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* 88: 1977-1987.
- Liston, A., Robinson, W. A., Piñero, D. y Alvarez-Buylla, E. R. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molec. Phyl. Evol.* 11: 95-109.
- López L. F. 2012. Diversidad genética y análisis de paternidad de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw, nativa de La Palma, Municipio de Los Reyes Michoacán. Tesis de Licenciatura. UMSNH.
- Luikart G., Allendorf F. W., Cornuet J. M. y Sherwin W. B. 1998. Distortion of allele frequency distribution provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89: 238-247.
- Madrigal S. X. 1986. Claves para la identificación de las coníferas silvestres del estado de Michoacán. Escuela de Biología, UMSNH. México. Pag. 101.
- Mápula-Larreta M, J López-Upton, J J Vargas-Hernández y A Hernández-Livera. 2007. Reproductive indicators in natural populations of Douglas-Fir in Mexico. *Biodiv. Conserv.* 16:727-742.

- Mathenson, A. C., J. C. Bell y R. D. Barnes. 1989. Breeding systems and genetic structure in some Central American pine populations. *Silvae Genetica* 38: 107-113.
- Maruyama, T. y P. A. Fuerst. 1985. Populations bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population derived from a large steady-state population by means of a bottleneck. *Genetics* 111: 675-689
- Martínez, N. 2001. Variabilidad izoenzimática en especies de distribución restringida: *Pinus culminicola* y *P. greggii*. XV Congreso Mexicano de Botánica, Querétaro, México
- Millar, C. I., S. H. Strauss, M. T. Conkle y R. D. Westfall. 1998. Allozyme differentiation and biosystematics of the Californian closed-cone pines (*Pinus* subsect. *Oocarpae*). *Syst. Bot.* 13: 351-370.
- Mitton, J. B. 1983. Conifers en: Isozymes in Plant Genetics and Breeding. En: D. Tanksley and T. J. Orton (eds). Elsevier, Amsterdam. 443-472 pp.
- Molina-Freaner, F., P. Delgado, D. Piñero, N. Perez-Nasser, and E. Alvarez-Buylla. 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Can. J. Bot.* 79: 131-138.
- Moreno L. A. 2002. Sistema de apareamiento y variación genética en *Pinus maximartinezii* Rzedowzkii. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Moreno, L. A. y P. D. Daniel. 2008. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. Across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)*.
- Morgante, M., G. G. Vendramin y A. M. Olivieri. 1991. Mating system analysis in *Pinus leucodermis* Ant.: detection of self-fertilization in natural populations. *Heredity* 67:197-203.
- NOM-59-ECOL-2001. Diario Oficial de la Federación.
- Newton A. C., Alnutt T.R. Dvorak W.S. Del Castillo R. F. y Ennos R. A. 2002. Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity* 89: 191-198.
- Nuez, F. y J. M. Carrillo. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. 321 p.
- Pautasso, M. 2009. Geographical genetics and the conservation of forest trees. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 11, 157-189.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2001. Genalex 5, Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia.

- Perry, J. L. 1991. The pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland.
- Petit R. J., Hampe A. y Cheddadi R. 2005. Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean. *TAXON* 54, 877-885.
- Perry, J. P. Jr., A. Graham y M. D. Richardson. 1998. The history of pines in México and Central America. *In*: M. D. Richardson (ed). Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp: 137-149.
- Piñero, D. y otros, 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital natural de México*, Volumen 1, pp. 415-435.
- Pollock D. D., A. Berman, M. W. Feldman y D. B. Golstein. 1998. Microsatellite behavior with range constraints: Parameter estimation and improved distance estimation for use in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Populations Biology*, 53: 256-271.
- Price, R. A., A. Liston y S. H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of pines, en D. M. Richardson (Ed.), Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 48-98.
- Pritchard, J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Rachmat, H. H., Kamiya, K. y harada, K. 2012. Genetic diversity, population structure and conservation implication of the endemic Sumatran lowl and dipterocarp tree species (*Shorea javanica*). *International Journal of Biodiversity and Conservation* 4(14): 573-583.
- Rajora, O. P. y A. Mosseler. 1998: Genetic diversity and population structure of the disjunct Newfoundland and central Ontario populations of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Can. J. Bot.* 76: (In press).
- Rajora O. P., Rahman M. H., Buchert G. P., Dancik B. P. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* 9: 339-348. 61
- Rentería A. M. 2002. Estructura y variación genética en *P. nelsonii* una especie de pino rara de México. Tesis de Licenciatura, Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM. 74 p.
- Ritland K. 1990. Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. *Evolution*. 44:1230-1241.

- Robledo-Arnuncio J. J., Austerlitz F. Smouse P. E. 2006. A new indirect method of estimating the pollen dispersal curve, independently of effective density. *Genetics* 173, 1033-1045.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8. Exeter Software, New York, NY.
- Román, R. R. 2004. Identificación de microsatélites nucleares en *Pinus chiapensis* y en el complejo *Pinus ayacahuite* - *Pinus. strobiformis* - *P. flexilis*. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resources*. 2008;8:103–6.
- Sánchez González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques* 14(1): 107-120.
- Saunders, D. A., R. J. Hobbs y C. R. Margules. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5: 118-32.
- Schaal, B. A., W.J. Leverich, y S. H. Rogstad. 1991. A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.), *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York. pp: 123-134.
- Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Holsen, J. T. Rauscher y W. A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol. Ecol.* 7: 465-154. Sweigart A., K. Karoly, A. Jones y J. H. Willis. 1999. The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in a population of *Mimulus guttatus*. *Heredity* 83: 625-632.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium population. *Evolution*, 47:264-279.
- Strauss, S. H. y Doerksen, A. H. 1990. Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution* 44: 1081–1096.
- Sweigart A., K. Karoly, A. Jones y J.H. Willis. 1999. The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in a populations of *Mimulus guttanus*. *Heredity* 83: 625-632.
- Storz, J. F., y M. A. Beaumont. 2002. Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution* 56:154–166.

- UAM, 2011. Ciencias. Variabilidad genética de las poblaciones. Recuperado en http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/joaquina, el 22 de septiembre de 2014.
- Unidad de Administración Forestal No. 10. Sur-occidental. 1991. Memoria general del estudio Manejo Integral Forestal. Michoacán. SARH. México. 114 pp.
- Vázquez-Lobo A. 1996. Evolución de hongos endófitos del género *Pinus* L: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Viard F., P. Bremond, R. Labbo, F. Justy, B. Dleay y P. Jarne. 1996. Microsatellites and the genetics of highly selfing populations in freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Genetics* 142: 1237-1247.
- Chhatre V. E. y Rajora O. P. 2014. Genetic divergence and signatures of natural selection in marginal populations of a keystone, long-lived conifer eastern white pine (*Pinus strobus* L.) from northern Ontario. *PLoS ONE* 9(5): e97291 (10.1371/journal.pone.0097291).
- Walter, R. y B. K. Epperson. 2005. Geographic pattern of genetic diversity in *Pinus resinosa*: Contact zone between descendants of glacial refugia. *American Journal of Botany* 92: 92-100.
- Weir B. S. y C. Clark Cockerham. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Weir B. S. 1996. Genetic data analysis II., Sinauer: Sunderland, MA.
- Williams C. G. y O. Sovolainen. 1996. Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. *Forest Science* 42:102-117.
- Williams C.G. C.G. Elsik y R.D. Barnes. 2000. *Microsatellite analysis of Pinus taeda L. in Zimbabwe*. *Heredity*, 84:261-268.
- Wright, S. 1965. The interpretation of populations structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19: 395-420.
- Young A. G., Boyle T. y Browun, A. H. D. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plant. *Trends Ecol Evol* 11, 413-418.

Anexo 1. Frecuencias alélicas por locus por población.

FRECUENCIAS ALÉICAS POR LOCUS POR POBLACIÓN														
Locus	Población /Alelos	Dur	Chi	Sol	Jo	Ma	Ag	Fre	Alb	Car	Vp	Pre	Hua	Can
RPS 2	151	0.066	0.285	0.3	0.062	0.071	0.25	0.105	0.022	0.181	0	0.156	0.138	0.166
	153	0.366	0.190	0.2	0.281	0.142	0.083	0.197	0.284	0.227	0.291	0.218	0.25	0
	159	0.2	0	0	0.125	0	0	0.052	0	0	0	0	0.055	0
	163	0	0	0	0	0.214	0	0	0	0	0	0.093	0	0
	165	0.366	0.523	0.5	0.531	0.571	0.541	0.618	0.613	0.590	0.708	0.5	0.472	0.5
	171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.166
	173	0	0	0	0	0	0.125	0.026	0.079	0	0	0.031	0	0
	177	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.083	0.166
RPS34b	117	0.1	0	0	0	0	0	0.064	0.010	0	0	0	0	0
	119	0.033	0	0	0.031	0	0	0.115	0.145	0	0.192	0	0.055	0
	121	0.566	0.521	0.5	0.468	0.642	0.576	0.448	0.552	0.681	0.423	0.562	0.5	0.375
	123	0	0	0	0.187	0.142	0.230	0.115	0.156	0.090	0.076	0.125	0	0.25
	125	0.3	0.478	0.5	0.312	0.214	0.153	0.256	0.125	0.227	0.192	0.281	0.444	0.375
	131	0	0	0	0	0	0	0	0.010	0	0.115	0	0	0
	133	0	0	0	0	0	0.038	0	0	0	0	0.031	0	0
RPS18	128	0	0	0	0.218	0.25	0	0.166	0	0	0	0.406	0	0
	134	0.433	0.152	0.1	0.468	0.416	0.423	0.282	0.343	0.363	0.615	0	0.083 33	0.125
	136	0	0.130	0	0	0	0	0	0.031	0.045	0	0	0	0
	138	0.566	0.717	0.9	0.312	0.333	0.576	0.525	0.614	0.590	0.384	0.593	0.916	0.875
	140	0	0	0	0	0	0	0.012	0.010	0	0	0	0	0
	162	0	0	0	0	0	0	0.012	0	0	0	0	0	0
RPS50	126	0	0	0.5	0.437	0.5	0	0.217	0.197	0.454	0.5	0.5	0.166	0
	128	0	0	0	0	0	0	0	0.010	0	0	0	0	0
	136	0.966	0.717	0.5	0.562	0.5	0.961	0.743	0.614	0.545	0.5	0.5	0.833	1
	138	0.033	0.282	0	0	0	0.038	0.038	0.177	0	0	0	0	0
RPS84	131	0.1	0	0	0	0.285	0	0	0.020	0	0	0	0	0
	147	0.466	0.456	0.5	0.5	0.214	0.5	0.461	0.406 25	0.5	0.423	0.312	0.305	0.5
	157	0	0.130	0.1	0	0.214	0	0.153	0.208	0.090	0.115	0.312	0.25	0.125
	161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.055	0
	163	0.033	0.239	0.2	0.031	0.285	0.5	0.217	0.343	0.272	0.461	0.375	0.277	0.375
	165	0	0	0	0	0	0	0	0.010	0	0	0	0	0
	167	0.166	0.043	0.2	0.312	0	0	0.128	0.010	0.136	0	0	0	0
	169	0.233	0	0	0.156	0	0	0.038	0	0	0	0	0.111	0
	171	0	0.130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

