

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VARIACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES
DE *Pinus pincea* DEL NORESTE DE MÉXICO

Por

M.E.C. VERÓNICA ADRIANA AGUIRRE LIMÓN

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con acentuación en
MANEJO Y ADMINISTRACIÓN DE RECURSOS VEGETALES

Julio, 2014

VARIACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES
DE *Pinus pincea* DEL NORESTE DE MÉXICO

Por

M.E.C. Verónica Adriana Aguirre Limón

Candidato a obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas
con Acentuación en Manejo y Administración de Recursos Vegetales

Comité Doctoral

Dra. Susana Favela Lara
Director de Tesis

Dr. José Ignacio González Rojas
Secretario

Dra. Adriana Flores Suárez
Vocal

Dr. Glafiro Alanís Flores
Vocal

Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal

DEDICATORIA

*Con todo mi Amor a las personas que hicieron todo para apoyarme a lograr mis
sueños y entender mis ausencias...*

*A Miguel Ángel por su amor, comprensión, paciencia y apoyo incondicional.
A mis hijos Mario y Bella por ser mi inspiración para no rendirme aún en tiempos
difíciles, pues sin ustedes a mi lado definitivamente no lo hubiera logrado.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, mi Alma máter, a la Facultad de Ciencias Biológicas, por todas las facilidades otorgadas en el desarrollo de la investigación, financiada por el proyecto PROMEP/103.5/09/562.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para la realización del presente estudio a través de la beca No. 221526.

A mi directora de tesis, la Dra. Susana Favela Lara, primero que nada por haber confiado en mí, por su paciencia, por estar siempre dispuesta a ayudarme y sobre todo a brindarme su asesoría, apoyo y comprensión.

A los miembros de mi comité de tesis:

Al Dr. José Ignacio González Rojas, por todas sus enseñanzas desde la Licenciatura y la Maestría por siempre tener un momento para asesorarme y ayudarme con sus observaciones para concluir con mis estudios.

A la Dra. Adriana Flores Suárez, por su apoyo en todo momento durante la investigación, por sus asesorías y revisiones.

Al Dr. Glafiro Alanís Flores, por estar siempre presente, por escucharme, orientarme y por compartir su sabiduría y experiencia para ayudarme a concluir mi posgrado.

Al Dr. Carlos Hernández Luna, por sus revisiones y asesorías.

A mi comité tutorial integrado por: el Dr. Gabino A. Rodríguez Almaráz, al Dr. Jesús Ángel de León González y a la Dra. Lourdes Lozano Vilano; quienes me guiaron y asesoraron en el transcurso de cada uno de los semestres de mis estudios.

A la Mtra. Ma. Gpe. Idolina Leal Lozano, por su incondicional apoyo y comprensión durante la realización de mi posgrado.

Al Biólogo Manuel Torres Barajas por su ayuda en la elaboración de los mapas utilizados en este trabajo.

A la Dra. Beatriz López Monroy, porque juntas logramos apoyarnos y ayudarnos en todo este camino que era un gran reto y porque además de concluir nuestros estudios terminamos siendo grandes amigas, gracias Bety.

A mi familia, mis papas C.P. Encarnación Aguirre Manrique y Profra. Cipriana Limón Rodríguez (†), mis hermanos: Sandra, Patricia, Diana y César Aguirre Limón por acompañarme y brindarme su apoyo y sus bendiciones.

Y un reconocimiento especial a todos mis maestros, compañeros y amigos que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Página

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN	3
3	HIPÓTESIS.....	6
4	OBJETIVOS	7
4.1	Objetivos específicos.....	7
5	ANTECEDENTES.....	8
5.1	<i>Pinus pinceana</i> Gordon (1858)	8
5.2	Técnicas Moleculares	13
5.2.1	Marcadores Bioquímicos (NO-ADN).....	13
5.2.2	Marcadores de ADN	14
5.3	Componentes de la variación genética.	17
5.3.1	Diversidad genética.....	17
5.3.2	Diferenciación genética.....	20
5.3.3	Distancia Genética.	23
5.4	Estudios de variación genética del género <i>Pinus</i>	25
5.4.1	Estudios Filogenéticos	25
5.4.2	Estudios de genética de poblaciones	26
5.4.3	Estudios genéticos del grupo Cembroides	27
6	METODOS.	30
6.1	Material biológico	30
6.2	Extracción de ADN.	38
6.3	Análisis de RAPD	39
6.3.1	Selección de Oligonucleótidos o primers.....	39
6.3.2	Condiciones de PCR.	40
6.3.3	Detección y procesamiento de productos de PCR con RAPD.....	40
6.3.4	Análisis de Datos	41
7	RESULTADOS.....	46
7.1	Colecta de material biológico.....	46
7.2	Extracción de DNA	46
7.3	Amplificación con marcadores RAPD.	46

7.4	Análisis de datos.....	51
7.4.1	Diversidad Genética.....	51
7.4.2	Diferenciación Genética.....	52
7.4.3	Estructura Genética.....	52
7.4.4	Distancia Genética.....	53
7.4.5	Aislamiento por distancia (Prueba de Mantel).....	55
8	DISCUSIÓN.....	57
9	CONCLUSIONES.....	65
10	LITERATURA CITADA.....	66
11	APÉNDICE.....	73

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Lista de poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> muestreadas en la Sierra Madre Oriental.	30
Tabla 2. Secuencias de primers para RAPD analizados en este estudio.	39
Tabla 3. Secuencias de primers y número de fragmentos amplificados de RAPD utilizados para escanear el ADN de poblaciones de <i>Pinus pinceana</i>	39
Tabla 4. Lista de primers y sus secuencias, numero de productos amplificados y polimorfismo total.	47
Tabla 5. Estimadores de diversidad genética para cada una de las 6 poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> , en México a partir de RAPD.	51
Tabla 6. Análisis de Varianza molecular (AMOVA) basado en el análisis de marcadores RAPD a partir de seis poblaciones de <i>Pinus pinceana</i>	53
Tabla 7. Medidas distancia genética basadas en el coeficiente de similitud de Jaccard entre pares de poblaciones de <i>Pinus pinceana</i>	53
Tabla 8. Medidas de distancia genética de Nei (1972) entre pares de poblaciones de <i>Pinus pinceana</i>	55
Tabla 9. Distancia geográfica (km) entre pares de poblaciones de <i>Pinus pinceana</i>	56
Tabla 10. Cálculos de la variación genética obtenidos para distintas especies de Pinos.	59
Tabla 11. Valores de Diversidad Genética (Fst) y Flujo Genético (Nm) en distintas especies de Pinos.	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución de la subsección Cembroides en Estados Unidos, México y Noreste de México. (Malusa, 1992)	9
Figura 2. Población de <i>Pinus pinceana</i>	10
Figura 3. Distribución de <i>Pinus pinceana</i> en México.....	12
Figura 4. Poblaciones muestreadas de <i>Pinus pinceana</i> en la Sierra Madre Oriental.	31
Figura 5. Muestreo de <i>Pinus pinceana</i> en la Sierra Madre Oriental.	31
Figura 6. Población de <i>Pinus pinceana</i> , La Noria, Cuatro Ciénegas, Coahuila. ...	32
Figura 7. Árbol maduro de <i>Pinus pinceana</i> , en La Noria, Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	32
Figura 8. Población de <i>Pinus pinceana</i> , de La Palmosa, Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	33
Figura 9. Árboles maduros de <i>Pinus pinceana</i> , de La Palmosa, Cuatro Ciénegas, Coahuila.	33
Figura 10. Población de <i>Pinus pinceana</i> , de La Casita, Parras, Coahuila.	34
Figura 11. Arboles maduros de <i>Pinus pinceana</i> , de La Casita, Parras, Coahuila..	34
Figura 12. Población de <i>Pinus pinceana</i> , de El Jaralito, General Cepeda, Coahuila.	35
Figura 13. Árboles maduros de <i>Pinus pinceana</i> , de El Jaralito, General Cepeda, Coahuila.	35
Figura 14. Población de <i>Pinus pinceana</i> , Cañón del Moroso, Santa Catarina, Nuevo León.....	36
Figura 15. Árboles maduros de <i>Pinus pinceana</i> , Cañón del Moroso, Santa Catarina, Nuevo León.	36
Figura 16. Población de <i>Pinus pinceana</i> , Las Lajas, Concepción del Oro, Zacatecas.	37

Figura 17. Árbol maduro de <i>Pinus pinceana</i> , Las Lajas, Concepción del Oro, Zacatecas.	37
Figura 18. Extracción de DNA de muestras de <i>Pinus pinceana</i>	38
Figura 19. Electroforesis en gel de Agarosa de <i>Pinus pinceana</i>	38
Figura 20. Gel de agarosa 1.8%, mostrando la extracción de ADN de <i>Pinus pinceana</i>	46
Figura 21. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPA-07 en <i>P. pinceana</i> . (M): marcador de peso molecular, (1.9 – 1.7): muestras de <i>Pinus pinceana</i> y (-): control negativo de la reacción de PCR.	48
Figura 22. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPA-08 en <i>P. pinceana</i> . (M): marcador de peso molecular, (1.1 – 1.16): muestras de <i>Pinus pinceana</i>	48
Figura 23. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPA-11 en <i>P. pinceana</i> . (M): marcador de peso molecular, (3.13 – 3.4): muestras de <i>Pinus pinceana</i>	49
Figura 24. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPC-06 en <i>P. pinceana</i> . (M): marcador de peso molecular, (5.1 – 5.11): muestras de <i>Pinus pinceana</i>	49
Figura 25. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPG-09 en <i>P. pinceana</i> . (M): marcador de peso molecular, (1.1 – 1.16): muestras de <i>Pinus pinceana</i>	50
Figura 26. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPP-11 en <i>P. pinceana</i> . (M): marcador de peso molecular, (5.7 – 5.4): muestras de <i>Pinus pinceana</i>	50
Figura 27. Gráfico de coordenadas principales de la distancia genética para 6 poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> , utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard.	54
Figura 28. Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei (1972) de poblaciones de <i>P. pinceana</i> derivado del análisis de marcadores RAPD (Modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP versión 3.5).	55
Figura 29. Prueba de Mantel para evaluar el aislamiento por distancia entre cada par de poblaciones, obtenida a partir de las distancias genéticas de Nei (1972) y las distancias geográficas (en Kilómetros).	56

1 RESUMEN

Pinus pinceana Gordon es una especie de pino Mexicano que pertenece al grupo Cembroides (pinos piñoneros). Se presenta en zonas montañosas y áridas en la Sierra Madre Oriental. Las poblaciones que se conocen son pequeñas, restringidas, aisladas y se distribuyen de manera fragmentada básicamente en tres regiones: Norte, Centro y Sur a lo largo del país. Se considera una especie rara, de bajo riesgo y sujeta a protección especial en la Norma oficial Mexicana NOM.059-ECOL-2001. Con el fin de evaluar la diversidad genética entre las poblaciones de *P. pinceana* la cantidad de flujo genético, así como la distancia genética 180 muestras fueron obtenidas de las localidades norteñas que se distribuyen en la Sierra Madre Oriental y analizadas utilizando la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). Los cinco primers utilizados para el análisis mostraron un patrón de bandeo con una alta reproducibilidad y resolución de bandas claras. Estos cinco primers produjeron un total de 76 bandas distintas, 72 de las cuales fueron polimórficas a través de todas las muestras. La diversidad genética en las poblaciones fue alta con un porcentaje de polimorfismo de 94.7 % y un grado de diversidad medido con el índice de Shannon de 48%. El total de la variación encontrada entre las poblaciones fue de 14.8 ($P=0.001$). La mayor parte de la variación se encontró dentro de las poblaciones (85.18%). El flujo genético medido con el coeficiente de migración fue de 2.76 por generación. Contrario a lo esperado, los niveles de variación genética encontrados en las poblaciones fue alta pero una diferenciación entre ellas baja ($G_{st} = 0.15$). Esto sugiere aun y cuando la especie presenta distribución restringida y fragmentada a través de la SMO, el flujo genético entre las poblaciones ha sido suficiente como para decir que *P. pinceana* no está en un vortex de extinción genética. La distancia genética muestra la formación de dos grupos uno con las poblaciones pertenecientes al estado de Coahuila y otro con las de Nuevo León y Zacatecas lo cual nos indica un mayor flujo genético entre estas con respecto a las de Coahuila y probablemente la influencia de alguna barrera fisiográfica dentro de la Sierra Madre Oriental.

ABSTRACT

Pinus pinceana Gordon is a Mexican pine, which belongs to subsection Cembroides (pinyon pines). It is distributed in mountainous and arid areas in the Sierra Madre Oriental. It is known from at least 21 populations, which are small, restricted, isolated and severely fragmented. They occur in three main areas: Northern, Central and southern parts of its range. It is listed on the Mexican National Red List (Norma Oficial Mexicana) as a rare and a species requiring special protection (NOM.059-ECOL-2001). In order to evaluate the genetic diversity between populations, the gene flow as well as genetic distance of *P. pinceana*, 180 samples were obtained from Northern localities within its range of distribution in the Sierra Madre Oriental and analysed using random amplified polymorphic DNA (RAPD). The five primers tested for the analysis showed banding patterns with very high reproducibility and clear band resolution. These five primers produce a total of 76 distinct bands, 72 of which were polymorphic across the whole sample. The genetic diversity in the populations was high with a percentage of polymorphism of 94.7% and degree of diversity measured by the Shannon index of 48%. The total variation found between the populations was 14.8% ($p = 0.001$). Most of the variation was found within populations (85.18). The gene flow measured by the coefficient of migration was 2.76 per generation. Contrary to expectations, the level of genetic variation found in the populations was high but differentiation between them low ($G_{st} 0.15$). This suggests that even though the species has a restricted and fragmented distribution through the Sierra Madre Oriental the gene flow between populations has been sufficient to say that *P. pinceana* is not in a genetic extinction vortex. The genetic distance shows the formation of two groups one with populations from the state of Coahuila and the other with Nuevo Leon and Zacatecas, which indicate a higher gene flow between these, regarding to Coahuila and probably the influence of some physiographic barriers within the Sierra Madre Oriental.

2 INTRODUCCIÓN

La variabilidad genética o diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones (Piñero *et al.* 2008).

La fragmentación en pequeñas y esparcidas poblaciones permite el aislamiento genético, pérdida de la diversidad genética, endogamia, diferenciación de las poblaciones e incrementa la probabilidad de extinción (Ledig *et al.* 2001). Las especies en México están representadas por poblaciones pequeñas y dispersas. Tal es el caso del género *Pinus* en donde 35 de las 47 especies que ocurren en México son endémicas y además reportadas como amenazadas o en peligro (Perry, *et al.* 1998). Nueve de estas especies de pinos mexicanos están enlistados por la Internacional Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) (IUCN 2001) como especies que causan preocupación. Sin embargo en especies anemófilas con gran liberación de polen, como en los pinos, los mecanismos que promueven la polinización cruzada podría compensar los efectos de la fragmentación, reduciendo la pérdida genética de la diversidad y el peligro de extinción (Ledig, 1998). En los pinos mexicanos, el efecto neto de la fragmentación parece haber sido la especiación, considerando que México es un centro secundario de biodiversidad para el género *Pinus* (Styles, 1993; Farjon y Styles 1997).

Pinus pinceana Gordon, especie endémica a México brinda una excelente oportunidad para estudiar los efectos de la fragmentación y los patrones genéticos de variación entre sus poblaciones. Se distribuye sobre una distancia de más de 750 km de norte a sur. Su extensión es muy por encima de 20.000 km². Debido a la distribución discontinua y dispersa de sus poblaciones el área que ocupa es probablemente menos de 2.000 km². Se presentan en tres áreas principales: el norte (Coahuila, Zacatecas, Nuevo León) central (San Luis Potosí) y el sur (Hidalgo y Querétaro), a lo largo de la Sierra Madre Oriental y separadas por montañas y grandes extensiones de zonas áridas. Esta especie no solo se presenta de forma dispersa en las comunidades si no que de forma fragmentada y aislada por barreras geográficas, lo que dificulta el intercambio genético o

conectividad entre sus poblaciones, especialmente en la parte Norte (Coahuila) en donde se detiene su distribución presentándose las poblaciones más septentrionales. El aislamiento genético favorece la diferenciación de las poblaciones por efectos de deriva genética, como se ha demostrado en estudios de diversidad genética de la especie mediante isoenzimas (Ledig *et al.* 2001; Molina-Freaner *et al.* 2001). Las diferencias ambientales entre regiones sugieren la posibilidad de que la selección natural haya ocasionado diferencias entre las poblaciones en características de importancia adaptativa a factores específicos de estrés ambiental. Junto con otras dos especies de su misma subsección (*P. maximartinezii* y *P. nelsonii*) esta especie ha sido considerada paleo-relicta (Perry 1991; Farjon y Styles, 1997).

Los bosques de *Pinus pinceana* están incluidos en el listado de hábitats naturales en peligro que exige medidas específicas de conservación, clasificada como “LRnt” en la IUCN Red List lo que significa en bajo riesgo y sujeta a protección en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 debido en parte porque sus poblaciones están distribuidas en forma fragmentada y en pequeños rodales y quizá por la falta de estudios sobre su variabilidad genética. Sin embargo diversos autores reportan que esta especie es vulnerable dado que en algunas áreas visitadas se presenta poca regeneración natural (Perry, 1991; Villarreal, 2009). Además es importante en la economía de los habitantes de las comunidades cercanas pues obtienen ingresos por la venta de la semilla comestible (piñón blanco) también es utilizado como fuente de leña y combustible.

Pinus pinceana ha sido estudiada previamente utilizando técnicas moleculares como isoenzimas (Ledig *et al.* 2001; Ramírez-Herrera 2007) y microsatélites (Delgado *et al.* 2001) para analizar la variación genética de algunas de sus poblaciones. Sin embargo los resultados no han sido concluyentes dado que el número de loci polimórficos que generaron no fue suficiente. Por lo tanto elegimos utilizar la técnica de RAPD que son marcadores dominantes y multilocus arbitrarios que generan un gran número de marcadores polimórficos por la amplificación o no amplificación de secuencia de ADN dispersos por todo el genoma (William *et al.*, 1990; Vos *et al.*, 1995) de los cuales se obtiene información más precisa de la que se infiere basada en un solo gen. (Koopman, 2005). Además RAPD ha sido utilizado previamente dentro del género *Pinus* y ha

mostrado ser de gran utilidad en resolver preguntas con respecto a la genética de poblaciones de diversas especies.

Con los datos obtenidos a partir de esta técnica en el presente estudio se han podido utilizar diferentes medidas genéticas como: diversidad genética (% de polimorfismo, diversidad genética de Nei, Índice de Shannon), diferenciación genética (AMOVA y flujo genético y coeficiente de migración N_m), distancia genética (PCO, Índice de Jaccard, UPGMA) y distancias geográficas (Prueba de Mantel) para examinar a las poblaciones nortañas incluyendo la población recientemente descubierta en Nuevo León de *P. pinceana* e inferir y contestar: a) Sí a pesar del argumento de que sus poblaciones están fragmentadas existe flujo genético y/o conectividad entre ellas, b) Sí existe evidencia de asilamiento genético entre sus poblaciones, c) Si hay una correspondencia entre la distancia genética y la distancia geográfica de sus poblaciones y d) Conocer el número y distribución de variación genética dentro y entre sus poblaciones, que son básicamente los objetivos de la presente tesis.

3 HIPÓTESIS

Las poblaciones de *P. pinceana* son pequeñas, se presentan aisladas y con distribución fragmentada en la Sierra Madre Oriental por lo que es de esperarse que a nivel intra-poblacional exista poca variación y a nivel inter-poblacional alta variación por aislamiento entre los fragmentos.

4 OBJETIVOS

Determinar la estructura genética de las poblaciones norteñas de *Pinus pinceana* utilizando marcadores moleculares de RAPD.

4.1 Objetivos específicos.

- Estimar los niveles de variación y flujo genético de las poblaciones de *P. pinceana* mediante los marcadores moleculares de RAPD.
- Estimar la distancia genética entre las poblaciones.
- Relacionar la distancia genética y la distancia geográfica entre las poblaciones, para determinar si existe o no asilamiento entre ellas.

5 ANTECEDENTES

5.1 *Pinus pinceana* Gordon (1858)

Esta especie pertenece a la subsección *Cembroides*, a la sección *Parrya* y al subgénero *Strobus* o los denominados *Haploxylon* o "pinos blandos" (Farjon y Styles, 1997). Se les conoce como pinos piñoneros en Norte América o como piñones en México por presentar una semilla grande sin ala y comestible. Son árboles de pequeños a medianos que crecen en regiones semiáridas desde el Sur de Idaho, EE.UU. (Lat 42° N) hasta Puebla, México (Lat 18 ° N).

Los pinos piñoneros en México ocurren en la Sierra Madre Oriental, en el límite oriental del Eje Volcánico, en la Sierra de Juárez y Sierra de San Pedro Mártir de Baja California Norte y en una pequeña Sierra de Baja California Sur.

En el Noreste de México este grupo de pinos están presentes en los estados de Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, al este de San Luis Potosí y el norte de Zacatecas. Desde un punto de vista fisiográfico el Noreste de México se caracteriza por la presencia de una cadena montañosa, la Sierra Madre Oriental. Esta región tiene una serie de características ecológicas que son importantes para los pinos que crecen ahí. Basándose en (1) la adaptación a la aridez, (2) una sierra rodeada de (semi)-desierto, (3) el endemismo local y (4) la diversidad de especies relictas, esta región se ha definido como un centro de diversidad de pinos piñoneros (Farjon, 1996).

La actividad tectónica fue importante en México durante el Eoceno tardío y el Oligoceno/Mioceno (hace 50 millones de años.) La actividad volcánica durante el terciario reconfiguro significativamente la Sierra Madre Occidental y formo la Sierra Madre Oriental y el eje Volcánico Transversal (Millar, 1993). El levantamiento de la nueva Sierra y la actividad volcánica durante este tiempo provoco un ambiente heterogéneo. La diversidad climática local fue formada por el efecto de sombra orográfica y las diferencias altitudinales. La formación de la Sierra provoco nuevas

barreras para la migración y flujo de genes, causando que los linajes establecidos previamente se fragmentaran y se aislaran. (Ferrusquia, 1993; Millar, 1993). Todas estas condiciones deben haber favorecido la divergencia y son causas importantes de la especiación de los pinos piñoneros. (Fig. 1) muestra la distribución real de las especies representadas en la subsección Cembroides en los EE.UU., México y el Sureste de México.

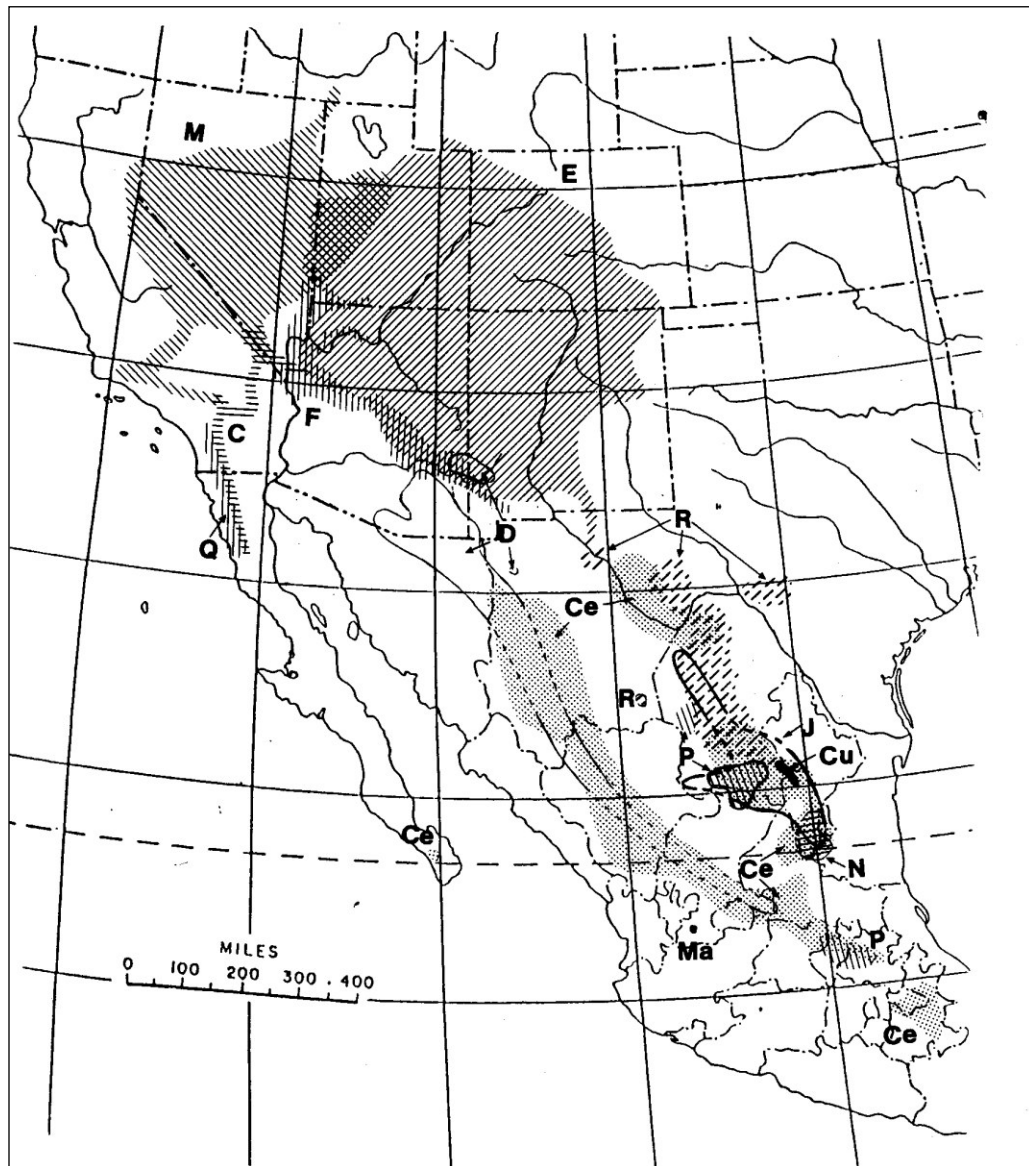


Figura 1. Distribución de la subsección Cembroides en Estados Unidos, México y Noreste de México. (Malusa, 1992)

Pinus pinceana (Figura 2) fue descrito por Gordon (1858). Sus ramas, hojas y conos péndulos, características que no se encuentran en la subsección Cembroides sugieren que este taxón debe ser colocado en una subsección separada. Perry en (1991) propuso que se debe colocar en la Subsección Pinceana y Farjon y Styles (1997) sugieren sea ubicado en la Subsección Nelsoniae.

Es un árbol o arbusto pequeño, que alcanza de 4 a 10 m de altura en la madurez (Martínez. 1947; Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997). Habita entre los 1400 a 2700 msnm sobre laderas calcáreas o barrancas (Farjon y Styles, 1997). Se puede decir que de los pinos Mexicanos ocurre en los sitios más áridos, abajo o justamente traslapándose con la parte más baja de las comunidades de piñoneros-juniperos (Perry, 1991; Favela, 2009) entre 1500 a 2700 m en altitud y a una precipitación anual de 300-400 mm (Perry, 1991). Crece en asociación con *Pinus cembroides* y *Juniperus flaccida* en las partes más altas y con arbustos esclerófilos y deciduas en las partes más desérticas y bajas. (Farjon y Styles, 1997; Favela, 2009). Se distribuye en poblaciones aisladas en el Norte y Centro Este de México, en los estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo y Querétaro.



Figura 2. Población de *Pinus pinceana*.

Se han reportado de 300 a 10.000 árboles dentro de sus subpoblaciones (Delgado, 2008). Aunque la regeneración en algunas partes de su área de distribución se

ha notificado a ser pobre, probablemente como resultado de un exceso de pastoreo (Perry, 1991), en los trabajos de campo más recientes ha encontrado evidencia de regeneración adecuada en todo su rango. (Favela, 2009). Por lo que quizá la recolección de leña y la intervención del hombre puede ser una amenaza potencial.

Es una especie interesante que ha llamado la atención desde diferentes puntos de vista, por un lado ha sido etiquetada como especie paleo-relictiva (Perry, 1991; Farjon y Styles 1997). Y por el otro es que a partir de al menos 21 poblaciones que se conocen (Fig. 3) podría ser considerada severamente fragmentada formando dos o tres grupos de poblaciones a lo largo de su área de distribución (Favela, S. & Thomas, P. 2013) en ambos casos se ha dado la pauta para analizar sus poblaciones desde un punto de vista genético utilizando marcadores moleculares.

Algo importante de mencionar es con respecto a los mecanismos de dispersión ya que juegan un rol importante en el flujo genético de la especie. El flujo genético en los pinos ocurre a través del polen y de las semillas, con la característica particular de que en los pinos los cloroplastos son heredados a través del polen parental (Neale y Sederoff 1989), y la mitocondria es heredada a través del óvulo.

La dispersión del polen y de las semillas de la especie no se ha estudiado. Sin embargo, en cuanto a la dispersión del polen no cabe duda de que, al igual que en el resto del género, ocurre por viento. En cuanto a la dispersión de las semillas, ya que estas no presentan alas, la dispersión por viento queda descartada y probablemente se lleve a cabo por aves (Lanner, 1998).

Las aves que normalmente tienen este mutualismo con los pinos (particularmente del subgénero *Strobus*), son de la familia Corvidae del género *Corvus* (Lanner, 1998). Solo existen estudios formales sobre la dispersión por aves en dos especies de pinos piñoneros: *Pinus edulis* y *P. monophylla*, cuyas semillas son dispersadas por cuatro córvidos (*Aphelocoma coerulescens*, *Cyanocitta stelleri*, *Gymnorhinus cyanocephalus*, *Nucifraga columbiana*) (Lanner, 1998). Estas aves tienen la capacidad de llevar 5, 18, 50

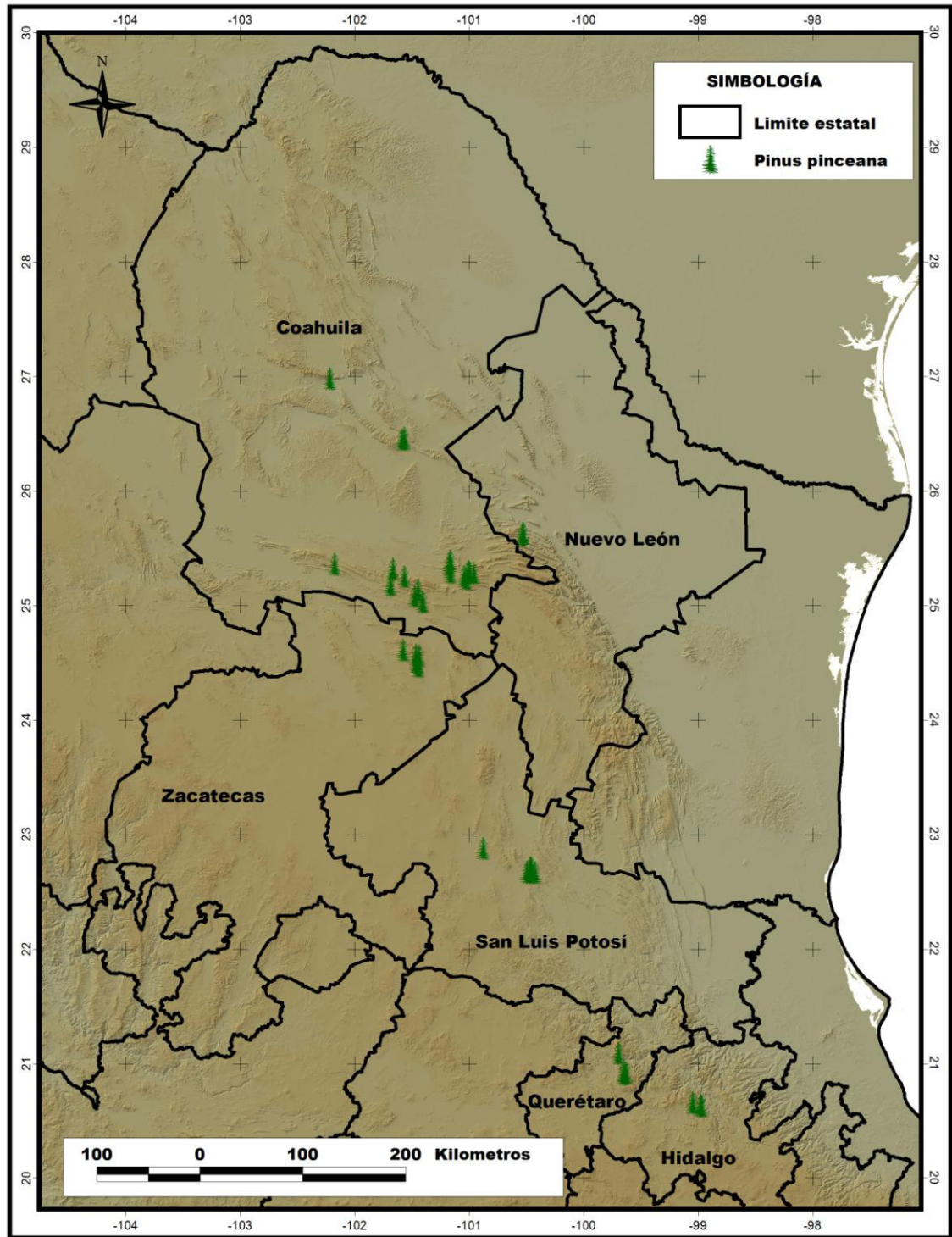


Figura 3. Distribución de *Pinus pinceana* en México.

y 90 semillas respectivamente y volar distancias que van de locales (*A. coerulescens* y *C. stelleri*), a 1-5 Km (*G. cyanocephalus*) hasta 5-15 km (*N. columbiana*; Vander Wall

1990). Numerosas coadaptaciones de los pinos y aves sugieren mutualismo (Marzluff y Balda 1992). Debido a que se ha observado una morfología similar entre otros pinos piñoneros y su coexistencia con los mismos córvidos u otros relacionados, se sugiere que el mutualismo con estas aves para la dispersión de semillas es el mismo en todos los miembros del grupo Cembroides.

5.2 Técnicas Moleculares

Una amplia gama de técnicas moleculares se han utilizado para estimar la diversidad y cantidad de variación genética contenida en las poblaciones del género *Pinus*, así como para tratar de resolver la taxonomía incierta de algunos complejos taxonómicos de este género. El uso de técnicas moleculares ha contribuido de manera significativa a los avances logrados en los estudios relacionados con este grupo de plantas.

5.2.1 Marcadores Bioquímicos (NO-ADN)

5.2.1.1 Aloenzimas e Izoenzimas.

La migración de las proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico (electroforesis de proteínas) fue el primer método que se utilizó rutinariamente para investigar la información genética a nivel molecular (Murphy *et al.* 1996). Se pueden obtener simultáneamente datos de proteínas a partir de dos formas utilizando métodos de electroforesis. Uno de ellos es isoenzimas que son más de una forma de una enzima codificada por diferentes loci y el otro es aloenzimas que son más de una enzima codificada por diferentes alelos en el mismo locus. La mayoría de los aloenzimas muestran herencia codominante (se expresan ambos alelos en un locus). Las aloenzimas se utilizan en estudios relacionados con la estimación de la diversidad genética y estructura de la población, investigaciones sobre hibridación, introgresión y flujo de genes. La ventaja de esta técnica es su bajo costo y la simplicidad de la técnica. Una de las razones por las que esta técnica está disminuyendo en popularidad se debe a bajo

número de alelos por locus que detectan, y la necesidad de tener acceso a material fresco adecuado (Lowe *et al.*, 2004)

5.2.2 Marcadores de ADN

Hay tres genomas en las plantas en el que la variación genética se puede detectar: ADN del cloroplasto, el ADN mitocondrial y ADN nuclear (Lowe, 2004). Se hace hincapié exclusivamente en los métodos utilizados para estudiar el ADN nuclear, ya que estos son los tipos de marcadores genéticos utilizados en este estudio.

5.2.2.1 Marcadores Nucleares

El genoma nuclear (ADNn) es el más grande de los genomas disponibles para el análisis genético, y varía en tamaño desde aproximadamente 5×10^4 a 7×10^8 kb. Sin embargo, esta diferencia en el tamaño del genoma no está asociado con la complejidad genética o morfológica (Lowe *et al.* 2004). Los genomas nucleares están empaquetados en un número variable de cromosomas dentro de una célula. Es una mezcla de regiones codificantes y no codificantes que se dividen en secuencias altamente repetitivas, secuencias moderadamente repetitivas y secuencias de una única copia, basada en su abundancia relativa. Hay dos tipos de ADN repetitivo: repeticiones intercalados, que consisten en unidades individuales de secuencia específicas dispersos por todo el genoma; y repeticiones en tándem, que son típicamente secuencias cortas que se repiten cientos o miles de veces (Lowe *et al.* 2004).

5.2.2.1.1 Marcadores multilocus aleatorios

Las técnicas basadas en PCR tienen como objetivo detectar la variación múltiple dispersa en el ADN nuclear. Los métodos más utilizados son los RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) (William *et al.* 1990) y AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados) (Vos *et al.* 1995). Estas técnicas tienen ciertas características en común: 1) No requieren información de la secuencia de las muestras en cuestión, 2) Producen marcadores que suelen ser dominante (cada banda se interpreta

como un locus, presente o ausente), 3) No se dispone de información en cuanto a la localización genómica de la banda en cuestión. Un código de barras arbitrarias se genera a partir de diferentes muestras, y las inferencias en las similitudes o diferencias entre individuos se hace, basado en el número de bandas compartidas entre ellos (Hollingsworth, 1998).

5.2.2.1.1.1 RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)

Los polimorfismos de ADN amplificados al azar son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies, se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases (pb) a lo largo del genoma. El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido y por inserción o delección de los fragmentos en estos sitios (Williams *et al.* 1990).

La técnica utiliza oligonucleótidos individuales de 10 nucleótidos con un contenido de GC de al menos 50% para amplificar regiones del genoma utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (Lowe *et al.* 2007).

Son marcadores dominantes, es decir, no pueden discernir los homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento particular (Eguiarte *et al.* 2007). Son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar tamaño efectivo, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación cruzada, una de las ventajas de los RAPDs es que amplifican mayor cantidad de regiones del ADN revelando así niveles de variación más altos que otras técnicas.

Entre las principales ventajas de los RAPDs está que amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos que los RFLPs e isoenzimas, es una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de loci que puede ser examinado es ilimitado y no requiere pruebas radiactivas (Eguiarte *et al.* 2007).

Sin embargo los problemas prácticos detectados con los RAPDs son la presencia de bandas “erróneas” (artefactos), la reproducibilidad de los resultados y la comigración de bandas. Asimismo, muchos de los alelos raros presentes en las poblaciones estudiadas con RAPDs no son detectados o pueden ser mal interpretados. Por otro lado, como los loci son dominantes, los RAPDs dan menos información genética por locus que los marcadores codominantes (Eguiarte *et al.* 2007).

5.2.2.1.1.2 AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)

La Técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados combina la digestión de dos enzimas de restricción, con la unión de secuencias específicas al nucleótido ligado a los extremos de los fragmentos de restricción y dos amplificaciones de PCR usando primers marcados basados en las secuencias ligadas. Los fragmentos resultantes son complementarios, además del iniciador, a las extensiones consideradas, razón por la cual sólo una porción del genoma fragmentado es finalmente amplificado (Eguiarte *et al.* 2007). Detecta múltiples loci polimórficos y es útil para generar huellas genéticas y mapeo; también se ha utilizado para la caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos en plantas, bacterias, hongos y en estudios de genética de poblaciones. Entre las ventajas que presenta ésta técnica es que no requieren ninguna información previa de la secuencia para su análisis; se producen una gran cantidad de bandas polimórficas; es altamente reproducible y existen kits estandarizados. Sin embargo, requiere gran número de pasos para producir resultados (Eguiarte *et al.* 2007).

5.2.2.1.1.3 ISSR (Secuencias simples repetidas)

Es un marcador molecular conocido como secuencias repetidas intersimples. Esta es una técnica relativamente nueva y es similar a los RAPDs, excepto que en los ISSRs el primer es un di ó trinucleotido repetido. Las bandas que se obtienen con este marcador van de 100 a 2000 pb. La variación alélica consiste de la presencia o ausencia de los productos amplificados. Comparada con los primers de los RAPDs las secuencias de los ISSRs es usualmente larga lo que resulta en una mayor reproductibilidad de las bandas. (Eguiarte *et al.* 2007).

Los ISSRs han sido utilizados en especies cultivadas desde 1994, pero sólo recientemente se han utilizado en estudios de la variación poblacional en especies silvestres. Entre las ventajas principales de la técnica es que tienen un gran número de bandas polimórficas. Por otro lado las limitaciones son: que las bandas son leídas como marcadores dominantes, es decir cuando tenemos la presencia de la banda no se sabe si el individuo es homocigoto dominante o heterocigoto, que la diversidad genética está basada considerando que cada banda representa un locus con dos alelos y que el alelo dominante está en equilibrio de Hardy-Weinberg con un alelo recesivo y por último que es una técnica relativamente cara (Eguiarte *et al.* 2007).

5.3 Componentes de la variación genética.

La variación genética se encuentra entre individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones dentro de las especies. Las diferencias genéticas que ocurren naturalmente entre los organismos dentro de las especies se llaman polimorfismos genéticos, los cuales se acumulan hasta que se tornan considerables entre las especies, en las cuales se denominan divergencias genéticas.

Dentro de las especies la variación genética es un concepto fundamental para los ecólogos genetistas, constantemente se está creando por mutación, selección natural y deriva genética y tiene tres componentes principales:

- La diversidad genética: estima la cantidad de variación genética
- La diferenciación genética: analiza la distribución de la variación genética entre poblaciones.
- La distancia genética: estima la cantidad de variación genética existente entre pares de poblaciones (Lowe *et al.* 2004).

5.3.1 Diversidad genética.

La diversidad genética es una expresión usada comúnmente para describir la variación que se encuentra en las entidades biológicas y que puede ser medida a nivel

individual, de población y de especie. (Lowe *et al.* 2004). Se considera que mientras mayor diversidad genética posea una especie, mayor será su capacidad de adaptación a distintas condiciones, por lo que, una especie que exhibe poca diversidad genética es más vulnerable a la extinción.

Las formas de cuantificar la variación genética pueden dividirse en tres categorías: observaciones, suposiciones y similitudes. Los enfoques basados en observaciones son los métodos más simples en la evaluación de la diversidad y típicamente asociadas con medidas de riqueza alélica. Por otro lado las medidas basadas en suposiciones como el equilibrio de Hardy-Weinberg determinan el total de la diversidad genética dentro de una especie y el grado en que esta se fragmenta dentro y entre poblaciones. Los enfoques de similitud están basados sobre el grado en el que son compartidos los alelos entre poblaciones y usualmente están asociados con el análisis de datos dominantes. Los análisis estadísticos de similitud miden el grado de diferencia entre pares de poblaciones o especies (Lowe *et al.* 2004).

Dentro de los métodos con los que se pueden medir la riqueza alélica y que serán utilizados en el presente estudio tenemos:

5.3.1.1 Diversidad genética de Nei.

Diversidad genética de Nei. El termino diversidad genética fue utilizado por primera vez por Nei (1973), sin embargo Marshall y Allard (1970) utilizaron el mismo método para calcular su “índice polimórfico”. La diversidad genética de Nei, toma en cuenta las frecuencias alélicas y consiste en la probabilidad que dos alelos elegidos al azar (o haplotipos) son diferentes en las muestras (Lowe *et al.* 2004). Utilizando la heterocigosidad esperada entre el total de las especies.

Es calculado por el locus como:

$$h = 1 - \sum p_i^2$$

La diversidad genética es sumada de $i=1$ a k , donde p_i es la frecuencia del alelo i th y k es el número de alelos. La diversidad genética h es el promedio sobre todo el loci y en ocasiones es denotado como H (Weising *et al.* 2005).

En el caso de marcadores dominantes con datos bialélicos, la diversidad genética de Nei puede ser también calculada:

$$h = 1 - p_i^2 - q_i^2$$

Donde p representa la frecuencia de los alelos visibles y q es la frecuencia de los alelos nulos para el marcador i (Weising *et al.* 2005).

La diversidad genética de Nei es ampliamente utilizada, sin embargo tiene sus inconvenientes. Por ejemplo, este varía entre 0 y 1, y mientras las frecuencias de alelos en un locus se aproximan a la igualdad, la medida se vuelve menos sensible (Lowe *et al.* 2004).

5.3.1.2 Porcentaje de loci polimórfico (P).

Es una de las medidas que se utilizan frecuentemente para estimar la variación genética presente dentro de una población, se expresa como el porcentaje de todos los loci registrados de en un set de muestras (Weising *et al.* 2005).

Un locus es definido como polimórfico de acuerdo a un criterio predeterminado, por ejemplo, la frecuencia de los alelos más comunes a un locus es <0.95. Esta medida es sensible a la definición arbitraria del criterio. Sin embargo, en literatura contemporánea loci es tratado como polimórfico si exhiben cualquier variación independiente (Lowe *et al.* 2004).

La medida de distancia genética más usada es la distancia de Nei (1973, 1977). Este índice pretende estimar el número de mutaciones que a nivel nucleotídico se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original. La idea (Nei, 1987) es que los diferentes alelos (o la presencia o ausencia de los loci en el caso de marcadores basados en PCR, como RAPD, AFLP Y ISSR) es originada gracias a que un codón (o una base nucleotídica en el caso de marcadores relacionados con el pcr) es distinto. Por lo tanto, a partir de datos de frecuencias alélicas debería ser posible calcular estadísticamente el número promedio de las diferencias en los codones o en las bases nucleotídicas por locus. Dado que este número es una medida directa de las diferencias genéticas entre dos poblaciones, se le considera como una medida de distancia genética (Piñero *et al.* 2008).

La diversidad genética de Nei es ampliamente utilizada, sin embargo tiene sus inconvenientes. Por ejemplo, este varía entre 0 y 1, y mientras las frecuencias de alelos

en un locus se aproximan a la igualdad, la medida se vuelve menos sensible (Lowe *et al.* 2004).

5.3.1.3 Índice de Shannon

El índice de Shannon se basa en la teoría de la información y por tanto en la probabilidad de encontrar un determinado individuo en un ecosistema.

El índice de Shannon toma valores en el rango de cero al infinito, siendo el número de loci muestreado el que determine el límite superior. Sin embargo, los valores pueden estar muy cercanos al promedio estimado a través de los loci. Este índice generalmente es preferido debido a que los resultados tienen una distribución normal, lo que permite aplicar pruebas estadísticas más refinadas a los datos (Lowe *et al.* 2004).

Debido a que éste índice utiliza datos binarios y el número de loci que es tomado en cuenta afecta el valor máximo de la medida, es muy importante que se utilicen números de loci similares si se desean hacer comparaciones válidas. En particular, es necesario considerar los efectos de datos faltantes o equívocos en cada locus cuando se hacen comparaciones entre poblaciones (Lowe *et al.* 2004).

5.3.2 Diferenciación genética

Existe abundante variación geográfica en la morfología y en la frecuencia de genes en la mayoría de las especies. El alcance de la variación geográfica es el resultado de un equilibrio de fuerzas que tienden a producir diferenciación genética local y fuerzas que tienden a producir homogeneidad genética. En una población finita, la mutación, deriva genética y la selección natural favorecen las adaptaciones en condiciones ambientales permitiendo la diferenciación genética de poblaciones locales, mientras que el movimiento de gametos a nivel individual o de poblaciones enteras, llamado flujo genético, se opondrá a esta diferenciación. (Slatkin, 1987)

Existen diferentes métodos para estimar la diferenciación genética:

5.3.2.1 Coeficiente de diferenciación de Nei (G_{ST}).

El total de la diversidad genética (H_T), medida en términos del total de la heterocigosidad esperada, puede ser desglosada con el objetivo de determinar la proporción de la diversidad genética de las especies que están presentes dentro de una población (H_S) y entre poblaciones (D_{ST} , Nei 1973), indicando la diferenciación genética entre poblaciones.

$$H_T = D_{ST} + H_S$$

Estos índices de diversidad (H_T , H_S , D_{ST}) pueden ser utilizados para calcular medidas de diferenciación genética. G_{ST} , es denominado coeficiente de diferenciación genética (Nei, 1973) donde:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Para entender la relación entre H_T , H_S y los estimadores de diferenciación habrá que considerar sus valores máximos y mínimos. En un sistema di alélico, con dos alelos a frecuencias iguales en todas las poblaciones el valor máximo de H_T es 0.5. Si los dos alelos están a frecuencias iguales dentro de una población, entonces el valor máximo de H_S es también 0.5 (Lowe *et al.* 2004).

Si comparamos los valores G_{ST} estos pueden variar entre 0 y 1. G_{ST} es 0 cuando el total de la diversidad genética (H_T) es igual a la heterocigosidad esperada (H_S) en cada población, lo que significa que las frecuencias alélicas son idénticas a través de todas las poblaciones. G_{ST} es 1 cuando el total de la diversidad genética (H_T) es 0, es decir que no hay variación dentro de las poblaciones, pero que dichas poblaciones están fijadas por diferentes alelos y por lo tanto las poblaciones están máximamente diferenciadas y toda la variación detectada está dividida entre las poblaciones (Lowe *et al.* 2004).

5.3.2.2 Flujo Genético

Flujo genético es la proporción de nuevos genes inmigrantes que se mueven a una población dada y puede operar previendo la adaptación a condiciones locales o promoviendo la evolución mediante la difusión de nuevos genes y combinaciones de

genes a través de todo el rango de la especie. El estudio del flujo génico ha sido un tema vital en la biología evolutiva ya que es un componente importante en la estructura de las poblaciones (Eguiarte, *et al.* 2007) Por su naturaleza el flujo genético depende de dos características intrínsecas de los organismos: modo de reproducción y movilidad de los organismos y sus propágalos (mecanismos de dispersión y comportamiento). Para tratar de medir y/o estimar el flujo genético se utilizan métodos directos e indirectos, en el presente estudio nos enfocaremos en los métodos indirectos ya que son los que se han utilizado en análisis moleculares. Estos se basan principalmente en observar la distribución espacial de los alelos en las poblaciones en estudio para hacer inferencias en los niveles o patrones de flujo genético en las poblaciones (Slatkin, 1985)

El método indirecto más comúnmente utilizado se basa en el estadístico F_{ST} de Wright, el cual es una medida de la correlación entre los genes en una subpoblación en relación a la población entera (Slatkin, 1994). Esta medida de diferenciación de la población permite estimar el rango de migración entre poblaciones, asumiendo que estas poblaciones están en equilibrio.

$$F_{ST} = 1/1 + 2Nm$$

Donde N es el tamaño de la población, m es el rango de migración y Nm es el número de individuos migrando por generación.

Usando F_{ST} como una medida de subdivisión de la población y notando que las poblaciones con alta diferenciación deben tener bajos niveles de flujo genético entre ellas a diferencia de aquellas con baja diferenciación, Wright (1931) deriva un parámetro para el flujo genético, número de migrantes por generación, Nm, el cual puede ser calculado directamente del F_{ST} como:

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

La relación entre Nm y F_{ST} es debido que con valores Nm menores a 1, se espera que las poblaciones diverjan genéticamente sobre el tiempo, ya que la deriva actúa en forma casi independientemente en cada población; pero donde Nm es mayor a 1 se espera que las poblaciones conserven conectividad genética, pues el flujo genético sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local (Slatkin, 1994).

5.3.2.3 Estructura Genética (AMOVA)

El método de análisis molecular de varianza fue desarrollado por primera vez por Excoffier *et al.* 1992 como un sistema para analizar datos moleculares que fueran lo suficientemente flexibles a ser aplicados a una amplia variedad de tipos de datos sin violar suposiciones inherentes de muchos otros modelos, como la independencia del loci molecular, la variación debida solamente a la deriva genética o al hecho de que no haya migración (Lowe *et al.* 2004).

El AMOVA, disponible en el programa computacional Arlequín, es generalmente utilizado con datos de marcadores dominantes (Weising *et al.* 2005). Esto debido al hecho de que las frecuencias alélicas no son calculadas (Lowe *et al.* 2004). Este análisis trabaja con distancias entre individuos y calcula la varianza entre y dentro de grupos predefinidos, permitiendo probar varias estructuras genéticas. Los componentes de varianza pueden ser calculados para cada nivel jerárquico. Originalmente, se prefiere el cuadrado de las distancias Euclidianas, pero los resultados son muy similares a los obtenidos con el coeficiente de similitud de Jaccard (Lowe *et al.* 2004).

Los niveles de significancia para AMOVA son computados por permutaciones no paramétricas del set de datos con 1000 permutaciones. Se generan estadísticos- ϕ , los cuales son correlacionados directamente con los estadísticos análogos F y derivados de los componentes de la varianza computados durante el análisis (Lowe *et al.* 2004).

5.3.3 Distancia Genética.

La distancia genética cuantifica el grado de similitud entre dos individuos, o grupos de individuos. Una medida de distancia genética debe ser métrica, es decir: los valores deben ser positivos, simétricos, distintivos y satisfacer la desigualdad triangular. Conceptualmente, la distancia genética mide que tan alejados están dos individuos o poblaciones en un hiperespacio n-dimensional marcado, donde cada eje corresponde a la variación en un marcador individual. Idealmente, el método de distancia genética debe producir valores que varíen entre cero y uno (Lowe *et al.* 2004).

5.3.3.1 Índice de Similitud de Jaccard

Para estimar la distancia genética para datos dominantes se puede hacer uso de la medida de similitud de Jaccard (Lowe *et al.* 2004), el cual confía en el número de bandas registradas entre dos individuos, como una proporción del número total de bandas que estos dos individuos demuestran.

5.3.3.2 Análisis de coordenadas principales (PCO)

Una matriz de presencia-ausencia de bandas de las muestras analizadas puede servir como punto de inicio para las técnicas de ordenamiento. Este tipo de datos de matriz deben ser tratados como datos no paramétricos y pueden ser sujetos a un análisis de coordenadas principales (PCO) y funciones discriminantes. En este tipo de análisis, los datos de la matriz no son derivados de la presencia o ausencia de todas las bandas en todos los OTU's (unidades taxonómicas operacionales), sino más bien las distancias (o similitudes) entre los OTU's. Dado que una matriz de distancia es el punto de inicio PCO no requiere de mucha información, comparado con otros análisis como el de análisis de componentes principales (PCA). Los datos punteados describen una hiperelipsoide en un espacio multidimensional. Para simplificar la descripción de estas nubes de puntos, los ejes principales por la hiperelipsoide son calculados. Un gráfico de dispersión de los datos representa la variación de los niveles de similitud entre las entidades. Uno puede calcular, además, que tan bien fueron agrupadas las muestras de acuerdo a un significado biológico, como la región de origen (Weising *et al.* 2005).

5.3.3.3 Construcción de dendrogramas. (UPGMA)

El objetivo de producir un dendrograma es visualizar la mejor representación de las relaciones fenéticas (sobre toda la similitud) o filogenética (historia evolutiva) entre un grupo denominado unidades de operación taxonómica (OTU's). Dos de los algoritmos de matrices de distancia más utilizados es el llamado UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) y Neighbor-Joining (Lowe *et al.* 2004). UPGMA asume un rígido reloj molecular, lo que significa que los rangos evolutivos a lo largo de todas las ramas del árbol necesitan ser idénticas (Weising *et al.* 2005). Este

método produce un árbol ultra métrico, donde todas las taxa terminales son equidistantes de la raíz. En contraste con el método de Neighbor Joining, donde las distancias a los nodos internos son calculados directamente y no se asume que todos los taxa son equidistantes de la raíz (Lowe *et al.* 2004).

5.3.3.4 Prueba de Mantel

Con el fin de saber si una especie sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir, si existe una correlación entre las distancias geográficas y distancia genética entre los distintos pares de poblaciones se puede hacer una comparación formal con una prueba de Mantel (1967).

Independientemente de la distancia genética empleada y su estandarización, la idea es la misma: si hay una correlación significativa entre las distancias geográfica y genética, existe evidencia de aislamiento por distancia (Slatkin, 1994; Rousset, 2001).

5.4 Estudios de variación genética del género *Pinus*

5.4.1 Estudios Filogenéticos

Aun y cuando los marcadores moleculares RAPD, AFLP e ISSR o los denominados multilocus arbitrarios, han sido cuestionados por la posible falta de homología de bandas co-migrantes entre especies, estos marcadores y específicamente RAPDs han sido ampliamente utilizados en el género *Pinus* para analizar las relaciones filogenéticas entre especies cercanas, obteniendo suficiente información para discriminar entre taxa estrechamente relacionados. Por ejemplo el estudio llevado a cabo en cuatro especies de pinos Mexicanos, *Pinus strobiformis*, *P. ayacahuite*, *P. lambertiana* y *P. chiapensis* (Castro-Félix *et al.* 2008) en donde estudian la relación filogenética entre los taxa, encontrando que *P. strobiformis* y *P. ayacahuite* son las especies mas relacionadas, seguidas por *P. lambertiana* y que la especie más distante genéticamente es *P. chiapensis*.

En este mismo contexto filogenético, Favela (2005) utiliza el marcador molecular de RAPD para diferenciar taxonómicamente a cuatro especies de pinos piñoneros

presentes en la Sierra Madre Oriental que son y han sido controversiales desde un punto de vista taxonómico (*P. catarinae* de *P. remota* y *P. johannis* de *P. cembroides* var. *bicolor*). En sus resultados obtenidos reporta que *P. catariane* es sinónimo de *P. remota* al igual que *P. johannis* de *P. cembroides* var. *bicolor*, esto de acuerdo a la cercanía genética y a los alelos compartidos entre sus poblaciones.

En otro estudio realizado en el oeste de Estados Unidos de Norteamérica en donde se investigó la relación evolutiva entre las subespecies de *P. contorta* subsp. *latifolia* y la subsp. *controta* y la existencia de un posible refugio glacial utilizando la técnica de RAPD (Fazekasy Yeh 2006), encontraron que existe un importante patrón de aislamiento por distancia en las poblaciones analizadas, sin embargo los resultados no muestran evidencia para una posible separación de las subespecies de *P. contorta* dado que las subespecies no han estado lo suficientemente aisladas unas de otras como para que se presente una divergencia genética.

Utilizando el marcador molecular de AFLP se llevó a cabo un estudio muy completo sobre el género emblemático de *Araucaria* en Nueva Caledonia (Gaudeul, M. *et al.* 2012). Se incluyeron en el estudio a 13 especies en cuales se analizó: la filogenia, la distribución de la variación genética de las especies, se delinearon los grupos estrechamente relacionados y se correlacionó la proximidad evolutiva de las especies con parámetros morfológicos, ecológicos y geográficos, además identificaron las variables intrínsecas y extrínsecas que pudieron haber llevado a los eventos de especiación de los taxa. Dentro de los resultados obtenidos reportan una divergencia genética baja entre las especies sugiriendo una diversificación reciente en lugar de la pre-existente de Gondwana; identifican tres grupos taxonómicos, pero no detectan asociaciones con parámetros bióticos e identifican eventos de especiación como adaptación y vicarianza en las poblaciones. Algo importante de resaltar es que mencionan, que utilizaron métodos estadísticos-genéticos robustos que ayudaran a contrarrestar los argumentos en contra del uso de este tipo de marcadores moleculares.

5.4.2 Estudios de genética de poblaciones

La técnica de RAPD previamente ha mostrado ser un marcador molecular útil, aportando valiosa información sobre la estimación de la distribución y cantidad de

variación genética contenida en las poblaciones, en cuantificar el grado de similitud y estructura genética de poblaciones y especies, por lo que variados y recientes estudios de este tipo y con estos objetivos se han llevado a cabo dentro del género *Pinus* en especies Mexicanas.

Dado que *P. chaipensis* es una especie altamente fragmentada en el Sur de México debido al impacto humano y una alta sobre explotación para uso maderable, Newton, et al 2002, evaluó la variación genética dentro y entre sus poblaciones, encontrando una alta diferenciación entre sus poblaciones, lo cual se interpreta como un posible aislamiento reproductivo entre las poblaciones, o que han estado aisladas en el pasado.

Otro estudio similar fue en donde se estimaron los niveles de variación y diferenciación genética de las poblaciones de *P. ayacahuite* (Castro-Félix, et al. 2006) mencionando que los valores encontrados de diversidad genética de la especie están dentro de los rangos reportados para otras especies de pinos. También se han realizado estudios similares en especies que ocurren en los Bosques de Europa por ejemplo *P. nigra* (Rubio-Moraga et al. 2012), *P. brutia* (Kurt et al. 2011), *Picea asperata* (Xue et al. 2006), *P. squamata* (Zhi-Yong Zhang et al. 2005), en todos ellos se han reportado valores similares de variación y diferenciación genética entre sus poblaciones, lo cual obedece al hecho de que estas especies son características de generaciones considerables y la dispersión del polen y semillas es a largas distancias.

5.4.3 Estudios genéticos del grupo Cembroides

Especies de pinos con distribuciones restringidas o endémicas a México y algunas de ellas representadas en poblaciones pequeñas y categorizadas en peligro, amenazadas o en riesgo han sido también estudiadas desde un punto de vista genético y con la técnica de RAPD. De estas especies se ha evaluado por un lado que tan distantes están genéticamente sus poblaciones unas de otras, para con esto inferir el grado de aislamiento o el poco flujo genético entre ellas y por el otro, su cercanía genética lo cual indica más entrecruzamiento y por lo tanto menos aislamiento. También se han estudiado para demostrar las hipótesis de poblaciones fragmentadas y constatar si el hecho de que se distribuyan en topografías homogéneas con la presencia de barreras

físicas como montañas limita el flujo genético e influye en la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones.

Dos poblaciones de *P. culminicola* han sido estudiadas por Favela (2010), en donde estima la variación genética de la especie y se pregunta si existe flujo genético entre sus poblaciones. Concluye que aun y cuando las poblaciones son restringidas y aisladas en la Sierra Madre Oriental aún existe flujo genético entre ellas.

De la misma manera y utilizando los marcadores moleculares de isoenzimas ha sido evaluada la especie endémica a México de *P. rzedowskii* encontrando afortunadamente valores de variación genética y estructura genética de sus poblaciones acordes a otros valores reportados en especies del género *Pinus* y en otras especies del grupo de las coníferas (Delgado *et al.* 1999).

Dado que la especie de *Pinus pinceana* es de interés para los investigadores y que ha sido categorizada como endémica, relictiva y sujeta a protección, sus poblaciones han sido estudiadas desde diversos puntos de vista. Mencionaremos en este momento algunos y más adelante daremos más detalles de la especie. Ledig *et al.* (2001) estudia a *P. pinceana* y a su especie hermana *P. maximartinezii* con los marcadores de isoenzimas en 7 poblaciones de *P. pinceana* y la única población de *P. maximartinezii* reportada para ese año. Evaluaron la diversidad y estructura genética de sus poblaciones, encontrando niveles altos de diversidad genética, poblaciones fuertemente diferenciadas dada la fragmentación de sus poblaciones y como un primer paso plantean medidas de conservación para las especies. Además buscan obtener más información con respecto a la relación hermana-evolutiva y sugiere que *P. maximartinezii* es el progenitor de *P. pinceana*.

Al mismo tiempo se lleva a cabo un estudio con marcadores de isoenzimas de tres especies “raras” Mexicanas de pinos (Molina - Freaner *et al.* 2001) en donde incluyen entre ellas a *P. pinceana*. Analizan la estructura genética de las poblaciones y reportan nivel altos de variación genética y una marcada diferenciación genética entre las poblaciones; mencionan que estos valores son mayores a los reportados en otras coníferas con rangos de distribución restringidos y sugieren estrategias de conservación para estas especies “raras” de pinos.

En estudios posteriores Ramírez Herrera (2007) comprueba el alto grado de diferenciación entre poblaciones de *P. pinceana* al analizar los índices de diversidad genética de 13 poblaciones utilizando 19 aloenzimas obteniendo también resultados altos en el porcentaje de polimorfismo (73%), F_{st} (0.165) y en el índice de heterocigosis (0.23).

En otro contexto pero de suma importancia es el trabajo que se llevó a cabo por Villarreal Quintanilla *et al.* (2009), en donde realiza un estudio florístico en 14 poblaciones de *Pinus pinceana* y concluye que de acuerdo a su composición florística y de distribución las comunidades se pueden separar en dos conjuntos de poblaciones las más norteñas, localizadas en Coahuila, Zacatecas y San Luis Potosí y las de la región sur en Querétaro e Hidalgo, detalla florísticamente a cada una de las poblaciones.

6 METODOS.

6.1 Material biológico

Para este estudio se analizaron 6 poblaciones (Tabla 1) que representan la distribución del Norte de México (Figura 4) específicamente aquellas que se distribuyen en los estados de Zacatecas, Coahuila y la recientemente encontrada para el estado de Nuevo León (Favela, 2009). Las coordenadas registradas para cada población se obtuvieron con la ayuda de un Geoposicionador (GPS) y con cartas geográficas escala 1:250,000 del INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática).

Tabla 1. Lista de poblaciones de *Pinus pinceana* muestreadas en la Sierra Madre Oriental.

	Localidad	Coordenadas		Altitud Msnm
		N	W	
1	La Noria, Cuatro Ciénegas, Coahuila.	25° 23' 08"	101 ° 10'03"	2050
2	La Palmosa, Cuatro Ciénegas, Coahuila.	25 ° 17'29"	101 ° 10'03"	2340
3	La Casita, Parras, Coahuila.	25 ° 15'08"	101 ° 34'08"	2200
4	El Jaralito, Gral. Cepeda, Coahuila.	26 ° 59'04"	102 ° 13'10"	2500
5	Cañón del Moroso, Santa Catarina, Nuevo León.	25 ° 15'10"	100 ° 54'18"	1500
6	Las Lajas, Concepción del Oro, Zacatecas.	24° 33'35"	101° 26'25"	2400

Dentro de cada localidad se seleccionaron 30 individuos espaciados cada 10 metros (Figura 5), de los cuales se tomaron manualmente 10 gr de hojas maduras y se almacenaron en bolsas de plástico con 10g de sílica gel. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Ecología Molecular, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en donde fueron almacenadas para ser procesadas posteriormente.

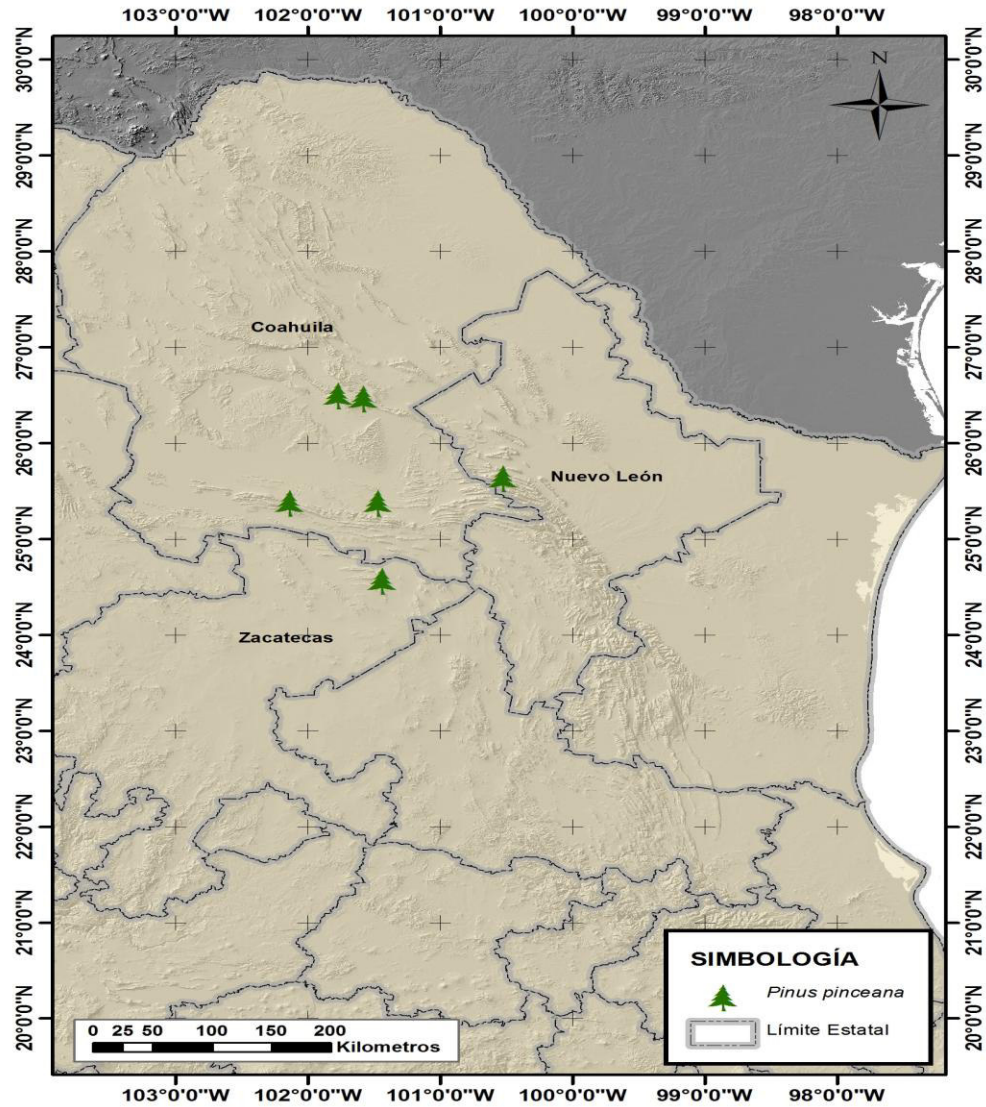


Figura 4. Poblaciones muestreadas de *Pinus piceana* en la Sierra Madre Oriental.



Figura 5. Muestreo de *Pinus piceana* en la Sierra Madre Oriental.



Figura 6. Población de *Pinus pinceana*, La Noria, Cuatro Ciénegas, Coahuila.

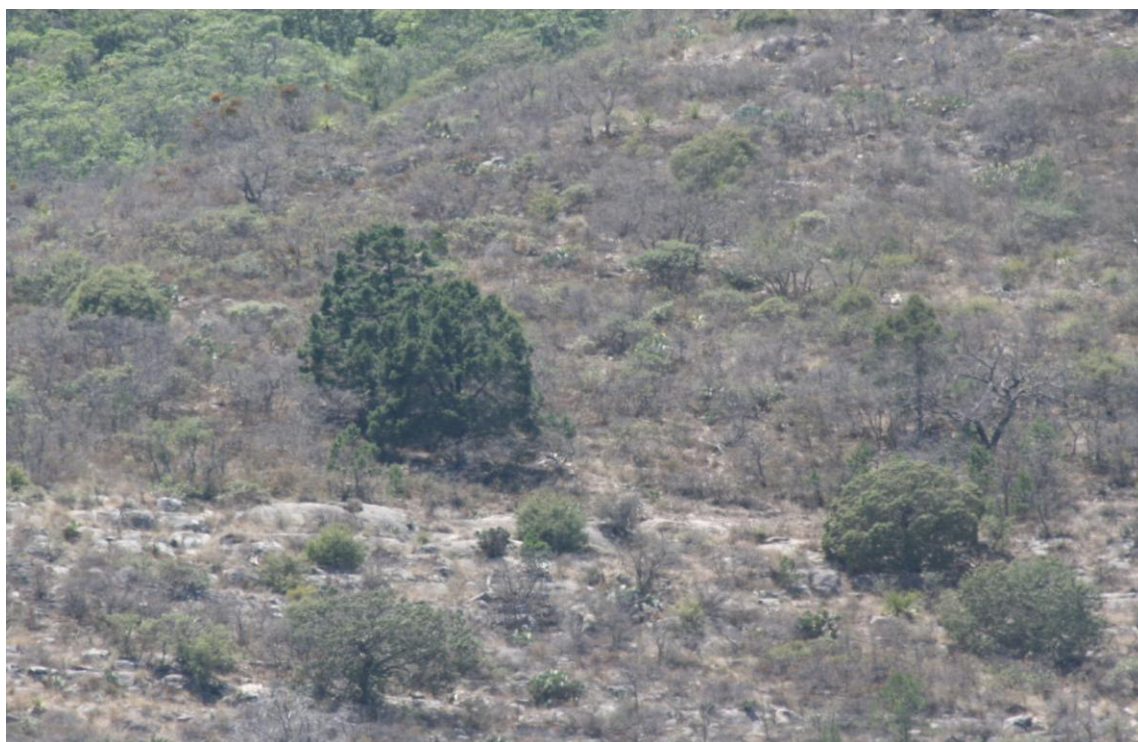


Figura 7. Árbol maduro de *Pinus pinceana*, en La Noria, Cuatro Ciénegas, Coahuila.



Figura 8. Población de *Pinus pinceana*, de La Palmosa, Cuatro Ciénegas, Coahuila.



Figura 9. Árboles maduros de *Pinus pinceana*, de La Palmosa, Cuatro Ciénegas, Coahuila.



Figura 10. Población de *Pinus pinceana*, de La Casita, Parras, Coahuila.



Figura 11. Arboles maduros de *Pinus pinceana*, de La Casita, Parras, Coahuila.



Figura 12. Población de *Pinus pinceana*, de El Jaralito, General Cepeda, Coahuila.

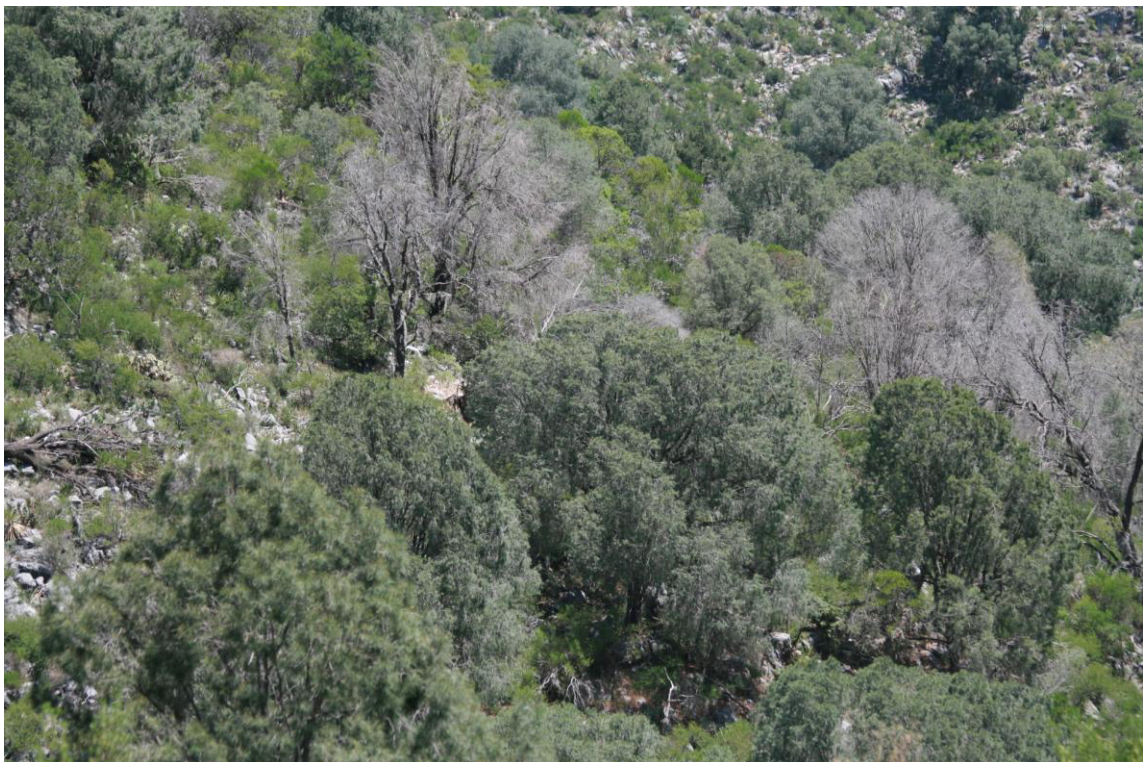


Figura 13. Árboles maduros de *Pinus pinceana*, de El Jaralito, General Cepeda, Coahuila.



Figura 14. Población de *Pinus pinceana*, Cañón del Moroso, Santa Catarina, Nuevo León.



Figura 15. Árboles maduros de *Pinus pinceana*, Cañón del Moroso, Santa Catarina, Nuevo León.



Figura 16. Población de *Pinus pinceana*, Las Lajas, Concepción del Oro, Zacatecas.



Figura 17. Árbol maduro de *Pinus pinceana*, Las Lajas, Concepción del Oro, Zacatecas.

6.2 Extracción de ADN.

El ADN se extrajo de 1 gr. de hojas secas (Figura 18) de los 30 individuos colectados en cada una de las poblaciones, siguiendo el método de Doyle & Doyle (1990) con adición de acetato de amonio para remover los excesos de carbohidratos (Hollingswoth et. al. 1999).

Se llevó a cabo la cuantificación y se determinó la calidad de cada una de las muestras del ADN en un NanoDrop 2000® (UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific) a 260 nm de absorbancia.



Figura 18. Extracción de DNA de muestras de *Pinus pincea*.



Figura 19. Electroforesis en gel de Agarosa de *Pinus pincea*.

6.3 Análisis de RAPD

6.3.1 Selección de Oligonucleótidos o primers.

Para seleccionar los primers a utilizar en todas las muestras se probaron 15 decanonucleótidos de secuencia arbitraria de las series A, B, C, G Y P de Operon[®] para RAPD, usando para ello dieciséis individuos escogidos de los 180 existentes (Tabla 2), de los cuales finalmente fueron seleccionados 6 que mostraron patrones de bandeos claros y reproducibles para poder llevar a cabo los análisis correspondientes (Tabla 3).

Tabla 2. Secuencias de primers para RAPD analizados en este estudio.

Clave	Secuencia de 5' a 3'	Clave	Secuencia de 5' a 3'	Clave	Secuencia de 5' a 3'
OPA-07	GAAACGGGTG	OPB-04	GGACTGGAGT	OPG-12	CAGCTCACGA
OPA-08	GTGACGTAGG	OPC-06	GAACGGACTC	OPP-11	AACGCGTCGG
OPA-11	CAATCGCCGT	OPG-05	CTGAGACGGA	OPP-12	AAGGGCGAGT
OPA-20	GTTGCGATCC	OPG-06	GTGCCTAACC	OPP-14	CCAGCCGAAC
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPG-09	CTGACGTCAC	OPP-17	TGACCCGCCT

Tabla 3. Secuencias de primers y número de fragmentos amplificados de RAPD utilizados para escanear el ADN de poblaciones de *Pinus pinceana*.

Primer	Secuencia de 5' a 3'	Numero de fragmentos amplificados
OPA-07	GAAACGGGTG	12
OPA-08	GTGACGTAGG	12
OPA-11	CAATCGCCGT	12
OPC-06	GAACGGACTC	10
OPG-09	CTGACGTCAC	14
OPP-11	AACGCGTCGG	16

6.3.2 Condiciones de PCR.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25µl y la mezcla consistió de los siguientes reactivos: 20ng de ADN genómico en buffer 1X (Invitrogen 10X) con 2.5mM MgCl₂, 0.2nM dNTP's, 0.5µM de primer, 2% formamida, 1Unidad Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Incluyendo un tubo control sin DNA genómico y con todos los componentes de la reacción para de esta forma descartar la contaminación.

La amplificación del ADN se llevó a cabo utilizando un termociclador programable (Thermo Electron Px2 Thermal Cycler PCR PCYL220 Issue 1, HBPX2110). Las condiciones de reacción para RAPD que se utilizaron fueron: 94°C (2 min) para la separación inicial de las cadenas de ADN, posteriormente se agregaron 2 ciclos donde la temperatura de alineamiento de la reacción decreció 2°C cada ciclo, luego 41 ciclos de 93°C (30 seg), 35°C (1 min), 72° C (2 min) y 72° C (5 min) para la extensión final.

6.3.3 Detección y procesamiento de productos de PCR con RAPD.

Las amplificaciones se realizaron de forma replicada para cada primer y cada población, siguiendo el protocolo estandarizado. Las muestras de ADN de cada una de las poblaciones se colocaron intercaladas en los geles de agarosa. Los productos amplificados fueron separados en electroforesis de gel de agarosa al 1.8% en buffer TBE 1x, incluyendo en cada gel en el primer y último carril un marcador de ADN de peso molecular conocido (100bp DNA Ladder, Invitrogen).

Para monitorear la migración de las bandas de ADN se adiciono azul de bromofenol, que migra con los fragmentos de 0.5 Kb, al cargar cada una de las muestras en el gel que posteriormente se pasaron a una cámara de electroforesis (Figura 19) con una diferencia de potencial constante de 135 voltios durante 2 hr 30 min.

Los geles posteriormente fueron teñidos colocándolos por 15 min en Buffer SB 1X con Bromuro de etidio y finalmente los patrones de bandeo fueron visualizados bajo luz UV donde se fotografiaron en un transiluminador (MultiDoc-It™ Imaging System, UVP®, USA).

6.3.4 Análisis de Datos

Con el patrón de bandas obtenidos por la separación durante la electroforesis de los diferentes fragmentos amplificados se construyó una matriz presencia-ausencia, registrándose visualmente como bandas presentes (1) que serían todos los homocigotos dominantes (AA) y heterocigotos (Aa) y bandas ausentes como (0) que serían homocigotos recesivos (aa) y se desarrollaron matrices binarias, para cada primer cada población mencionados, que posteriormente se utilizaron para estimar la variabilidad genética y estructura de las poblaciones de *P. pinceana* (APÉNDICE).

Cada banda fue considerada como un locus con dos alelos, el alelo dominante sería el que amplifica mientras que el recesivo sería el alelo nulo que no amplifica.

6.3.4.1 Medidas de Diversidad Genética

Se registró la variación genética en una matriz binaria (presencia – ausencia) para cada una de las poblaciones (Apéndice).

Se usaron tres estimadores para registrar la variación genética: % de loci polimórficos (P), Índice de Diversidad de Shannon (S) y Diversidad genética (H). Se analizaron utilizando el programa POPGENE ver.32 (Yeh *et al.* 1997).

6.3.4.1.1 Diversidad genética de Nei.

La diversidad genética h es el promedio sobre todo el loci y en ocasiones es denotado como H (Weising *et al.* 2005).

En el caso de marcadores dominantes con datos bialélicos, la diversidad genética de Nei puede ser también calculada:

$$h = 1 - p_i^2 - q_i^2$$

Donde p representa la frecuencia de los alelos visibles y q es la frecuencia de los alelos nulos para el marcador i (Weising *et al.* 2005).

La diversidad genética de Nei es ampliamente utilizada, sin embargo tiene sus inconvenientes. Por ejemplo, este varía entre 0 y 1, y mientras las frecuencias de alelos en un locus se aproximan a la igualdad, la medida se vuelve menos sensible (Lowe *et al.* 2004).

6.3.4.1.2 Porcentaje de loci polimórfico (%P).

El porcentaje de loci polimórfico fue calculado para cada población. Es una de las medidas que se utilizan frecuentemente para estimar la variación genética presente dentro de una población, se expresa como el porcentaje de todos los loci registrados de un set de muestras (Weising *et al.* 2005).

P = porcentaje de loci polimórfico, ignora la variación en frecuencias dentro de cada locus polimórfico.

Se estima como:

$P = N^{\circ} \text{ de loci polimórfico} / N^{\circ} \text{ total de loci analizados.}$

6.3.4.1.3 Índice de Shannon (I)

El índice de diversidad de Shannon (Lewontin, 1972) utilizado para cuantificar los niveles de variación genética dentro de cada población.

Se calcula de la siguiente forma:

$$S = -\sum p_i \log_2(p_i)$$

Donde p_i es la frecuencia presencia y ausencia de cada locus. El S_{pop} fue calculado como el valor medio de S en toda la muestra de la población.

6.3.4.2 Medidas de diferenciación genética

Cuando las poblaciones se dividen, eventualmente se diferencian genéticamente. Existen parámetros que nos ayuda a determinar el grado de diferenciación genética entre las poblaciones y, de alguna manera es un reflejo del aislamiento que existe entre ellas.

6.3.4.2.1 Coeficiente de diferenciación de Nei (G_{ST}).

El estadístico de la diversidad genética de Nei fue utilizado también para calcular la diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}). Utilizado para determinar la proporción de la diversidad genética de las especies que están presentes dentro de una

población (H_S) y entre poblaciones (D_{ST} , Nei 1973), indicando la diferenciación genética entre poblaciones.

$$G_{st} = D_{st}/H_t$$

Donde D_{st} es la diversidad genética encontrada entre las poblaciones y H_t es la diversidad genética total. (Lowe *et al.* 2004)

6.3.4.2.2 Flujo genético (F_{st} de Wright y el coeficiente de migración (N_m)).

F_{st} mide la variación de frecuencia alélica entre poblaciones, por lo tanto la diferenciación genética entre ellas.

$$F_{st} = (H_t - H_s)/H_t$$

Donde H_t es el promedio de heterocigocis esperada en la población total, para todos los loci, y H_s es el promedio de heterocigocis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci

6.3.4.2.3 Coeficiente de migración (N_m)

La cantidad de flujo genético entre todas las poblaciones fue calculada usando N_m , (utilizando POPGENE versión 32, Yeh *et al.* 1997) medida que resulta fácil de calcular y conceptualmente útil, es la multiplicación del tamaño efectivo (N_e) por la tasa de migración (m), y nos habla del número de “migrantes efectivos”. Si N_m o el número de migrantes efectivos es mayor que 1, teóricamente el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local. Si N_m es menor que 1 entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones, y si es mayor de 4 entonces las poblaciones se comportan como una gran población más o menos panmíctica. La cantidad de flujo genético entre poblaciones fue calculada usando $N_m = (0.5 (1 - G_{st}))/G_{st}$ (McDermott and McDonald, 1993).

6.3.4.3 Medidas de la Estructura Genética.

Para analizar la estructura de la población se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) esto para evaluar la variación entre y dentro de las poblaciones

utilizando el programa Arlequín (Schneider et al., 2000). Con base al patrón de agrupamiento entre las poblaciones, generado tanto en el gráfico de coordenadas principales como el dendrograma (UPGMA) con el objetivo de calcular los componentes de la varianza dentro y entre las poblaciones de estudio.

Los niveles de significancia para AMOVA son computados por permutaciones no paramétricas del set de datos con 1000 permutaciones. El programa de Arlequin genera un estadístico Φ (Ecoffier et al. 1992), los cuales son correlacionados directamente con los estadísticos análogos F y derivados de los componentes de la varianza computados durante el análisis (Lowe et al. 2004). Este método ha sido ampliamente utilizado con datos de RAPD (Favela, 2010).

6.3.4.4 Medidas de distancia genética.

La distancia genética cuantifica el grado de similitud entre dos individuos, o grupos de individuos. Una medida de distancia genética debe ser métrica, es decir: los valores deben ser positivos, simétricos, distintivos y satisfacer la desigualdad triangular. Conceptualmente, la distancia genética mide que tan alejados están dos individuos o poblaciones en un hiperespacio n-dimensional marcado, donde cada eje corresponde a la variación en un marcador individual. Idealmente, el método de distancia genética debe producir valores que varíen entre cero y uno (Lowe et al. 2004).

También se utilizan las distancias genéticas entre pares de poblaciones para reconstruir las genealogías de poblaciones, ya sea mediante métodos de agrupamiento como el *Unweighted Pair-Groups Method with Arithmetic Averages* (UPGMA) o *Neighbor-joining* (Piñero et al. 2008).

Por tanto, a partir de la matriz binaria se calculó la distancia genética (Jaccard). La matriz de distancia genética generada fue sujeta a un análisis de Coordenadas Principales (PCO) en el programa PAST ver.3 (Hammer et al. 2001), el cual produce una representación visual de la relación genética dentro y entre las poblaciones.

Además se construyó un dendrograma utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages) basado en la distancia genética de pares (Nei, 1972) en PHYLIP versión 3.5 (Felsenstein, 1993).

6.3.4.5 Medidas de distancia geográfica

Para calcular la distancia lineal que separa a las poblaciones muestreadas, se construyó una matriz con las coordenadas en grado de latitud y longitud (obtenidas con un GPS), las cuales se transforman de grados a kilómetros. Ya con la ubicación de las coordenadas en kilómetros se logra establecer las distancias entre pares de poblaciones. (www.tutiempo.net/p/distancias/calcular_distancias.html).

6.3.4.6 Aislamiento por distancia (Prueba de Mantel)

Además las distancias genéticas entre pares de poblaciones se puede utilizar para el análisis de aislamiento por distancia, graficando las distancias genéticas pareadas como función de la distancia geográfica que separa a las poblaciones, bajo el supuesto de que las diferencias genéticas se incrementan con la distancia que las separa, con una transformación logarítmica y usualmente analizando la confiabilidad con una prueba de Mantel (Piñero *et al.* 2008).

Con el fin de saber si una especie sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir, si existe una correlación entre las distancias geográficas y las genéticas entre los distintos pares de poblaciones se puede hacer una comparación formal con una prueba de Mantel (Smouse *et al.* 1986). La distancia genética puede ser directamente la distancia genética de Nei, o con las estimaciones de Nm pareadas (M) en logaritmo que recomienda Slatkin (1993, 1994) o seguir la sugerencia de Rousset (2001) y graficar

$$F_{st} / 1 - F_{st}.$$

Dado lo anterior para estimar el aislamiento por distancia se utilizó la prueba de Mantel (1967), la cual nos permitió evaluar la correlación entre la distancia genética, dada por el estadístico de Nei (1972) y la distancia geográfica. Para dicho análisis se utilizó el programa XLSTAT versión 2012.

7 RESULTADOS.

7.1 Colecta de material biológico

Se colectaron 30 individuos en cada una de las 6 poblaciones de *Pinus pinceana* analizando un total de 180 individuos distribuidos, en la franja norte, dentro del rango de distribución geográfica de la especie.

7.2 Extracción de DNA

Se aisló el ADN de cada uno de los individuos de las 6 poblaciones de *Pinus pinceana*, generando un total de 180 muestras con concentraciones entre 200 – 1000 ng/ μ l y una pureza de 2.00. la Figura 20 muestra la extracción de ADN a partir de las hojas colectadas.

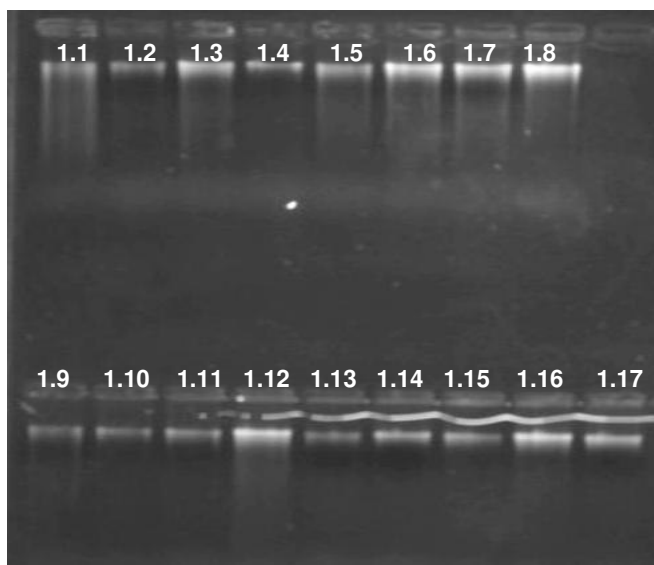


Figura 20. Gel de agarosa 1.8%, mostrando la extracción de ADN de *Pinus pinceana*.

7.3 Amplificación con marcadores RAPD.

De los 15 primers probados, 6 produjeron patrones reproducibles de bandas de fácil resolución, los cuales se utilizaron con 168 individuos muestreados. Estos 6

primers generaron un total de 76 bandas con tamaños que variaron de 1500 a 250 pb. Se obtuvo un rango de bandas de 10 – 16 por primers. En la Tabla 4 Puede observarse el número de bandas obtenidas y el polimorfismo encontrado por cada primer.

Tabla 4. Lista de primers y sus secuencias, numero de productos amplificados y polimorfismo total.

Clave	Secuencia de 5' a 3'	Productos amplificados	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas	Polimorfismo total (%)
OPA-07	GAAACGGGTG	12	12	0	100.0
OPA-08	GTGACGTAGG	12	12	0	100.0
OPA-11	CAATCGCCGT	12	12	0	100.0
OPC-06	GAACGGACTC	10	9	1	90.0
OPG-09	CTGACGTCAC	14	12	2	85.7
OPP-11	AACGCGTCGG	16	15	1	93.8
					94.9

Los patrones de bandeo generados a partir de las amplificaciones con los 6 marcadores RAPD en *Pinus pinceana* se muestran en las figuras 21 – 26.

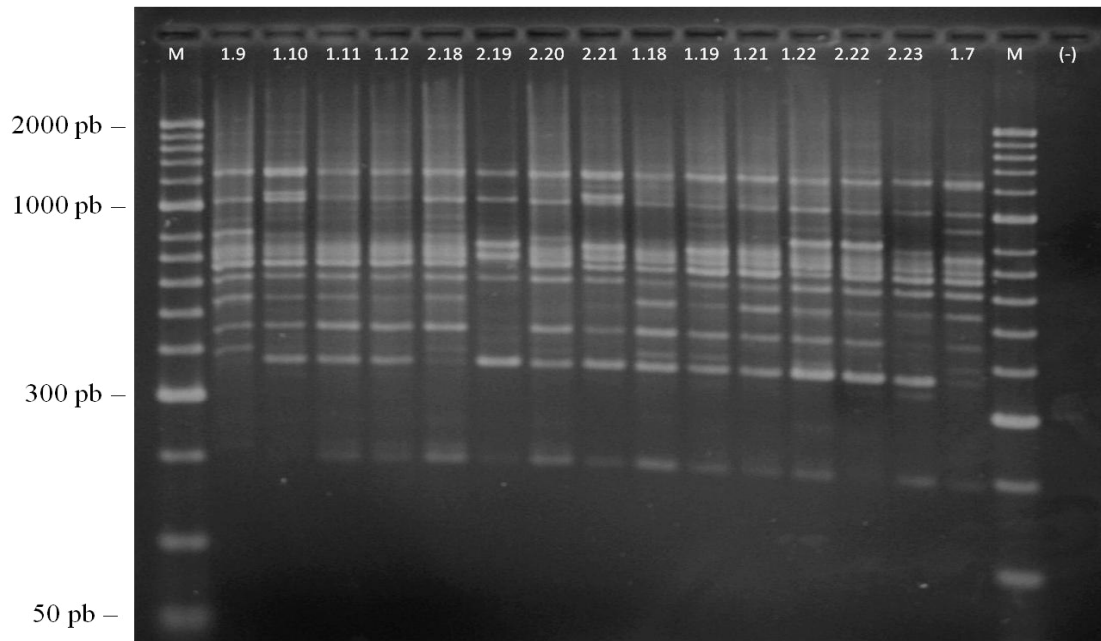


Figura 21. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPA-07 en *P. pinceana*. (M): marcador de peso molecular, (1.9 – 1.7): muestras de *Pinus pinceana* y (-): control negativo de la reacción de PCR.

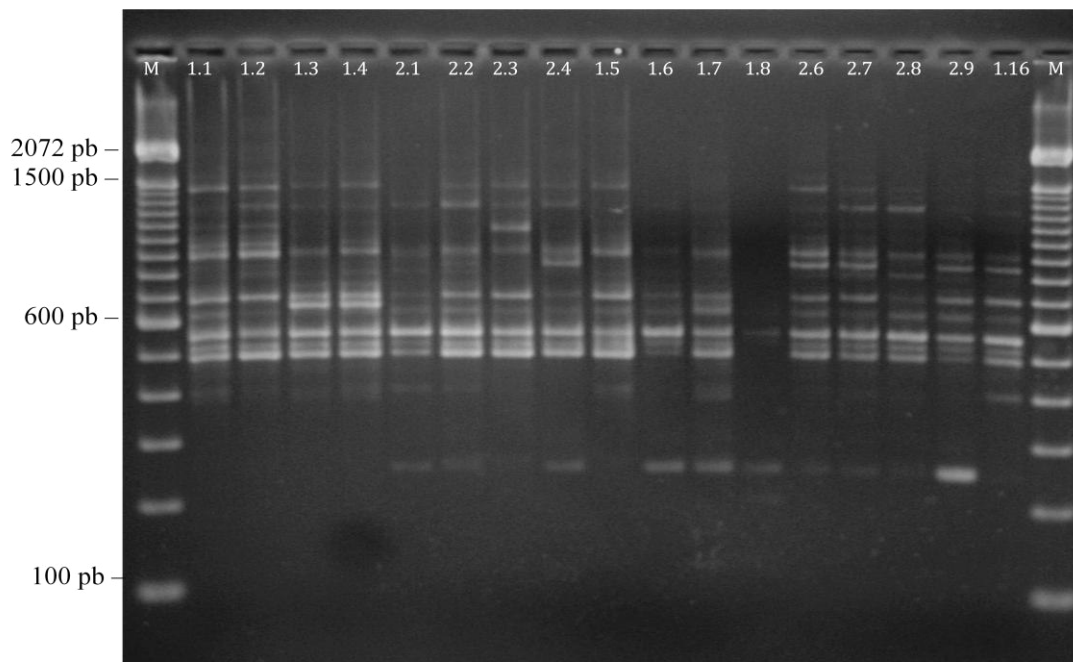


Figura 22. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPA-08 en *P. pinceana*. (M): marcador de peso molecular, (1.1 – 1.16): muestras de *Pinus pinceana*.

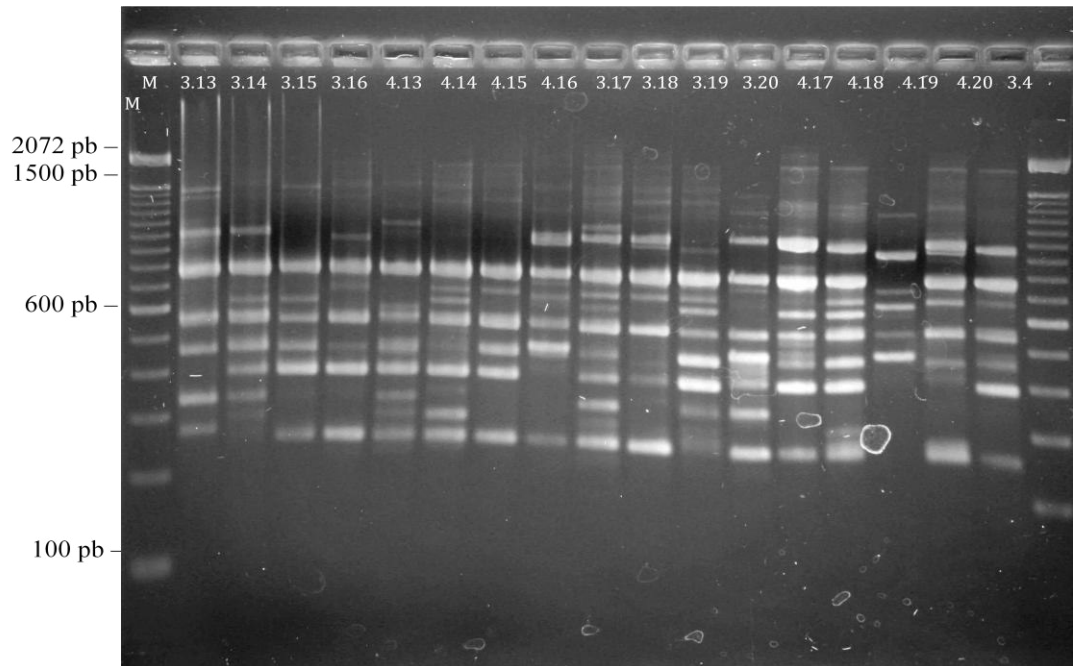


Figura 23. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPA-11 en *P. pinceana*. (M): marcador de peso molecular, (3.13 – 3.4): muestras de *Pinus pinceana*.

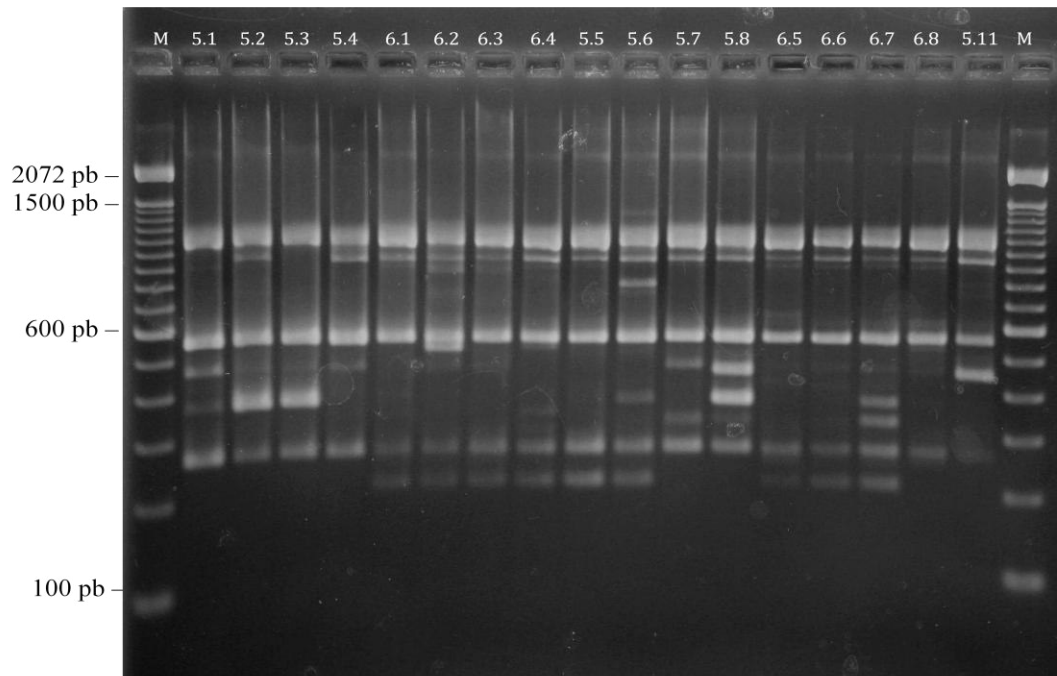


Figura 24. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPC-06 en *P. pinceana*. (M): marcador de peso molecular, (5.1 – 5.11): muestras de *Pinus pinceana*.

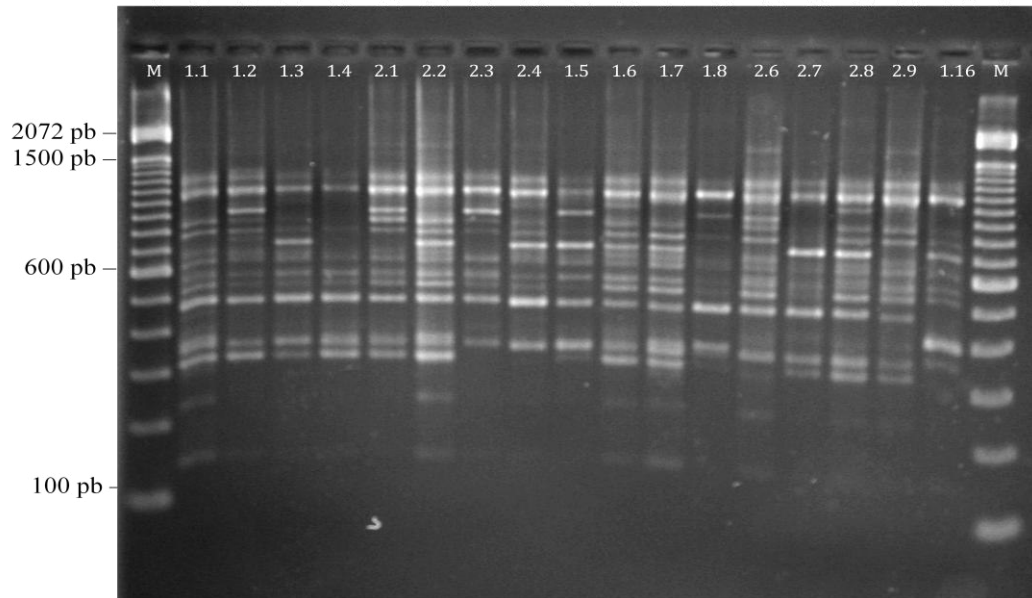


Figura 25. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPG-09 en *P. pinceana*. (M): marcador de peso molecular, (1.1 – 1.16): muestras de *Pinus pinceana*.

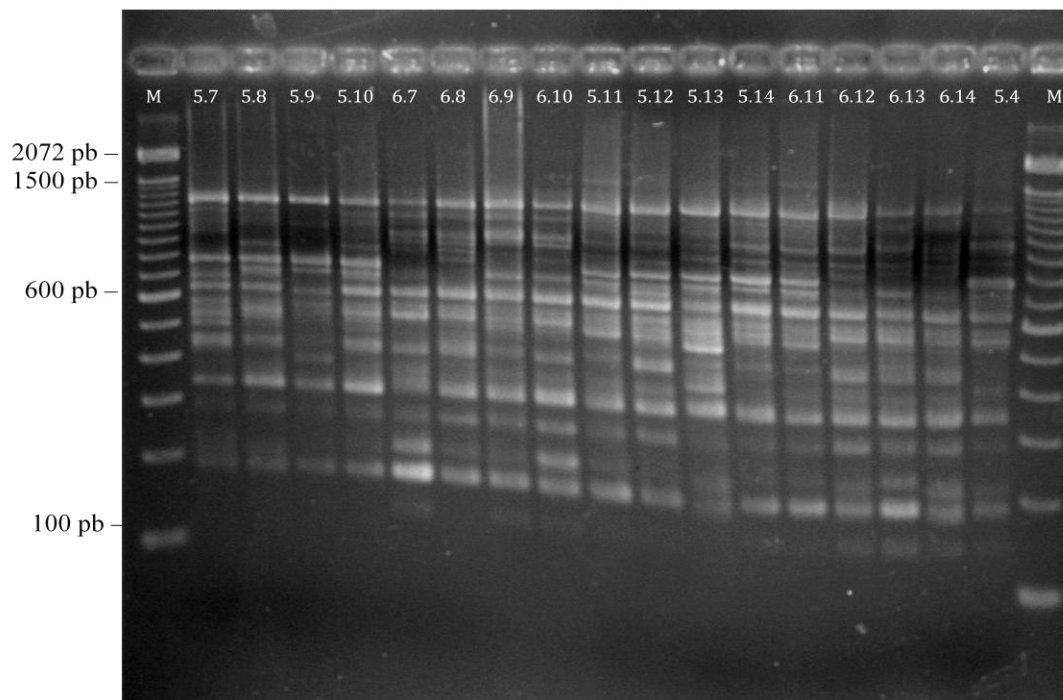


Figura 26. Gel de agarosa 1.8%, que muestra los productos de amplificación con primer OPP-11 en *P. pinceana*. (M): marcador de peso molecular, (5.7 – 5.4): muestras de *Pinus pinceana*.

7.4 Análisis de datos.

7.4.1 Diversidad Genética.

Los análisis de diversidad, diferenciación, estructura y distancia genética se realizaron de un total de 180 individuos, distribuidos en 6 poblaciones y analizados 6 primers los cuales resultaron polimórficos (Tabla 4) y por lo tanto informativos sobre la variación de las poblaciones nortehñas de *Pinus pinceana* estudiadas.

Para determinar la Diversidad Genética entre las poblaciones se utilizó el índice de diversidad genética de Nei (H) en donde la variación total fue de 0.3262, siendo las poblaciones con mayor diversidad las de La Noria y La Palmosa (0.2993 y 0.2971) seguidas por las de General Cepeda y Santa Catarina (0.2787 y 0.2745) y las de menor diversidad las de Parras y El Pabellón (0.2577 y 0.2501).

Otro índice de diversidad estimado fue el Índice de Shannon (I= 0.48), encontrando resultados comparables con el índice de Nei (Tabla 5), siendo las poblaciones de Cuatro Ciénegas, Coahuila las que presentaron una diversidad más alta y la población del Pabellón, Zacatecas la menor.

Tabla 5. Estimadores de diversidad genética para cada una de las 6 poblaciones de *Pinus pinceana*, en México a partir de RAPD.

Población	N	Diversidad genética (H)	Índice de Shannon (I)	Porcentaje de loci polimórfico (P)
La Noria	30	0.2993	0.44	84.21
La Palmosa	30	0.2971	0.43	77.63
La Casita	30	0.2577	0.39	78.95
El Jaralito	30	0.2787	0.41	78.95
Cañón del Moroso	30	0.2745	0.41	81.58
Las Lajas	30	0.2501	0.37	76.32
Total	180	0.3262	0.48	94.74

N: Número de individuos utilizados en el análisis de cada población.

Por otro lado también se evaluó el porcentaje de loci polimórficos (P) entre poblaciones encontrando un rango entre 77.63 – 84.21%, siendo la población de La

Noria, Coahuila con mayor polimorfismo y la menos polimórfica la de Las Lajas, Zacatecas, todas mostraron una media de 79.60% de polimorfismo.

Finalmente es importante mencionar que las poblaciones que mantienen los valores de diversidad más altos son las de La Noria y La Palmosa, en Cuatrociénegas, Coahuila, ambas poblaciones se encuentran en la franja más norteña o septentrional de la distribución de *P. pinceana*.

7.4.2 Diferenciación Genética

También partiendo de los estimados de diversidad de Nei (1972) fue posible calcular el coeficiente de diferenciación genética (G_{st}) entre las poblaciones, el cual describe como la variación encontrada, es repartida entre las poblaciones en estudio. El valor encontrado G_{st} fue de 0.15, recordando que este valor va de 0 a 1. En donde 0 implica que comparten más material genético y cuanto más se apege a 1 comparten menos material genético.

Los valores del número de migrantes entre poblaciones se obtiene a partir de los valores del F_{st} , el cual resultó con un coeficiente de migración (N_m) entre poblaciones de 2.76 por generación.

7.4.3 Estructura Genética.

Se analizó sometiendo los datos al análisis Molecular de Varianza (AMOVA) con el método que se refiere al F_{st} , utilizando el programa ARLEQUIN versión 3.1 (Schneider *et al.* 2000), evaluándose la variación dentro y entre las poblaciones.

Los resultados del AMOVA se muestran en la tabla 6. Este análisis se llevó a cabo utilizando los datos RAPDs y confirman que la mayor parte de la variación total se debe a diferencias entre individuos dentro de las poblaciones (85.18%). Por otro lado la diferencia del valor obtenido de la variación entre las poblaciones fue significativa (14.82%), indicando la existencia de diferencia inter-poblacional. Observando un valor de F_{st} (0.1482) que es equivalente al valor de G_{st} (0.15) mencionado anteriormente.

Tabla 6. Análisis de Varianza molecular (AMOVA) basado en el análisis de marcadores RAPD a partir de seis poblaciones de *Pinus pinceana*.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación (%)	p ^a
Entre poblaciones	5	319.470	1.89	14.82	p<0.001
Dentro de poblaciones	162	1763.25	10.88	85.18	p<0.001
Total	167	2082.72	12.77		

F_{ST} : 0.1481

^aNiveles de significancia basado en 1000 interacciones.

7.4.4 Distancia Genética.

Para determinar la relación entre las 6 poblaciones de *P. pinceana* en base a la distancia genética dado por el coeficiente de similitud de Jaccard (Tabla 7), se realizó el análisis de coordenadas principales (PCO), utilizando el programa PAST ver. 3, obteniéndose una gráfica de PCO (Figura 15). En donde observamos claramente como las poblaciones de Nuevo León y Zacatecas de *P. pinceana* se separan del resto de las poblaciones de Coahuila en un grupo distinto.

Tabla 7. Medidas distancia genética basadas en el coeficiente de similitud de Jaccard entre pares de poblaciones de *Pinus pinceana*.

Población	La Noria	La Palmosa	La Casita	El Jaralito	Cañón del Moroso	Las Lajas
La Noria	*****	0.304	0.328	0.347	0.394	0.379
La Palmosa		*****	0.334	0.347	0.408	0.375
La Casita			*****	0.28	0.376	0.365
El Jaralito				*****	0.396	0.375
Cañón del Moroso					*****	0.298
Las Lajas						*****

Los valores mínimos y máximos de distancia genética entre poblaciones se muestran en color verde y azul, respectivamente.

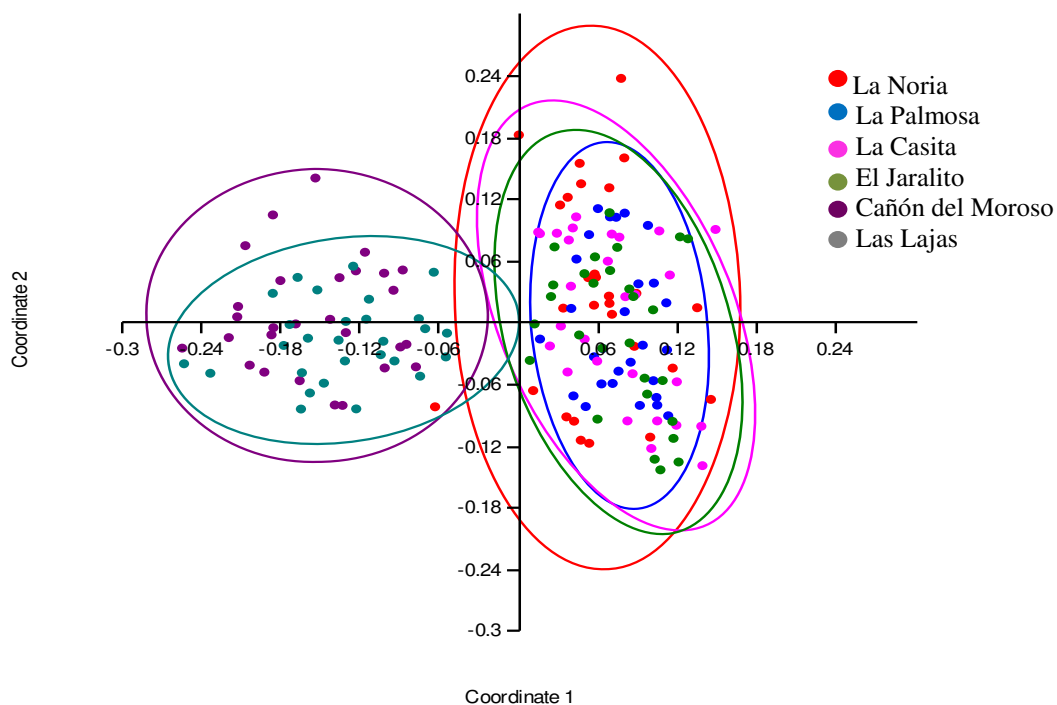


Figura 27. Gráfico de coordenadas principales de la distancia genética para 6 poblaciones de *Pinus pinceana*, utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard.

También se calcularon las distancias genéticas de las poblaciones (Tabla 8) en base a la distancia no sesgada de Nei (1972) con el programa POPGEN ver.32 obteniendo una distancia mínima de 0.0226 y una máxima 0.1396, siendo la población de General Cepeda, Coahuila la más cercana genéticamente a la población de Parras, Coahuila, mientras que las poblaciones de Santa Catarina, Nuevo León, La Palmosa y General Cepeda, Coahuila mostraron ser las más alejadas genéticamente.

Considerando las distancias genéticas dadas por el estadístico de Nei (Tabla 8) se construyó un dendrograma con el método UPGMA (Figura 16), entre individuos pertenecientes a las poblaciones de *Pinus pinceana*, en el se muestra la formación de dos grupos el primero con las poblaciones de Coahuila y el segundo con las poblaciones de Santa Catarina, Nuevo León y Las lajas, Zacatecas con valores de bootstrap de 100%; en el de Coahuila se forman dos subgrupos uno con las poblaciones de la Noria y La Palmosa y otro con las poblaciones de Parras y Gral. Cepeda, con valores de bootstrap de 96 y 98% respectivamente.

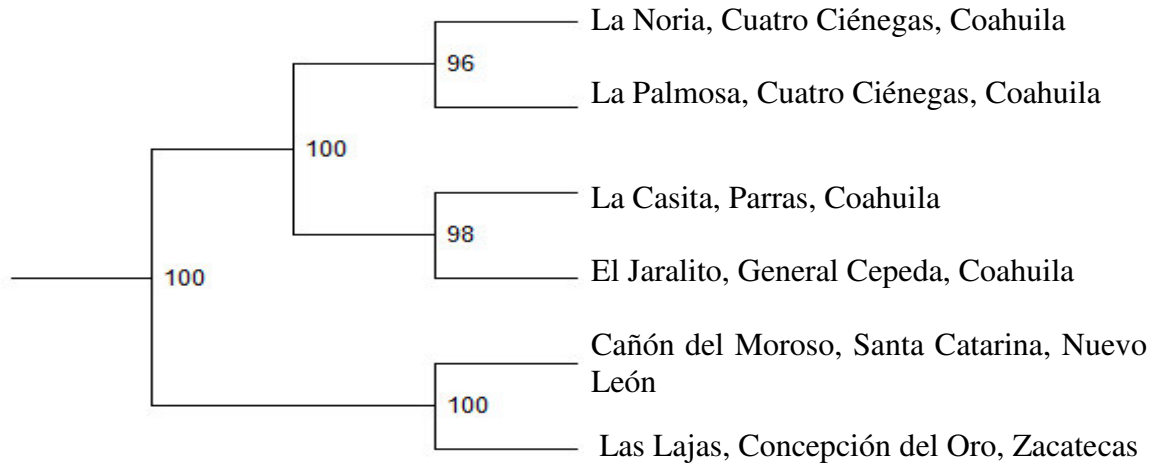


Figura 28. Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei (1972) de poblaciones de *P. pinceana* derivado del análisis de marcadores RAPD (Modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP versión 3.5)

Tabla 8. Medidas de distancia genética de Nei (1972) entre pares de poblaciones de *Pinus pinceana*.

Población	La Noria	La Palmosa	La Casita	El Jaralito	Cañón del Moroso	Las Lajas
La Noria	*****					
La Palmosa	0.0232	*****				
La Casita	0.0470	0.0399	*****			
El Jaralito	0.0511	0.0397	0.0226	*****		
Cañón del Moroso	0.1288	0.1396	0.1355	0.1396	*****	
Las Lajas	0.1216	0.1287	0.1286	0.1298	0.0326	*****

***** Por debajo de la diagonal se muestra la distancia genética entre cada par de poblaciones.

Los valores mínimos y máximos de distancia genética entre poblaciones se muestran en color azul y verde, respectivamente.

7.4.5 Aislamiento por distancia (Prueba de Mantel)

Se realizó un análisis de aislamiento por distancia mediante la prueba de Mantel con el programa XLSTAT para verificar la correlación entre la matriz de distancias genéticas (Tabla 8) y la matriz de distancias geográficas (Tabla 9), en donde se obtienen los valores de $r = 0.29$ y $p < 0.05$ indican que no hay una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas presentes en cada par de

poblaciones, es decir que las poblaciones en estudio no siguen un modelo de aislamiento por distancia (Figura 29).

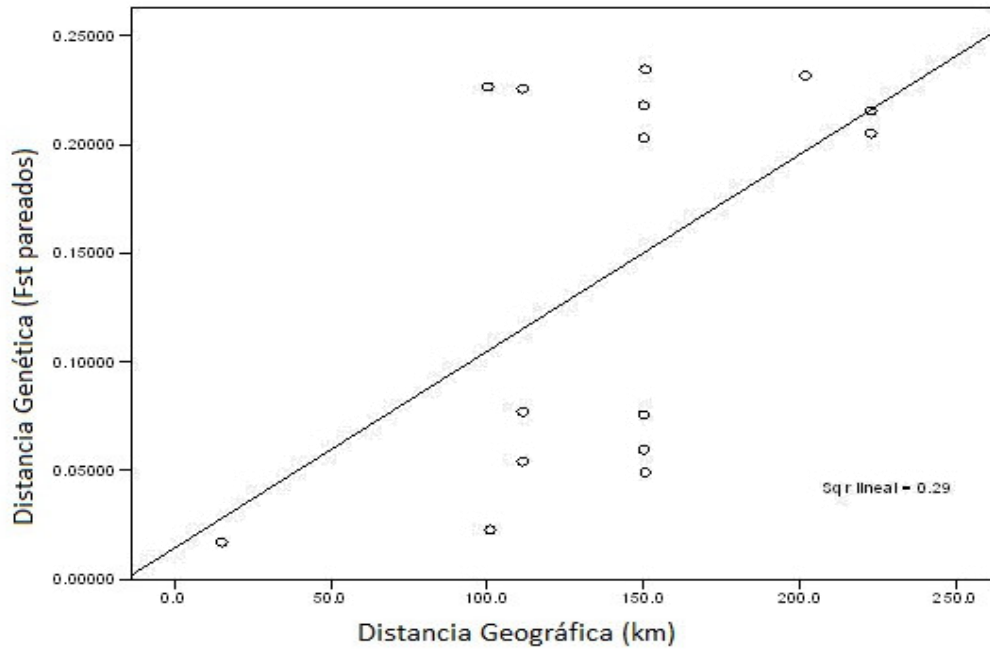


Figura 29. Prueba de Mantel para evaluar el aislamiento por distancia entre cada par de poblaciones, obtenida a partir de las distancias genéticas de Nei (1972) y las distancias geográficas (en Kilómetros).

Tabla 9. Distancia geográfica (km) entre pares de poblaciones de *Pinus pinceana*.

Población	La Noria	La Palmosa	La Casita	El Jaralito	Cañón del Moroso	Las Lajas
La Noria	*****					
La Palmosa	15.0	*****				
La Casita	150.0	150.0	*****			
El Jaralito	111.3	111.3	100.9	*****		
Cañón del Moroso	150.0	150.0	201.7	100.1	*****	
Las Lajas	222.6	222.6	150.5	111.3	150.5	*****

8 DISCUSIÓN

Diversos investigadores coinciden en que las principales ventajas de los RAPDs está que amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos que los RFLP e isoenzimas además de ser una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN (Eguiarte *et al.*, 2007).

En el presente estudio, los marcadores RAPD utilizados mostraron ser una técnica rápida y eficiente para el estudio de la genética de poblaciones de *P. pinceana*, por su alto polimorfismo visualizado en geles de agarosa. A partir de los cuales se logró medir la variación genética a través de sus componentes: diversidad, diferenciación y distancia genética.

Diversidad Genética entre Poblaciones de *Pinus pinceana*

Los estimadores de diversidad indicados por el índice de diversidad de Nei (H) y el índice de Shannon (S) varían entre 0-0.5 y 0-0.73 respectivamente (Lowe *et al.* 2004).

El índice de Diversidad de Nei (H) estimado para las poblaciones de *Pinus pinceana* resultaron en un rango de 0.25 – 0.29, (Tabla 5), el cual muestra valores muy cercanos debido a que solo se evalúan poblaciones norteñas dentro del rango de distribución geográfica de la especie. Tomando en cuenta todos los loci las poblaciones con los valores más altos son las de la Noria y la Palmosa (0.29), le siguen El Jaralito y El Cañón del Moroso (0.27) y finalmente La Casita y Las Lajas (0.25). En general al observar la Diversidad Genética H, nos podemos dar cuenta que las poblaciones más norteñas son las que presentan mayor variación, lo cual pudiera deberse a que después de la fragmentación que presentó la especie en el pasado (Ledig, *et al.* 2001), el número de individuos que quedaron en los diferentes parches fue tan dispar como la variación genética entre las poblaciones actuales y que esto ha ido provocando un aislamiento que ha permitido esa diferencia entre la variación de las diferentes poblaciones además de la deriva génica ocasionada por los cambios climáticos. (Molina-Freaner, *et al.* 2001.)

Considerando todos los loci y todas las poblaciones este índice de Diversidad resultó más bajo (0.32) que los reportados para poblaciones de *P. brutia* (0.40), (Kurt *et*

al., 2011); *Larix gmelinii* (0.344), (L. Zang *et al.*, 2013) y más alto que *P. sylvestris* (0.216), (Cipriano *et al.*, 2013) y para *Picea mariana* (0.269), (R. Narendrula *et al.*, 2012) coníferas estudiadas también mediante la técnica de RAPDs. Las diferencias en los niveles de Diversidad Genética entre estas especies pueden ser explicadas por la distribución geográfica, el número de poblaciones muestreadas, el tamaño de las poblaciones y el efecto de los cambios climáticos ocurridos en el pasado.

Por otro lado la diversidad genética estimada mediante el índice de Shannon ($I=0.48$), medida de variación más sensible, sigue igual que los valores de H un patrón en el que las poblaciones más norteñas tienen los valores de diversidad más altos, la Noria y la Palmosa (0.44 y 0.43), le siguen El Jaralito y Sta. Catarina (0.41) y finalmente La Casita y Las Lajas (0.39 y 0.37) (Tabla 5), lo cual nos lleva a inferir que la fragmentación pudo iniciar la divergencia entre las poblaciones generando en alguna de ellas nuevos y únicos alelos como resultado del aislamiento.

Sin embargo, al comparar el índice de Shannon obtenido para todas las poblaciones estudiadas (0.48) no difieren en promedio comparándolo con otras especies de pinos (0.45) (Tabla 10) y de otras coníferas (0.53) (*Araucaria*, *Fitzroya* y *Cedrela*) reportado por Bekessy *et al.* (2002), Allunt *et al.* (1999) y Gillies *et al.* (1997) respectivamente.

El porcentaje de loci polimórfico es otro indicador importante para determinar el nivel de variación genética de un área, pues una especie con un valor alto muestra una elevada capacidad de adaptación al medio ambiente y por el contrario una especie con una capacidad débil de adaptación pudiera ser eliminada por Selección Natural (Zhang *et al.* 2013).

La diversidad genética, en términos de loci polimórfico (Criterio: 0.95) para *P. pinceana* fue relativamente alto (79.80%) comparado con otras especies de pinos piñoneros como *P. culminicola* (57.3), (Favela, 2010) *P. cembroides* var. *bicolor* y *P. johannis* con 69.9 y 78.1% respectivamente (Favela, 2004) y con otras especies de pinos; y resultados similares con otras especies del grupo Cembroides reportadas y de otras coníferas en donde utilizaron el marcador molecular de RAPD (Tabla 10). Lo cual indica que cada población contiene una fracción considerable de la diversidad genética

de la especie, con valores más altos que lo reportado para especies endémicas (Hamrick *et al.* 1992; Hamrick *et al.* 1996).

Tabla 10. Cálculos de la variación genética obtenidos para distintas especies de Pinos.

Taxón	D	NP	Marcador	S	%P	Referencia
<i>P. ayacahuite</i>	A	2	RAPDs		75.0	Castro Félix <i>et al.</i> 2006
<i>P. brutia</i>	R	6	RAPDs	0.58	100.0	Kurt Y. <i>et al.</i> 2011
<i>P. catarinae</i>	R	3	RAPDs	0.53	71.6	Favela 2004
<i>P. cembroides var. bicolor</i>	R	2	RAPDs	0.53	69.9	Favela 2004
<i>P. chiapensis</i>	R	12	RAPDs	0.54	24.5	Newton 2002
<i>P. culminicola</i>	R	2	RAPDs	0.56	57.3	Favela 2004
<i>P. johannis</i>	R	4	RAPDs	0.53	78.1	Favela 2004
<i>P. oocarpa</i>	A	10	RAPDs		82.7	Díaz <i>et al.</i> 2001
<i>P. pinceana</i>	R	6	RAPDs	0.48	79.8	Presente estudio
<i>P. remota</i>	R	2	RAPDs	0.46	84.4	Favela 2004
<i>P. squamata</i>	R	1	RAPDs	0.03	6.5	Zhi-Yong <i>et al.</i> 2004
<i>P. sylvestris</i>	A	9	RAPDs	0.35	99.8	Cipriano <i>et al.</i> 2013
Promedio				0.45	69.1	

Taxón	D	NP	Marcador	S	%P	Referencia
<i>Larix gmelinii</i>	A	7	RAPDs	0.514	97.4	Zhang <i>et al.</i> 2013
<i>Picea mariana</i>		14	RAPDs	0.39	67	Narendrula <i>et al.</i> 2012
<i>Araucaria araucana</i>		13	RAPDs	0.65	68.39	SA. Bekessy <i>et al.</i> 2002
Promedio				0.52	77.6	

En general es importante inferir que si consideramos todos los estimados de diversidad genética aquí evaluados y los comparamos con otros estudios realizados con la misma especie o con especies cercanas (Tabla 10), si se presentaran solos indicarían que la variación de la especie es alta, sin embargo, el estado de la especie en cuanto a diversidad va más allá de un valor de variación total. Es por ello que resulta muy importante analizar la diversidad de las especies a niveles particulares, es decir de poblaciones, pues esto nos da un panorama mucho más claro y real de la condición del grupo y en el caso particular de la conservación nos da una visión más real del estado genético y de la estrategia a seguir con la especie. Ya que los valores de *Pinus pinceana* son notablemente altos podemos decir que a pesar de su fragmentación existe mucha

variación la cual puede rescatarse buscando poblaciones que representen la mayor parte de la variación.

Diferenciación (Estructura) Genética entre poblaciones de *Pinus pinceana*.

Para estimar la proporción de la variación genética dentro y entre las poblaciones se utiliza el estadístico (F_{st}), especialmente útil para datos dominantes como RAPD (Excoffier, 2001) el cual varía en un rango de 0-1, si los valores se acercan a 0, indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones, no ha habido diferenciación y el máximo posible es de 1, cuando cada población está fija en alelos diferentes (Piñero *et al.* 2007).

El valor obtenido en las poblaciones estudiadas (0.15) fue comparable con el F_{st} (0.152) reportado por Ledig *et al.* (2001), pero más bajo (0.24) que el estimado por Molina-Freaner (2001) y (0.16) Ramírez-Herrera (2007) respectivamente para la misma especie, utilizando isoenzimas y para otras variedades de *Pinus* (Tabla 11) que se encuentran en poblaciones aisladas y dispersas (Hamrick, 2004).

Este valor indica que un 15% de la diversidad genética de la especie se encuentra entre poblaciones, valor muy cercano al estimado para otro pino piñonero *P. rzedowskii* (Delgado *et al.* 1999) especie endémica de México que también se encuentran en poblaciones fragmentadas y aisladas. Es importante mencionar que un F_{st} mayor a 0.10 es considerado como un indicador de una fuerte diferenciación genética entre poblaciones, lo cual es poco común en especies alógamas como es el caso para el género *Pinus* (Hamrick *et al.*, 1992; Ledig, 1998). Solo en algunas especies de coníferas con una distribución natural restringida o una fuerte fragmentación en sus poblaciones se han reportado con valores similares de diferenciación genética entre poblaciones (Ledig, 1998).

La mayoría de la variación en las poblaciones de *Pinus pinceana* fue encontrada dentro de ellas (85.18%) este resultado es similar al reportado para otras especies de pinos (Ledig 1998) y especies de plantas leñosas Hamrick *et al.* (1992). Estos resultados son comparables con datos obtenidos utilizando RAPD en donde la mayoría de las especies examinadas muestran altos niveles de variación genética dentro de las poblaciones (Xue *et al.* 2006; Favela 2010). Mientras que el grado de variación genética

entre poblaciones fue (14.82%). Los altos niveles de diversidad y diferenciación entre poblaciones parece ser común en especies de coníferas Mexicanas. (Ledig *et al.* 2001; Fazecas, 2001 y Favela, 2010)

Tabla 11. Valores de Diversidad Genética (Fst) y Flujo Genético (Nm) en distintas especies de Pinos.

Taxón	D	NP	Marcador	Fst/Gst	Nm	Referencia
<i>P. ayacahuite</i>	A	2	RAPDs	0.100	-	Castro Félix <i>et al.</i> 2006
<i>P. brutia</i>	R	6	RAPDs	0.01	-	Kurt Y. <i>et al.</i> 2011
<i>P. contorta</i>	A	31	RAPDs	0.090	-	Fazeakas and Yeh 2006
<i>P. culminicola</i>	R	2	RAPDs	0.059	-	Favela-Lara 2010
<i>P. oocarpa</i>	A	10	RAPDs	0.122	-	Díaz <i>et al.</i> 2001
<i>P. pinceana</i>	R	6	RAPDs	0.148	2.76	Presente estudio
<i>P. squamata</i>	R	2	RAPDs	0.011	-	Zhi-Yong <i>et al.</i> 2004
<i>P. nigra</i>	R	8	ISSRs	0.233	-	Rubio-Moraga <i>et al.</i> 2012
<i>P. sylvestris</i>	A	9	ISSRs	0.057	-	Cipriano <i>et al.</i> 2013
<i>P. ayacahuite</i> var.. <i>strobiformis</i>	A	-	Isoenzimas	0.08	2.87	Matheson <i>et al.</i> 1989
<i>P. ayacahuite</i>	A	14	Isoenzimas	0.22	0.88	Matheson <i>et al.</i> 1989
<i>P. engelmanni</i>	A	23	Isoenzimas	0.13	1.65	Bermejo 1993
<i>P. greggii</i>	R	19	Isoenzimas	0.379	1.17	Parraguirre <i>et al.</i> 2002
<i>P. lagunae</i>	R	4	Isoenzimas	0.188	1.11	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2001
<i>P. muricata</i>	R	3	Isoenzimas	0.161	0.564	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2001
<i>P. pinceana</i>	R	5	Isoenzimas	0.247	0.77	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2001
<i>P. pinceana</i>	R	7	Isoenzimas	0.152	1.39	Ledig <i>et al.</i> 2001
<i>P. pinceana</i>	R	13	Alloenzimas	0.166	1.26	Ramírez-Herrera 2007
<i>P. rzedowskii</i>	R	9	Isoenzimas	0.175	1.5	Delgado <i>et al.</i> 1999
PROMEDIO				0.177	1.5	

Flujo genético

En función del Fst se estimó el número de migrantes por generación entre las poblaciones (Nm) resultando un valor de 2.76, más alto (1.39 y 1.26) que lo reportado por Ledig *et al.* (2001) y Ramírez-Herrera (2007) en poblaciones de la misma especie respectivamente; esto probablemente debido a que las poblaciones muestreadas en este estudio abarcan solo poblaciones norteñas y la distancia geográfica entre ellas es menor (Tabla 11) pero bajo para lo reportado para pinos cuyos rangos están entre 4.6 y 17.2 (Ledig *et al.* 1998). Valores muy bajos de Nm han sido reportados para especies

mexicanas endémicas o con rangos de distribución fragmentada, (Ledig *et al.* 1997; Ledig, 2000). Esto pudiera explicar el bajo grado de diferenciación pues indica que en promedio hay 2 individuos migrantes por generación entre las poblaciones, sin embargo este flujo genético es suficiente para no conducir a la pérdida de variación y diferenciación genética pues si Nm es mucho mayor que 1, el flujo genético sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local y si Nm es mucho menor que 1, la deriva actúa en forma casi independiente en cada población (Slatkin, 1994). De acuerdo con la teoría (Wright, 1965) se requiere de un mínimo de 4 migrantes por generación para mantener un balance que evite los efectos de diferenciación genética asociados con la deriva génica. Por tanto podemos inferir que el reducido flujo génico y la baja diversidad genética de la mayoría de las poblaciones de *P. pinceana*, pueden estar asociadas con el hecho de que las poblaciones de esta especie son pequeñas (300 a 10,000) y se encuentran aisladas entre sí. Esta situación se ve realmente favorecida por la fragmentación de las poblaciones debido a la eliminación de individuos por causas naturales o antropogénicas.

Distancias Genéticas y Geográficas entre poblaciones de *Pinus pinceana*.

Para estudiar la estructura poblacional, una de las estrategias en el estudio de marcadores dominantes es generar a partir de datos una matriz de distancia genética. Esta información es posteriormente sujeta a un análisis fenético para producir una representación visual, que puede ser un árbol o un gráfico de coordenadas principales de las relaciones entre los individuos en la muestra. Ambas representaciones nos permiten hacer inferencias acerca de las poblaciones de las cuales se originan los individuos, pues el agrupamiento de los individuos de diferentes poblaciones en el mismo grupo o clado en un árbol se interpreta como evidencia del flujo genético entre estas poblaciones (Hollingsworth y Ennos, 2004).

En el gráfico obtenido de acuerdo al coeficiente de similitud de Jaccard que fue sujeto al análisis PCO muestra una separación de las poblaciones de Nuevo León y Zacatecas de las de Coahuila lo cual nos indica que son las más alejadas genéticamente.

Hollingsworth y Ennos (2004), argumentan también que el agrupamiento de individuos de diferentes poblaciones en el mismo grupo o clado en un árbol se interpreta

como evidencia del flujo genético entre estas poblaciones, esto lo podemos observar de igual manera en el árbol obtenido mediante el método UPGMA en donde también se forman dos clados en el primero se agrupan las poblaciones de Coahuila dentro del cual se muestran dos subclados uno con las poblaciones de Cuatro Ciénegas; localidades de la Noria y la Palmosa; y otro con las localidades de Parras y General. Cepeda y formando un solo grupo las localidades de Cañón del Moroso, Santa. Catarina, Nuevo León y las Lajas, Zacatecas. Esto nos permite inferir que entre las poblaciones de Nuevo León y Zacatecas existe un mayor flujo genético con respecto a las poblaciones de Coahuila. La variación mostrada entre las poblaciones puede deberse a las diferencias ecológicas en cada uno de los dos grupos y en general a las regiones climáticas y orográficas que se definen por la Sierra Madre Oriental. Cabe mencionar, por ejemplo, que el primer clado corresponde a regiones con menor cantidad de lluvia (350 a 400mm) comparado con las poblaciones del segundo grupo (400 a 500mm) y considerando la composición florística también pueden existir diferencias, como lo menciona Villarreal Quintanilla *et al.* (2009) en su estudio donde determina que la población de las Norias es la que mayor número de especies presenta mientras que las ubicadas al sur de Coahuila y norte de Zacatecas son las más pobres desde el punto de vista de la flora.

Cabe mencionar que probablemente la especie presentaba en el pasado una distribución continua y que los cambios climáticos del Pleistoceno provocaron una fragmentación y modificación de la estructura original de la especie, rompiendo la continuidad y formando los parches que se observan actualmente como lo menciona Escalante (2001).

Otra forma de interpretar las representaciones gráficas tanto del PCO como del UPGMA, las cuales muestran flujo genético, puede ser debido al intercambio de semillas por los córvidos y de polen entre sus poblaciones.

Diversos estudios sobre *P. pinceana*, muestran datos similares en donde se separan las poblaciones norteañas (Coahuila) de las del centro y sur de México (Ledig *et al.* 2001; Molina-Freaner *et al.* 2001; Ramírez-Herrera 2007; Villarreal *et al.* 2009). De igual forma en un estudio sobre pinos mexicanos realizado por Castro-Félix *et al.* (2008) se separa la población de *P. strobiformis* de Nuevo León en un subclado mostrando ser la más divergente.

Aislamiento por distancia de poblaciones de *Pinus pinceana*.

La correlación entre la matriz de distancias genéticas y la matriz de distancias geográficas no resultó significativa, lo que permite suponer que la estructura genética de las poblaciones norteñas estudiadas de *Pinus pinceana* no se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia entre poblaciones. A diferencia de otros resultados obtenidos por Delgado *et al.* (2001) al comparar poblaciones de *Pinus pinceana* y Ledig *et al.* (2001) probablemente debido a las diferentes poblaciones estudiadas y por Ortiz-Medrano *et al.* (2008) al comparar poblaciones de *P. ayacahuite*. Sin embargo estos resultados no excluyen que haya habido eventos de flujo génico restringido por aislamiento por distancia (Templeton, 2006).

En general es importante mencionar que con el uso de RAPDs los valores que se obtuvieron para los diferentes parámetros obtenidos y estadísticos genéticos son comparables a los obtenidos en otros estudios realizados con anterioridad con isoenzimas, microsatélites y aloenzimas (Molina *et al.* 2001; Delgado *et al.* 2001 y Ramírez-Herrera, 2007) obteniendo por ejemplo datos que nos ayudan a entender los patrones de aislamiento por distancia de la especie (Molina *et al.* 2001 y Delgado *et al.* 2001) y el grado de diferenciación moderado entre las poblaciones que mantiene un flujo genético suficiente para no conducir a la pérdida de variación y diferenciación genética pues este sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local de las poblaciones (Delgado *et al.* 2001 y Ramírez-Herrera, 2007). Resultados que en conjunto permiten discernir de una manera más clara entre las diferentes fuerzas evolutivas que actúan en la dinámica de las poblaciones de la especie. Aún y cuando ha sido reportada como una especie paleo-relicta no parece estar dentro de un vórtex de extinción genética

9 CONCLUSIONES

La variación genética (interpoblacional) encontrada en las poblaciones de *Pinus pinceana* fue alta y en concordancia con estudios previos en donde especies de pinos y árboles han sido incluidos.

El grado de diferenciación genética encontrada entre las poblaciones de *P. pinceana* fue bajo pero consistente con otros valores registrados para otras especies de coníferas. La diferenciación presente sugiere que aun y cuando las poblaciones de *P. pinceana* son restringidas, aisladas y fragmentadas, el flujo genético entre las poblaciones por lo menos en la actualidad, no ha conducido a la pérdida dramática de la variación genética y la diferenciación de las poblaciones.

Las medidas de distancia genética entre las poblaciones de *Pinus pinceana* muestran que las poblaciones de Coahuila tienen un mayor flujo genético entre ellas y que están más alejadas genéticamente de las poblaciones de Nuevo León y Zacatecas; sugiriendo quizá dos fragmentos (poblaciones de Coahuila y poblaciones de Nuevo León y Zacatecas) y la influencia de alguna barrera fisiográfica en esta parte de la Sierra Madre Oriental.

Estudios futuros sobre la estructura de las poblaciones de *Pinus pinceana* nos pudieran ayudar a entender si sucesos históricos han influido en el patrón de la fragmentación de la especie en su rango de distribución.

10 LITERATURA CITADA

- Aagaard J.E., V.K. Krutovskii y H.S. Strauss. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* 81:69-78.
- Allunt, T.R., A.C. Newton, A. Lara, A. Premoli, J.J. Armesto, R. Vergara and M. Gardner, 1999. Genetic Variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Molecular Ecology*, 8: 975-987.
- Backeljau T., L. De Brun, H. De Wolf, K. Jordaens, S. Dongen, R. Verhagen y B. Winnepenninckx. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* 11:119-130.
- Bekessy, S. A., T.R. Allnut, A.C. Premoli, A. Lara, R.A. Ennos, M.A. Burgman, M. Cortes and A.C. Newton, 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity*, 88:243-249.
- Castro-Félix, P., Pérez de la Rosa, J.A., Vargas, A. G., Velázquez, M. S., Santerre, A., López-Dellamary, T. Villalobos-Arámbula, A. R. 2008. Genetic relationships among Mexican White pines (*Pinus*, Pinaceae) based on RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 36:523-530.
- Cipriano J., Carvalho A., Fernandes C., Gaspar M. J., Pires J., Bento J., Roxo L., Louzada and Lima-Brito J. 2013. Evaluation of genetic diversity of Portuguese *Pinus silvestris* L. populations based on molecular data and inferences about the future use of this germplasm. *Indian Academy of Sciences, Journal of Genetics* Vol. 92.
- Cuenca, A., Escalante, A. E. and Piñero D. 2003. Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology*. 12, 2087 – 2097.
- Delgado Valerio, P. y D. Piñero, 2001. Estructura poblacional, variación genética y conservación de tres especies del género *Pinus*, endémicas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. R116. México D. F.
- Delgado, P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser and E. R. Álvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86: 669-676.
- Diaz, V., Muñoz L. M., and Ferrer E. 2001. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan population of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology* 10, 2593 – 2603.

- Doyle, J. J. & J. L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: 13-15.
- Escalante, H. A. 2001. Estructura genética de poblaciones de *Pinus pinceana* usando como marcadores moleculares microsatélites de cloroplasto (cpSSR's). Tesis para obtener el título de Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. México, D. F.
- Eguiarte L, Souza V, y Aguirre X. 2007. Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. México, pp. 594.
- Excoffier L, Smouse P. and Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Farjon, A., J. A. Perez de la Rosa and B. T. Styles. 1997. A field guide to the Pines of México and Central America, The Royal Botanic Gardens, Kew and Oxford Forestry Institute, University of Oxford.
- Fazekas A. J. and Yeh F.C. 2006. Postglacial colonization and population genetic relationships in the *Pinus contorta* complex. *NRC Canada* 84: 223-234.
- Favela, L. S. 2005. Taxonomy and genetic variation of pinyon pines (*Pinus* subsection *Cembroides*) in the ortheast of Mexico. Unpublished doctoral dissertation, University of Edinburgh, Scotland.
- Favela, S. 2010. Population variation in the endemic *Pinus culminicola* detected by RAPD. *Polibotánica* 30: 55-67.
- Favela, L. S., Velazco C. y Alanís G. 2009. *Pinus pinceana* (*Pinaceae*), nuevo registro para el estado de Nuevo León, México. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 3(2): 771 – 774.
- Favela, S. & Thomas, P. 2013. *Pinus pinceana*. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2014. 2.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- García de León, F.J. 2001. Los marcadores genéticos en el conocimiento y manejo de recursos bióticos. BIOTAM nueva serie. *Revista de la Universidad Autónoma de Tamaulipas*. 12(3):57-80.
- Gaudeul M., Rouhan G., Gardner M. F. and Hollingsworth P. M. 2012. AFLP Markers provide insights into the evolutionary relationships and diversification of New

- Caledonian *Araucaria* species (Araucariaceae). *American Journal of Botany* 99(1): 68-81.
- Gillies, A.C.M., J.P. Cornelius, A.C. Newton, C. Navarro and M. Hernández, 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*, **6**: 1133-1145.
- Hamrick, J.L. 2004. Responses of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, **197**, 323-335.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W., 1996. Conservation genetics of endemics plant species. In: J.C. Avise & J.L. Hamrick (Eds.). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman & Hall. New York.
- Hamrick, J.L., M.J.W. Godt, S.L. Sherman-Broyles, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. *New Forests*, **6**: 95-124.
- Hollingsworth, M.L. (1998). Clonal growth and hybridization in some invasive *Fallopia* spp. Ph D Thesis, Leicester, University of Leicester.
- Hollingsworth, M.L., J.P. Bailey, P.M. Hollingsworth and C. Ferris, 1999. Chloroplast DNA variation and hybridization between invasive populations of Japanese knotweed and giant knotweed (*Fallopia*, Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **129**: 139-154.
- Hollingsworth P. M. and Ennos R. A. 2004. Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity* **92**: 490-498.
- IUCN (2001). *IUCN Red List Categories and Criteria: version 3.1*. Gland ,Switzerland and Cambridge, UK, IUCN Species Survival Commission, IUCN.
- Koopman, W. J. M. 2005. Phylogenetic signal in AFLP datasets. *Systematics Biology* **54**: 197-217.
- Kurt Y., Bilgen B. B., Kaya N and Isil K. 2011. Genetic Comparison of *Pinus brutia* Ten. Populations from Different Elevations by RAPD Markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **39**(2):299-304.
- Lanner, R. M. 1998. Seed dispersal in pines. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Richardson, D. M. (ed). Cambridge university Press. UK. 281-295.
- Ledig, F. T., M. A. Capo-Ortega, P. D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. Thompson y B. Bermejo-Velázquez. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñón, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* **88**: 1977-1987.

- Ledig, F.T., 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: D.M. Richardson, (Ed.) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 251-280.
- Ledig, F.T., B. Velázquez-Bermejo, and J. Vargas-Hernández, 2000. *Genetic differentiation in Mexican Conifers*. The 16th North American Forest Biology workshop & The Western Forest Genetic Association. Merida, Mexico. July 2000.
- Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolution Biology* 6, 381-398.
- Lowe, A., S. Harris and P. Ashton. 2004. *Ecological Genetics. Design, Analysis, and Application*. Uk, Balkwell Publishing.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Marshall, D, and Allard R. 1970. Maintenance of Isozyme Polymorphisms in Natural Populations of *Avena barbata*. *Genetics* 66: 393-399.
- Marzluff, J. M. and R. P. Balda. 1992. *The Pinyon Jay: behavioural ecology of a cooperative, colonial corvid*. T. & A. D. Poyser., London. 317 pp.
- McDermott J, and McDonald B. 1993. Gene Flow in Plant Pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 31: 353-373.
- Molina-Freaner, F., P. Delgado, D. Piñero, N. Perez-Nasser, and E.R. Alvarez-Buylla, 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Can. J.Bot.*, **79**: 131-138.
- Murphy, R. W., Sites J. W., Buth D. G. and Haufler C. H. 1996. Proteins: isozyme electrophoresis. In: *Molecular Systematics*. D. M. Hillis, C. Mortiz and B. K. Mable. Southerland, MA. USA., Sinauer, 51-120.
- Hammer Ø, Harper D, and Ryan P. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1): 9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Neale, D. B. and Sederoff, R. R. 1989. Paternal inheritance of Chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly Pine. *Theoretical and Applied Genetics* 77:212-216.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 282–283.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EUA* 70: 321–3323.

- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 41: 225-33.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nerendula R. and Nkongolo K. K. 2012. Genetic Variation in *Picea mariana* x *Picea rubens* Hybrid Populations Assessed with ISSR and RAPD Markers. *American Journal of Plant Sciences* 3, 731-737.
- Newton, A.C., T.R. Allnut, W.S. Dvorak, R.F. Del Castillo, and R.A. Ennos, 2002. Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity*, **89**: 191-198.
- Norma Oficial Mexicana (2001) NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestres – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión y exclusión o cambio – lista de especies en riesgo.
- Ortiz-Medrano, A., Moreno-Letelier, A. y Piñero, D. 2008. Fragmentación y expansión demográfica en las poblaciones Mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. *Ayacahuite*. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana*, 83: 25-36.
- Parker, K.C., Hamrick, J.L. 1996. Genetic variation in sand pine (*Pinus clausa*). *Can J. For. Res.* 26: 244-254.
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.
- Perry, J. P. Jr. 1991. *The pines of México and Central America*. Timber press. Portland, Oregon, USA. 231.
- 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., *et al.* 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 415-435.
- Ramírez Herrera, Carlos. 2007. Quantitative trait variation and allozyme diversity of *Pinus pincheana*. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Forestry. University of New Brunswick, Canada.

- Ritland, C. and K. Ritland. 2000. DNA Fragments Markers in Plants. En: Baker, A.J. (ed.) *Molecular Methods in Ecology*, Blackwell Science Ltd. Pp 208-234.
- Rodríguez-Banderas A., Vargas-Mendoza C.F., Buonamici A., and Vendramin G.G. 2009. Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: post-glacial range expansion. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* 36, 1807-1820.
- Rousset, F. 2001. Inferences from spatial population genetics, en D.J. Baldwin, M. Bishop y L. Cannings (eds.), *Handbook of statistical genetics*. John Wiley, Nueva York, pp. 239-270.
- Rubio-Moraga A., Candel-Perez D., Lucas-Borja M. E., Tiscar P. A., Viñegla B., Linares J. C., Gómez-Gómez L. and Ahrazem O. 2012. Genetic Diversity *Pinus nigra* Arn. Populations in Southern Spain and Northern Morocco Revealed By Inter-Simple Sequence Repeat Profiles. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 5645-5658.
- Schneider, S., Roessli, D., & Excoffier, L. 2000. ARLEQUIN, version 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Slatkin, M. 1987. Gene Flow and the geographic structure of natural populations *Science*, 263:787-792.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47:264-279.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. *Ecological Genetics*. L. Real Princeton.
- Smouse, P. E., Long, J. C. and Sokal, R. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondence. *Systematics Zoology* 35:627-632.
- Templeton A. R. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. Jhon Wiley and Sons Inc. Hoboken, New Jersey. 705 pp.
- Van Devender, T. R. 1990. Late quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan desert, United State and México. In: Packrat Middens. The Last 40,000 Years of Biotic Changes. J. L. Betancourt, T. R. Van Devender and P. S. Martin. Arizona, The University Arizona Press, pp. 104-133.
- Villarreal, J. A., Mares, O., Corejo, E. y Capó, M. A. 2009. Estudio Florístico de los piñonares de *Pinus pinceana* gordon. *Acta Botánica Mexicana* 89:87-124.

- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, *et al.* (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Research* 23, 4407-4414.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, and Kahl G. 2005. DNA Fingerprinting in plants: Principles, Methods and Applications. Taylor & Francis Group. CRC press. EUA, pp. 444.
- Williams J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16: 97-158.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19:395-420.
- Xue X., Wang Y., Korpelainen H., and Li C. 2006. Genetic diversity of *Picea asperata* populations based on RAPD's. *Plant Biology*. 9(2007): 101 – 108.
- Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T., Ye Z. H. and Mao J. X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- Zhang L., Zhang H. G. and Li X. F. 2013. Analysis of genetic diversity in *Larix gmelinii* (Pinaceae) with RAPD and ISSR markers. *Genetic and Molecular Research* 12 (1): 196-207.
- Zhivotovsky L.A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8:907-913.
- Zhi-Yong Z., Yong-Yan Ch. And De-Zhu L. 2005. Detection of low genetic variation in a critically endangered Chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers. *Biochemical Genetics*, Vol. 43, Nos. 5/6, June 2005.

11 APÉNDICE

Matrices de datos para cada una de las poblaciones de *Pinus pinceana* estudiadas con 6 primers para RAPDs.

Pinceana1

OPP-11	OPG-06	OPA-08	OPA-07	OPC-06	OPA-11
100100111111101	110010111111111	1111110111110	1000111111010	1110101101	011111111101
1001101110111101	11111011111011	1111110011110	101111111110	1111101100	100111111001
1001000110111101	11001111111011	1101110111110	110011110000	1111001101	100100101000
1001110111111111	11000001111111	1101000111110	1000111111100	1111101111	110111101000
1001110100111101	11010111111111	1111110111110	1111111111100	1110111101	000111111001
1111110110111101	11101111111111	1111110111110	1000111111100	1110111100	111111111001
1001000110111111	11001111111111	1111110111110	1001011111110	1110111010	110111111110
1101100111111101	110100111111110	1101110111100	1101111111100	1111111011	110111110101
1111101110111110	11101101111011	1111101111110	1011111111110	1111101010	110111111011
1101010011001000	11111111111001	1111101111110	1111111111101	1111101111	101111111101
1101101011111111	11101111110111	1100101111110	1011111111101	1111111100	101110111100
1101100011011111	11101111110001	1111101111110	1011111111101	1111101100	101110110110
1101010111111110	11101111111011	1110101111110	1010001111111	1111101010	011111011111
1111101111111111	11101111111011	1111010111110	1010001111111	1111111111	010111010101
1111101111111111	11111111111011	1100101111111	1010001111111	1111101000	010110000000
1111111111111110	11111111111101	1111010111110	101001110111	1111111110	000111011101
1101111010111101	11111111111111	1000101111110	1011011111110	1111101010	000010011111
1111101001111101	11111111111111	1001100011110	1010111111111	1111111100	101110011111
1111101111111101	11111101111111	1000101111110	1110111111101	1111101011	000111111110
1101110010011101	11111111111101	1101111111110	1011111111111	1111111000	011111010101
1101101111111101	11001110011011	1111111011111	1001000111111	1110101000	010111010101
1011110111111011	11111111111101	1111101001111	1111000111111	1111101000	110111100001
1101101111111101	11111101111101	1111101101111	1101000111111	1111101010	100110111011
1101101101010111	111111111110110	1111101101111	1011000111111	1111101110	100111110001
1001001101000111	11010011110110	0001001011111	1001100111111	1111111111	011111101101
1111001001100011	11111011111100	1111011101111	1001001111111	1111111001	001110110110
1011101101110011	11101111111100	1111111111111	100100011101	1111101111	101111111101
1001111100110011	11001111111100	1111001111111	1001000111111	1111101001	111111011011

Pinceana2

111111101110101	11111011111011	1101011011110	1011111111110	1111111000	000110110101
1111101111111101	11101111111111	1111111011110	1000011111100	1111111011	110110000111
1111101101111001	110110011111110	1111010111110	1000111111110	1111111001	011111110101
1101111111110001	111011111111110	1111010111110	1100111101110	1111111001	000110110001
1001000110110101	111110111111111	1111111111110	1000111111100	1111111000	101110111011
1101010111111001	110001111111111	1111110011110	1000011111110	1110111000	111110110001
1111100111111101	11101111111111	1111100111110	100011110100	1110111011	001111111001
111111101111001	11001011111111	1111111101111	110011111010	1111101010	011111110101
1111101011111111	11001111111001	1100101111111	1011101111111	1111111100	001111110010
1111101011111111	11101111111001	1100111111111	1011101101111	1111101100	001111110010
1111101011111110	111111011111001	1110101111111	1010101111110	1110101100	101110111101
1111101011111100	111011011111000	1100111111111	101011110001	1111111011	110110110011

1101111010111110 11101101111001 110111111111 101110111110 1111111111 111110101111
1101100011111100 11111101111001 110011111111 101010111101 1111111111 111110011101
1111111011111100 11101111111001 110010111111 101110110111 1111111010 010111011101
1111011011111110 11111111111001 110011111111 111001110101 1111101010 011110011101
1101111010111101 11101101111111 110010111110 101111111110 1111101000 011111011111
1111110011111101 11100011011101 110111011110 101011010001 1111111100 111111001100
1111101011111001 11111100011101 111110111111 101111110101 1111101010 101110011111
1111010011111001 11101111111101 110111101111 111011110101 1111101000 010110111011
1111001011111001 11111100111101 110111111110 101111111101 1110111011 101100001101
1111110111111101 11011111110100 111101111111 101011111001 1111111111 000101110001
1111011011111001 11000011000000 111100111111 110110011111 1111111101 110110110001
1111111010111101 11001101111101 111100110111 100111011111 1111101010 000111111101
1001000100111111 11111001110100 111100011111 100100011111 1110101000 011111011111
1001010101100111 11011111111110 111100011111 100100111111 1111101000 010111111101
1101111011001111 11111101111100 111111111111 101100010111 1111101010 010100001001
1101011101110111 11001111110110 111111101111 100100111111 1111111010 011111111011

Name =Pinceana3

111111101111011 11011011110011 110101111110 1001111111000 1111111010 010111101110
111111011111111 11101101111101 111101011111 111111101111 1111101011 010110111011
110101010111011 11111011111011 111111111110 100111111110 1111101111 010110111101
110111111111111 11111101111001 110101011110 110101111100 1111101001 010110111101
1101110111110011 11111101111101 111111011110 1000111111011 1111101001 000111101011
111111111111111 11011011111001 111101011010 101101111011 1111111111 000101111100
110111111111011 11111011111011 110111111110 101111111001 1110111000 010101101101
1111111111110011 11011011111011 110111011110 100111000101 1110101000 000100011101
111111111011111 11111101111101 111111001110 1011111110001 1111101010 0001011110100
1100111111111110 1101111111101 111101001010 101011110001 1111111101 011110011101
110011111111111 1100111111111 111111111110 101011111101 1111111001 010100111101
110011111111101 1110111111101 111111101110 101001100000 1110101000 010100111101
1101110110111101 1111110111101 11110101111 111111111110 1110101010 111100011011
1101111111111110 1111111111101 111111111110 111111111101 1111101001 010101111110
111111111011111 1101111011111 110101001010 101111111101 1111101110 000101011101
111011111111111 1111111111101 110101001110 101111111101 1111101010 010110111101
111011111111011 11111101111101 11011010111 111000111010 1111101010 110110011111
111111011111111 11011101111101 11111010111 11100111111 1111101010 011111010101
1110011111110101 11101111111101 10001010111 11010111111 1111111100 110111011101
111011111110101 11111110111100 11011110111 110101111110 1111111010 010110011100
1110111111010101 1111111111101 110111101111 110101111010 1111101000 010110011011
1111111111010101 11101101111101 11011111111 100001111010 1111101011 110110011101
1111101111011101 11111101111101 11011010111 10000111111 1111111001 101111011010
1111111111110010 11000101111101 110110101110 10111111111 1111101011 010110111001
1110011011111110 11110001111100 110111111110 11111110111 1111101000 001110111001
1111101111101110 11111101111101 110100111110 11111111111 1111101000 010110111001
1111111111111110 1111111111101 111110111110 101111110111 1111111000 111110111111
1111111011101110 11010111111001 110101101110 101111110111 1110101000 111111111000

Name =Pinceana4

1111100101111011 11011011111011 110101111110 100011111110 11111111100 111111011100
1111101101111011 11111011111011 110101111110 101101101001 1111111000 011111101101
111111111111111 11111001110011 111101011111 101101111011 1111101000 001110100101
111111111111111 11111101111101 110100111111 110111101011 1111101000 010111111011
111111011111011 11111101110011 110111011110 110111111101 1111101010 100100111011
1111011101110011 11011101111011 110111011110 111101101001 1111101000 000111111111
1101110101110111 11011001111011 110100111110 11010111111 1111101000 101111111111
1101111101111110 11011101111101 111111001110 101111110111 1111101001 000100110100

110111110111100 1111111111001 111110001110 101111111110 1110111000 010100010100
1101110110111110 1110110111111 111101111111 111011111111 1110111000 001110110101
1101111000111100 11101101111101 001111011110 111001111010 1110111100 000111110111
1111110010111101 11001101111101 111011001110 111111111100 1111101000 100100111111
1110111010111110 11101101111011 111101101110 111011111101 1111101000 010110110111
1100010101111110 1111110111111 111111101110 111111110101 1111111100 000111011101
111111110111110 1110110111111 110101101100 110111111110 1111111000 11011111001
111011111100111 11101110111000 110110101111 110101111101 1111101010 011111111101
1110110111110101 11111101111001 11111011111 110001111110 1111101001 011111011111
111101111110101 11111101111100 110110101111 110001111111 1110101001 100100011010
1111110001110111 11111101011001 111110101111 110001111110 1111101001 111110011111
111010111110111 11001101111011 11011011111 110110111100 1111111100 010111011101
1111110111110101 11111101111100 110101111110 111111110011 1111111001 001110111111
1111101011100010 1111111111111 110111111110 111111111110 1111101000 001111111101
1110011011110010 11111101111101 111100101110 110111111111 1111111000 011110111001
1111001111101110 11101101111101 111101101110 111111010001 1111101001 011111011101
1110001110110010 11111101111101 111101101110 100111111110 1111111001 101101111011
1111101011100010 1111111111111 111111011110 101111000000 1111101001 101101111011

Name =Pinceana5

1011111101111111 11010111111010 0111111100000 111111111011 1100010111 111110111111
1011111111011110 11101101111011 010111101000 111011111111 1110010011 001111111111
1011101111011010 11010001101010 010111100000 111011111111 1100010011 111110101101
1111111111011011 11010111111010 010111100001 111111111111 1110010101 001110111101
1111111011011011 11100111011111 111111111111 111111111111 1110010001 111110111001
1011111111011010 11100111111011 111111111001 111111111111 1110110011 001111111000
1110101111111010 11111111111010 010111110110 101110110101 1110010101 011111111011
1101111111111010 11001111111010 011101110000 101110111001 1110010111 101111111011
1000111110011010 11111111111110 010101010100 101111110111 1110011001 001101111111
1101111111111010 11111101111010 010101110100 101111111111 1111111111 100101111111
1001111100111111 11100111111110 010101010100 001111110111 1110011101 000110111111
1001111111111010 11011111111111 111111111100 101111110111 1110011001 101111111111
1010111111111110 11111101111110 011111111010 101111111111 1110011111 000101111111
1110111111011011 11011111111110 011111111010 101111111111 1101111101 000101111101
11111101110110010 11110111111110 111111111100 101011110111 1110011101 011111111011
101111110110010 11110111111010 011101010000 100111011111 1110011000 110110111111
1011101110011011 11101100011101 000101010000 101111011111 1110011111 011110111011
1011111111110010 11110111111001 011111110000 101011111111 1110011111 111110111111
1111110111010010 11111111111101 000101110000 101111011111 1110011001 111111111111
1100111111110110 11111111111101 000101110001 111111001111 1111011011 100111111001
1010111111110110 11011111111100 001111110000 001111001111 1110011001 000101111011
1011100111110110 11110100010111 101111100011 111111111111 1110011001 011111111101
1001100111010110 11110100010111 111111100001 100011011111 1110011111 001101101101
1001111010111110 11111111101111 111011100001 101011011111 1111111111 0001011110101
1111111011111111 11111111101111 101011100001 101111110111 1111011011 100111111001
1011111111111111 11101111111011 111111110101 111111111111 1111011111 111110111001
1001101011010110 11011111111010 111011101110 111111111111 1111011111 011110111111
1111110110110011 11011111111110 111011100001 001010010111 1111011111 111111111011

Name =Pinceana6

1111011101111110 11111101111111 111111111111 101111111111 1110010001 111110110001
1111011101011111 11011111111011 110111111111 101111110111 1111011101 111111111001
1111011101011111 11001101111011 111111111101 101111111111 1111010101 001110110101
1111001111111111 11011101111011 010111110001 101100011101 1110010001 001111111001

1111011111111111 11111011111110 010111110010 111011111111 1110010001 001101111011
1110001110111111 1101111111000 010111111111 111111111111 1111010111 011110111101
1111001110111110 1111111111101 010111111101 101111010111 1111010001 001110111101
1110011111111111 11001101111111 010111111000 111111111111 1110011011 001110111111
1110011110111111 11010001011111 010011111111 101111111111 1111011111 001111111101
1111011111011010 11101111111011 011111111010 111111111111 1111011111 100111111111
1011011110111111 11001101111111 011001111010 100111111111 1111111111 011110111001
1011011110111111 11001101111111 010101111001 000111011101 1110011111 110110111011
1000011110111111 1111111111111 010111111000 111111111101 1111011111 111111111001
1110110111010111 11001101111110 000111111101 001111011111 1110010101 010110111101
1010110101011111 11111101111111 010111111111 111111011111 1110011101 010111111111
111111011110110 11000111111111 011111111001 111111111111 1111010101 110110111001
1111111111010111 1111111111111 010101110000 101111111111 1111010111 011111111111
1011110111110111 1110111111111 010111111000 001111101011 1110010101 111111111101
1001110110110011 1111111111101 011111111000 111111011111 1110010011 111111111111
1001110111110111 1111111111111 011111111010 001111000111 1110010101 111111111111
1000110111010011 1111111111100 011111111010 111111011111 1110010111 111111111101
1011111111011111 1111111111100 001111111110 111111111111 1110011001 111111101101
1011111011011111 1100111111101 001111110011 111111111111 1110010001 111111111011
1011111011011011 1101111111011 001011100001 001111011111 1110011101 111111111111
111110111111011 11111101101110 101011110001 110111110111 1111011001 111111111111
1011100110111010 11011101101011 001011100001 000111011111 1010010001 110111111101
1011110111111110 1111111110111 101111110101 111111110111 1111010011 101110111111
1111110111010010 1111111110111 111011100001 111111110111 1111010011 111101111111