

00345
1
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTRUCTURA DEMOGRAFICA Y GENETICA DE UNA
ESPECIE DEL GENERO Pinus (Pinus rzadowskii
MADRIGAL ET CABALLERO), ENDEMICA DEL
ESTADO DE MICHOACAN, MEXICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA VEGETAL)**

P R E S E N T A :

PATRICIA DELGADO VALERIO

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELENA ALVAREZ-BUYLLA ROCES**

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Esta tesis esta dedicada a la Facultad de
Biología de la Universidad Michoacana de
San Nicolas de Hidalgo "Tzipecuarengua" y
a los pinos "Tzinchag"**

AGRADECIMIENTOS

Como agradecer los esfuerzos plasmados en estas páginas:

A la Dra. Elena Alvarez-Buylla, M en C. Xavier Madrigal y al Dr. José Luis Villaseñor por haber aceptado forma parte del comité tutorial y por sus valiosos comentarios y sugerencias durante el planteamiento y desarrollo del trabajo. A los demás integrantes del jurado, Dr. Daniel Piñero, Glenn Furnier, Ken Oyama, Luis Eguiarte y Nidia Pérez. Por su revisión detallada del manuscrito, ya que fueron criticas y sugerencias sumamente valiosas para megamejorar esta tesis. Especialmente las sugerencias de Luis Eguiarte, que fueron muy interesantes.

De manera especial agradezco a la Dra. Elena Alvarez-Buylla por dirigir esta tesis. Por el tiempo y esfuerzo que dedicó en mi formación profesional y por el entusiasmo y ánimo que siempre proyectó aún en mis deserciones repentinas.

También quiero agradecer muy firmemente al Dr. Daniel Piñero por su vivacidad, confianza y apoyo en todo momento. Por que los pinos son el futuro.
Al Ing. Francisco Ruiz por el apoyo que brindó durante el trabajo de campo y facilitar mi integración con la gente local.

Dos de las personas que merecen todo mi respeto y gratitud son el Sr. Seferino Moreno y don Manuel Sapián, quienes realizaron toda la coordinación en el trabajo de campo y me enseñaron a dar largas caminatas sin exasperación, ni desánimo. A toda la familia de Dos Aguas y El Varaloso.

Glenn Furnier por su gran ayuda durante la elaboración de este trabajo y mucho más por su apoyo durante los momentos estelares.

Agradezco a Rosaura Luna, Liz Izquierdo y Nidia Pérez, por su ayuda durante el montaje de la técnica de electroforesis; Liz, por aguantar mis incansables desacuerdos; Rosaura por ser tan paciente y rescatar lo aprendido; Nidia, porque le tocó hacerla de cuatacha. Estoy muy agradecida con Alvaro Chaos, por toda su ayuda en el análisis de los datos y uso de los programas de cómputo, y porque siempre está.

América Castañeda, quien con toda disposición me explicó y ayudó en diversos aspectos del trabajo. Gracias.

Adrián Quijada, con quien después de tanto rebote logramos hacer un trabajo en común, *Pinus rzedowskii*.

Carlos Lara, por las explicaciones de la genética de poblaciones con canicas blancas y negras y por la revisión que hizo del primer borrador de la tesis, que pesadilla.

Eneida Montesinos, por los días de trabajo arduo en que logramos coincidir.

Alejandra Vázquez -Lobo y Guadalupe Méndez, por su sonrisa.

Rodolfo Salas, por su ayuda, cuentos y novelas.

También a Virgilio Lara, Gloria García, Alicia Cervantes, Raúl Cueva, Cuauhtémoc Chávez

y los veladores, quienes siempre me auxiliaron en algún momento crítico del trabajo.

A mi familia. Aida Valerio, Francisco, Aida, Fabiola y Clementina. Por su ánimo y tranquilidad.

RESUMEN

Analice factores genéticos y demográficos que pueden ser importantes en determinar la extinción de *P. rzedowskii* y tambien para su conservación. *Pinus rzedowskii* es una especie endémica del estado de michoacán, México, para la cual solo se habian reportado 3 poblaciones. Es una especie particularmente interesante por presentar caracteres morfológicos intermedios entre los dos grupos taxonómicos principales de pinos (Haploxylon y Diploxylon). La estructura poblacional de la especie fue analizada con base en parámetros demográficos y en loci isoenzimáticos. Encontré 12 localidades en donde crece la especie con una abundancia total de aproximadamente 6000 individuos. Los datos demográficos muestran un reclutamiento bajo y una estructura de edades con una preponderancia de individuos maduros y una proporción baja de plántulas y juveniles. Aproximadamente el 55% de los individuos son mayores de 50 años. La mayoría de ellas tienen un reclutamiento deficiente, solamente en 3 poblaciones se registraron plántulas (individuos menores de un año) y estas se localizaban en parches bien definidos. La variación y estructura genética se estudiaron con base en 14 loci para 344 individuos distribuidos en 9 poblaciones. *P. rzedowskii* tiene una variación genética relativamente alta, con 46.8% de los loci ensayados polimórficos, un total de 32 alelos y heterocigosidad promedio por población de 0.219. Hay una marcada diferenciación genética entre poblaciones, el 17.5% de la diversidad genética se debe a diferencias entre poblaciones. Aunque *P. rzedowskii* es endémica, con poblaciones pequeñas y fragmentadas, presenta más variabilidad genética que otras especies de pino más abundantes o que se encuentran en su misma condición poblacional. En esta especie los procesos de extinción probablemente dependen más de los factores demográficos que de los genéticos.

ABSTRACT

I analyzed genetic and demographic factors which could be important for the conservation of *Pinus rzedowskii*. This species is endemic from the state of Michoacán in central western México, that had previously been reported from only three localities. It is a particularly interesting species because it exhibits morphological characters intermediate between the two main taxonomic groups of pines (Haploxyylon and Diploxyylon). Population structure was analyzed with genetic markers and demographic parameters. In our field surveys, I found 12 localities of *P. rzedowskii*, with a total of approximately 6000 individuals. Demographic data demonstrate a very low recruitment and on age distribution biased to wards mature individuals, with 55% of the individuals being older than 50 years old. Seedling recruitment was detected in only three populations and the seedlings had a patchy distribution. The genetic structure of nine populations (344 individuals) was examined using 14 isozymic loci. *P. rzedowskii* has a relatively high level of genetic variation with 46.8% of the loci assayed being polymorphic, a total of 35 alleles and a mean heterozygosity per population of 0.219. There is a marked differentiation among populations; 17.5% of the total genetic diversity is due to differences among populations. Although *P. rzedowskii* is endemic, with small and fragmented populations, it presents higher levels of genetic variation than other species with larger populations or with similar population sizes. In this species the process to extinction likely depend more on demographic than on genetic factors.

CONTENIDO

PRESENTACIÓN

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Procesos de extinción	3
1.2 Genética de poblaciones	5
1.3 Biología de la conservación	6
1.4 Objetivos	9

CAPÍTULO II

DESCRIPCIÓN DE *P. rzedowskii* Y DEL ÁREA DE ESTUDIO

2.1 <i>P. rzedowskii</i> Madrigal et Caballero nombre común "Pino ocote"	10
2.2 El área de estudio	13

CAPÍTULO III

DEMOGRAFÍA DE *P. rzedowskii*

3.1 INTRODUCCIÓN	16
3.2 MÉTODOS	18
3.3 RESULTADOS	20
3.3.1 Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>P. rzedowskii</i>	20
3.3.2 Densidad y tamaño de las poblaciones de <i>P. rzedowskii</i>	22
3.3.3 Estructura de edades y reclutamiento	25
3.4. DISCUSIÓN	32

CAPÍTULO IV

VARIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *P. rzedowskii*

4.1 INTRODUCCIÓN	35
4.2 MÉTODOS	39
4.2.1. Colecta de material y electroforesis	39

4. 2. 2. Análisis de datos	39
4. 3. RESULTADOS	43
4. 3. 1. Variación genética de las poblaciones de <i>P. rzedowskii</i>	43
4. 3. 2. Estructura genética de las poblaciones de <i>P. rzedowskii</i>	49
4. 4. DISCUSIÓN	54
CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN GENERAL	
5. 1. Demografía y genética: Perspectivas de conservación	61
5. 2. Conclusiones	69
LITERATURA CITADA	70
APÉNDICE	

PRESENTACIÓN

En esta tesis presento dos estudios bajo la idea central de que factores demográficos y genéticos pueden ser fundamentales en los procesos de extinción de especies. El primer estudio trata sobre algunos parámetros de la demografía de *P. rzedowskii*: inicialmente, hago una exploración exhaustiva de los posibles lugares donde habita esta especie y a partir de ello, analizo algunos parámetros demográficos que proporcionan información general sobre la dinámica poblacional de esta especie, como son el tamaño, reclutamiento y estructura de las poblaciones. El segundo estudio trata sobre la variación y diferenciación genética entre las poblaciones, cuyo análisis está sustentado en las desviaciones de las frecuencias alélicas del equilibrio Hardy-Weinberg. Con estos datos se logró hacer una estimación de las distancias genéticas de las poblaciones, que se representan en un fenograma realizado con base al método de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). También se realizó un análisis de aislamiento por distancia (Slatkin 1993) y se estimó el tamaño efectivo de las poblaciones de manera indirecta. Finalmente, hago una discusión conjunta de los dos estudios (demográfico y genético) y propongo algunas pautas para la conservación *in situ* y *ex situ* del recurso genético de *P. rzedowskii* y de otras especies de pinos en peligro de extinción que puedan presentar características semejantes.

El presente estudio fue realizado en el laboratorio de Genética y Evolución del Dr. Daniel Piñero Dalmau y en el laboratorio de Genética Molecular y Evolución de la Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces, del Instituto de Ecología, UNAM. Fue financiado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) y el Instituto de Ecología, UNAM.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las condiciones biogeográficas, geológicas, orográficas y climatológicas de México han promovido la diversificación de muchos linajes de plantas y animales. Entre ellos se encuentra el género *Pinus*, del cual México cuenta con el mayor número de especies del mundo. De acuerdo a Perry (1991) en México hay 72 especies, variedades y formas de este género, distribuidas en un rango muy amplio de condiciones ambientales. Varias de estas especies están representadas por poblaciones muy pequeñas y algunas de ellas están en peligro de desaparecer localmente. Además, algunas de las especies amenazadas son endémicas a México y por tanto, se encuentran en peligro de extinción global. En estos momentos existen por lo menos nueve especies consideradas como raras y en peligro de extinción que son: *Pinus culminicola*, Andresen et Beaman, *P. lagunae*, Passini, *P. jaliscana*, Perez de la Rosa, *P. johannis*, Passini, *P. maximartinezii*, Rzed, *P. nelsoni*, Shaw, *P. pincaeana*, Gord, *P. rzedowskii*, Madrigal et Caballero, *P. radiata* var. *hinata*, Lemm (Tabla 1. 1).

La gran diversidad de especies de pinos, así como el alto índice de endemismos existentes en México constituyen una riqueza, no solo para nuestro país sino para todo el mundo. Cada una de las especies es el resultado de millones de años de evolución biológica que ha moldeado y producido entidades con diversas composiciones genéticas y adaptaciones ecológicas, por ejemplo al fuego, diversos factores del clima, plagas etc. Algunas especies de pino tienen una distribución restringida probablemente porque son de origen reciente. Para otras especies su hábitat ha sido perturbado, con la consecuente fragmentación y disminución del tamaño de sus poblaciones (e.g. *P. muricata*, *P. pincaeana*). El manejo forestal inadecuado de especies maderables y resineras, las altas tasas de destrucción de los bosques por plagas e incendios y la transformación de áreas de la vegetación nativa en agrícolas y de pastoreo, han sido determinantes en la acelerada reducción de algunas de estas poblaciones de *Pinus*.

La conservación de la diversidad de pinos puede, por lo tanto, tener gran relevancia para: 1) la obtención de híbridos más vigorosos y resistentes a plagas y diversas condiciones ambientales en plantaciones comerciales, 2) programas de producción masiva de

pinos destinados a la restauración y conservación de bosques naturales bajo diferentes condiciones ambientales, y 3) programas de manejo múltiple que incorporen el conocimiento nativo acerca del potencial de uso de las especies. La amplia gama de usos de las especies de pino, su importancia ecológica, económica y social, así como el precario estado de conservación de algunas especies, sustentan solidamente el desarrollo de trabajos relacionados con la preservación de este importante grupo de especies. Sin embargo, los mayores esfuerzos de investigación forestal en México se han destinado solamente a algunas de las especies más comunes y comerciales (Darrow y Coetzee 1983, Flores 1986, Barnes, et al. 1987).

En el presente escrito, presento un estudio sobre *P. rzedowskii*, una especie que se distribuye en una área muy restringida del suroccidente del estado de Michoacán. Es endémica y catalogada como rara y en peligro de extinción (Perry 1991). *P. rzedowskii* no ha sido estudiada después de su descripción en 1969, sin embargo es una especie muy interesante para su estudio desde el punto de vista de su biología e historia evolutiva. i) no se conoce el número total de poblaciones ni su área de distribución actual, ii) es una especie endémica y representa por poblaciones pequeñas con una distribución sumamente restringida, iii) *P. rzedowskii* es considerada en peligro de extinción y catalogada como rara, presenta caracteres morfológicos intermedios entre los dos grupos de pinos que representan a este género (*Haploxylon* y *Diploxylon*). Por lo tanto, es una especie que puede servir como patrón para generar información básica sobre la biología de los pinos y como pauta para iniciar trabajos de conservación y manejo de áreas naturales.

Tabla 1.1. Distribución de especies del género *Pinus* catalogadas como raras y en peligro de extinción en México (modificado de Perry 1991).

ESPECIES DEL GÉNERO <i>Pinus</i>	ESTADO	LOCALIDAD	ALTITUD (msnm)
<i>P. culmnicola</i>	Nuevo Leon	Cerro Potosi, cercano al Mpio de Galeana	3,500
	Coahuila	Sierra Sta Marta,	
	Zacatecas		
<i>P. maximartinezii</i>		Villa de Pueblo Viejo, Meseta pequeña de la Sierra de Morones	2,800 - 3,200
<i>P. rzedowskii</i>	Michoacán	Mpio de Coalcomán	2,040 - 2,300
		Cerro de Chiqueritos	
		Cerro Octoso y Puerto del Pimabete	
		El Fresno	
<i>P. pinecana</i>	Coahuila	Cuaultemoc	1500 a 2300
	Zacatecas	Huizache	
	San Luis Potosí	Guadalcazar	
	Queretaro	San Joaquin	
<i>P. johannis</i>	Zacatecas	Ejido de Concepción del Oro, en Masapil	2,700
	Coahuila	Pueblo de Miquihuana	
	Nuevo Leon	Mpio Aramberri,	
<i>P. radiata</i> var <i>vinata</i>	Baja California Norte	Isla de Cedros	300 - 1,100
		Isla de Guadalupe,	
<i>P. lagunae</i>	Baja California Sur	La Paz, en la Sierra de la Laguna	1,200 - 2000
<i>P. jaliscoana</i>	Jalisco	Mpio El Tuito, Minas de Zimapan y Rancho El Saucillo	850 - 1,650
<i>P. nelsonii</i>	Nuevo León	Villa de San Lorenzo Aramberri, Galeana y Valle de Miquihuana	1,800 - 3,00
	San Luis Potosí	Valle de las Tablas	
	Coahuila	Montañas del Carmen.	

1. ANTECEDENTES

1.1. Procesos de extinción

La probabilidad de extinción de una especie depende de las características intrínsecas de la misma y de los diferentes factores que alteran el ambiente donde se

encuentra. Las especies con tamaños poblacionales pequeños son de antemano más susceptibles a la extinción que las especies abundantes, y los factores extrínsecos solo incrementan esta probabilidad

Hay numerosos modelos matemáticos que analizan las probabilidades de extinción en áreas geográficas amplias y para toda una asociación de especies (MacArthur 1972). Estos modelos ignoran los detalles ecológicos de cada una de las especies y de la estructura de sus poblaciones, por lo tanto no pueden predecir de manera específica la extinción de especies particulares. Recientemente, se ha estimulado el estudio de procesos demográficos y genéticos para conocer el status poblacional de una especie. Los datos generados por estos estudios pueden constituir herramientas útiles para el desarrollo de modelos predictivos que permitan evaluar las posibilidades de extinción de especies particulares. Lande (1988) menciona que la extinción de especies está fundamentalmente determinada por procesos demográficos y genéticos, de tal manera que para predecir las posibilidades de extinción de una especie se requiere tanto de información ecológica como evolutiva

Los procesos demográficos son aquellos que determinan el tamaño (número de individuos por población), tasas de crecimiento (número de individuos dejados por individuo de una generación a otra) y la estructura de edades (número de individuos en cada categoría de edad) en una población. Los procesos genéticos determinan la calidad, cantidad y distribución espacial y temporal de la variación genética (Alvarez-Buylla, 1993)

Lande (1988), agrupa a los factores demográficos que determinan la dinámica de una población en cuatro grupos: i) estructura social y de sexos, ii) la variación en las historias de vida producidas por fluctuaciones ambientales, iii) la dispersión en ambientes heterogéneos y iv) las tasas de extinción y colonización locales. Todos estos factores se reflejan en el tamaño de las poblaciones y sus fluctuaciones a través del tiempo. Cualquier factor ecológico que provoque tasas de crecimiento menores a uno de manera sostenida (es decir, cada individuo deja menos de un individuo de una generación a otra), provocará la reducción del tamaño poblacional y eventualmente su extinción.

Por otro lado, algunos de los factores genéticos que afectan las posibilidades de extinción de una especie son 1) La depresión endogámica, es decir la formación de genotipos deletéreos por el apareamiento entre parientes que origina individuos con menos

posibilidades de establecerse en medios adversos; 2) La pérdida de variación genética por efectos de la deriva genética (pérdida de variación génica al azar, por error de muestreo en poblaciones pequeñas), lo cual también limita la capacidad de las poblaciones para adaptarse a cambios ambientales; 3) La fijación de mutaciones deletéreas (Hedrick 1983; Hartl y Clark, 1989). Queda claro entonces, que mientras que las causas demográficas de extinción están asociadas a la ecología de las poblaciones, las causas genéticas dependen de la historia y de la dinámica evolutiva de las mismas. En este trabajo se enfatiza el análisis de la genética de poblaciones, aunque también se proporcionan algunos datos a cerca del status demográfico de la especie bajo estudio.

1.2. Genética de poblaciones

La genética de poblaciones describe y analiza los niveles de variación genética dentro y entre las poblaciones a partir de las frecuencias alélicas y genotípicas. Su interpretación se basa en el principio matemático formulado por Hardy-Weinberg. Este principio postula que las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra si se cumplen cuatro supuestos centrales. 1) que el tamaño de las poblaciones sea grande y por lo tanto no haya fluctuaciones en las frecuencias alélicas o genotípicas, 2) que todos los apareamientos se lleven a cabo al azar, 3) que todos los individuos sean igualmente competentes para dejar hijos y 4) que no lleguen alelos de fuentes externas (que no haya flujo genético). Sin embargo, en la naturaleza se observan pocas poblaciones que cumplan con estos supuestos por lo que este principio se infringe fácilmente. Por ejemplo, cuando la primera condición no se cumple (tamaño muy grande) actúa la deriva génica, promoviendo la pérdida y fijación de alelos de manera azarosa. Si no todos los individuos son igualmente competentes (tercer supuesto), la selección natural puede estar operando. Por tanto en el estudio de la genética de poblaciones se trata de conocer cuánto se desvían las frecuencias alélicas del equilibrio Hardy-Weinberg y de analizar las fuerzas y procesos evolutivos que están actuando en las poblaciones naturales: selección natural, deriva génica, mutación, migración, flujo genético y sistemas de apareamiento (Eguarte 1990)

En poblaciones pequeñas y/o fragmentadas los niveles de variación y la estructura genética dependen mucho de la deriva génica y del flujo genético. Se ha visto que las probabilidades de cambio de las frecuencias alélicas por deriva genética son mayores en

poblaciones pequeñas (Wright 1965; Hedrick 1983; Hartl and Clark, 1989). Esto ocurre porque en la transmisión de gametos de una generación a otra, sólo se contiene un tipo de alelos de los que presenta la generación parental (Ellstrand y Elam, 1993). Por lo tanto, la deriva genética cambia la distribución de la variación genética mediante dos vías: i) disminución de la variación genética dentro de las poblaciones (pérdida de heterocigos y fijación eventual de alelos), e ii) incrementando la diferenciación entre las poblaciones.

El flujo genético se refiere al movimiento de genes entre las poblaciones. Este proceso está en interacción con otras fuerzas evolutivas como la selección natural y la deriva génica (Wright 1943, 1946, 1965; Maruyama y Kimura, 1980) Tanto en poblaciones pequeñas como grandes el flujo genético homogeniza la variación genética contenida en éstas (Slatkin 1987)

La manera en como está repartida la variación genética dentro y entre las poblaciones tiene particular importancia para la conservación de recursos genéticos. La estructura genética de las poblaciones por tanto, no sólo proporciona elementos para entender los mecanismos de evolución que operan en los organismos, sino que también es muy útil para conocer los procesos de domesticación de plantas cultivadas y proporciona información necesaria que puede aplicarse en programas de manejo y conservación de recursos naturales (Franklin 1980; Frankel y Soule 1981; Clegg y Brown 1983)

1.3 Biología de la conservación

Se conocen pocos trabajos que conjunten tanto información demográfica como genética para especies particulares y que sean desarrollados con fines de conservación. Tradicionalmente los estudios de conservación de especies se sustentan sólo en información genética (Bannister 1965; Levin 1981, Crawford 1984a). Los estudios genéticos permiten hacer estimaciones de la variación genética y estructura genética de las poblaciones, así como determinar su tamaño efectivo (N_e) que es un parámetro muy útil para fines de conservación (Barret et al., 1991; Ellstrand y Hoffman, 1990; Eguiarte 1990). El tamaño efectivo es un estimador del número de individuos que contribuyen a la adecuación de la especie (individuos que se reproducen) y se define como el número de individuos en una población ideal que puede tener la misma probabilidad de variación de las frecuencias alélicas por deriva génica que una población real (actual) (Hartl y Clark, 1989). N_e siempre

es menor que el tamaño real de la población (N) y la diferencia se debe a varios aspectos como fluctuaciones temporales en el número de individuos que componen una población, sistemas reproductivos no aleatorios, fertilidad diferencial, desviación de la proporción (1:1) de sexos, diferencias en la estructura de edades, en el tamaño de las poblaciones y en la cantidad de movimiento genético entre las poblaciones (Kimura y Crow 1963, Crawford 1984a, Heywood 1986). Las poblaciones que presentan tamaños efectivos constantemente pequeños pueden ser más susceptibles a la pérdida y reorganización de la variación genética que aquellas con poblaciones mayores (Ellstrand y Elman, 1993).

A pesar de la importancia del tamaño efectivo para determinar la dinámica evolutiva de las poblaciones, son pocos los trabajos que han hecho estimaciones directas o indirectas de este parámetro, particularmente para plantas (Hill 1972, 1979, Eguiarte 1990, Alvarez-Buylla y Garay, 1994). Esto es, que conjunten información de algunos parámetros demográficos, como tasas de crecimiento poblacional, de dispersión, fecundidad o de sobrevivencia y determinen el N_e directamente y por otro lado, que analicen este mismo estimador de manera indirecta, basado por ejemplo, en el uso de frecuencias alélicas (Nei y Tajima, 1981; Van Dijk 1987) o del uso de la F_{st} (Crow y Aoki, 1984). Esto se debe a que las estimaciones indirectas de N_e requieren de estudios demográficos a largo plazo (censos anuales o periódicos que permitan conocer los parámetros poblacionales). Para las especies raras o en peligro de extinción sin embargo, es imprescindible el conocimiento de los patrones demográficos. Por lo tanto, es importante considerar estrategias que en menor tiempo proporcionen información de este tipo.

Muchos de los programas de conservación se han hecho con base en la distribución de especies y los tamaños de las poblaciones (Hamrick y Godt 1989, Brown y Briggs 1991, Ellstrand y Hoffman, 1990). Para las especies que están representadas por poblaciones grandes y de amplia distribución no se requieren grandes cantidades de individuos. La cantidad de poblaciones a proteger es menor que la que se necesita en poblaciones fragmentadas y pequeñas (Brow et al., 1989). En este último caso las poblaciones pueden contener una pequeña fracción de la variación genética del aservo original y por tanto, se requiere proteger a todas las poblaciones (Center for Plant Conservation 1987).

Eguiarte (1990) menciona que si se mantienen menos individuos de los que se

necesitan para tener un tamaño efectivo, la tasa de pérdida de variación genética, o el incremento en la endogamia van a tender a aumentar. Por lo tanto un objetivo de la conservación genética debe ser mantener poblaciones con cuando menos un tamaño efectivo. Varios estudios han demostrado que se necesitan tamaños efectivos de entre 50 a 500 individuos (Franklin 1980, Frankel y Soule, 1981; Lande 1988; Brown et al., 1989). Generalmente se piensa que 50 individuos cuando lo que se quiere conservar son los polimorfismos y los fines de conservación son eficientes a corto plazo y de 500 cuando se quiere conservar los niveles de variación cuantitativa (más importantes en términos adaptativos y ecológicos), o cuando los objetivos de conservación son a largo plazo (Franklin 1980, Frankel y Soule, 1981; tomado de Eguiarte 1990) Indudablemente la derivación de estos números (50/500) no es generalizable y siempre es mejor tratar de hacer estudios particulares para las poblaciones que se pretende conservar (Lande 1988) Además, no hay que olvidar que los factores demográficos y ambientales pueden causar la extinción de especies con poblaciones aun mayores que estas (50/500) (Alvarez-Buylla et al., 1996).

Actualmente, en los planes de conservación y preservación de especies se han manejado dos estrategias con objetivos específicos. Por un lado, el establecimiento de reservas biológicas en los sitios en donde se encuentran las poblaciones naturales, programas llamados "*in situ*" y por otro lado, la conformación de bancos de germoplasma mediante el almacenamiento de semillas viables y tejidos vegetativos, o bien los jardines botánicos. En este caso, como se toma una muestra del total de la población natural se le llama preservación "*ex situ*". En el primer caso, es importante considerar el status demográfico de la especie para definir criterios de extensiones a proteger. Para el establecimiento de las colecciones en los bancos de germoplasma o en algún ambiente artificial, es importante establecer criterios claros para el muestreo de las semillas que sean representativas de la variación genética existente en las poblaciones (Brown et al., 1989).

1.4 Objetivos.

En este trabajo se propone como objetivo general hacer un estudio demográfico y genético de la estructura de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*. Con esta información (demográfica y genética) se pretende obtener bases teóricas y empíricas sobre el status poblacional de la especie y evaluar su importancia en las posibilidades de extinción de la especie.

Objetivos particulares:

(1) Determinar el área de distribución de *Pinus rzedowskii*, así como las poblaciones que representan a la especie.

(2) Hacer estimaciones del tamaño y estructura de edades de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

(3) Estimar los niveles de variación genética encontrados en *Pinus. rzedowskii*, con base en marcadores isoenzimáticos.

(4) Hacer un análisis de la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones.

(5) Estimar indirectamente el tamaño efectivo de las poblaciones y el aislamiento geográfico entre las mismas.

(6) Proponer una estrategia de manejo y conservación para la especie con base en la información demográfica y genética recabada.

CAPÍTULO II DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE Y DEL ÁREA DE ESTUDIO

2.1. *Pinus rzedowskii* Madrigal et Caballero (Nombre común "Pino ocote").

Pinus rzedowskii fue descubierta en 1956 y descrita en 1969 por X. Madrigal y M. Caballero. Esta especie está clasificada taxonómicamente dentro del subgénero o sección Haploxyton (pinos blandos) que agrupa a todas las especies que contienen un haz vascular en las hojas, dentro de la sección Paracembra y subsección Pincenana (siguiendo el criterio de Shaw 1914 y Martínez 1945, modificado por Perry, 1991). Cuatro especies conforman este grupo: *P. maximartinezii* Rzed., *P. rzedowskii*, *P. pinacana* y *P. nelsonii*. Las dos primeras especies son raras y se encuentran en peligro de extinción (Dirección Oficial de la Federación 1994) y las dos últimas están catalogadas como especies raras (Perry 1991). Con excepción de *P. rzedowskii* tres de estas especies son de talla pequeña con coronas redondeadas. *P. rzedowskii* es de mayor talla con semillas aladas más parecidas a las semillas de la sección Cembra. Pero con el umbo de las escamas en posición dorsal, rasgo que caracteriza a la sección Paracembra.

Madrigal y Caballero (1969) reportan tres poblaciones para esta especie: Puerto del Pinabete, la población de El Cerro Ocotoso (que en este trabajo se le nombra La Soledad) y la población de Chiqueritos. Las especies de pino que se encuentran en ecotono con *P. rzedowskii* (*P. herrerae* Mtz., *P. michoacana* Mtz., *P. pseudostrobus* Lind y *P. oocarpa* Schiede, *P. leophylla* Schl et Cham, *Pinus douglasiana* Mtz.), pertenecen a la sección Diploxyton (pinos duros). No se ha encontrado en las proximidades del área de estudio ninguna especie del subgénero Haploxyton (especies que se caracterizan por tener únicamente un haz vascular en las hojas). La única especie de pino blando que existe en el estado de Michoacán es *P. ayacahuite* var. *verchii* Chaw, pero se distribuye en una pequeña área cerca de Zitácuaro (en el poblado de Las Palmas) a una distancia lineal aproximada de 250 km de donde se encuentra *P. rzedowskii*. Por lo tanto, las posibilidades de entrecruzamiento por dispersión de polen con esta última especie son muy remotas. Sin embargo, Madrigal y Caballero (1969) mencionan que cuando los árboles de *P. rzedowskii* tienen un buen desarrollo se asemejan a los de la sección Ayacahuite.

La descripción realizada por los autores de esta especie, se hecha con

ejemplares obtenidos de la población tipo (El Pinabete), descripción que mencionaré como antecedente para su comparación posterior con los datos obtenidos en este estudio (figura 2. 1).

Los árboles de *P. rzedowskii* tienen una altura de 15 a 30 m, copa irregular y poco compacta, troncos de 60 cm de diámetro como máximo y corteza oscura de 3 a 6 cm de espesor. Ramillas de color gris ceniciento u obscuro, con la inserción de los fascículos foliares claramente marcada cuando éstos se desprenden; hojas cortas en fascículos de 3 y 4, de 6 a 10 cm de longitud. Las ascúsculas son brillantes en la cara externa y en su cara interior verde ceniciento o glaucas, de ápice agudo y márgenes con numerosos denticillos, con estomas dispuestos en número de 2, 3 y 4 hileras en cada una de las caras internas. La hipodermis es homomorfa, constituida por dos hileras casi continuas de células, con ligeros engrosamientos en las caras internas. Los canales resiníferos son externos y se presentan en número de dos, tres y cuatro, el cilindro central es de forma circular, la endodermis con células de paredes ligeramente engrosadas, con un haz fibrovascular. Las vainas son pronto caedizas; son de color amarillento en las hojas jóvenes y castaño oscuro en las adultas, de base no decurrente. Estrobilos masculinos de color violáceo, de 1 cm de longitud por 3-4 mm de ancho. Los estrobilos femeninos maduran en el segundo año después de su fecundación, son caedizos, oblongos, ligeramente colgantes, simétricos, con pedúnculos largos y delgados, poco encorvados, que se desprenden con el cono, su longitud es de 10-15 cm y el diámetro de 6-8.5 cm en su parte media cuando están abiertos. Escamas duras y rígidas, cóncavas en su cara interior y convexas en la exterior, de color ocre en ambas caras hasta el nivel del umbo, el cual está cubierto de una resina ambarina. Umbo dorsal de forma tetragonal, de 15-22 mm de ancho y de 13-20 mm de longitud. Apófisis saliente de forma subpiramidal, de color ocre brillante, claramente aquillada transversalmente. Cúspide no protuberante, de color café oscuro que lleva en su extremo una espina dirigida hacia abajo. Las escamas de la parte central del cono miden de 3 a 5 cm de largo y 2.5 cm de ancho, el ápice de las escamas es irregular, terminando en ángulo obtuso. Se encuentran dos semillas en la base interior de cada escama, con una ala articulada que mide de 2 a 3.5 cm de largo por 1-1.3 cm de ancho. Las alas son adnadas de color café claro, brillantes y translúcidas. Las semillas son de color café oscuro, de testa delgada, de 8-10 cm de longitud y 4-5 cm de ancho; la cubierta seminal interna es de color café claro.

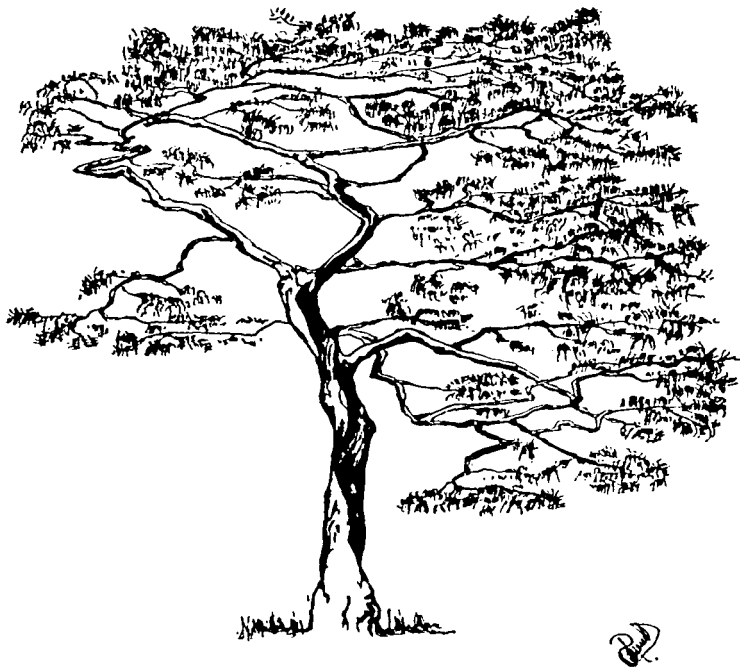


Figura 2. 1. Arbol de *Pinus rzedowskii* en la población La Alberca, Dos Aguas, Michoacán, México.

Después de la descripción de Madrigal y Caballero (1969), se obtuvo información adicional a partir de estudios sobre la madera y análisis de resinas oleaginosas. Las especies de pino de madera dura (*Diploxylon*) tienen terpenos con alto porcentaje de alfa-pinene y bajos porcentajes de beta-pinene, mientras que en los pinos blandos (*Haploxylon*) las concentraciones de alfa-pinene son menores que las de beta-pinene. Sin embargo, en *P. rzedowskii* se obtuvieron altos porcentajes de beta-pinene (70%) y bajos de alfa-pinene (4%), concentraciones opuestas a las reportadas para pinos blandos, grupo al cual pertenece *P. rzedowsku*. Por todas estas características morfológicas, anatómicas y químicas, la taxonomía de *P. rzedowsku* se vuelve confusa. Pery (1991) inclusive, plantea que puede ser conveniente ubicar a esta especie en un nuevo subgénero entre las dos divisiones.

2.2. El área de estudio

El área de estudio forma parte de la Sierra Madre del Sur en el estado de Michoacán; pertenece al Municipio de Coalcomán. Está comprendida entre las coordenadas geográficas 102° 47' 21" y 102° 55' 39" de longitud Oeste y 18° 44' 14" y 18° 48' 24" de latitud Norte. El área tiene una superficie total de 1, 600, 000 ha.

En la región existen nueve tipos de suelo (regosol, cambisol, luvisol, feozem, vertisol, litosol, rendzina y solonchat), lo cual indica una gran variación de condiciones topográficas, geológicas y climáticas (Unidad de Administración Forestal No-10, 1991). Las poblaciones de *P. rzedowsku* se han encontrado únicamente en suelos de tipo cambisol. Estos suelos tienen muy poco desarrollo. Presentan en el subsuelo una capa que parece más suelo de roca, acumulación de materiales como arcilla, carbonato de calcio, fierro y manganeso..

Los tipos de vegetación presentes en el área también son muy diversos; bosque de pino-encino, bosque de encino, selva mediana subcaducifolia, selva baja caducifolia y manglar. De estos se describirá únicamente la comunidad vegetal a la que se integra *P. rzedowskii*.

Bosque de Pino-Encino.

Este tipo de vegetación cubre la mayor extensión del área y en ella se encuentran especies de latifoliadas y ocasionalmente oyamel. Normalmente se localiza desde los 900

hasta los 2800 msnm. La estructura de los bosques mixtos de pino-encino frecuentemente revela la existencia de un estrato superior de pino y otro más bajo de encinos. Muchas veces los rodales de pino se presentan puros (aunque generalmente existen diversos grados de mezclas entre especies) y en estos existe un estrato arbóreo, uno herbáceo y uno rasante

Las principales especies vegetales en el estrato arbóreo superior son: *Pinus douglasian* Martínez, *P. montezumae* Lamb, *P. lausonii* Roetzl, *P. pseudostrobus* Lind, *P. herreraei* Mtz, *P. michoacana* Mtz, *P. oocarpa* Schiede, *P. leptophylla* Schl et cham, *P. rzedowskii* Madrigal et Caballero, *Abies religiosa* (H.B.K) Schl et Cham y *A. guatemalensis* Rehd. En el estrato arbóreo inferior se encuentran *Quercus microphylla* Née, *Q. Castanea* Née, *Q. Crassifolia* H. et B, *Q. Conspersa* Benth, *Q. Candicans* Née, *Q. Peduncularis* Née, *Q. Crassipes* H et B, *Abies jorullenses* H.B.K, *Arbutus xalapensis* H.B.K y en el herbáceo: *Tagetes sp.*, *T. micrantha* Cav. *Heterotheca inuloides* Cass, *Xanthosoma robustum* Schott, *Passiflora dictamo* DC, *Bocconia frutescens* L., *Tillandsia usneoides* L., *Urvillea ulmacea* H.B.K, *Porophyllum coloratum* DC, *Ricinus communis* L, *Rumex sp.*, *Porophyllum coloratum* DC, *Agave cupreata* Trel et Berger, *Cucumis anguria* L, *Amaranthus palmira* Wats, *Tagetes erecta* L, *Mimosa Benthoni* MacBride; *M. fasciculata* Benth , *Vitis ulifolia* Humb. Et Bonpl, *Arthostylidium racemiflora* Stand, *Latania horbonica* Lam, *Serjania triquetra* Radlk, *Leptochloa filiformis* (Lamb) Beauv, *Melinis minutiflora* Beauv, *Paspalum distichum* L., *Panicum purpurascens* Radd. En la región se reconocen otras especies consideradas como raras o en peligro de extinción: *Abies religiosa* var *enmarginata* Mtz, *Bursera aloexylon* Schieder, *Podocarpus reichei* Buchh, *Carpinus calorimiana* Welt, *Cedrela mexicana* Roem, *Junglas sp.*, *Roseodendrom sp.*, y *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. (Unidad de Administración Forestal No - 10, 1991).

Derivado de la diversidad fisiográfica, los tipos de clima presentes en el área son ocho, de acuerdo con la clasificación de Koeppen modificada por García (1973), las cartas elaboradas por la Secretaria de Programación y Presupuesto (SPP) y el Instituto de Estudios Geográficos e Informática (INEGI). Cuatro tipos pertenecen al clima cálido con algunas variantes, AWO W cálido subhúmedo con lluvias en verano, A W1 W, cálido subgrupo de clima semicálido, es de los menos húmedos, a diferencia de (A) C (W2) (W) que es de los más húmedos y A (C) (W1) (W), de humedad media entre los semicálidos subhúmedos. Dos del grupo de clima templado, C (W2) (W), del tipo templado subhúmedo con lluvias en

verano, (A) C (W1) (W), clima templado pero del subgrupo de semicálidos subhúmedos con lluvias en verano, aquí se agrupan los subtipos de humedad media de los semicálidos subhúmedos. Los dos últimos tipos pertenecen al tipo de clima seco, BS1 (H1) W (W), clima seco tipo semiseco con lluvias en verano y BS1 (H1) W que es del tipo seco con lluvias en verano y escasas a lo largo del año y muy cálido. La precipitación media anual se estima en 1, 500 mm entre los meses de julio a octubre y la temperatura mínima anual es de -5° C y de 30° C la máxima (Madrigal y Caballero, 1969).

CAPÍTULO III DEMOGRAFÍA DE *Pinus rzedowskii*

3.1. INTRODUCCIÓN

El estudio demográfico de una especie requiere conocer el tamaño y la estructura de sus poblaciones ya que ambas pueden variar a través del tiempo y el espacio (Harper 1981; Hubbell y Foster 1987, Moloney 1988) La estructura y el tamaño de una población en un momento dado, es el resultado de los procesos de reproducción, establecimiento, crecimiento y sobrevivencia de los individuos. Procesos que están influenciados por los factores físicos del ambiente, como clima, suelo, humedad, etc. y por las relaciones bióticas intra e interespecificas (Begon et al. 1986)

Los factores ambientales y bióticos pueden ser sumamente variables y producir estructuras poblacionales transitorias de muchas especies. Strauss y Ledig (1985) mencionan que para el caso de especies del genero *Pinus* se conocen dos tipos de patrones de historia de vida: 1) especies de corta vida, de crecimiento rápido, de madurez temprana, como *P. palustris* (Strauss y Ledig, 1985), *P. pauciflora* y *P. oocarpa* (observacion personal) y 2) especies de larga vida (longevas), de crecimiento lento y madurez tardia, como *P. longeva*, que puede llegar a vivir hasta 5000 años (Wahlenberg 1946). Las especies de vida corta cuando son jóvenes, invierten más energía en el follaje y maduran tempranamente, lo cual reduce el potencial de lograr un mayor tamaño (mayor desarrollo de estructuras de sosten). Mientras que las especies longevas crecen más lentamente y maduran tardiamente, invierten más energía en el mantenimiento de estructuras de sosten y transporte (en el desarrollo de la raiz y del tronco) (Strauss y Ledig, 1985). Esta asociacion de características define una tendencia de especies fugitivas para el primer caso, que típicamente presentan una estructura de edades uniforme (con árboles que tienen la misma edad) como resultado de procesos eventuales de colonización y extinción y persisten en espacios donde los disturbios ocurren a intervalos cortos de tiempo (Heinselman 1973, 1981). En contraste, las especies longevas forman coberturas abiertas y el reclutamiento da como resultado estructuras de edades no uniformes, con árboles representantes de todas las edades (Strauss y Ledig, 1985, Platt et al., 1988). Estas características son muy importantes porque indican que la etapa juvenil va a actuar como un predictor de la historia de vida a la cual va a estar sujeta determinada

especie y por tanto nos habla de sus estrategias evolutivas. Por ejemplo, Platt et al. (1988), encontraron que en *P. palustris* la estructura de edades es uniforme, o sea que todos los árboles tienen la misma edad, y esto indica que es una especie que pertenece al primer patrón de historia de vida. Sin embargo, los tamaños de los árboles son muy variables, lo que puede crear confusión para decir a cuál patrón de historia de vida pertenece la especie. Así mismo, Platt et al. (1988) mencionan que las diferencias en el tamaño de los árboles se deben al estrés ambiental o aspectos relacionados con su capacidad competitiva. Estos factores actúan como artefactos que enmascaran el patrón real de historia de vida de la especie. Por tanto, hay que analizar cuáles factores ecológicos o ambientales pueden alterar la historia de vida de las especies, como podrían ser cambios climáticos drásticos, incidencia de plagas y enfermedades, incendios, huracanes etc.

Strauss y Ledig (1985) sugieren que las especies de pino que pueden ser más longevas, o sea que pertenecen al segundo patrón de historia de vida, se encuentran dentro de la sección Haploxyton (pinos blandos) y las especies de vida corta son de la sección Diploxyton (pinos duros). Para *P. rzedowskii* se esperaría que presentara un patrón de historia de vida de especies longevas. Esto también concuerda con estudios filogenéticos recientes que demuestran claramente que *P. rzedowskii* está ubicada en el grupo Haploxyton o pinos blandos (Alvarez-Buylla et al., en preparación).

El género *Pinus* es un grupo de especies que hasta la actualidad ha recibido relativamente poca atención relacionada con el conocimiento básico de algunos parámetros poblacionales (West et al., 1981; Caswell 1982; Tebo 1985; Strauss y Ledig, 1985; Parker 1986; Platt et al., 1988). Hay pocos estudios que sean útiles para planear la protección y conservación de especies de este género con base en criterios demográficos (Wahlenberg 1946; Adams 1981; Moran y Bell, 1987). Para México, la mayoría de los trabajos están dirigidos hacia el estudio silvícola y de mejoramiento genético de especies potencialmente explotables (Darrow y Coetzee, 1983; Flores 1986; Barnes et al., 1987).

En este capítulo se persiguieron dos objetivos específicos: (1) conocer el rango de distribución de la especie y la ubicación precisa de cada una de las poblaciones descubiertas y estudiadas en este trabajo; (2) obtener estimaciones del tamaño de las poblaciones, la estructura de edades y de reproducción. Con las observaciones realizadas desde 1993 a 1995 y los datos obtenidos durante 1995 se encontraron patrones

demográficos característicos de especies longevas. La especie presenta una estructura no uniforme (con representantes de todas las categorías de edad). La hipótesis en este caso sería que *P. rzedowskii* es una especie longeva que se establece en habitats muy específicos. El gasto energético lo asignan preferentemente a la diferenciación de estructuras de sostén y mantenimiento más que al desarrollo de tejido vegetativo y reproductivo. Como consecuencia demográfica, el tamaño de sus poblaciones es pequeño y el reclutamiento es pobre. Las poblaciones están restringidas a suelos específicos de tipo calizos. Las condiciones del habitat, por otro lado, hacen que *P. rzedowskii* pueda prosperar en un tipo de ambiente, donde otras especies de pino no prosperan.

3. 2. MÉTODOS

Se hicieron tres salidas preliminares para reconocer el área que ocupa cada una de las poblaciones (1993-1994). Primero se inspeccionaron las tres poblaciones reportadas por Madrigal y Caballero (1969) y Perry (1991) y se identificó a la especie. Las demás poblaciones fueron detectadas con información local y con los nombres de los predios o parajes en los cuales se encuentran las poblaciones. Estos nombres se usaron para diferenciar los sitios en el mapa y en el manejo de los datos. La colecta del material y toma de datos se realizó en enero y febrero de 1995. Las poblaciones en el campo fueron ubicadas utilizando un posicionador geográfico marca Magellanes (modelo ProMARKV'GPS, $\pm 50 \text{ m}^2$), se obtuvieron las coordenadas geográficas y altitud para cada población. Se hizo un mapa de la ubicación de las poblaciones con base en las cartas topográficas elaboradas por el INEGI (1987) y con los registros del Inventario Forestal del estado de Michoacán (1983) a una escala de 1:50,000.

Para obtener los datos demográficos se estimó el área que ocupa cada población por hectárea para lo que se usó un Televedoscopio de Biterlich que permitió cuantificar el número aproximado de árboles por hectárea (indiv/ha). El muestreo de las poblaciones se realizó de tres maneras, según se requirió: (1) en la mayoría de las poblaciones se hizo un transecto de la parte más alta de la ladera donde se encuentra la población hasta la parte más baja, (2) como en el caso de la población La Alberca (5) que se muestreó en cinco puntos colocados en los extremos de la población y uno en la parte media y (3) En las poblaciones más escasas como Chiqueritos (6), Tejamanil (10), Durazno (11) y La Soledad (3), se

contaron todos los individuos presentes. Se cuantificó el número de plántulas por m^2 dentro de cada transecto y el número de conos que tenían los árboles. Para cada árbol se midió la altura, cobertura y perímetro, con un clinómetro, forcípula y cinta diamétrica, respectivamente. Cada árbol fue etiquetado con una placa de aluminio a 1m de la base del tronco, esto para su censo y reconocimiento en posteriores inspecciones. La estimación de edades se basó en el conteo de anillos de crecimiento en 182 árboles, para lo que se usó un taladro de Pressley. Con esta muestra se estimó una regresión entre la edad vs perímetro y altura, con un modelo de regresión simple usando logaritmos de base 10

$$\log y = (a + m) \times \log x$$

donde

a = ordenada al origen de la función y (perímetro)

m = pendiente ($m = y_2 - y_1 / x_2 - x_1$)

Como la edad y el perímetro tuvieron una correlación altamente significativa ($p < 0.0001$), el perímetro sirvió para hacer una estimación de la edad para el resto de los individuos. El análisis de la estructura de edades se realizó con base en categorías de 25 años, tamaño de categoría que ha sido utilizado comúnmente en especies de coníferas (Platt et al., 1988).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

En la tabla 3.1 y figura 3.1 se muestran datos de ubicación y características de las diferentes poblaciones de *P. rzedowskii*. La especie se distribuye en un área ubicada entre las coordenadas geográficas 102° 55' y 103° 00' de longitud Oeste y 18° 54' y 18° 39' de latitud Norte. En total se encontraron 12 poblaciones. Sin embargo, hay que mencionar que dos de las poblaciones están representadas por 1 y 4 individuos únicamente. Las poblaciones más distantes entre sí se encuentran a 22.6 km de distancia lineal, estas son La Alberca (5) y Chiqueritos (6) (figura 3.2).

Tabla 3.1. Datos generales de la ubicación de las poblaciones de *Pinus rzedowskii* Michoacán, México.

No	Población	Exposición	Lat.N	Long.W	Altitud (msnm)	Individuos (No)	Densidad (ha)
1	Vaca Pinta	SW	18 39'56"	102 58'03"	2149	200	200
2	Predio Var	SW	18 41'09"	102 58'48"	2480	200	30
3	La soledad	SW	18 47'40"	102 58'17"	2100	9	9
4	Fresno	SW	18 40'04"	102 59'43"	2450	3500	30
5	Alberca	SW	18 39'09"	103 00'19"	2340	2000	40
6	Chiqueritos	NW	18 49'17"	102 55'36"	2380	60-70	60
7	Varaloso	SW	18 40'39"	102 54'34"	2300	50-60	18
8	Pinabete	SW	18 39'59"	103 00'24"	2340	150	60
9	Aguaacatera	SW	18 40'56"	103 00'40"	1714	500	50
10	Tejamanil	NW	18 44'02"	102 58'40"	2195	1	1
11	El Durazno	NW	18 50'30"	102 58'02	2110	15	15
12	Tabernas	SW	18 45'40"	102 59'02"	2300	4	4

Individuos de *P. rzedowskii* 6000-6500

Las poblaciones están separadas por laderas muy pronunciadas, con pendientes de hasta 90%. Es común observar la porción noreste de estas formas fisiográficas cubiertas por otras especies de pino o latifoliadas; entre las especies de pino se encuentran *P. leiophylla* y *P. pseudostrobus*, pero en la parte donde habita *P. rzedowskii* solo se asocia con algunas especies de Cactáceas y Agaváceas. En las partes marginales de las poblaciones

P. rzedowskii, como en la población del Predio Varaloso, forma ecotono con *P. douglasiana* y *P. pseudostrobus*, en la población El Fresno con *P. leiophylla* y *P. michoacana*. Todas estas especies de pino con las que se asocia *P. rzedowskii* son de la sección Diploxylón (pinos duros) y es la única especie perteneciente a la sección Haploxylón (pinos blandos) que se encuentra en la región. Además es una de las dos únicas especies de pino blando que se han descrito para el estado de Michoacán (Madrigal y Caballero, 1969).

Figura 3.1. Distribución geográfica de las poblaciones de *P. rzedowskii*, Michoacán, México.

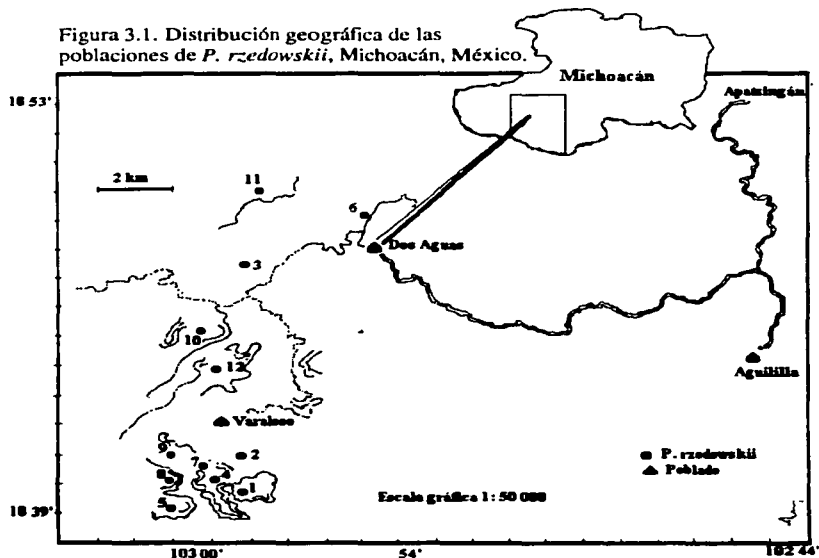


Figura 3. 2. Matriz de distancias geográficas (lineal en Km) entre poblaciones de *Pinus rzedowskii*

		SITIOS (N ^o)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0												
1	2.0	0											
2	13.0	10.5	0										
3	2.0	2.2	14.6	0									
4	2.0	4.0	17.0	3.0	0								
5	20.0	15.2	7.2	20.0	22.6	0							
6	2.6	2.4	13.0	2.0	4.8	18.0	0						
7	2.0	4.0	15.2	2.4	2.0	20.8	3.6	0					
8	2.3	4.0	13.2	3.0	4.0	19.4	3.0	1.8	0				
9	11.0	7.0	5.0	8.6	12.2	11.8	8.6	10.4	8.4	0			
10	10.2	14.0	5.0	20.0	22.0	6.0	18.0	20.6	18.8	10.0	0		
11	8.0	5.2	7.2	8.6	10.0	13.0	6.0	8.0	6.4	2.8	12.2	0	
12													

3. 3. 2. Densidad y tamaño de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*

En la figura 3.1 se puede apreciar que las poblaciones forman dos grupos. El primer grupo está formado por tres de las poblaciones representadas por pocos individuos (de 7 a 65), cada una de ellas con exposición noroeste. El segundo grupo está representado por el resto de las poblaciones (con 200 a 3500 individuos) con exposición suroeste. Se calcula que la especie está representada por un total de 6000 a 6500 individuos maduros.

Se presentan dos tendencias en la distribución espacial de los árboles. En el primer caso los árboles se encuentran en manchones dispersos, formando grupos de 8-10 árboles separados por 2-5 m y después entre 10 m y 70 m se encuentra otro grupo. En el segundo caso la distribución es más continua y se presenta cuando las poblaciones se encuentran en una área menor a dos hectáreas, los árboles están separados por una distancia de 1-2 m y las poblaciones están representadas por un número menor de individuos que en el primer patrón descrito. Esto se puede deber a la distribución del suelo en el cual se desarrolla *P. rzedowskii*, ya que se establece en parches de suelo calizo y los árboles dependen de la manera en que se distribuyen estos parches de suelo y de la cantidad de suelo que exista en los diferentes sitios.

La densidad de las poblaciones osciló de 1 hasta alrededor de 3500 individuos por sitio (tabla 3.1). La población FRE (4) tiene la mayor densidad (ind/ha, aprox.) con un total aproximado de 3500 árboles. Las condiciones del lugar son más húmedas, con un tipo de

suelo más profundo que en el que se encuentran las otras poblaciones. En una ladera de pendiente mayor de 90° se encontró un solo individuo en un sitio denominado Tejamanil (11), pero puede ser un individuo aislado de alguna de las otras poblaciones, probablemente de la población Varaloso (7). Las poblaciones como el Predio Varaloso (2) y Varaloso (7), tienen entre 200 y 60 árboles respectivamente. Se encuentran en suelos con roca caliza pero son más desarrollados que el suelo que se encuentra en Alberca (5) que además de ser un suelo pobre y calizo, en el solo crecen magueyes asociados a *P. rzedowskii*. Sin embargo, es una de las poblaciones que tiene mayor número de árboles, 2000-2500 aproximadamente. En los parrafos siguientes se presenta la caracterización general de cada una de las poblaciones visitadas.

Descripción de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

Sitio 1. Vaca Pinta (VP): esta población está representada por 200 árboles. Se encuentra en un peñasco y a una altitud de 2000 msnm, que cubre un área de 400 m² aprox., con una pendiente de 85-90°. Los árboles se establecen, en los espacios de suelo que separan a las rocas. En esta población los árboles fueron mayores de 80 años y no se observaron plántulas ni conos maduros o en desarrollo. Esta población está separada de la población El Fresno (4) por dos especies de pino, *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana*, las cuales actúan como barrera biológica, ya que geográficamente estas dos poblaciones están muy cerca, a unos 2.34 Km lineales (ver figura 3.1).

Sitio 2. Predio el Varaloso (PRED): esta población presentó la mayor cantidad de conos (abiertos) del año pasado, 30 conos/m². La población está compuesta por individuos juveniles con edades que van de 15 a 22 años y algunos maduros entre 50-80 años. En este sitio se aprecia un suelo más formado que el de la población La Alberca (5). Está cubierto de hojarasca y el lugar es más húmedo. También esta población está aislada, tanto por el suelo calizo como por la presencia de *P. pseudostrobus*, una de las especies que probablemente no deje que *P. rzedowskii* invada otros tipos de suelo en la región.

Sitio 3. La Soledad o Cerro Octoso (SOL): en esta población solo existen nueve árboles maduros, en los cuales se observó producción de conos del año pasado (15 a 20 conos/m² del año de 1992). Esta población se encuentra entre rocas calizas muy grandes, las cuales forman un acantilado. En la base de los troncos hay evidencia de incendios pasados.

probablemente provocados para el uso agrícola de los terrenos adyacentes. La población esta muy cerca del poblado de Dos aguas (figura 3.1). Este hecho hace pensar que esta población estuvo formada por más individuos y las bajas densidades que hoy observamos son el resultado de incendios frecuentes.

Sitio 4. El Fresno (FRE): esta población tiene una distribución agregada, pero es la que presenta una mayor extensión (90 has aproximadamente). Se observan manchones de árboles y algunos individuos aislados. Se pueden encontrar árboles con diferentes formas, tamaños y edades, desde 40 hasta 400 años, con diámetros hasta de 2.5 m y alturas de hasta 50-55 m. Además esta es la población con el mayor número de plantulas (88 plantulas). Los individuos están localizados en las faldas de barrancas húmedas y cubiertas de vegetación, a diferencia de las otras poblaciones las cuales se encuentran en las partes altas de las lomas donde la radiación solar es directa. Esta es una de las dos poblaciones (la otra población es AG (9)) en las que *P. rzedowskii* se encontró en simpatria con *P. oocarpa*, *P. pseudostrobus*, *P. douglasiana* y *P. leiophylla*.

Sitio 5. La Alberca (ALB): esta formada por 1700-2000 árboles y de entre 65 y 90 años, con una densidad aprox de 40 árboles por hectárea. Los árboles son variables en forma y tamaño. La población se encuentra ubicada muy cerca de la población PIN (2 km), pero ambas poblaciones están separadas por manchones de *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana*, y por una barranca.

Sitio 6. Chiqueritos (CHIQ): esta población esta representada por 65 individuos por hectárea, donde la mayoría son juveniles entre 18-25 años, con solo cuatro adultos mayores de 60 años; estos últimos presentaron entre 15 a 20 conos por árbol en 1993 y 1995. Nuevamente esta población se encuentra aislada de otras en este caso de DUR (11) y SOL (3), por *P. pseudostrobus* y por barreras topográficas.

Sitio 7. El Varaloso (VAR): representada por 40-60 árboles en dos grupos de edad promedio de 15-26 años y de 100-150 años respectivamente. En esta población se observa producción de conos, pero también del año de 1992 (15 conos/m²). El sitio de esta población, al igual que el del PRED (2) es húmedo y con suelo selectivamente bien desarrollado.

Sitio 8. Puerto del Pinabete (PI): esta población se encuentra en la parte SW de la población La Alberca, separadas solo por una barranca profunda que no presenta individuos

de *P. rzedowskii*, pero sí de *P. douglasiana* y *P. pseudostrabus*. En la parte baja de la población se observó un manchón de árboles juveniles menores de 15 años (aproximadamente, 20-30 árboles). Esta es una de las poblaciones descritas por Madrigal y Caballero (1969).

Sitio 9. La Aguacatera (AG): esta población es la que se encuentra a menor altitud (1714 msnm). Está representada por más de 500 individuos, con edades mayores a los 100 años. No se observaron conos abiertos de años pasados o en desarrollo. También es un sitio muy rocoso aunque sus pendientes no son muy pronunciadas (aproximadamente de 30°). Algo particular que se observó en esta población fue la asociación de especies de encino y en las partes marginales de la población menor densidad de especies de pino, entre las cuales se encuentran *P. oocarpa*, *P. herrerae* y *P. leophylla*.

Sitio 10. El Tejamanil (TEJ): aquí sólo existe un individuo de 65 años de edad, pero presenta conos en desarrollo, (aprox. 5 en 1993) y la base de su tronco se encuentra quemada. El pino está aislado en el filo de una barranca rocosa y asociado a gran cantidad de magueyes. Se hace mención de este sitio, aunque sea un solo individuo porque puede ser útil como dato del área de distribución original de la especie y como antecedente para inspecciones posteriores.

Sitio 11. El Durazno (DUR): solo 15 árboles conforman esta población, es un área muy rocosa y los árboles se establecen en los espacios libres entre las rocas. Esta población también se encuentra muy cerca del poblado de Dos Aguas y también se observa la base de los árboles quemadas.

Sitio 12. Las Tabernas (TAB): se encontraron 4 árboles dentro de una barranca con pendiente de 80° a 90°. No se obtuvieron los anillos de crecimiento para estos árboles ya que era demasiado peligroso llegar a las bases de los troncos para medirlos. Con el conteo de los entrenudos de las ramas se estimó una edad aproximada entre 60-70 años. Los árboles se encuentran en una barranca que divide el camino hacia TAB (12) en donde posiblemente se encuentre otra población de la especie en una localidad denominada Las Palmas (lugar que no se logró visitar).

3. 3. 3. Estructura de edades y reclutamiento

Los individuos medidos tuvieron entre 1 y 400 años de edad (Tabla 3. 2).

Aproximadamente el 55% de los árboles son mayores de 50 años. En las poblaciones SOL (3) y DUR (11) se encontraron los árboles más viejos con edades de 149 y 183 años, respectivamente. Pero los individuos más viejos se encontraron en la población FRE (4), que son árboles con edades hasta de 400 años. Por otro lado, en la población CHIQ (6) se encontraron los individuos de menor edad con promedio de 40 años, esto si tomamos en cuenta a los 4 árboles maduros mayores de 50 años, si se excluyen del conteo el promedio de edad para esta población disminuye a 25 años.

Tabla 3. 2. Valores promedio del perímetro, edad y altura entre las poblaciones de *P. rzedowskii*, con un tamaño de muestra de 340 individuos en Michoacán, México. (entre parentesis se indican los valores de la desviación estandar)

No Población	No Indvs	Perímetro (cm)	Edad (años)	Altura (m)
1 Vaca Pinta	29	114.32 (41.109)	52.90	18.92
2 Pred. Varaloso	29	138.35 (87.833)	60.32 (56.118)	14.76 (9.783)
3 La Soledad	9	247.71 (53.263)	183.32 (57.847)	19.22 (57.694)
4 El Fresno	81	147.440 102.3895)	75.437 (41.7735)	27.156 (13.50)
5 La Alberca	56	114.068 (65.6793)	76.343 (49.797)	17.88 (21.489)
6 Chiqueritos	37	48.28 (40.7666)	31.190 (24.453)	8.619 (16.247)
7 El Valaroso	30	77.00 (74.4104)	44.45 (25.6537)	18.87 (19.740)
8 El Pinabete	26	138.84 (74.410)	60.53	18.52
9 La Aguacatera	30	126.75 (95.109)	123.47 (48.189)	34.58 (12.135)
10 El Tejamanil	1	120.00	60.23	13.00
11 El Durazno	11	236.56 (39.525)	148.92 (5.0519)	10.25 (8.1200)
Media		137.207	83.374	18.343
Varianza		3518.121	2276.149	54.4373
Desv. Estandar		59.313	47.090	7.37816

Se encontró que la relación entre la edad de los individuos y el perímetro es muy estrecha ($r = 0.857$, $n = 314$, $p < 0.0001$) (Figura 3.3). Mientras que la relación entre la altura y la edad presentan una dispersión mayor que el perímetro y la edad ($r = 0.681$, $n = 314$, $p = < 0.7942$) figura 3.4. El perímetro incrementa rápido hasta los 60 años, a partir

de ésta edad la tasa crecimiento disminuye progresivamente. La relación entre la edad y el perímetro es más predecible en árboles menores de 50 años ($r = 0.853$, $n = 78$, $p < 0.0001$) figura 3.5. Cuando tienen más de 60 años el perímetro tiende a aumentar muy lentamente, lo cual no se refleja en la edad ($r = 0.466$, $n = 78$, $p < 0.0001$).

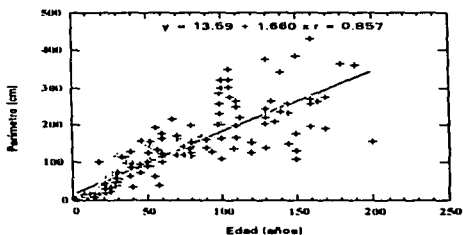


Figura 3.3. Relación entre el perímetro y la edad de 314 árboles de *Pinus rzedowskii* en Michoacán, México. El ajuste lineal es estadísticamente significativo ($p < 0.0001$)

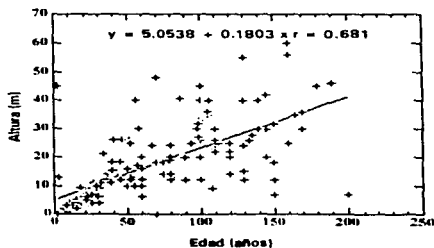
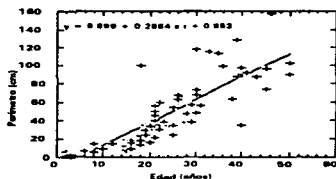


Figura 3.4. Relación entre la altura y la edad en 314 árboles de *Pinus rzedowskii* en Michoacán, México. El ajuste lineal no es estadísticamente significativo ($p < 0.7942$).

a)



b)

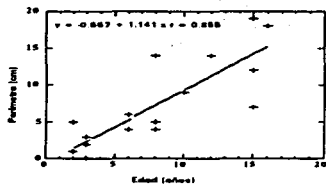


Figura. 3. 5. Relación entre la edad y perímetro en árboles menores de a) 50 años y b) menores de 20 años en *Pinus rzedowskii* en Michoacán, México. El ajuste lineal es estadísticamente significativo en los dos casos ($p < 0.0001$)

La estructura de edades reflejó una distribución no uniforme para la especie. Es decir que la especie está representada por todas las categorías o clases de edad, con una distribución de jota invertida, donde el mayor número de individuos se presenta entre las edades de 1 a 25 años y disminuye al aumentar la edad (Figura 3.6). Pero para algunas poblaciones en particular no se presentan todas las categorías de edad (Figura 3.7). Para la especie, el mayor número de individuos se encuentra entre las clases 1-25 años seguido de las clases entre 26 a 50 años, y de 100 a 150 años. Solo se nota disminución de individuos de las edades entre 51 a 100 años y en las edades mayores de 200 años. Si analizo particularmente la estructura de edades en las diferentes poblaciones, vemos poblaciones

totalmente representadas por individuos mayores de 80 años. Otras poblaciones contrastan, como CHIQ (6) que está representada por árboles juveniles, menores de 10 años e individuos entre 20 a 25 años. Esto nos indica que existen diferencias en la estructura de edades entre las poblaciones.

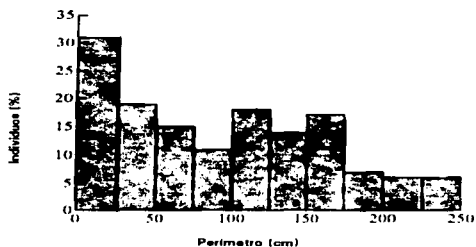
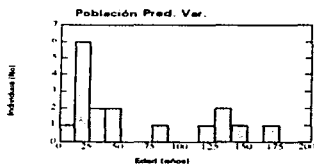
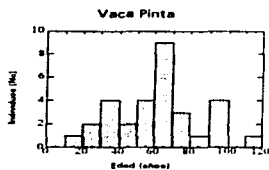


Figura 3. 6. Estructura de tamaño (perímetro) para 314 árboles de *Pinus rzedowskii* en Michoacán, México.



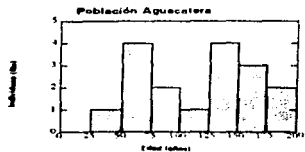
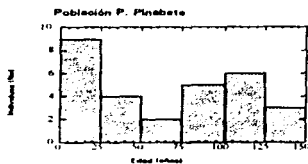
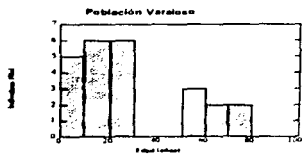
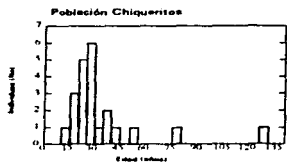
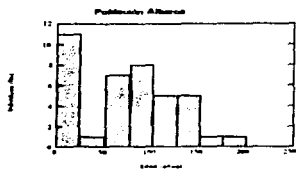
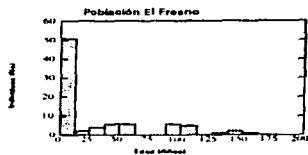
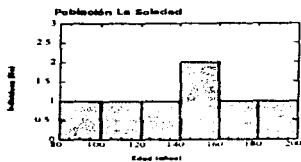


Figura 3. 7. Estructura de edades para nueve poblaciones de *Pinus rzedowskii* en Michoacán, México.

Se cuantificaron 135 plántulas dentro de los transectos estudiados, lo que indica que existe un reclutamiento pobre y menor que 1 plántula por individuo adulto (314 individuos) (Tabla 3.3). La distribución de las plántulas es heterogénea; 88 plántulas fueron reclutadas en la población FRE (4), con un promedio de 5 plántulas por árbol. Esta población FRE (4) es la que contiene el mayor número de individuos, y aproximadamente el 66% de las plántulas se encontraron en ella.

Tabla 3.3. Datos aproximados de la producción de conos y establecimiento de plántulas en 1995 para las poblaciones de *P. rzedowskii* en Michoacán, México.

Población	No de conos	No de árboles con conos	No de plántulas	No de árboles con plántulas	No de plántulas (m ²)
1 V. Pinta	SD	SD	SD	SD	SD
2 P. Varaloso	16	7	15	3	5
3. Soledad	5	3	6	2	3
4. Fresno	50	12	90	18	5
5. Alberca	21	5	10	6	2
6 Cuqueños	30	2	2	1	2
7. Varaloso	12	6	3	2	2
8. P. Pinabete	11	2	7	3	2
9. Agüincatera	0	0	0	1	2
Total	145	37	135	37	23
Promedio/pob	20	5.3	15		3.0
Promedio/ind.	0.5		0.4		
				SD= dato no disponible	

En total se cuantificaron 145 conos en 314 árboles muestreados. En la población CHIQ (6) se encontró la mayor producción de conos maduros en 1995, 16 conos por árbol seguido de la población ALB (5) con 14 conos y FRE (4) con 10 conos por árbol. En las poblaciones restantes el número de conos por árbol fue menor a 7 (Figura 3 8) Se encontró que no existe una relación fuerte entre el número de conos y el perímetro del árbol ($r = 0.162$ $p < 0.0001$). En este caso la producción de conos no se puede predecir con la edad o el perímetro. Hasta ahora las evidencias sugieren que únicamente los árboles mayores de 40 años se reproducen. Sin embargo, como la producción ha sido muy baja no se logró estimar con certeza la edad en que ocurre la primera reproducción y el comportamiento reproductivo de los individuos.

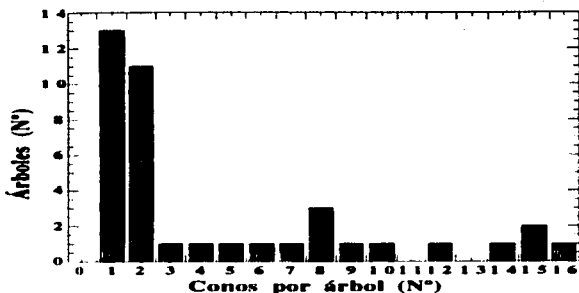


Figura 3.9. Producción de conos por árbol, en una muestra de 314 individuos de *P. rzedowskii* en Michoacán, México.

3.4. DISCUSIÓN

En este estudio se corroboró que *P. rzedowskii* se distribuye en una área muy restringida (en 22.6 km lineales, 160 ha aprox) del suroccidente del estado de Michoacán, México. La distancia que separa a cada una de las poblaciones por tanto es muy corta (2.5 a 15.7 Km). Sin embargo, se encuentran aisladas entre sí a nivel microgeográfico por barreras topográficas con pendientes de hasta 90°. Se encontraron 9 poblaciones más de las reportadas por Madrigal y Caballero (1969). En total son 12 poblaciones que se distribuyen en un gradiente de norte a sur, con el mayor número de poblaciones y el mayor número de individuos al sur del área. Se ha visto que el suelo es uno de los factores que influyen en la distribución de las coníferas, aunado a gradientes altitudinales y climáticos (Guries y Ledig, 1982; Ledig y Conkle, 1983; Hamrick 1987). *P. rzedowskii* se distribuye en altitudes que van de los 1700 a 2500 msnm, pero en todos los casos se encontró en suelo calizo. Parece que la distribución de *P. rzedowskii* está estrechamente asociada al tipo de suelo. La capacidad de *P. rzedowskii* de establecerse en condiciones tan extremas de suelo ha permitido que no sea desplazada por otras especies de pino menos tolerantes.

En la mayoría de las especies arbóreas se ha encontrado que la edad, la altura y el perímetro están relacionados significativamente (Strauss y Ledig, 1985, Platt et al., 1988). La correlación no significativa entre la edad y la altura de los árboles nos habla del estrés ambiental en el que están sujetas las poblaciones de *P. rzedowskii*. Sin embargo, el perímetro y la edad mostraron una correlación altamente significativa, en este caso parece que el mayor gasto energético lo están utilizando para el desarrollo de estructuras de sostén y mantenimiento. El suelo actúa como un factor limitante en el crecimiento de los árboles y, en este caso, también la insolación directa y fuego parecen influir. Varias de las poblaciones están expuestas a la insolación directa, lo cual hace que los árboles se estresen y presenten un crecimiento raquítico. Además, varios de los árboles presentan evidencias de incendio en su tronco, lo cual actúa como un factor de daño en árboles maduros y como factor de mortalidad de plántulas y árboles jóvenes menores de 20 años.

Para *P. rzedowskii* la estructura de edades no es uniforme. Esto es que la especie está representada por todas las categorías de edad (Krebs 1978, Strauss y Ledig, 1985). Para algunas poblaciones no existen reclutas menores de un año (plántulas) y para otras poblaciones no existen o hay escasos individuos entre las edades de 15 a 25 años, como en AG (9), o bien, como la población CHIQ (6) donde la mayoría de los representantes oscilan entre los 15 a 25 años. Las diferencias en la estructura de edades, se deben tanto al factor suelo y luz, como a los incendios. La acción de estos factores sobre las poblaciones influyen en dos aspectos centrales, i) en la diferenciación y desarrollo de estructuras reproductivas y ii) en el establecimiento de plántulas y juveniles. En el primer caso, podría suceder que al existir un suelo pobre en nutrientes, los árboles utilizan la energía absorbida para su mantenimiento y desarrollo, más que para la reproducción (patrón de historia de vida de especies longevas), lo cual origina desajustes en la fenología reproductiva de la especie (asincronía reproductiva) presentándose fases de reproducción y regeneración muy espaciadas. En el segundo caso, si hay producción de semillas, muchas de ellas por azar pueden caer en sitios propicios para su desarrollo y muchas no. Muchas de las semillas que logren germinar, establecerse y crecer en este ambiente, pueden ser destruidos por los incendios. Tal es el caso de las poblaciones SOL (3), DUR (11) y AG (9), en las que se cuantificó escasas plántulas y ningún juvenil (menor de 20 años) y todas los árboles presentan evidencias de incendios. Perry (1991) menciona que es probable que durante la

estación de sequía muchas poblaciones juveniles puedan ser destruidas por incendios, por ello es difícil encontrar individuos juveniles y los pocos que se hallan tienen menos de 12 cm de diámetro en su fuste.

En cuanto a la producción de conos, fue sumamente baja en comparación a lo que producen otras especies de pino con características muy similares en el tamaño y morfología de los conos. Por ejemplo, las especies de *P. pseudostrobus* o *P. montezumae* producen entre 400 a 500 conos por árbol (Patiño et al., 1983; Delgado 1993). En los pinos en general, existen épocas en que la producción de semillas se incrementa significativamente en los llamados años semilleros que generalmente se presenta cada 4 años en promedio (Patiño et al., 1983). El tiempo que transcurre entre la polinización, fecundación y maduración de las semillas es de 2 años en la mayoría de los pinos mexicanos, en el primer año se da la polinización y en el segundo año, la fertilización, a partir del cual se inicia el crecimiento de los conos y el desarrollo y maduración de las semillas (Eguiluz 1978, Bramlett et al., 1977; Patiño et al., 1983). Por tanto, existen dos fases de producción de semillas, una donde la producción es baja y otra en que la producción se dispara. Con esta información se puede calcular que para *P. rzedowskii*, en 1991 se presentó la dispersión de semillas en algunas poblaciones evidenciada por la presencia de conos abiertos en el suelo. En 1993, 1994 y 1995 se hizo este tipo de observaciones pero no se encontraron árboles con suficiente producción de conos cerrados, para 1995 se cuantificó de 1 ó 16 conos por árbol y solo en 37 árboles de 314 que se inspeccionaron, comportamiento semejante que fue observado durante los dos años anteriores (1993 y 1994), lo cual puede ser indicativo de que no se presente un año semillero durante 1996 y 1997.

En conclusión, los factores edáficos, climáticos y los incendios provocados por el hombre, han influido en la estructura demográfica que presentan las poblaciones de *P. rzedowskii*. Es posible que *P. rzedowskii* actualmente se encuentre en crecimiento, pero que los mecanismos de reproducción e invasión de nuevos hábitats sea lento. Esta especie no se establece con éxito en otros espacios que no sean de roca caliza tipo de suelo donde las otras especies de pino no son tolerantes. Por lo tanto, *P. rzedowskii* está efectivamente amenazada de extinción, y en consecuencia es prioritario implementar estrategias de conservación que permitan incrementar el tamaño de las poblaciones.

CAPÍTULO IV
VARIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE
Pinus rzedowskii.

4. 1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las poblaciones naturales presentan niveles elevados de variación genética en caracteres moleculares, comparten se comportan mendelianamente (Lewontin y Hubby, 1966; Marshall y Allard, 1970, Nevo 1978, Brown 1979; Hedrick 1983; Ledig 1986). En plantas, las especies de árboles exhiben altos niveles de variación con respecto a otros grupos de organismos (Brown 1979, Hedrick 1983; Ledig 1986) En general, las especies vegetales que presentan mayores niveles de variación genética se caracterizan por ser de vida larga, de distribución amplia o localmente abundantes, con mecanismos de polinización por viento y predominantemente de fecundación cruzada (Hamrick y Godt, 1989).

Para especies de árboles se ha encontrado que los niveles de variabilidad genética a nivel isoenzimático se pueden correlacionar con los patrones de distribución geográfica, agrupandose a las especies en cuatro tipos 1) especies con distribución continua, 2) especies con distribución discontinua, 3) especies con distribución discontinua pero en áreas pequeñas y 4) especies con distribución restringida (Tabla 4.1) (Muller et al., 1992). De acuerdo a estos tipos de distribución, *P. rzedowskii* pertenecería al cuarto grupo, por ser de distribución extremadamente restringida y endémica Aunque la distribución geográfica parece ser un factor importante para determinar los niveles de variación genética, no es el único. Factores históricos, demográficos, estacionales y de historias de vida, pueden afectar de una manera más inmediata los niveles de variación genética y la estructura genética de las poblaciones (Moran y Hopper, 1987, Coates 1988)

Las coníferas presentan en general altos niveles de variabilidad genética, inferida con base en marcadores isoenzimáticos (Yeh y O'Malley, 1980, Hamrick et al., 1981; Weber y Settler, 1981; Guries y Ledig, 1982, Ledig y Conkle, 1983; Weeler y Guries, 1982; Hiebert y Hamrick, 1983; Furnier y Adams, 1986, Merkley y Adams, 1987; Li y Adams, 1988). Sin embargo, los niveles de polimorfismo varían ampliamente entre diferentes especies de pinos. Por ejemplo, en *P. torreyana* Parry et Carr, especie que esta representada

solo por dos poblaciones (Ledig y Conkle, 1983), no se encontró variación en el número de loci analizados. En *P. resinosa* Ait, que es una especie de distribución amplia y fragmentada se encontró un 4% de heterocigosidad (Fowler y Morris, 1977), mientras que en *P. longeava* Bailey, especie de distribución amplia y continua la heterocigosidad fue de 30-35% (Hiebert y Hamrick, 1983).

Tabla 4. 1. Clasificación de especies arbóreas de Europa según su área de distribución (Muller et al., 1992)

DISTRIBUCION	ESPECIE	VARIACION/ DIFERENCIACION GENETICA
Especies de amplia distribución geográfica (especies continuas)	<i>Picea sp</i> <i>Abies sp</i> <i>Pinus sylvestris</i> <i>Fagus sylvatica</i>	Muestran gran variación genética y poca diferenciación entre poblaciones dentro de regiones, pero gran diferenciación entre poblaciones derivadas de diferentes refugios glaciales
Especies con distribución geográfica amplia pero subdivididas (especies disjuntas)	<i>Pinus resinosa</i> <i>P. nigra</i> <i>P. halepensis</i> <i>Larix decidua</i>	Gran variación genética dentro de las poblaciones y poca variación entre poblaciones dentro de subespecies, alta diferenciación dentro de subespecies
Especies con distribución geográfica pequeña y disjunta	<i>Abies alba</i> <i>Pinus cembra</i>	Diferenciación interpoblacional grande y moderada variación genética intrapoblacional
Especies con distribución geográfica extremadamente pequeña	<i>Pinus pumila</i> <i>P. leucodermis</i>	No es claro el patron de variación intrapoblacional Diferenciación interpoblacional grande

Conocer los niveles de variación genética en especies que están representadas por poblaciones reducidas y/o fragmentadas es de suma importancia. Por un lado, esta información es útil para corroborar la relación entre la distribución de la especie y su variación genética, y por otro lado esta información nos sirve como base para implementar estrategias para la conservación de recursos genéticos de este tipo de especies.

La estructura genética de las poblaciones se refiere a la distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones e involucra la distribución de alelos o genotipos en el tiempo y/o en el espacio. La estructura genética es el resultado de la acción conjunta de fuerzas evolutivas, como mutación, migración, selección y deriva génica. Estas fuerzas operan dentro del contexto histórico y biológico de cualquier especie (Wright 1931;

Loveless y Hamrick, 1984). Hamrick y Godt (1989), estiman que aproximadamente el 22% del total de la diversidad genética de las especies vegetales en general se distribuye entre poblaciones ($G_{ST}/F_{ST} = 0.224$). La variación entre poblaciones es solo una fracción de la diversidad genética dentro de la especie, pero en términos cualitativos, es significativa para la adaptación evolutiva de las especies (Falk y Holsinger, 1991)

Las especies que tienen un limitado potencial de migración de genes manifiestan altos niveles de variación ecotípica y alta diferenciación genética entre las poblaciones (altos valores de F_{ST}) (Millar y William, 1991). Los sistemas de apareamiento también influyen en la estructura genética de las poblaciones naturales (Antonovics y Bradshaw, 1970, Crawford 1984a; Crow y Aoki, 1984, Holsinger 1988, Baskin y Baskin, 1991). En las plantas existe un gradiente de sistemas de apareamiento, siendo los casos extremos la autofertilización y la fecundación cruzada (Ellstran y Elam, 1993). La autofertilización por ejemplo, reduce la heterocigosis y el flujo genético, incrementando la diferenciación genética. Mientras que la fecundación cruzada promueve un mayor flujo genético y acerca las proporciones genotípicas al equilibrio Hardy-Weinberg (Wright 1931, 1965)

En especies con sistemas mixtos de apareamiento, una proporción de la progenie es producto de la autofertilización (s) y el resto es producto de la fecundación cruzada (t). Las proporciones de autógamos y alogamos pueden influir en la estructura genética (Rabinowitz et al., 1989, Klingler et al., 1992). Sin embargo, estudios teóricos demuestran que una pequeña cantidad de fecundación cruzada puede ser suficiente para impedir la diferenciación entre poblaciones y aumentar los niveles de flujo genético (Tigerstedt 1973, Guries y Ledig, 1982, Millar 1983, Friedman y Hamrick, 1984). Los sistemas de apareamiento de las coníferas son mixtos, aunque la mayoría tienen altas tasas de fecundación cruzada (Loveless y Hamrick, 1984). Sin embargo, las proporciones de autofecundación y fecundación cruzada de las diferentes especies de pino son extremadamente variables (Muller 1977a,b, Mitton et al., 1977, Mitton et al., 1983, Furnier y Adams, 1986). En consecuencia las estimaciones del flujo genético (N_m) varían considerablemente entre especies, desde valores muy bajos de 0.10 unidades hasta valores muy altos mayores de 10.0 unidades (Hamrick 1987, Govindaraju 1988a, 1989)

Los pinos son especies de larga vida (100 a 500 años o más), polinizados por el viento, predominantemente de fecundación cruzada con un período reproductivo

prolongado (desde los 6 hasta más de 200 años) (Dancig y Yeh, 1983; Loveles y Hamrick, 1984). Todos estos aspectos promueven el flujo genético aún entre poblaciones que se encuentran separadas entre sí por cientos de kilómetros y se piensa que son la causa de que la mayoría de las especies de coníferas tengan poca estructura genética. Además, en las especies de pino longevas cabe una mayor posibilidad de fijación de mutaciones por azar que en especies de vida corta (Guries y Ledig, 1982, Hamrick y Loveless, 1989, Hamrick et al., 1991), lo que también promueve una mayor variación genética en este grupo de especies.

En la mayoría de los estudios isoenzimáticos de coníferas se ha encontrado poca estructura genética y la mayor parte de la variación se encuentra dentro de sus poblaciones (Yeh y Layton, 1979, Yeh y O'Malley, 1980, Guries y Ledig, 1982, Hiebert y Hamrick, 1983, Yeh 1988). Guries (1984) menciona que menos del 15% de la variación genética en las coníferas es resultado de la diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}/F_{ST}). Existen varios estudios que apoyan esta conclusión, incluyendo los realizados con *P. longaeva* (Hiebert y Hamrick, 1983), *P. contorta* (Yeh y Layton, 1979), *P. ponderosa* (O'Malley et al., 1979), *P. rigida* (Guries y Ledig, 1982), *Pseudotsuga menziesii* (Yeh y O'Malley, 1980) y *Picea sitchensis* (Yeh 1979, Yeh y El Kassaby, 1980). Sin embargo, las estimaciones de la estructura genética en coníferas son muy variables. Govindaraju (1988) compara los valores de G_{ST} en 23 coníferas y obtiene una media de 0.076, pero con rangos muy amplios, que van desde 0.02 hasta 1.0, para *P. sylvestris* y *P. torreyana*, respectivamente.

Pinus rzedowskii, es una especie representada por pocos individuos y poblaciones, de distribución restringida y en peligro de extinción. Por lo tanto, se esperarían bajos niveles de variación genética, altos valores de flujo genético y poca estructura genética entre sus poblaciones. Con el uso de isoenzimas se puso a prueba esta hipótesis. Los objetivos específicos fueron i) documentar los niveles de variación genética de la especie y ii) conocer la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones de *P. rzedowskii*. Utilizando 14 loci isoenzimáticos encontré que la variación genética es superior a la esperada teóricamente, y una estructura genética marcada entre las poblaciones, lo cual demuestra que aunque cercanas las poblaciones están aisladas genéticamente. Al ser pequeñas las poblaciones, se han fijado por deriva genética diferentes variantes alélicas. Estos resultados son inesperados y tienen gran relevancia para la planeación de la conservación a largo plazo de esta especie de pino.

4. 2. MÉTODOS

4. 2. 1. Colecta del material y electroforesis

Las colectas se realizaron en la región de Dos Aguas, Mpio. de Coalecomán Michoacán en enero de 1995 para nueve de las poblaciones de *P. rzedowskii* descritos en el capítulo tres. Se colectaron ramillas con yemas en desarrollo y se mantuvieron en bolsas de polietileno selladas en hielo hasta llegar al laboratorio. Una vez en el laboratorio, una réplica de cada individuo se colocó en un cuarto frío a 4° C y otra réplica se almacenó en un ultracongelador a -70°C. Se obtuvieron genotipos multilocus para 310 individuos en total.

Para la extracción de las proteínas se molieron las partes vivas de las yemas sacadas de las escamas que las protegen, con un buffer de extracción que se prepara con tres partes de buffer VegII de Cheliack y Pitel (1984) y una parte del buffer O'Malley et al (1980) (ver Apéndice 1 para receta completa). En la tabla 4.2 se listan las poblaciones colectadas y el número de individuos colectados y caracterizados electroforéticamente para cada población. Los geles se prepararon al 12% p/v de almidón hidrolizado (SIGMA S-4501). Se usaron tres sistemas de corrida (Mitton et al. 1977, Miles et al. 1977, Conkle et al., 1982) y 12 enzimas con buena resolución. En total se analizaron 14 loci. Para la tinción de las enzimas se usaron recetas de Hakim Elahi (1976), para APX-1 APX-2, CPX-2, de Conkle et al (1982) para MNR-1y GDH-2, de Soltis et al (1983), para IDH-2, de Selander (1986) para EST-2, F-EST-1, y de Werth et al (1982) para LAP-1 (en el Apéndice 2 se detallan las recetas). La designación de los loci y alelos se realizó con base en la movilidad relativa de las proteínas. Los loci número 1, son los que están más lejos del catodo, es decir, los loci que migran más lejos del punto de origen de la muestra.

4.2.2 Análisis de datos

A partir de los datos electroforéticos se obtuvieron los siguientes estimadores:

1) Frecuencias alélicas. Para el caso de dos y tres alelos (Hartl 1987):

$$p = (N_{11} + (N_{12} / 2)) / N \quad q = (N_{22} + (N_{12} / 2)) / N \quad z = (N_{33} + (N_{13} / 2 + N_{23} / 2)) / N$$

Donde N_{11} , N_{12} , N_{22} , N_{13} , N_{23} , N_{33} , son las frecuencias absolutas de los seis genotipos y N es el número de individuos.

2) Proporción de loci polimórficos (P). Es igual al número de loci polimórficos de polimorfismos (más de un alelo en un locus) entre el número total de loci (Cavalli y Bodmer, 1971). Un locus se considera polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia mayor al 95% de probabilidad. Este índice toma valores entre 0 y 1. Si es 0 no existe variación genética. Entre más alto, es mayor la variación genética hasta llegar a 1, cuando todos los genes analizados son polimórficos, es decir, todos los genes tienen dos o más formas alternativas de un gen (Hedrick 1983)

$$P = x/m$$

Donde x = número de loci polimórficos y m = número de loci analizados

3) La heterocigosis promedio esperada, H . Este índice se obtiene a partir del promedio de la heterocigosis esperada en el equilibrio Hardy-Weinberg para todos los genes estudiados en las poblaciones (Brown y Weir, 1983). Se define de la siguiente manera:

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

Donde p_i es la frecuencia alelica para cada locus y cada alelo. Este índice toma valores que van de 0, cuando no se registra variación en ninguno de los genes estudiados, hasta 1, cuando todos los loci son polimórficos, tienen un número infinito de alelos (o muy grande) y las frecuencias de los alelos son iguales entre sí.

4) El promedio del número de alelos por locus, A , que es simplemente el número de alelos promedio por locus.

Estos estimadores se obtuvieron con el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981). Para probar si las frecuencias genotípicas y alélicas son iguales estadísticamente a las esperadas bajo el equilibrio Hardy Weinberg se realizó una prueba de χ^2 de acuerdo a Workman y Niswander (1970).

Para realizar los análisis de la estructura genética de *P. rzedowskii* se utilizaron los siguientes índices y estimadores:

1) Índices de fijación F , propuestos por Sewall Wright (1921), derivados a partir

de:

$$F = 2pq - H_o/2pq = 1 - H_o/2pq$$

donde H_o es la proporción de heterocigos observados y $2pq$ la proporción de heterocigos esperados. Este índice tiene un valor de 0 si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, dado que la heterocigosis observada es igual que la heterocigosis esperada, y puede tomar valores entre -1 y +1, alcanzando un valor de -1 si existen exclusivamente individuos heterocigos, hasta +1 si todos los individuos son homocigos. Este índice puede ser dividido en niveles geográficos, lo que genera los estadísticos F

a) F_{IS} que es la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg a nivel local (población) y toma valores de -1 a +1

$$F_{IS} = H_o - H_e/H_e$$

Donde, H_o es la heterocigosis promedio observada sobre todos los loci, a nivel subpoblación, H_e es la heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel subpoblación (Hedrick 1983)

b) F_{IT} representa la correlación entre unidades gaméticas relativas al total de la población. Toma valores de -1 a +1.

$$F_{IT} = H_T - H_o/H_T$$

Donde H_o es la heterocigosis promedio observada sobre todos los loci, a nivel subpoblación, H_T es la heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel subpoblación (Hedrick 1983).

c) F_{ST} estima el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones. Toma valores entre 0 y 1.

$$F_{ST} = H_T - H_e/H_T$$

Donde H_e es la heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci, a nivel subpoblación, H_T es la heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel de la población (Hedrick 1983).

2) Las relaciones genéticas entre poblaciones se evaluaron con base en los estimadores de la identidad y la distancia genéticas (Nei, 1978) para todos los pares de poblaciones posibles. La identidad I toma valores que van de 0, si ambas poblaciones de cada pareja no comparten ni un solo alelo, a 1 si las dos poblaciones tienen frecuencias

alélicas idénticas. La distancia $D (I) = - \ln (I_N)$ varía entre 0 hasta infinito. Es igual a 0 si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, y de infinito si no comparten ningún alelo (Hedrick, 1983).

3) La estimación del flujo genético (N_m) se realizó de manera indirecta, y se usó la fórmula propuesta por Crow y Aoki (1984).

$$F_{ST} = 1 / (4a N_m + 1) \quad ; \quad N_m = 1 - F_{ST} / 4F_{ST}$$

Donde $a = [n / (n-1)]$ y n es el número de poblaciones

Con el valor promedio de N_m se estimó de manera indirecta el tamaño efectivo (N_e) por vecindad (Slatkin y Barton, 1989)

$$N_e = 2 \times 3.1416 \times N_m$$

Donde N se refiere al tamaño de la vecindad genética (que considera el área total de las subpoblaciones) y N_m se refiere al valor promedio obtenido entre las subpoblaciones

4) Finalmente, se usó un método propuesto por Slatkin (1993), basado en un modelo de estructura poblacional de islas, para estimar los niveles de flujo genético y ver si existen patrones de aislamiento por distancia. Para los datos de frecuencias alélicas de poblaciones pareadas se puede usar el estadístico $M = (1 / F_{ST} - 1) / 4$, donde poblaciones con dispersión restringida y en equilibrio genético, muestran un decremento entre las relaciones de M para pares de poblaciones y la distancia geográfica que separa las poblaciones de cada pareja (Slatkin 1993, Alvarez-Buylla, et al. 1994) Para conocer la significancia estadística entre las matrices de distancia geográfica y de tasas de dispersión (M) se realizó una prueba de t de Mantel (1993).

El programa BIOSYS-1 se usó para obtener las frecuencias alélicas y genotípicas, las identidades y distancias genéticas (Nei 1975, 1977), y el índice de fijación F para cada loci y población analizada (Wright 1965) Los estadísticos F de Wright, así como los intervalos de confianza al 95% de su valor medio, se calcularon con el método de "jackknife" propuesto por Weir y Cockerham (1984) a través de un programa de computación modificado de Weir e implementado por Alvarez-Buylla et al (1996). Para ver si los valores de F , F_{IS} , F_{IT} de cada loci son significativamente diferentes de 0, se obtuvo el estadístico $\chi^2 = F^2 N (K-1)$, para $K (K-1) / 2$ grados de libertad, donde N es el tamaño de la

muestra y K es el número de alelos (Li y Horvitz, 1953). Para la significancia de los valores de F_{ST} por locus, se aplicó $\chi^2 = 2N F_{ST}^2 (K-1)$ con $(K-1)(s-1)$ grados de libertad, donde N es el tamaño de la muestra (número de individuos), K el número de alelos y s, el número de subpoblaciones (Workman y Niswander, 1970). Para el análisis de aislamiento por distancia se usó el programa ISO (Slatkin, 1993). Por último, para la descripción de las relaciones genéticas entre poblaciones se usó el método de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). El dendrograma fue construido con la matriz de distancias genéticas de Nei (1975).

4. 3. RESULTADOS

4.3.1 Variación genética de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

Se ensayaron 17 enzimas, de las cuales 5 no presentaron actividad. De las 12 enzimas restantes se incluyen 14 loci isoenzimáticos.

La resolución enzimática se obtuvo en tres sistemas de corrida (apéndice I). En el sistema de Mitton et al (1977) se resolvió la peroxidasa anódica (APX), la peroxidasa catódica (CPX), la glutamato oxalato transaminasa (GOT) y la menadione reductasa (MNR). En el sistema de Conkle (1982) la leucina aminopeptidasa (LAP), la esterasa (EST) la esterasa fluorescente (EST-F), la nicotinamida adenina dinucleótido (NADHDI) y la rubisco (RUB), las cuatro enzimas restantes se resolvieron en el sistema #2 de Miles et al (1977). Estas son la shikimato deshidrogenasa (SDH), la glutamato deshidrogenasa (GDH), la isocitrato deshidrogenasa (IDH) y la malato deshidrogenasa (MDH) (figura 4.1). La MNR y la NADHDI, presentaron dos loci, pero solo consideré el locus-1 en cada una, ya que el segundo loci no presentó actividad para algunos individuos. La enzima MDH, tampoco se analizó, ya que para dos poblaciones no se lograron apreciar las bandas claramente.

Del total de los 14 loci analizados, nueve fueron polimórficos siguiendo el criterio del alelo más común con una frecuencia máxima de 0.95 (Tabla 4.2). Se cuantificaron 32 alelos en total y el promedio de alelos por locus fue igual a 1.8, con un rango de 1.6 a 2.4. La proporción de loci polimórficos varió desde 35.7% hasta 64.3%, con un valor promedio de 46.8%. La heterocigosidad observada entre las poblaciones varió de 0.129 a 0.239, con un valor promedio igual a 0.162, y la heterocigosidad esperada varió entre 0.183 y 0.304, con promedio de 0.219.

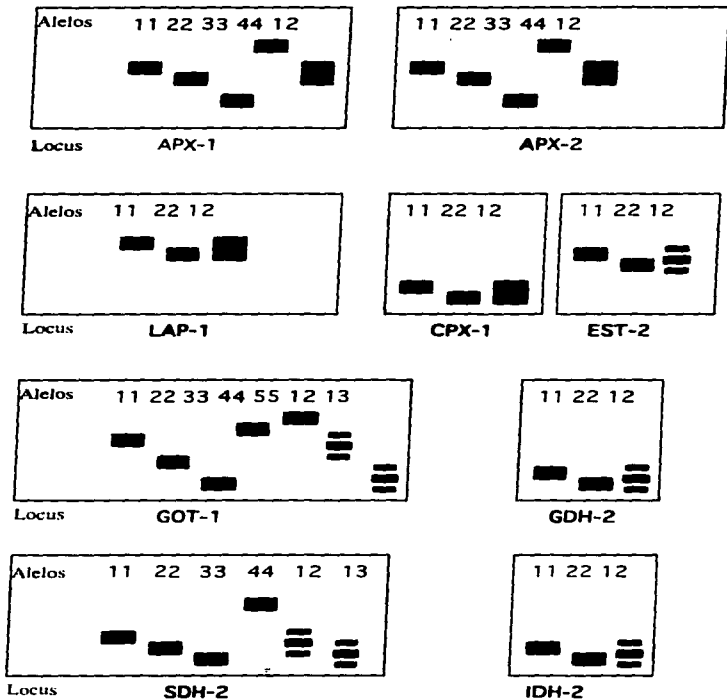


Figura 4.1. Patrones de bandeo de los 9 loci polimórficos observados en *P. zedowskii*, Michoacán, México.

Tabla 4. 2. Estimadores de la variación genética en nueve poblaciones de *Pinus rzedowskii* (entre paréntesis el error estándar).

Población (No)	Individuos (No)	Prom. de alelos por locus (No)	% de loci polimórficos	Promedio de heterocigosis observada	Promedio de heterocigosis esperada
1 Vaca pinta	28	1.8	50.0	0.239 (0.071)	0.230 (0.066)
2 P. Varaloso	25	1.8	42.9	0.141 (0.058)	0.183 (0.070)
3 La Soledad	6	1.6	35.7	0.143 (0.060)	0.211 (0.081)
4 El Fresno	66	2.1	57.1	0.175 (0.051)	0.272 (0.067)
5 La Alberca	52	1.9	50.0	0.141 (0.049)	0.222 (0.066)
6 Chiqueritos	34	2.4	64.3	0.168 (0.073)	0.304 (0.079)
7 El Varaloso	30	1.6	35.7	0.129 (0.057)	0.144 (0.057)
8 El Pinabete	25	1.6	42.9	0.148 (0.060)	0.208 (0.071)
9 Aguacatera	29	1.6	42.9	0.174 (0.060)	0.203 (0.072)
Promedio	33	1.8	46.8	0.162 (0.059)	0.219 (0.069)

En la tabla 4.3 se observa el número de alelos por locus para los 9 loci polimórficos. Se encontraron 2 alelos para los loci APX-1, CPX-1, LAP-1, IDH-2, GDH-2, 4 alelos en los loci APX-2, EST-2 y SDH-2. El mayor número de alelos (5) se encontró en el locus GOT-1 pero solo en la población Chiqueritos (6)

Las frecuencias alélicas para cada locus no son muy similares entre sí. Los valores van desde 0.043 en SDH-2 hasta 0.953 en CPX-1. La mayoría de los loci presentaron un alelo claramente común con frecuencias superiores al 90%. Por ejemplo, para LAP, el alelo 1 fue el más común en todas las poblaciones. Esto se aprecia claramente cuando se comparan las poblaciones de CHIQ (6) y el FRE (4). En el locus LAP-1 las frecuencias para el alelo 3 son mayores que para el alelo 1 en la población CHIQ (6). En la población FRE (4) las frecuencias de estos alelos se invierten, se presenta mayor frecuencia

Tabla 4.3 Frecuencias alélicas en 14 loci isoenzimáticos de 9 poblaciones de *P. rzedowskii*.

Población	alelos	Loci													
		MNR-1	APX-1	APX-2	CPX-2	EST-1	EST-2	GOT-1	LAP-1	SDH-2	IDH-1	GDH-2	RUB-1	FEST-1	NAD-1
V. Pinta	N	29	29	6	67	53	37	30	26	30	29	29	29	29	29
	1	1.000	.328	.714	.340	1.000	.296	.296	.810	.643	.000	.000	1.000	1.000	1.000
	2	.000	.672	.250	.660	.000	.537	.667	.190	.339	1.000	1.000	.000	.000	.000
	3	.000	.000	.000	.000	.000	.167	.000	.000	.018	.000	.000	.000	.000	.000
	4	.000	.000	.036	.000	.000	.000	.037	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
Pred Var.	N	29	9	9	29	29	29	18	29	28	29	29	29	29	
	1	1.000	.444	.056	.000	1.000	.052	.417	.862	.018	1.000	1.000	1.000	1.000	
	2	.000	.556	.944	1.000	.000	.793	.389	.138	.339	.000	.000	.000	.000	
	3	0.000	0.000	0.000	0.000	.155	.139	.000	.196	.000	.000	.000	.000	.000	
	4	0.000	0.000	0.000	0.000	.056	.000	.446	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
Soledad	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	1	1.000	.5000	.5000	.000	1.000	.000	.000	1.000	.083	.000	.000	.000	.000	
	2	.000	.5000	.5000	1.000	.000	.750	.250	.000	.167	1.000	1.000	1.000	1.000	
	3	.000	.000	.000	.000	.000	.250	.417	.000	.333	.000	.000	.000	.000	
	4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.333	.000	.417	.000	.000	.000	.000	
Fresno	N	67	66	57	67	67	67	66	66	66	67	67	67	67	
	1	1.000	.394	.132	.000	1.000	.381	.659	.705	.424	.209	.261	1.000	1.000	
	2	.000	.5000	.632	1.000	.000	.552	.265	.280	.500	.784	.739	.000	.000	
	3	.000	.000	.202	.000	.067	.076	.015	.076	.007	.000	.000	.000	.000	
	4	.000	.000	.035	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
Alberca	N	53	51	50	53	53	48	52	51	53	51	53	53	53	
	1	1.000	.245	.220	.000	1.000	.573	.529	.225	.783	.137	.000	1.000	1.000	
	2	.000	.755	.640	1.000	.000	.365	.356	.676	.217	.863	1.000	.000	.000	
	3	.000	.000	.000	.000	.000	.063	.106	.076	.000	.000	.000	.000	.000	
	4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.010	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
Chiqueritos	N	37	31	37	37	34	25	36	24	34	37	37	37	37	
	1	1.000	.597	.324	.081	1.000	.480	.319	.208	.412	.108	.108	1.000	1.000	
	2	.000	.403	.378	.919	.000	.440	.431	.250	.529	.892	.892	.000	.000	
	3	.000	.000	.216	.000	.000	.040	.194	.458	.029	.000	.000	.000	.000	

	4	.000	.000	.081	.000	.000	.040	.028	.083	.029	.000	.000	.000	.000	.000
	5	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.028	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
Varaloso	N	30	28	28	30	30	26	28	30	25	30	30	30	30	30
	1	1.000	.821	.054	.000	1.000	.654	.250	1.000	.400	.000	.033	1.000	1.00	1.000
	2	.000	.179	.929	1.000	.000	.346	.607	.000	.600	1.000	.967	.000	.000	.000
	3	.000	.000	.018	.000	.000	.000	.143	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
P. Pinta	N	26	22	26	26	26	18	23	26	26	26	26	26	26	26
	1	1.000	.455	.423	.000	1.000	.444	.261	.115	.442	.000	.000	1.000	1.000	1.000
	2	.000	.545	.558	1.000	.000	.556	.370	.885	.558	1.000	1.000	.000	.000	.000
	3	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.348	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.022	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
Agucatera	N	30	29	29	30	30	26	25	30	30	30	30	30	30	30
	1	1.000	.741	.431	.000	1.000	.462	.380	.167	.683	.000	.000	1.000	1.000	1.000
	2	.000	.259	.569	1.000	.000	.538	.2000	.833	.283	1.000	1.000	.000	.000	.000
	3	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.340	.000	.033	.000	.000	.000	.000	.000
	4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.080	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

del alelo 1 que del alelo 3 (ver gráfica 4.1). Para el locus GOT-1 el alelo 2 ocurre mas frecuentemente que el alelo 1 en las poblaciones de FRE (4) y El VAR (7). En la gráfica 4.1 tambien se aprecia que dos de los loci GDH-2 e IDH-2, son polimórficos para 3 de las 9 poblaciones estudiadas. Solo para la población el FRE (4), VAR (7) y CHIQ (6) la GDH-2 fue polimórfica y el locus IDH-2 se presentó con dos alelos pero solo en las dos últimas poblaciones mencionadas y en la población La Alberca (5) Solo la APX-1 presentó dos alelos con frecuencias similares cercanas a 0.500. Los resultados de las pruebas de χ^2 realizados para ver si existia heterogeneidad en las frecuencias alélicas por locus (Workman y Niswander, 1970) demostraron que existen diferencias significativa ($p < 0.001$) entre poblaciones para todos los loci polimórficos ensayados.

Para las frecuencias genotipicas tambien se realizo una prueba de chi-cuadrada para ver si se desvian de lo esperado en el equilibrio Hardy-Weinberg. La mayoría de las frecuencias genotipicas se desvian significativamente de los valores esperados en Hardy-Weinberg. Seis de los loci presentan diferencias significativas al 99% y 95% de confianza (LAP-1, GOT-1, SDH-2, APX-2, EST-2 e IDH-2) los tres loci restantes son marginalmente significativos al 90% de confianza ($p < 0.10$). Para las poblaciones FRE (4) y CHIQ (6), unicamente dos de sus loci APX-2 y EST-2 no se desvian significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg. Se aplicó la corrección de Hedrick (1983) para los casos en que los valores de clases esperados son menores a 1 y de 0. Sin embargo, diez de los loci permanecieron con valores significativamente diferentes al 99%, debido a un exceso de homocigos, mientras cinco loci muestran valores significativos al 90% debido a exceso de heterocigos. Tambien se presentaron homocigos y heterocigos raros, pero solo en dos loci. Con estos resultados se deduce que las desviaciones genotipicas del equilibrio Hardy-Weinberg que se obtuvieron se deban más al exceso de homocigos más que de heterocigos.

Tabla 4. 4. Loci que se desvian del equilibrio Hardy-Weinberg (prueba de χ^2 corregida de Hedrick, 1983), en las diferentes poblaciones de *Pinus rzedowskii* en Michoacán, México.

LOCI	Población							
	1	3	4	5	6	8	9	
APX-2			***hom	***hom				
EST-2			*het					
LAP-1			***hom	***hom	***hom/het			

continuación

GOT-1			***hom	***hom	*het		**het
IDH-2			***hom				
SDH-2	*het	*hom/het			***hom		*hom

Hom = homocigos comunes, het = heterocigos comunes, hom/het = homocigos y heterocigos raros (* = $p < 0.10$, ** = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$)

4. 3. 2. Estructura genética de las poblaciones de *Pinus rzedowskii*.

Los índices de fijación por locus por población fueron significativamente diferente ($p < 0.05$) de 0, que es el valor esperado en el equilibrio Hardy-Weinberg en veintiocho ocasiones (Tabla 4.5). Veinticuatro de éstos índices son positivos y cuatro negativos. En la población PI (8) y VP (1) tres loci fueron significativos, para la primera población la APX-2, APX-1 y LAP-1, y APX-1, APX-2 y GOT-1 para la segunda. Las poblaciones FRE (4) y ChIQ (6) fueron las que mostraron mayor número de F' positivos y significativos, 6 loci en ambas poblaciones. El locus LAP-1 fue el que presentó mayor número de valores de F' significativamente diferentes de cero en las diferentes poblaciones. Por tanto, el índice de fijación en *P. rzedowskii* es positivo y significativamente diferente de 0 en 24 de 59 casos. Esto indica que existe mayor probabilidad de que las desviaciones genotípicas que se obtuvieron se deban más a un exceso de homocigos para varios loci y en varias de las poblaciones.

Tabla 4.5. Índices de fijación (F') para 9 loci de las poblaciones estudiadas de *Pinus rzedowskii*
Hipótesis nula $F = 0$ ($P < 0.05$ con base en una prueba χ^2) (* = Valores significativos)

Locus	Población								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
APX-1	0.14*	0.1	0.33*	0.37*	0.21	0.53*	-0.22	0.63*	-0.35
APX-2	0.16*	-0.6	0.33*	0.39*	0.32*	0.07	-0.06*	-0.06*	0.09
CPX-2	0.2					1.00*			
EST-2	0.06	0.1	-0.33*	0.07	0.18	-0.12	-0.19	0.1	-0.39
GOT-2	0.27*	0.23	-0.02	0.2*	0.27	0.01	0.11	0.16	0.31
LAP-1	0.23	1.00*		0.82*	0.96*	1.00*		1.00*	1.00*
SDH-2	-0.36	0.17	0.76	0.22	-0.05	0.68*	0.67*	0.3	0.34
IDH-2				0.39*		1.00*	1.00*		
GDH-2				0.5*	0.67	1.00*			
Media	0.10	0.16	0.21	0.37	0.36	0.54	0.15	0.35	0.21

Los estadísticos F de Wright para los loci polimórficos de *P. rzedowskii* se presentan en la tabla 4.6. Los valores de los tres estadísticos son positivos y estadísticamente significativos al 99% de confiabilidad en todos los loci, a excepción de EST-1 de los estadísticos F_{IS} y F_{IT} . Los valores de F_{IS} , son muy variables, varían de 0.083 (EST2) a 0.902 (LAP1). Todos los valores de F_{IS} son positivos y significativos ($p < 0.0001$) con excepción del locus EST2. El valor medio de F_{IS} es considerablemente alto, igual a 0.405, con intervalo de confianza de 0.256 a 0.616 (95%) y sugiere que en promedio existe un exceso de homocigos en las poblaciones. En general, se puede observar que los valores del índice de fijación F y de F_{IS} , son diferentes para los loci, esto significa que existen poblaciones que presentan mayores niveles de endogamia y más loci homocigos que otras poblaciones. Al promediar cada locus, juntando todas las poblaciones en un solo valor de F_{IS} para cada locus, éstos son mayores que los valores de F , los cuales se obtienen de manera particular para cada población y permite ver en cuales poblaciones hay exceso de homocigosis.

Los valores de F_{ST} para todos los heterocigos, con un intervalo que va de 0.083 a 0.388. El valor promedio para todos los loci es de 0.175 con un intervalo de confianza de 0.121 a 0.261 ($p < 0.05$). Todos los valores de F_{ST} resultaron estadísticamente significativos y diferentes de cero ($p < 0.001$). Estos resultados concuerdan con los encontrados en el análisis de χ^2 para la heterogeneidad de frecuencias alélicas en las diferentes poblaciones, indicando que existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas y más clara estructura genética de las poblaciones. El 17.5% de la variación genética es explicada por diferencias entre poblaciones.

Los valores de F_{IT} , variaron desde 0.001 hasta 0.840, con un valor medio de 0.274 y un intervalo de confianza entre 0.151 y 0.482 ($p < 0.05$). Al igual que la F_{IS} , solo el locus EST-2 no tuvo F_{IT} significativo. Los demás loci tuvieron F_{IT} diferentes de cero al 0.001 de probabilidad a excepción de CPX-2 y GOT-1, los que fueron significativos ($p < 0.025$). Este resultado indica que *P. rzedowskii* contiene, en general menos heterocigos de los esperados bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg.

En la tabla 4.6 se muestran los estimados de flujo génico (Nm) obtenidos para los 9 loci polimórficos. Se observa que cuatro de los loci presentan valores superiores a una unidad de este estimador (APX-1, APX-2, EST-2 y GOT-1); sin embargo cuatro loci LAP-

1, IDH-2, CPX-2 y GDH-2 presentan valores menores a 1. Cuatro de los loci tienen valores superiores a 1: APX-1 con 1.940 de flujo genético, APX-2 con 1.892, EST-2 con 3.480 y GOT-1 con 2.259. En los otros loci los valores fueron menores que 1 pero solo en el locus IDH-2 fue menor que 0.5 (0.141). Esto indica que existe poco intercambio genético entre las poblaciones de *P. rzedowskii*.

Tabla 4.6. Estimación de F_{IS} , F_{IT} , F_{ST} y N_m , para 9 loci en 9 poblaciones de *Pinus rzedowskii*

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}	N_m	N_e
APX-1	0.3622*	0.1401*	0.2666*	1.9400	12.19
APX-2	0.3269*	0.1433*	0.2161*	1.8922	11.89
CPX-2	0.3730*	0.3595*	0.2381*	0.5326	3.35
EST-2	0.0834	0.0834*	0.0897	3.4784	21.86
GOT-1	0.2462*	0.1229*	0.1415*	2.2588	14.19
LAP	0.9022*	0.3881*	0.8400*	0.4985	3.13
SDH	0.3834*	0.1569*	0.2712*	0.7007	4.40
IDH	0.5427*	0.0965*	0.5023*	0.1401	0.88
GDH	0.5016*	0.2414*	0.4171*	0.9946	6.25
Media	0.4048*	0.1753*	0.2736*	1.4929	8.68
Limites de confianza	(0.2557- 0.8159) (0.1209-0.2606) (0.1507-0.4821)				
(Alvarez-Buylla y A. Chaos 1996, modificando de Weir y Cockerham 1984)					

Hipótesis nula $F = 0$ ($P < 0.001$) con base en una χ^2

El estimado del tamaño efectivo obtenido indirectamente (Slatkin y Barton, 1989) fue bajo (90 individuos en promedio). Esto sugiere que pocos individuos están aportando variantes alélicas y por lo tanto el flujo genético puede ser insuficiente para impedir la diferenciación de las poblaciones de esta especie.

Las relaciones genéticas entre poblaciones son analizadas utilizando los estadísticos de distancia y similitud genética de Nei (1978). La estimación de la identidad y distancia genética entre todos los pares de poblaciones son muy heterogéneas (Figura 4.2). Se puede apreciar que la identidad genética mayor es de 0.981 entre la población AG (9) y PI (8) y el valor menor es de 0.870 entre SOL (3) y ALB (5). La distancia genética menor (cerca a 0) es de 0.014 entre las poblaciones AG (9) y PI (8), y el valor mayor (alejado de 0) es de 0.1390 entre las poblaciones ALB (5) y SOL (3). No se encontró un patrón específico que concuerde con la distancia que separa a las poblaciones. Esto se corroboró usando el método de Slatkin (1993) ($r^2 = 0.110$, $p = 0.460$) (Figura 4.3), y sugiere que la

estructura de las poblaciones no se debe a diferencias en el flujo génico producidas por aislamiento por distancia. Las poblaciones están tan cerca unas de otras que las tasas de flujo génico más bien pueden estar afectadas por barreras microgeográficas. Por ejemplo, la topografía accidentada que aíslan en diferente grado a las poblaciones.

Figura. 4.2. Matriz de distancias genéticas (arriba de la diagonal) e identidad genética (abajo de la diagonal) de Nei (1978) para las poblaciones de *Pinus rzedowskii* en Michoacán, México. (Identidad promedio = 0.929, Distancia promedio = 0.073)

Población	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V. Pinta	***	0.915	0.934	0.938	0.931	0.941	0.016	0.903	0.015
El Varaloso	0.089	***	0.977	0.956	0.903	0.918	0.944	0.899	0.899
La Soledad	0.068	0.024	***	0.922	0.870	0.910	0.918	0.898	0.892
El Fresno	0.065	0.045	0.082	***	0.959	0.960	0.048	0.933	0.935
La Alberca	0.072	0.102	0.139	0.042	***	0.957	0.902	0.962	0.968
Chiquerito	0.061	0.085	0.094	0.041	0.044	***	0.938	0.953	0.960
P. Varaloso	0.088	0.058	0.086	0.053	0.103	0.064	***	0.886	0.911
P. Pinabete	0.102	0.107	0.108	0.070	0.039	0.049	0.121	***	0.986
La Aguacatera	0.089	0.107	0.114	0.067	0.033	0.040	0.093	0.014	***

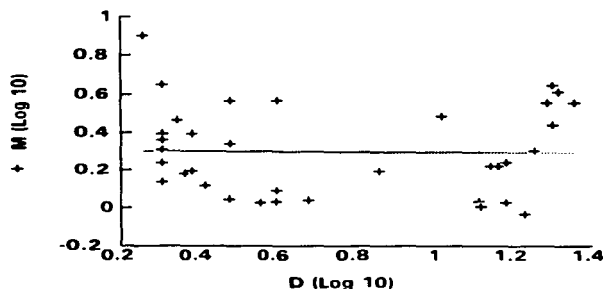


Figura. 4.3. Relación lineal entre un estimado del flujo génico M (\log_{10}) y la distancia geográfica D (\log_{10}) para parejas de poblaciones de *Pinus rzedowskii* en Michoacán, México (Statkin 1993).

En la figura 4. 4. se presenta un fenograma de las posibles relaciones genéticas de las poblaciones de *P. rzedowskii*, obtenidas con base en la matriz de distancias genéticas (UPGMA). Existen dos ramas principales formadas por dos grupos definidos. El primero de ellos contiene 6 poblaciones y dentro de estas seis, se encuentran las poblaciones con mayor variación genética y son las poblaciones que están también representadas por el mayor número de individuos (entre 200 y 3500 individuos por población) excepto la población CHIQ (con 60 individuos) Dentro del segundo grupo se encuentran 3 poblaciones y está representado por las de menor variabilidad y de menor número de individuos (entre 7, 60 y 200 individuos) Es interesante notar que dentro del primer grupo una de las poblaciones (CHIQ 6) se encuentra ubicada en el extremo opuesto del área con respecto a la localización de las otras poblaciones del mismo grupo De igual manera, en el otro grupo encontramos otra población (SOL 3) que geográficamente se encuentra ubicada más cerca de la población de CHIQ (6) que con las poblaciones que se agrupa genéticamente. Estos resultados sugieren al igual que el análisis de aislamiento por distancia, que no existe un patrón claro de divergencia con respecto a la distancia geográfica que separa a las poblaciones.

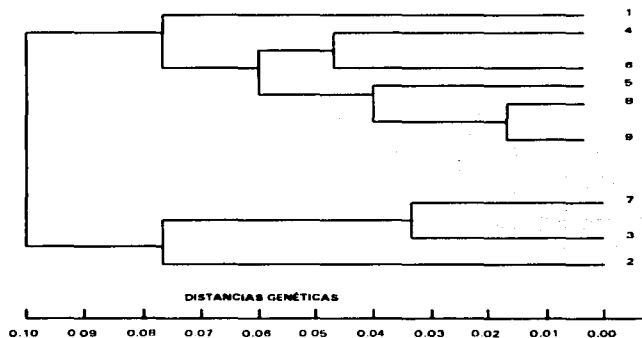


Fig 4. 4. Relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *Pinus rzedowskii*, obtenidas con base en el método de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973).

4. 4. DISCUSIÓN

Pinus rzedowskii, es una especie endémica y catalogada en peligro de extinción. Sin embargo, presentó altos niveles de variación genética superiores a los estimados para otras especies de pino con características similares e incluso superior a otras especies de pinos de amplia distribución (Tabla 4-7)

En términos generales, *P. rzedowskii* presenta una cantidad de variación genética semejante a los valores presentados en la mayoría de las especies de coníferas estudiadas. Hamrick et al (1981) recopilaron datos isoenzimáticos para 113 taxa de plantas y encontraron que para 21 especies de coníferas, el 67.7% de los loci estudiados son polimórficos. Aunque el rango de variación de polimorfismos varío de 0 a 100% para las diferentes especies. El número promedio de alelos por locus fue de 2.29 y varió entre 1.00 a 3.87. La heterocigosidad esperada en promedio fue de 0.210, que varió entre 0.00 a 0.37 para las diferentes especies. En *P. rzedowskii*, lo que se encontró es que tanto la heterocigosidad esperada, como el número de alelos son similares a los valores promedio reportados por Hamrick et al (1981) para coníferas. El promedio de alelos por locus es comparable por ejemplo, en *P. maximinoi* (Mathenson et al., 1989, citado en Bermejo 1993) *P. attenuata* y *P. muricata* (Millar et al., 1988) que es de 1.7, 1.7 y 1.6 respectivamente. A diferencia de *P. rzedowskii*, estas especies son de distribución amplia y con tamaños poblacionales grandes. En pinos es raro que especies de distribución restringida presenten valores altos de heterocigosidad o de polimorfismos. Para el caso particular de *P. rzedowskii* y con base en los antecedentes de distribución en coníferas se esperaría que presentara poca variación genética. Sin embargo, los estimadores de la variación genética tuvieron valores altos. Por ejemplo, la heterocigosidad esperada en *P. rzedowskii* (0.219) fue superior a la que presenta *P. muricata* (0.120) (Millar et al., 1988), especie de amplia distribución aunque con poblaciones fragmentadas. El porcentaje de loci polimórficos es más alto en *P. rzedowskii* (46.8%) que en *P. torreyana* (3.4%) (Ledig et al., 1983) especie que presenta características similares que *P. rzedowskii*, es de distribución restringida y representada solo por dos poblaciones con tamaños pequeños (2000 y 7000 individuos respectivamente). Otra especie interesante es *P. washoensis* que es endémica de California (USA) y que se encuentra amenazada de extinción. Esta especie presentó en promedio una heterocigosidad esperada de 0.148 (Niebling y Conkle, 1990) que al igual que *P. rzedowskii* es un valor más

alto que el encontrado en otras especies de amplia distribución.

Es interesante resaltar que la heterocigosidad observada en *P. rzedowskii* (0.162) fue significativamente inferior a la heterocigosidad esperada (0.210). En contraste, en la mayoría de las especies de pino que se han estudiado, ambos estimadores (*H_o* y *H_e*) son muy semejantes (ver tabla 4.7). Estos resultados sugieren que en *P. rzedowskii* la variación genética es menor a la que esperaríamos teóricamente. En la mayoría de los casos se encontró un exceso de homocigos, probablemente lo reducido del tamaño de sus poblaciones y su parcial aislamiento favorecen el apareamiento entre parientes por lo que existe una substancial pérdida de heterocigos en las poblaciones que representan a esta especie.

El análisis de la estructura genética de las poblaciones de *P. rzedowskii* reveló que sus poblaciones tienen niveles de diferenciación genética significativos. El 82.5 % de la variación genética ocurre dentro de las poblaciones y el 17.5 % se debe a diferencias entre las poblaciones. El índice de fijación (*F_s*), como el estadístico *F_{ST}* corroboran que las poblaciones se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg, revelando exceso de homocigos dentro de las poblaciones. Es interesante observar que una de las poblaciones que presentan más valores de *F_s* significativamente diferentes de cero (fuera del equilibrio Hardy-Weinberg) está representada por el mayor número de individuos FRE (4) y otra población CHIQ (6), contiene el mayor número de individuos jóvenes no reproductivos menores de 30 años. En las dos poblaciones es muy probable que se esté presentado endogamia pero los mecanismos pueden estar actuando de diferente manera. En la primera población puede existir un intercambio entre individuos cercanos (efecto Wahlund) y en la segunda población, como solo existen 4 árboles reproductivos, puede haber pérdida de variación por efecto de la autofecundación y consanguinidad entre estos 4 árboles.

El valor promedio de *F_{ST}* (diferenciación genética entre poblaciones) de *P. rzedowskii* (17.5) es relativamente alto al compararlo con la mayoría de las coníferas que se han estudiado. Si lo comparamos con especies de amplia distribución (Tabla 4.7), vemos que los valores de *F_{ST}* son menores en estas especies que en *P. rzedowskii*. Pero si lo comparamos con especies que tienen poblaciones grandes y con distribución discontinua el valor reportado aquí se encuentra dentro del intervalo reportado para este otro tipo de especies. Por ejemplo, en *P. cembra* especie con poblaciones fragmentadas y de amplia

Tabla 4.7. Estimación de algunos parámetros de la variación y estructura genética para varias especies de *Pinus* con distribución geográfica amplia y restringida: número de loci analizados (Loci); número medio de alelos por locus (A), proporción de loci polimórficos (P), Heterocigosis esperada (H_e) diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}/F_{ST}).

Especie y tipos de distribución geográfica	Loci	A	P	H_e	G_{ST}/F_{ST}	Referencia
<i>Pinus engelmannii</i> (amplia)	26	1.4	0.36	0.10	0.130	Bermejo et al., 1993
<i>P. caribae</i> var <i>Hondurensis</i>	16	2.2	0.73	0.22	0.130	Mathenson et al., 1989
<i>P. oocarpa</i> (amplia)	16	2.2	0.74	0.17	0.100	" "
<i>P. oocarpa</i> (amplia)	32	1.9	0.65	0.27	—	Millar et al., 1988
<i>P. maximinoi</i> (amplia)	16	1.7	0.62	0.14	—	Mathenson et al., 1989
<i>P. jeffreyi</i> (amplia)	20	1.0	0.22	0.04	—	Furnier y Adams, 1986
<i>P. muricata</i> (amplia)	32	1.6	0.47	0.12	—	Millar et al., 1979
<i>P. attenuata</i> (amplia)	32	1.7	0.55	0.13	—	" "
<i>P. patula</i> (amplia)	8	—	0.33	—	—	Lockart, 1991
<i>P. sylvestris</i> (amplia)	19	3.9	0.39	0.16	—	" "
<i>P. torreyana</i> (restringida)	59	2.2	0.03	—	1.00	Ledig y Conkle, 1980
<i>P. kalfarjana</i> (restringida)	23	2.1	0.58	—	—	Hiebert y Hamrick sin publicar citado por Hamrick et al., 1981
<i>P. wahoensis</i> (restringida)	—	—	0.15	—	—	Niebling y Conkle 1990
<i>P. banksiana</i>	—	—	—	0.14	0.052	Brown y Moran, 1980
<i>P. resinosa</i> (restringida)	14	1.8	0.47	0.22	0.175	El presente estudio

Tabla 4.8. Niveles de flujo genético (Nm) y tamaño efectivo (N_e) encontrados en especies de coníferas (tomado de Ellstrand 1992 y Eguiarte 1993).

Especie	Área de vegetación (m ²)	Flujo genético (N_m)	Tamaño efectivo (N_e)	Referencia
<i>Pinus glauca</i>	1000	0.3	—	Schoen y Stewart 1986
<i>P. mariana</i>	—	3.6	—	Govindaraju 1988b
<i>P. glauca</i> II	1000	2.3	—	Stewart 1986
<i>Pinus latuya mexicana</i>	8	1.3	—	El-Kassaby y Rutland 1986
<i>Pinus elliotii</i>	—	—	365	Levin 1981
<i>P. cembroides</i>	1760	2.0	11	Crawford 1984
<i>P. radiata</i>	29550	2	1-3200	Hannister 1965
<i>P. taeda</i>	122	54	—	Friedman et al. 1985
<i>P. banksiana</i>	—	4.3	—	Brown y Moran, 1980
<i>P. jeffreyi</i>	—	1.4	—	Govindaraju 1988b
<i>P. rigida</i>	—	8.8	—	" "
<i>P. sylvestris</i>	—	7.5	—	" "
<i>P. resinosa</i>	—	1.5	9	Presente estudio

distribución su valor de F_{ST} es de 32.0% (Szmith 1982), en *P. rigida* que también es de distribución amplia y con poblaciones fragmentadas, es de 13.5% (Nicole y Tucic, 1983), y en *P. torreyana*, con solo dos poblaciones con F_{ST} de 1.0, ya que un alelo distinto está fijo en cada una de las poblaciones (Ledig y Conkle, 1983)

Bermejo (1993), menciona que las especies de pino que se han estudiado en México y Centro América, presentan mayor diferenciación genética entre sus poblaciones que las especies de Norte América. Tal es el caso de *P. engelmanni*, *P. oocarpa* y *P. caribaea* var *bahamensis* (13%, 10% y 13% respectivamente. Esto podría estar muy relacionado con la distribución de las especies en sierras y cadenas montañosas accidentadas (Perry 1991). La topografía, por tanto puede actuar como barrera natural que promueve la diferenciación genética entre poblaciones, originando además la gran cantidad de formas y variedades que se han encontrado para el género *Pinus* en México

Pinus rzadowsku es una especie con una distribución muy restringida (160 ha aprox). Sus poblaciones están en refugios aislados e inaccesibles, con topografía muy accidentada (85-90% de pendiente) y separadas por masas grandes de otras especies de pino como *P. pseudostrobus* y *P. leiophylla*. Al tener poblaciones pequeñas y aisladas de otros individuos de la especie se favorece la reproducción entre individuos de la misma población lo cual reduce el movimiento de genes entre las poblaciones y promueve la diferenciación local. Estas dos características (tamaño pequeño y aislamiento poblacional) pueden promover la pérdida de variantes genotípicas por endogamia y de alelos por el efecto de la deriva génica, (que actúa cuando el tamaño poblacional es pequeño). Por ejemplo, el alelo 5 de la enzima GOT-1 solo se encuentra en la población de CHIQ (6), o el alelo 4 de la enzima SDH-2 que se encontró solo en la población FRIE (4). Estos alelos, fijados en una población y ausente en otras, contribuyen a los valores de F_{ST} relativamente altos. Por tanto, la estructuración de las poblaciones observada en *P. rzadowsku* puede deberse en cierta medida a la endogamia y fundamentalmente a la deriva genética, las cuales pueden estar jugando un papel importante en la diferenciación local de las poblaciones.

Entre más alto sea el valor de la F_{ST} , se considera que ha habido mayor deriva génica y menor flujo génico, y por lo tanto mayor diferenciación entre las poblaciones (Wright, 1965; Slatkin, 1987; Slatkin y Barton, 1989). Si comparamos el valor promedio de flujo génico obtenido para *P. rzadowsku* (1.5) es menor que el reportado para otras especies

de coníferas (ver tabla 4.8). Esto indica que existe poco intercambio genético entre las poblaciones, aunque probablemente es el suficiente para impedir el aislamiento total entre ellas. En una revisión realizada por Hamrick (1987), los valores de N_m para coníferas oscilan entre 5.3 y 37.8. Sin embargo Guries y Ledig (1982), mencionan que una pequeña cantidad de fecundación cruzada (N_m mayor a 1.0) es suficiente para evitar la diferenciación entre poblaciones divididas o cuando el tamaño efectivo es grande (Hartl y Clark, 1989), ya que el flujo génico y el tamaño efectivo guardan una relación directa. Valores bajos de N_m (<1) determinan N_e , pequeños. Desafortunadamente existen pocos trabajos que hayan estimado N_e en plantas (Eguiarte 1990, Izquierdo y Piñero, en revisión). Además, los valores que se han reportado son muy relativos y estos están más relacionados con factores particulares de las especies (historia de vida, ecología, reproducción, etc.). En el caso de *P. rzedowskii*, la estimación fue de 9.0 individuos por población. Pero la estimación es indirecta por lo que es únicamente preliminar. Sin embargo, los datos de producción de conos y reclutamiento de plántulas podrían apoyar la idea de que son pocos los individuos que se reproducen y por tanto colocan a *P. rzedowskii* en una situación muy susceptible a la extinción.

Los resultados del aislamiento por distancia no fueron significativos ($p = 0.460$), aunque para algunos puntos (poblaciones) se observa cierta relación (figura 4.3). Al analizar las relaciones genéticas entre las poblaciones (D e D) podemos describir de una manera más clara el comportamiento que se presenta en el aislamiento por distancia. Cinco de las poblaciones estudiadas se ubican en la parte sur del área de distribución de *P. rzedowskii*. Son las que tienen mayor variación genética y forman un grupo bien definido. Dos más forman un segundo grupo y se ubican hacia el este de la región y son las que presentan menor variación genética. Excepcionalmente, las dos poblaciones que se encuentran al norte del área de distribución se incorporan en grupos distintos (la población CHIQU (6) en el primer grupo y SOL (3) en el segundo). Esto indica que la distancia que separa a las poblaciones no promueve su diferenciación y probablemente la afinidad genética se deba a factores históricos y a su aislamiento por barreras microgeográficas y ecológicas.

Además de las condiciones ecológicas características de los sitios donde se establece *P. rzedowskii* (suelos de tipo calizo) y su historia de vida (especie longeva de crecimiento tardío), el comportamiento reproductivo parece estar influyendo en la variación y estructura genética encontrada. Se ha visto que en muchas especies de pinos mexicanos, la asineromía

intra e interespecífica de la floración es un fenómeno muy común (Patiño et al., 1983; Yeaton et al., 1983). Hay liberación de polen en épocas en que los estróbilos femeninos no se encuentran receptivos (Mitton et al., 1977; Patiño et al., 1983; Yeaton et al., 1983). Parece ser que este fenómeno está muy relacionado con factores fisiológicos de los árboles y con las fluctuaciones climáticas de los sitios donde se establecen (Barnes 1987; Patiño et al., 1983). Estos factores hacen que las posibilidades de autofecundación y de endogamia aumenten con la consecuente fragmentación y aislamiento genético de las poblaciones.

Pinus rzedowskii parece presentar asincronía floral. En cuatro años consecutivos (1992-1995) solo se ha observado una escasa producción de conos, máximo 16 conos por árbol y en pocos individuos (de 314, solo 37 tuvieron conos). Como se menciona en la discusión de la parte demográfica, no se tienen evidencias de que en 6 años se haya presentado un año semillero. Más aún, la gente del lugar me informó que no habían observado un año semillero en esta especie en los últimos 20 años. Probablemente la asincronía floral ha influido en los mecanismos de la diferenciación genética durante la evolución de *P. rzedowskii*, influyendo directamente en los sistemas reproductivos, si *P. rzedowskii* presenta un sistema mixto de reproducción por un lado, y por otro lado asincronía floral, se puede especular que presente largos períodos donde la reproducción se lleve a cabo por alguna de las dos vías (por autofecundación o fecundación cruzada) y promueva en un tiempo determinado la disminución o el aumento de la variación genética entre las diferentes poblaciones.

El intercambio genético se está dando entre grupos de individuos de cada población (efecto Wahlund), esto es, cuando se presentan frecuencias alélicas diferentes entre subpoblaciones pero que se encuentren en equilibrio Hardy-Weinberg, cuando se mezclan los genotipos de estos grupos la cantidad de homocigos disminuye y se promueve la expresión de variantes alélicas. Así, cuando se llegan a presentar eventos de entrecruzamiento entre grupos de individuos (diferentes subparches de una población o entre poblaciones) aumentan los niveles de heterocigos y cuando solo se cruzan individuos que pertenecen al mismo grupo (al mismo subparche de la población) se incrementa la consanguinidad local. La estimación indirecta del tamaño efectivo y la deficiencia de heterocigos en la mayoría de los loci sugieren que, tanto la endogamia y probablemente el efecto Wahlund contribuyen al déficit de la heterocigosidad observada en las poblaciones.

esto, aunado al tamaño reducido y al aislamiento parcial de las poblaciones promueven la estructura genética presentada actualmente en las mismas.

Existen dos posibles escenarios acerca de la historia de las poblaciones que representan a la especie. La primera tiene que ver con que la distribución de las poblaciones es el resultado de la dispersión de individuos a partir de una población central. El grado de diferenciación estaría en función de los niveles de flujo genético, del número de fundadores y del momento del evento fundador. El segundo escenario consistiría que en el pasado la especie estuvo representada por una sola población panmictica, que por el efecto de algún evento geológico se fragmentó en varios parches (islas) que no fueron afectados. En este caso la diferenciación genética dependerá tanto de la cantidad de flujo genético, del tamaño de las poblaciones y del grado de aislamiento geográfico.

Es difícil discernir a cual escenario corresponde la historia de *P. rzedowski*. Pero los resultados obtenidos y las explicaciones que se infieren con estos, apoyan más el segundo escenario. Los bajos valores de flujo genético encontrados indican que es menos probable que se diera la dispersión de una población central, ya que si fuera así las posibilidades de dispersión actualmente serían las mismas y se encontraría algún patrón de aislamiento por distancia. Por lo menos cuatro aspectos pueden respaldar esta aseveración, (1) existe aislamiento micro-ambiental muy marcado, (2) las poblaciones están formadas por un número reducido de individuos, (3) los valores de los *F*-estadísticos son sumamente altos en comparación con muchas de las especies con dispersión anemofila y (4) existe bajo intercambio genético entre las poblaciones ($Nm \approx 1.5$).

En conclusión, *P. rzedowski* probablemente está representada por pequeños parches de una sola población continua que al ser fragmentada por algún evento geológico, formó subpoblaciones pequeñas. Algunas poblaciones han mantenido en común algunas variantes alélicas y otras variantes se han perdido probablemente por el efecto de la deriva génica. La fragmentación y consecuente aislamiento de las poblaciones, el tamaño pequeño de las mismas y principalmente la acción de la deriva genética pueden explicar gran parte de los procesos históricos y evolutivos que han generado los patrones de distribución genética encontrados actualmente en *P. rzedowski*.

CAPÍTULO V DISCUSIÓN GENERAL

5.1. Demografía y genética: Perspectivas de conservación de *Pinus rzedowskii*.

Tanto la demografía como la genética de poblaciones son aspectos necesarios para planear la conservación de especies, particularmente aquellas representadas por tamaños poblacionales pequeños o consideradas en peligro de extinción. La genética de poblaciones proporciona información a cerca de los procesos históricos y evolutivos que dan lugar a la estructura poblacional de las especies, y la demografía permite conocer como ha sido su dinámica poblacional. En general los genotipos de las poblaciones no se encuentran al azar sino que presentan una estructura temporal y espacial (Brown 1978, Hamrick y Holden, 1979). La estructura genética de la especie es el resultado conjunto de la acción de las fuerzas de mutación, selección, migración y deriva genética, así como del panorama demográfico y ambiental en el cual las poblaciones se desenvuelven.

En el caso de *P. rzedowskii* se pueden mencionar varios aspectos demográficos y genéticos relevantes del "por que" es una especie amenazada de extinción. Desde el punto de vista de su demografía, el tamaño de sus poblaciones parece ser un factor determinante. Rabinowitz y colaboradores (1989), argumentan que las especies raras o catalogadas en extinción están formadas por poblaciones pequeñas y aisladas geográficamente. *P. rzedowskii* tiene una distribución aislada, con tamaños poblacionales pequeños (entre 1 a 3500 individuos). El habitat de *P. rzedowskii* es limitado a suelos de tipo calizo y las poblaciones se encuentran distribuidas en forma de parches definidos. En este ambiente existen importantes restricciones de nutrientes y humedad, por lo que en los árboles se refleja un estrés fisiológico (crecimiento raquítico y conformación estructural muy heterogénea). La reproducción va a depender por tanto, de la cantidad de energía que puede ser obtenida de este medio físico y de su distribución en los árboles. Tal vez la escasez de estróbilos (masculinos y femeninos) sea una consecuencia de la poca energía que reciben, la cual principalmente es utilizada para su establecimiento y sobrevivencia más que para la producción de estructuras reproductivas.

Por otro lado, genéticamente el tamaño reducido de las poblaciones también tiene implicaciones importantes para promover la extinción de *P. rzedowskii*. Puede activar

los mecanismos de endogamia y la acción de la deriva genética sobre las poblaciones (Ellstrand y Elam, 1993). *P. rzedowski* presentó mucha heterogeneidad en las frecuencias genotípicas y éstas se desvían significativamente del equilibrio genético, debido en mayor proporción a la presencia de homocigos en las poblaciones. También el índice de fijación (F_{ST}) fue significativo para la mayoría de los loci. Esto refleja que la reproducción se está dando más por cruce entre parientes que por fecundación cruzada. Puede haber autofecundación o fecundación cruzada, pero esta última se puede estar efectuando entre individuos adyacentes, lo cual resulta en un déficit de heterocigos. Las diferencias encontradas entre la heterocigocidad observada y la esperada también pueden ser explicadas bajo este contexto (H_o 0.17 y H_e 0.22).

El efecto de la deriva genética se ve reflejada en los valores obtenidos de la F_{ST} (promedio de 0.175). Al haber estructura entre las poblaciones (valores de F_{ST} altos) la cantidad de flujo genético disminuye (promedio de 1.5) y por tanto se promueve la diferenciación entre poblaciones (D entre 0.78 y 0.96). Una consecuencia muy importante en este patrón es que el tamaño efectivo de las poblaciones se ve reducido (90 individuos/población), aumentando potencialmente las posibilidades de extinción de la especie. El tamaño efectivo de las poblaciones es un parámetro muy importante para la genética de la conservación (Ellstrand y Elam 1992, Eguiarte 1990). N_e siempre tiende a ser menor que el tamaño real de la población (N). El tamaño efectivo es un estimador del número de individuos que contribuyen a la adecuación de la especie (individuos que se reproducen). Estas diferencias que hacen que el número de individuos que componen una población (N), sea diferente al tamaño efectivo (N_e) se deben a varios aspectos, como fluctuaciones temporales en el número de individuos que componen una población, sistemas reproductivos no aleatorios, fertilidad diferencial, diferente proporción de sexos, diferencias en la estructura de edades, en el tamaño de las poblaciones y en la cantidad de movimiento genético entre las poblaciones (Kimura y Crow 1963, Crawford 1984b, Heywood 1986). Estos factores se ven más reflejados en la demografía que en la genética de la especie, por lo que las posibilidades de extinción de *P. rzedowski* dependerán en primera instancia de los factores demográficos.

Los patrones demográficos y genéticos analizados nos pueden sugerir algunas ideas generales acerca de las estrategias de conservación de *P. rzedowski*, así como de otras

especies con características similares. La pregunta central es ¿cuales son las poblaciones más importantes para conservar?, la respuesta tribal en este caso, serían todas las poblaciones ya que los valores de las F_{ST} son altos y las condiciones demográficas son extremas. Sin embargo, debemos de tomar en cuenta aparte de lo económico, ecológico y genético algunos aspectos filogenéticos particulares que de una manera integral permitan definir criterios más específica de conservación. En este sentido la prioridad de conservación sería 1) proteger cuando menos las poblaciones que estan representadas por el mayor número de individuos, ya que estas pueden llegar a desaparecer por algún proceso estocastico independientemente de la cantidad de variación genética que contengan, 2) proteger tambien aquellas poblaciones que son mas variables geneticamente para garantizar que se mantenga la variación genetica representativa de la especie, y 3) las poblaciones más diferentes evolutivamente, es decir aquellas poblaciones que contienen alelos más raros, únicos y que podrian ser filogenéticamente más importantes. Existen algunos modelos de conservación que pueden ser útiles para analizar estos criterios (May, 1990, Vane-Wright et al., 1991, Williams et al., 1991, Crozier 1992, Faith 1992) en los cual a partir de una filogenia se obtiene un indice de diversidad filogenética tomando en cuenta las relaciones de parentesco entre los taxa.

La diversidad filogenetica parte del hecho de que las especies no son unidades equivalentes y toma en cuenta las diferencias taxonomicas en estas. Los sistematicos han ofrecido dos posibilidades para medir estas diferencias: las medidas de similaridad, dadas por distancias fenéticas o geneticas, y las medidas del numero de miembros de un grupo, dadas por las relaciones cladisticas que son interpretadas en terminos de ancestro-descendiente (May 1990, Vane-Wright et al., 199, tomado de Santos del Prado 1996)) Aunque estas medidas de diversidad filogenetica solo se han usado en taxa supraespecificos (especies, géneros, familias, ordenes, etc) puede ser aplicada en un nivel infraespecifico (poblacional) y ayudar mucho a la eleccion de las poblaciones que deben de ser protegidas.

Santos del Prado (1996) menciona que un sitio con una gran diversidad filogenética no tiene que coincidir forzosamente con un sitio de gran riqueza de especies. La magnitud de la diversidad filogenetica estara dada por aquellas especies cuyas historias evolutivas son muy distintas y que se separaron más tempranamente del resto. A nivel poblacional tambien se podria encontrar diversidad filogenética, debido a que podrian existir

diferencias importantes en la historia evolutiva de las poblaciones. En este contexto para *P. rzedowskii* se podría esperar (dados los valores de F_{ST}) diferencias claras en la historia evolutiva de las poblaciones y con ellos conocer cuales son las poblaciones más importantes para conservar.

En principio, el dendrograma obtenidos para *P. rzedowskii* con el método de UPGMA resume la información necesaria para tratar de analizar de esta manera los tres criterios de conservación mencionados anteriormente, (poblaciones de mayor tamaño, más diversas genéticamente y de mayor importancia filogenética) Utilizando, por ejemplo el índice de diversidad táctica de Vane-Wright et al (1991) obtuve los valores para conocer la diversidad filogenética de las poblaciones. El índice de diversidad táctica se basa en la cuantificación del número de linajes que surgen de cada nodo o puntos de ramificación para cada taxa. Utilizando este índice obtuve los siguientes parámetros:

- Agrupaciones taxonómicas (AT): es el numero de taxa que se obtiene en el cladograma (dendrograma para este estudio) o conjunto de taxa
- Pesos taxonómicos básicos (PTB): se refiere a la división del total de la agrupación taxonómica entre el valor de cada Taxa Para facilitar los cálculos se estandarizan los valores dividiendo entre el valor más bajo (E), lo que da al taxón de menor categoría el valor de uno Al aplicar este método se dan los valores más altos a aquellos taxa que divergieron relativamente cerca de la raíz del cladograma, o sea las que filogenéticamente son mas diferentes

En el dendrograma obtenido con el metodo de UPGMA, se observan dos grupos definidos en los cuales se distribuyen las 9 poblaciones de *P. rzedowskii*. Con este conjunto de poblaciones se obtuvieron dos agrupaciones taxonómicas para A (ABCDEF, ABCDEFGHI) cuatro para B, C y D (AB, ABC, ABCDEF, ABCDEFGHI) (ABC, ABCDE, ABCDEF, ABCDEFGHI) y (ABCD, ABCDE, ABCDEF, ABCDEFGHI), para E y F cinco (ABCDE, ABCDEF, ABCDEFG, ABCDEFGH, ABCDEFGHI), tres para G (ABCDEFG, ABCDEFGH, ABCDEFGHI) y dos para I (ABCDEFGH, ABCDEFGHI) Con un total de 32 agrupaciones taxonómicas (ver Tabla 5.1). Para que no se presenten diferencias muy grandes entre los valores que se obtienen para taxa basales y terminales, se divide el total de la agrupación taxonómica entre el valor de cada taxa, por ejemplo para el primer valor seria $32/2$ y nos da un cociente de 16. Los cocientes que se obtienen son los pesos taxonomicos

básicos (PTB). Para facilitar los cálculos los valores se estandarizan, dividiéndolos entre el valor más bajo (E). Así, encontramos que las poblaciones más diferentes son las que quedan más basales en la filogenia. Las más parecidas evolutivamente a otras son las que se encuentran después de muchas vicifurcaciones. Entonces, las poblaciones 1 y 2 se encuentran a solo dos nodos de la raíz, son las más diferentes evolutivamente al resto y por tanto las más valiosas para conservar (Figura 5.1)

Tabla 5.1. Análisis de diversidad filogenética de las poblaciones de *P. rzedowskii* con base al índice táctico propuesto por Vase-Wright et al (1991).

Población (No)	AT	PTB	E	%
1	2	16	2.5	17.79
2	2	16	2.5	17.79
3	3	10.6	1.65	11.74
4	4	8	1.25	8.9
5	4	8	1.25	8.9
6	4	8	1.25	8.9
7	3	10.6	1.65	11.74
8	5	6.4	1	7.11
9	5	6.4	1	7.11
Promedio	32		14.05	100

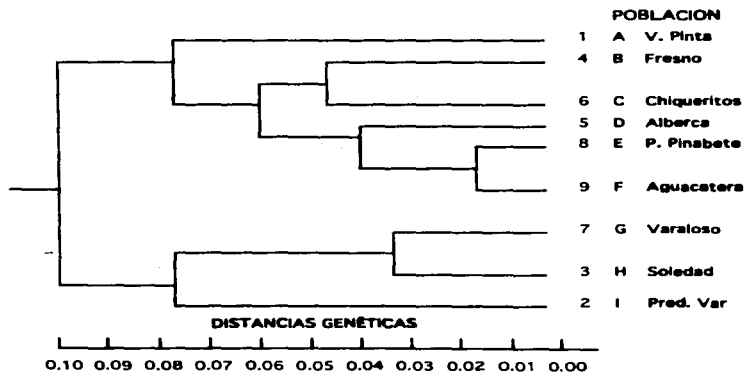


Figura 5.1. Dendrograma de diversidad filogenética de las poblaciones de *P. rzedowskii*.

Parte del método de diversidad filogenética también se aplicó al tamaño de las poblaciones y a la cantidad de variación genética de cada población, pero en lugar de usar el número de ramificaciones se tomó en cuenta el tamaño y cantidad de variación genética (Tabla 5.2). De los datos de la tabla 3.1 del capítulo tres, tome los datos y para darle un valor mayor al más pequeño use su inverso y estandarice entre el más pequeño, así la población más chica da de 1. Para la diversidad genética, use la heterocigosis esperada de la tabla 4.2 (capítulo cuatro). Luego estandarice entre la más alta, así se obtuvo nuevamente valores entre 1 (la más diversa) y 0.

Tabla 5.2. Aplicación del método Vane-Wright et al (1991), a datos demográficas, genéticas y filogenéticas implicados en la conservación de las poblaciones de *P. rzedowskii*.

Pobl. (No)	Tamaño (No)	Inverso	Inv. Sids	<i>H_e</i>	<i>H_e</i> sids	AT	Inverso	AT sids	Importancia
1	200	0.0050	0.0450	0.2300	0.7565	2.00	0.500	1.000	1.76158
2	200	0.0050	0.0450	0.1830	0.6019	2.00	0.500	1.000	1.60697
3	9	0.1111	1.0001	0.2110	0.6941	3.00	0.333	0.666	1.47186
4	3500	0.0003	0.0026	0.2720	0.8947	4.00	0.250	0.500	1.39502
5	2000	0.0005	0.0045	0.2200	0.7237	4.00	0.250	0.500	1.22418
6	65	0.0154	0.1385	0.3040	1.0000	4.00	0.250	0.500	1.51538
7	55	0.0182	0.1637	0.1440	0.4737	3.00	0.333	0.666	1.15853
8	150	0.0067	0.0600	0.2080	0.6842	5.00	0.200	0.400	1.09088
9	500	0.0020	0.0180	0.2030	0.6678	5.00	0.200	0.400	1.06976

La suma de los tres valores (tamaño, cantidad de variación genética e importancia filogenética) nos dirá cuales son las poblaciones con prioridades para conservarse. El análisis indica que serían las poblaciones 1 (V. PIN), 2 (P. VAR), 6 (CHIQ) y 3 (SOL), que tienen rarezas en individuos, son más diferentes en la filogenia, y tienen bastante variación genética. Las menos importantes serían la 8 (P. PIN) y 9 (AGUA), que son moderadamente grandes, con niveles intermedios de variación genética pero poco importantes filogenéticamente.

Sin embargo, si tomamos en cuenta la escala de distribución de la especie, esta es sumamente pequeña, por lo que en primera instancia deberían de conservarse todas las poblaciones. Además, varias de las poblaciones que aparecen como de menor importancia filogenética, podrían ser núcleos para el origen de nuevas especies (encontrarse en procesos de especiación); al estar las poblaciones en ramas terminales (parecidas evolutivamente) y con variación genética semejante las posibilidades de cambio para originar nuevas especies son mayores. *P. rzedowskii* es una especie para la que aún se tiene insertidumbre de su

origen y evolución, presenta varias características morfológicas, químicas, anatómicas y ahora moleculares, que son intermedias entre los dos subgéneros. Esto me hace pensar que probablemente pudo ser originada por hibridización o bien, que actualmente esten ocurriendo eventos de diversificación fuerte entre algunas de las poblaciones, lo cual nos indica claramente que la conservación de esta especie por lo menos a corto plazo debe de implicar a todas las poblaciones.

Por otro lado, se tiene información empírica de que esta especie tiene madera de muy alta calidad, resistente y con una durabilidad mayor a otras especies de pino que se explotan en México (Zapian, com pers 1995). Por tanto, a largo plazo podría ser una especie que, económicamente sería rentable para su explotación. La persistencia actual de las pocas poblaciones que representan a la especie, se debe en gran medida a que estas se encuentran aisladas en sitios inaccesibles para que puedan ser explotadas; el costo es mayor que el beneficio que se pueden obtener de los árboles.

Con el panorama descrito se pueden proponer dos planes de manejo para la aplicación de estas estrategias. 1) que tiene que ver con la conservación "*in situ*", definiendo zonas núcleo, excluidas de todo tipo de perturbación (por lo menos en las poblaciones que tiene prioridad para su conservación), y 2) la preservación "*ex situ*", la cual también se debe de implementar para esta especie, sugiriendo que se realicen colectas tanto de semillas como de tejido vegetativo. En *P. rzedowskii* existe un problema muy fuerte con la producción de conos, pues es mínima comparada con la capacidad de producción que tiene otras especies de pinos y en particular mexicanas (400 a 700 conos por árbol). Es esencial rescatar la mayor cantidad de semillas de esta especie. También sería conveniente tratar de cultivar en viveros y posteriormente establecer sitios de experimentación, hacer pruebas de introducción en otras áreas y ver posteriormente si se logran reincorporar a su hábitat natural.

Actualmente se tienen avances en cuanto a la conservación de *P. rzedowskii*, tanto por parte de los lugareños como de las instituciones gubernamentales encargadas de explotar y mantener los recursos forestales en México. *P. rzedowskii* fue catalogada como especie en peligro de extinción el 2 de febrero de 1993 (Norma oficial Mexicana NOM-PA-CRN-001/93) publicada en el Diario Oficial de la Federación. Muchos de los esfuerzos para que los lugares donde se establece esta especie fueran exentos de perturbación antropogénica fue realizada por los mismos dueños de las poblaciones. Además

de esto, existe un compromiso formal con la Secretaria de Desarrollo Social para aplicar algunas estrategias de conservación. Entre ellos se incluyen colecta de semillas, producción de plántulas en vivero y reforestación de los sitios. Es importante, sin embargo, seguir produciendo investigación cualitativa y cuantitativa acerca de aspectos como, fenología, plagas, perturbación, asociación biológica, etc., que permitan plantear estrategias de manejo y conservación a largo plazo. Los resultados obtenidos en este trabajo son una contribución para la aplicación de estos programas.

A pesar de que se obtuvo información básica de *P. rzedowskii*, es importante hacer algunas sugerencias que se desprenden de los resultados.

(1) Hacer estimaciones de las tasas de polinización cruzada (t) y análisis de paternidad que permitan aclarar si la deficiencia de heterocigos encontrada en las poblaciones se debe a la consanguinidad local, y ver si los progenitores se distribuyen en áreas contiguas (vecindad).

(2) Hacer estimaciones del tamaño efectivo de las poblaciones con análisis directos: movimiento de polen y/o semillas. Con esto se podría estimar la vecindad o el número de individuos reproductores por área.

(3) Analizar la importancia de la depresión endogámica en las poblaciones.

(4) Completar la información demográfica en *P. rzedowskii*, para estimar tasas de crecimiento, de sobrevivencia y de mortalidad.

(5) Hacer observaciones de la fenología por lo menos durante 10 a 15 años. Esto para ver si en efecto hay pérdida de semillas por la producción escasa de estructuras reproductiva o por algún otro factor extrínseco de la especie (incendios, depredación, patógenos etc).

(6) Hacer análisis del ecosistema, tales como análisis de suelo, nutrientes, de humedad, temperatura, o de la distribución específica de estos factores en micrositios. Tal vez mucha de la heterogeneidad obtenida en los resultados tenga que ver con este tipo de componentes.

(7) Establecer a corto plazo programas de rescate (conservación "ex situ") utilizando de entrada la información obtenida en este trabajo y diseñar algunos modelos de conservación "in situ", que permitan a largo plazo mantener e incrementar el tamaño y el número de poblaciones.

5. 1.2. Conclusiones

(1) *P. rzedowskii* está representada por 6000-6500 individuos maduros aprox., tiene una distribución restringida y aislada geográficamente de otras especies de pino

(2) Se encontraron 12 poblaciones con distribución discontinua aisladas por barreras microgeográficas.

(3) La distribución espacial de *P. rzedowskii* está claramente asociada a suelo calizo, por lo que la especie se distribuye en parches definidos

(4) Se presenta variación en la estructura de edades entre las diferentes poblaciones. Sin embargo, la estructura de edades para la especie presenta una distribución de jota invertida no uniforme (representada por todas las categorías de edad)

(5) La etapa reproductiva de *P. rzedowskii* es superior a los 200 años: existen árboles reproductivos entre 30 a 250 años

(6) Se observo escasa producción de conos durante tres años consecutivos

(7) Los niveles de variación genética estimados para *P. rzedowskii* se encuentran dentro del promedio reportado en la literatura para especies de coníferas. Sin embargo, son superiores a los reportados para especies de coníferas con distribución restringida.

(8) *P. rzedowskii* genéticamente no esta depauperada, pero sus poblaciones no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y esto se debe principalmente a la presencia de homocigos en las poblaciones. El efecto Walhund podría estar actuando en este sentido

(9) Existe marcada estructura genética entre las poblaciones. Los valores de F_{ST} son significativos y superiores a los encontrados en otras especies de pinos.

(10) La manera en que se distribuye la variación genética entre las poblaciones se debe más al aislamiento por barreras geográficas que por aislamiento por distancia

(11) El tamaño pequeño y el aislamiento geográfico de las poblaciones limita el intercambio genético entre ellas, sugiriendo que la deriva genética ha sido la fuerza más importante en la evolución de *P. rzedowskii*

Con este estudio se corroboró que los factores demográficos son de una importancia más inmediata que los factores genéticos en las posibilidades de extinción de *P. rzedowskii*. Lo que implica la necesidad de implementar estrategias de conservación de esta riqueza biológica (*P. rzedowskii*).

LITERATURA CITADA

- Adams, W.T. 1981. Population genetics and gene conservation in Pacific Northwest Conifers. In: Evolution Today. Proc. Second International Congress Systematic and Botanical Documentation. 401-415 pp.
- Antonovics, J. and A. D. Bradshaw. 1970. Evolution in closely adjacent plant populations. VIII. Clinal patterns at a mine boundary *Heredity* 25: 349-62
- Alvarez-Buylla, R. E. 1993. Seed and forest dynamics: a theoretical framework and an example from the neotropics *Amer. Naturalist* 137: 133-154
- Alvarez-Buylla, R. E., and A. A. Garay. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia* a tropical pioneer tree species *Evolution* 48: 437-453
- Alvarez-Buylla, R.E., A. Chaos., D. Piñero. and A. A. Garay. 1996. Demographic genetic of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. *Evolution* 50: 1155-1166
- Bannister, M. H. 1965. Variation in the breeding system of *Pinus radiata*. In H. G. Baker and G. L. Stebbins, (eds). The genetics of colonizing species. Academic Press, New York, 353-372 pp.
- Barrett S, C. H. and Kohn R. J. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implication for Conservation. En: D. A. Falk and E. K. Holcinger. (ed) Genetics and Conservation of Rare plants. Oxford University Press. New York. 3-29 pp.
- Baskin, J. M., and Baskin C. C. 1986. Some considerations in evaluating and monitoring populations of rare plants in successional environments. *Nat. Areas J.* 6: 26-30
- Barnes, R. D., A. C. Mathenson, L. J. Millin., and J. Birks. 1987. Dominance in a metric trait of *Pinus patula* Schel et Cham. and Deppe *Forest Sci.* 33: 809-815
- Begon M., L. J. Harper, and Townsend, C. R. 1986. Ecology: Individuals, Populations and Communities. Blackwell Scientific Publications. Boston. 130-172 pp.
- Bermejo, V. B. 1993. Genetic diversity and the mating system in *Pinus engelmannii* Carr. Ph. D. dissertation. Wisconsin University, Wisconsin, USA. 99 pp.
- Bramlett, D. L., E. W. Belcher., G. L. DeBarr., G. D. Hertel., R. P. Karrfalt., C. W. Lantz., T. Miller., K. D. Ware. and H. O. Yates. 1977. Cone analysis of Southern pine:

- a guidebook, USDA. *For. Serv. Gen. Tech. Rep.* SE 13: 1-28.
- Brown, A. H. D. 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52: 145-157.
- Brown, A. H. D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* 15: 1-42.
- Brown, A. H. D. and C. Moran. 1980. Isozymes of North American Forest Trees and forest Insects. USDA. *For. Serv. Gen. Tech. Rep.* PSW-48.
- Brown, A. H. D. and B. S. Weir. 1983. Measuring genetic variability in plant populations. In S. D. Tanksley and T. J. Orton, (eds) *Isozymes in Plant Genetics and Breeding Part A*. Elsevier, Amsterdam. 219-239 pp
- Brown, A. H., O. H. Frankel, D. R. Marshall and J. T. Williams. 1989. The use of plant genetic resources. Cambridge Univ. Press. New York. USA. 382 pp
- Brown, A. H. D. and D. J. Briggs. 1991. Sampling strategies for Genetic Variation. *Ex Situ Collections of endangered Plant Species*. In Genetics and conservation of Rare Plants. Falk D. A. and K. E. Holsinger (ed) Oxford. New York. 99-119 pp
- Boyle, T. J. and E. K. Morgenstern. 1987. Some aspects of the population structure of black spruce in central New Brunswick. *Silvae Genet.* 36: 53-60.
- Buth, D. 1984. The application of electrophoretic data in systematics studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 501-522.
- Baskin, J.M. and Baskin C. C. 1991. An eight-year greenhouse germination study of the cedar glade endemic, *Onosmodum molle* subsp. *molle*. *Nat. Areas J.* 11: 1990-1992.
- Caswell, H. 1982. Life history and the equilibrium status of populations. *Amer. Naturalist.* 120: 317-339.
- Cavalli-Sforza, L. L. and W. F. Bodmer. 1971. The genetics of human Populations, W. H. Freeman, San Francisco.
- Clegg, M. T. and A. H. D. Brown. 1983. The founding of plant populations. In: genetics and Conservation, de C. M. Schonewald - Cox, S. M. Chambers, B. MacBryde., and L. Thomas Benjamin-Cummings, Melo Park, Calif. 216-228 pp.
- Coates, D. J. 1988. Genetic diversity and populations genetic structure in the rare chattering grasswattle *Acacia anomala* Court. *Austral. J. Bot.* 36: 273-286

- Crawford, T. J. 1984a. What is a population?. En: Evolutionary ecology. B Shorrocks (ed). 135-74 pp. Blackwell Scientific, Oxford. 418 pp.
- Crawford, T. J. 1984b. The estimation of neighborhood parameters for plant populations. *Heredity*, 52: 273-283.
- Crozier, R. H. 1992. Genetic diversity and the agony of choice. *Biol. Conservation*. 61: 11-15.
- Crow, J. F. and K. Aoki. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 6073-17
- Cheliak, W. M. and Pitel, J. A. 1984. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. *Canad. J. Forest Res* 14: 740-743
- Conkle, M. T., P. D. Hodgskiss, L. B. Nunnally and S. C. Hunniter. 1982. Starch Gel Electrophoresis of Conifer Seeds: a laboratory manual. USDA. *For. Serv. Gen. Tech. Rep* PSW-64. 18 pp
- Dancig, B. P. and F. C. Yeh. 1983. Allozyme variability and evolution of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) and jack pine (*P. banksiana*) in Alberta. *Canad. J. Genet. Cytol.* 25: 57-64.
- Delgado, V.P. 1994. Evaluación de la capacidad productiva y eficiencia de semillas para tres especies del género *Pinus* (*P. montezumae* Lamb, *P. pseudostrobus* Lind y *P. leiophylla* Sch at Cham) en la zona boscosa de nuevo san Juan parangaricutiro, Michoacán, México. *Bol. Soc. Bot. México*. 54: 267-274
- Donahue J. K. and C. L. Mar. 1995. Observations on *Pinus maximartinezii* Rzed. *Madroño*, 42: 19-25.
- Darrow, W. K. y H. Coetsee. 1983. Potentially valuable Mexican pines for summer rainfall region of Southafrica. *S. African Forest. J.* 124: 23-35
- Durán, C. F. 1993. Variabilidad intraespecífica y dinámica poblacional de *Pseudopichonx sargentii*, Tesis Doctoral. Centro de Ecología UNAM. México D. F.
- Ellstrand N. C. and C. A. Hoffman. 1990. Hybridization as an avenue of escape for engineered genes. *BioScience*. 40: 438-442.
- Ellstrand, C. N. and D. R. Elman. 1993. Population genetic consequences of small size: Implications for plant conservation. *Annua. Rev. Ecol. Syst.* 24: 217 - 242.

- Eguiluz, P. T. 1978. Ensayo de integración sobre conocimientos del género *Pinus*. Tesis prof. E.N.A.CH. Chapingo, México. 104 pp.
- Eguiarte, F. L. 1988. Una guía para principiantes en la genética de poblaciones, en Olea Franco A. (ed) AGT S. A. 41-56 pp.
- Eguiarte, F. L. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocarium mexicanum* Liebm. en los Tuxtlas, Veracruz Tesis Doctoral. Centro de Ecología. UNAM. México D. F. 190 pp.
- Faith, D. P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol. Conservation* 61: 1-10
- Falconer D. S. 1989. Introduction to Quantitative Genetics. New York: Wiley. 438 pp.
- Falk D. A. and K. E. Holsinger. 1991. Genetics and Conservation of Rare Plants. Centers for Plant Conservation. Oxford University Press. New York. 283 pp.
- Flores, E. 1986. Establecimiento de un sitio experimental sobre aclareos de *P. patula* Schel et Cham. en Tlaxcala Tesis Profesional. División de Ciencias Forestales. E.N.A.CH. Chapingo, México
- Frankel, O.H. and Soule ME. 1981. Conservation and evolution. Cambridge Univ. Press. New York. 327 pp.
- Franklin, I. R. 1980. Evolutionary change in small population. In M. E. Soule and B. A. Wilcox, (eds). Conservation biology, and evolutionary-ecological perspective. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 135-150 pp.
- Furnier, G. R. and W. T. Adams. 1986. Geographic patterns of allozyme variation in jeffrey pine. *Amer. J. Bot.* 73: 1009-1015
- Fowler, D. R. and R. W. Morris. 1977. Genetic diversity in red pine. Evidence for genetic heterogeneity. *Canad. J. Forest Res.* 7: 343-347.
- Friedman, S. T., and J. L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación de Koeppen para adaptarlo a las condiciones particulares de la República Mexicana. Larios. México, D. F., México.
- Goff, F. G. and D. West. 1975. Canopy-understory interaction effects on forest population structure. *Forest Sci.* 21: 98-108.

- Govindaraju, D. R. 1984. Mode of colonization and patterns of life history and some North America Conifers. *Oikos* 43: 271-276.
- Govindaraju, D. R. 1986. Estimates of gene flow in forest trees. *Biol. J. Linn. Soc.*
- Govindaraju, D. R. 1988. Mating systems and the opportunity for group selection in plants. *Evol. Trends Pl.* 2: 99-106
- Govindaraju, D. R. 1989. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *J. Evol. Biol.* 2: 173 - 181.
- Gottlieb, L. D. 1972. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64: 161-180
- Guries, R. P. and F. T. Ledig. 1982. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Evolution* 36: 387-402.
- Guries, R. P. 1984. Genetic variation and population differentiation in forest trees. En: Proc. Eight North Amer. For Biol. Worksh., Logan 119-131pp.
- Hakim-Elahi, A. 1981. Temporal changes in the population structure of the slender wild oat (*Avena barbata*) as measured by allozyme polymorphisms. Ph. D. Thesis. University of California, Davis
- Holsinger, K. E. 1988. Inbreeding depression doesn't matter: the genetic basis of mating system evolution. *Evolution*. 42. 1235-1244.
- Hamrick, J. L. and L. R. Holden. 1979. Influence of microhabitat heterogeneity on gene frequency distribution and gametic phase disequilibrium in *Avena barbata*. *Evolution* 33: 521-533.
- Hamrick, J. L., J. B. Mitton, and Y. B. Linhart. 1981. Levels of genetic variation in trees: Influence of life history characteristics. En: Forest Insects. N. T. Conkle, (ed). Pacific for SW. Range Expt. Sta. Tech. report # 48. Berkeley.
- Hamrick, J. L. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation within and among Natural Plant Populations. En: K. Urbaska (ed) Differentiation patterns in higher plants. Academic Press, New York. 53-67 pp.
- Hamrick, J. L. and G. M. J. W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. En: plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. I. Kahler, and B. S. Weir (ed) Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 43-63 pp.

- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., Murawski D. A. and M. D. Loveless. 1991. Correlation Between species Traits and allozyme Diversity: Implications for Conservation Biology. En: Falk, D. and Holsinger E. K. Editor Genetics and Conservation of rare Plants. Oxford University Press. New York, 75-98 pp.
- Harcombe, P. A. and P. L. Marks. 1978. Tree diameter distributions and replacement processes in southeast Texas forests. *Forest Sci.* 24: 153-166.
- Harper J. L. 1981. The meanings of rarity. En: Syngé, H (ed). The Biological Aspects of Rare Plant Conservation. 189-203 pp. John Wiley. New York.
- Hartl, D. L. 1987. A primer of populations genetics. Second ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 303 pp.
- Hartl, D. L., and A.G. Clark. 1989. Principles of population genetics. Second edition. Sinauer Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick, P. W. 1983. Genetics of populations. Science Books International. Boston.
- Heinselman, M. L. 1973. Fire in the virgin forest of the Boundary Waters Canoe Area. Minnesota. *Quat. Res.* New York. 3: 329-382.
- Heinselman, M. L. 1981. Fire intensity and frequency as factors in the distribution and esturce of northern Lotan. En: W. A. Reiners (ed) Fire regimes and ecosystem properties. USDA. *For. Serv. Gen. Tech. Rep.* WO-26.
- Heywood, J. S. 1986. The effect of plant size variation on genetic drift in population of annuals. *Amer. Naturalist*. 127: 851-861.
- Hiebert, R. D. and J. L. Hamrick. 1983. Patterns and levels of genetic variation in Great Basic bristle cone pine (*Pinus longaeva*). *Evolution*. 37: 302-310.
- Hill, W. G. 1972. Effective size of population with overlapping generations. *Theor. Populat. Biol.* 3: 278-289.
- Hill, W. G. 1979. A note on effective population size with overlapping generations. *Genetics* 92: 317-322.
- Holsinger, E. K. and L. D. Gottlieb. 1991. Conservation of Rare and Endangered plants: Principles and Prospects. En: Falk, D. A. and E. K. Holsinger (ed). Genetics and Conservation of Rare Plants. Oxford University Press. New York. 240 pp.
- Hubbell, S. P. and R. B. Foster. 1987. La estructura espacial en gran escala de un bosque neotropical. En: Clark, D., R. Dirzo y N. Fetcher, (eds) Ecología y ecofisiología

- de plantas en los bosques mesoamericanos. *Revista de Biología Tropical* 35: 7-22.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1987. Síntesis geográfica, nonmeclator y anexo cartográfico del estado de Michoacán, México. D. F.
- Izquierdo, Y. L. 1995. Estructura y variación genética en cuatro especies de *Aechmea* (Bromeliaceae) en México: *A. mexicana* (Baker), *A. luuddemanniana* (K. Koch) Brongn. ex Mez in Engl., Pflansentr., *A. macvaughii*, L. B. Smith y *A. tuetensis* (P. Magaña y E. Lott). Tesis doctoral. Centro de Ecología. UNAM. México.
- Jones, S.M., D.H. Van Lear. and S.K. Cox. 1981. Competition and density-diameter pattern of an old growth forest stand of the Boiling Springs Natural Area, South Carolina. *Bull. Torrey Bot. Club* 108: 347-353
- Kephart, S. R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77:693-712.
- Kimura, M. and J. F. Crow. 1963. The measurement of effective population numbers. *Evolution*. 17: 279-288.
- Klinger, T., P. E. Arriola. and N. C. Ellstrand 1992. Crow-weed hybridization in radish (*Raphanus sativus* L.): effects of distance and population size. *Amer. J. Bot* 79: 1431-1435
- Krebs, J. C. 1978. *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. Second Edition. ARLA. New York. 678 pp.
- Kruckeberg, A. R. and D. Rabinowitz. 1985. Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 16: 447-479.
- Krutouskii, K. V., Politov, D. V. and A. L. Tukhov. 1990. Genetic differentiation by isozyme loci between Eurasian cedar pines. *Genetika* 28: 694 (Abstract)
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*. 241: 1455-1459.
- Ledig, F. T. 1986. Heterozygosity, heterosis and fitness in outbreedig plants. En: M. E. Soulé (ed). *Conservation Biology. The science of scarcity and diversity*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 77-104 pp.
- Ledig, F. T. and M. T. Conkle. 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow

- endemic Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry et Carr.) *Evolution*. 37: 70-85.
- Levin, D. A. 1981. Gene flow versus dispersal in plants *Annual Missouri Bot. Gard.* 68: 232 -235.
- Lewontin R. C. y J. L. Hubby. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura* *Genetics* 54: 595-609.
- Lewontin R. C. 1974. La base genética de la evolución Ediciones Omega S. A. Barcelona.
- Linhart, Y. B., K. B. Sturgeon and M. L. Davis 1981. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. *Heredity*. 46. 407-426
- Li, C. C. and W. T. Adams 1989. Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Canad. J. For. Res.* 19: 149-161.
- Li, C. C. and D. G. Horvitz. 1953. Some methods of estimating the Inbreeding coefficient. *Am. J. Hum. Genet.* 5: 107-117
- Loveless, M. D. and J. L. Hamrick 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 15: 65 - 95.
- MacArthur, R. H. 1972. Geographical Ecology patterns in the distribution of species Harper and Row. New York. 259 pp
- Madrigal S. X. y D. M. Caballero 1969. Una nueva especie mexicana de *Pinus*. Bol. Téc. Inst. Nac. Invest. For. México. 26 pp.
- Marshall, D. F. and R. W. Allard. 1970a. Isozyme polymorphism in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata* *Heredity* 25. 373-382
- Maruyama, T. and M. Kimura 1980. Genetic variability and effective population size when local extinction frequent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6710-6714.
- May, R. M. 1990. Taxonomy as destiny. *Nature* 347: 129-130
- Merkley, S. A. and W. T. Adams. 1987. Patterns of allozyme variation within and among Douglas-fir breeding zones in Southwest Oregon. *Canad. J. For. Res.* 17: 402-407.
- Mejhartowicz, L. y Bergmann F. 1985. Genetic differentiation among Scots pine populations from the lowlands and the mountains in Poland. pp 253-266 En: Gregorius, H. R. (ed.) Population Genetics in forestry Lecture notes in

Biomathematics, 60. Springer-Verlag, Berlin.

- Miles, Mc A., P. J. Toye., C. O. Sarah, and D. G. Godfrey. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups. *Trypanosoma cruzi*. Circulating on decedently in a rural areas of Brazil. Implications of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Vol. 71, No 3.
- Millar, C. I. 1983. A deep cline in *Pinus muricata*. *Evolution*. 37: 311-319.
- Millar, C. I., S. H. Strauss, M. T. Conkle, and R. D. Westfall 1988. Allozyme differentiation and biosystematics of the Californian closed-cone pines (*Pinus* subsect. *Oocarpae*). *Syst. Bot.* 13: 351-370.
- Millar, I. C. and William, J. L. 1991. Strategies for conservating clinal ecotypic, and Disjunct population Diversity in widespread Species. In Falk, D. A., and Holsinger, E. K. (eds) Genetics and Conservation of Rare Plants. New York.
- Mitton, J. B., J. L. Linhart., J. L. Hamrick, and J. S. Beckman. 1977. Observations on the genetic structure and mating system of Ponderosa Pine in the Colorado front Range. *Theor. Appl. Genet.* 51: 5-13.
- Mitton, J. B. 1983. Conifers en: Isozymes in Plant Genetics and Breeding. En: D. Tanksley and T. J. Orton (eds) Elsevier, Amsterdam. 443-472 pp
- Moloney, K. A. 1988. Fine-scale spatial and temporal variation in the demography of a perennial bunchgrass. *Ecology*: 69: 1588-1598.
- Moran, G. F., J. C. Bell. 1987. The origin and genetic diversity of *Pinus radiata*, in Australia. *Theor. Appl. Genet.* 73: 616-622.
- Moran, G. F. and Hopper S. D. 1987. Conservation of the genetic resources of rare and widespread eucalypts in remnant vegetation. In Nature Conservation: The Role of Remnants of Native Vegetation. En: D. A. Sunders, G. W. Arnold, A. A. Burggringe, A. J. M. Hopkins (ed). pp 151-162 Chipping Norton. Surrey Beatty and Sons.
- Muller, G. 1977a. Cross fertilization in a conifer stand inferred from gene-marks in seeds. *Silvae Genet.* 26: 223-226.
- Muller, G. 1977b. Investigation of the degree of natural self-fertilization in stands of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Darst.) and scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genet.* 26: 207-217.

- Muller, G., P. H. Baradat, and F. Bergmann. 1992. Genetic variation within European tree species. En: Adams W. T., S. H. Strauss., L. C. Donald, and D. L. Copes. (eds). *Population Genetics of Forest Trees*. 23-47 pp.
- Nei, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. American Elsevier, New York.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annual Human Genet.* 41:225-233.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics* 90: 589-590.
- Nei, M. and F. Tajima. 1981. Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics* 98: 625-640.
- Nevo, E. 1978. Genetic variation in natural populations, patterns and theory. *Theor. Populat. Biol.* 13: 121-177
- Niebling, A. U., and Conkle, M. T. 1990. Diversity of washoe pine and comparisons with allozymes of ponderosa pine races. *Canad. J. For. Res.* 2: 298-308
- Nicolie, D. and N. Tucic. 1983. Isoenzyme variation within and among population of european Black pine (*Pinus nigra* Arnold). *Silvae Genet.* 32: 80-89
- O' Malley D. M., F. W. Allendorf y G. M. Blake. 1979. Inheritance of isozyme variation and heterozygosity in *Pinus ponderosa*. *Biochem. Genet.* 17: 233-250
- O'Malley, D. M., N. C. Wheeler. and R. P. Guries. 1980. A manual for starch gel electrophoresis. University of Wisconsin Department of Forestry. Staff Paper No. 11.
- Patiño, V. F., P. Garza, A. Y. Villagómez, A. L. Talavera y M. F. Camacho. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. I N I F. SF-SARH. 7-81 pp.
- Parker A. J. 1986. Persistence of lodgepole pine forests in the pinelands of southeastern Louisiana. *Amer. Midl. Nat.* 18: 661-682.
- Platt, W. J., W. G. Evans. and S. L. Rathbun. 1988. The population dynamics of a long-lived conifer (*Pinus palustris*). *Amer. Naturalist.* 131: 491-525.
- Perry, J. L. 1991. The pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon.
- Rabinowitz D., J. K. Rapp, S. Caims and M. Mayer. 1989. The persistence of rare prairie

- grasses in Missouri environmental variation buffered by reproductive output of sparse species *Amer. Naturalist*. 134: 525-44
- Santos del Prado, K. G. 1996. Diversidad y conservación de mamíferos en México: Un enfoque taxonómico y filogenético. Tesis (de licenciatura). Facultad de Ciencias. UNAM. México D. F. 1-55 pp.
- Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whitam. 1986. Method of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial populations genetics and systematics *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 873-884.
- Shaw, G. R. 1914. The genus *Pinus*. Publications of the Arnold Arboretum No. 5. Riverside Press. Cambridge, Mass. 96 pp.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236: 787 - 792.
- Slatkin, M. and N. H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium population. *Evolution*. 47: 264-279.
- Sneath, P. A., and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman. San Francisco. 573 pp.
- Soltis, D.C., C. Haufler, D. Darrow, and G. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of gridding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. *Amer. Fern J.* 73: 9-26.
- Strauss, S. H. and F. T. Ledig. 1985. Seedling architecture and life history evolution in pines. *Amer. Naturalist*. 125: 702-715
- Szmidt, A. 1982. Genetic variation in isolated populations of stone pine (*Pinus cembra*) *Silvae Fennica*. 16: 196-200
- Swofford, D. J. and R. B. Selander. 1989. Biosys-1: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetic and biochemical systems. Release 1.7. Illinois. Natural History Survey, Champaign, Illinois
- Tebo, M. 1985. The southeastern pinewoods. describers, destroyers, survivors. Master's thesis. Florida State University. Tallahassee.
- Tigerstedt, P. M. A. 1973. Studies of isozyme variation in marginal and central populations

of *Picea* and *Abies*. *Heredity*. 75: 47-60.

- Unidad de Administración Forestal No 10. Sur-occidental, 1991. Memoria general del estudio Manejo Integral Forestal. Michoacán. SARH. México. 114 pp.
- Van Dijk, H. 1985. The stimulation of gene flow parameters from a continuous populations structure, 311-325 pp. En P. Jaquard et al (eds). Genetic differentiation and dispersal in plants. Springer-Verlag, Berlin.
- Vane-Wright, R. I., C. J. Humphries y P. H. Williams. 1991. What to protect?-Systematics and the agony of choice. *Biol. Conservation* 55: 235-254
- Ward, R. O. 1977. Relationship between enzyme heterozygosity and quaternary structure. *Biochem. Genet* 15: 123-135.
- Wahlenberg, W. G. 1946. Longleaf pine: its use, ecology, regeneration, protection, growth and management. Charles Lathrop Pack Forestry Foundation, Washington, D. C.
- Weber, J. C. and R. F. Stettler. 1981. Isozyme variation among ten populations of *Populus trichocarpa* Torr. et Gray in the Pacific Northwest. *Silvae Genet* 30: 82-87
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358-1370.
- Weeler, N. C. y R. P. Guries. 1982. Population structure, genic diversity and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Canad. J. For. Res* 12: 595-606
- West, D. C., H. H. Shugart, Jr. and J. W. Ramney. 1981. Population structure of forests over a large area. *Forest Sci* 27: 701-710
- Werth, C. A., A. A. Karlin. And S. I. Guttman. 1982. Enzyme extraction from phenolic-containing plant using caffeine. *Isozyme Bull.* 15: 139
- Williams, P. H., C. J. Humphries. and R. I. Vane-Wright. 1991. Measuring biodiversity: Taxonomic relatedness for conservation priorities. *AUST. Syst. Bot.* 4: 665-679.
- Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics*. 6: 111-178
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28: 114-138
- Wright, S. 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*. 31: 39-59.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395 - 420
- Workman, P. L. and J. D. Niswander. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes

- II. Local genetic differentiation in the Papago. *Amer. J. Hum. Genet.* 22: 24-29.
- Wyatt, R. 1989. A general protocol of starch gel electrophoresis. (Manuscrito).
- Yeaton, R. I., R. W. Yeaton., and Waggoner III. 1983. Changes in morphological characteristics of *Pinus engelmannii*, over an elevational gradient in Durango, México. *Madroño*. 30: 168-175.
- Yeh, F. C. y C. Layton. 1979. The organization of genetic variability in central and marginal populations of lodgepole pine *Pinus contorta* spp. latifolia. *Canad. J. Genet. Cytol.* 21: 487-503
- Yeh, F. H. and D. O' Malley. 1980. Enzyme variation in Natural Populations of Douglas - fir. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco), form british Columbia. I Genetic variation patters in cosatal populations. *Silvae genetica.* 29 83-92
- Yeh, F. C. and A. El-Kassaby. 1980. Enzyme variation in natural populations of sitka spruce (*Picea sitchensis*) I. Genetic variation patterns among trees from 10 I. U. F. R. G provenances. *Canad. J. Forest Rev.* 10: 415-422
- Yeh, F. C. 1988. Isozyme variation of *Thuja plicata* (Cupressaceae). En: British Columbia. *Biochem. Syst. Eco.* 16: 373-377.

APÉNDICE

- | | |
|--------------------|-----------------------------|
| Apéndice 1. | Sistemas de corrida |
| Apéndice 2. | Buffer de extracción |
| Apéndice 3. | Recetas de tinción |

Apéndice 1. Sistemas de Corrimiento y Expresión Enzimática.

Buffer del gel	Buffer del electrodo	Enzimas
Milton PP 0.015M Tris 0.05M Acido Cítrico pH= 7.6 con NaOH Ac. Cítrico.	(Milton et al, 1977) 0.031M NaOH 0.2195M Ac. Bórico pH= 7.5 Ac. bórico.	APX- Peroxidasa anódica (Hakim, Elahi, 1976) CPX-Peroxidasa (Hakim, Elahi, 1976). GOT-Glutamato oxaloacetato transaminasa (Wyant, 1989) MNR- Menadion reductasa (Cheliak y Pitel, 1984)
Conkle RR 0.03M Trizma base 0.005 Ac. cítrico 10 ml del buffer del elec- trodo en 990 ml del Buffer del gel. pH= 8.5 1% del buffer del electrodo pH= 8.5 a una concentración de 10X del buffer del gel.	(Conkle, 1982) 0.06M LiOH 0.3M Ac. bórico llevar a 1 lt. pH= 8.1	NADHDH-Nicotidamina adenina dinucleotido deshidrogenas LAP-Leucina aminopeptidasa (Werth, 1985). F-EST- Esterasa fluorescente (Cheliak y Pipet, 1984) EST- Esterasa (Cheliak y Pitel, 1984) RUB -Rubisco (Cheliak y Pitel, 1984)
SIS#2 1 parte del B. electrodo 9 partes de agua destilada Para el B. del electrodo se pesa 0.15 Tris (T-1378) 18.77 g 0.0075M Ac.citrico monoh 1.58 g Agua destilada 100 ml (aforar) pH = 9.0	(Miles 1977)	GDH-Glutamato deshidrogenasa (Cheliak y Pitel, 1984) IDH-Isocitrato deshidrogenasa (Modificado de Vallejo 1993) SDH-Shikimato deshidrogenasa (Modificado de Werth 1985)

Apéndice 2. Buffer de extracción.

YO (para 100ml)

10ml solución de tris-ácido cítrico (1.57g de trisma base,

0.83g de ácido cítrico, llevar a 100ml de agua y pH 7.0)

0.05g NADP

0.05g NAD

0.018g Acido ascórbico

0.034g EDTA

0.10g Bovine serum albimin

0.33ml 2-mercaptoethanol

llevar a 100ml con agua destilada

VEGII

0.31g Acido bórico

2 ml Tergitol 15-S

10.27g Sacarosa

2g PEG 8000

0.005g Fosfato de piridoxal

7g PVP 40

1g PVP 360

0.88g Acido ascórbico

0.02g NAD

0.1g Bovine serum albumin

0.66ml 2-mercaptohetanol

llevar a 100 ml con agua destilada ajustar el pH a 7.1 con NaOH.

Apéndice 3. Recetas de tinción.

MNR (MENADION REDUCTASA; E.C.1.6.99.2) (Conkle et al., 1982)

Pesar:

- b-NADH (forma reducida)..... 25 mg
 - Menadione..... 25 mg
- Añadir:
- 0.05M Tris-HCl pH 7.0 50 ml
 - NBT 1 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura amb.

APX (PEROXIDASA ANODICA; E.C.1.1 1.1.7) Hakim Elahi, 1976)

Pesar:

- 3- Amino-9-ethylcarbazole 100 mg

Añadir:

- Dimetilformamida 7 ml
- H₂O destilada 90 ml
- Peróxido de Hidrógeno al 3% 1 ml
- Cloruro de Calcio al 1% 2 ml
- 1 M de Acetato de Sodio pH 5.0 5 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura amb.

CPX (PEROXIDASA CATODICA; E.C. 1.11.1.7) (Hakim-Elahi., 1976)

Pesar:

- 3- Amino-9-ethylcarbazole 100 mg

Añadir:

- Dimetilformamida 7 ml
- H₂O destilada 90 ml
- Peróxido de Hidrógeno al 3% 1 ml
- Cloruro de Calcio al 1% 2 ml
- 1 M de Acetato de Sodio pH 5.0 5 ml

GOT (= AAT; GLUTAMATO OXALOA- CETATO TRANSAMINASA; E.C.2.6.1.1) (Wyat, 1989)

Pesar:

- Pyridoxal 5-phospahte 4 mg
- Fast Blue BB salt 150 mg

Añadir:

- 0.2 M Tris-HCl pH 7.0 50 ml
- Substrato GOT pH 7.0 5 ml

Incubar en la obscuridad a 37°C.

SDH (SHIKIMATO DESHIDROGENASA; E.C.1.1.1.25) (Modificado de Werth, 1985)

Pesar:

- Ac. shikimico 40 mg
- Agar 0.36 g

Añadir:

- 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 25 ml
- MgCl (10%) 1 ml
- TPN (=NADP) 1% 1 ml
- MTT 1% 1 ml
- PMS 1% 1 ml
- PMS 1% 1 ml
- 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 25 ml

Calentar hasta que hierva y se disuelva bien el agar, entonces mezclar. Incubar en la obscuridad a 37°C.

GDH (GLUTAMATO DESHIDROGENASA; E.C.1.4.1.2) (Conkle et al., 1982)

Pesar:

- L-Glutamic acid monosodium salt 2g

Incubar en la obscuridad a temperatura amb

**EST (ESTERASA) (Modificada de Selan
et al., 1986)**

Pesar:

- Fast Blue RR salt 50 mg
- α -Naphthyl acetate 25 mg

Añadir:

- Acetona 2 ml
- Disolver muy bien y añadir:
- Buffer de fosfatos 1M pH 6.0 5 ml
- H₂O destilada 45 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura amb

**LAF (LEUCINA AMINOPEPTIDASA;
E.C.3.4.11.1) (WERTH, 1985)**

Pesar:

- Fast Black K salt 100 mg
- Disolverlo muy bien en 5 ml de H₂O destilada
justo antes de teñir.

Añadir:

- Buffer 0.2 Tris-maleato pH 5.2 50 ml
 - L-lucina-b-naftilamida-HCl 2.5% 1 ml
- Incubar en la obscuridad a 37 °C durante 30 min.
Posteriormente añadir el Fast Black K salt disuelto
Dejar incubando en la obscuridad a 37 °C

- DPN (=NAD) 10mg

- Añadir:

- 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 40 mg
- H₂O destilada 40 ml
- MTT 1% ó NBT 1% 1.5 ml
- PMS 1% 0.5 ml

Incubar en la obscuridad a 37°C.

**IDH (ISOCITRATO DESHIDROGENASA;
E.C.1.1.1.42) (Modificado de Soltis et al.,
1983)**

Pesar por separado:

- 1) - Ac. isocitrico, sal trisódica 150 mg
- 2) - Agar 0.36 g

Añadir por separado:

- 1) - 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 25 ml
 - 1 M MgCl₂ o al 10% 1 ml
 - TPN (= NADP) 1% 1 ml
 - MTT 1% 0.5 ml
 - PMS 1% 0.2 ml
 - 2) - 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 25 ml
- Calentar hasta que hierva bien el agar, entonces
mezclar 1) y 2) Incubar en la obscuridad a 37 °C