



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

FILOGENIA DE PINOS MEXICANOS, CON BASE EN
LOS ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS
(ITS) DEL *nrDNA* Y SU APLICACION A HIPOTESIS
BIOGEOGRAFICAS Y ADAPTATIVAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A
MA. GUADALUPE MENDEZ CARDENAS

DIRECTORA: ELENA ALVAREZ-BUYLLA ROCES.

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

36 1872



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Filogenia de pinos mexicanos con base en los espaciadores internos transcritos (ITS) del nrDNA y su aplicación a hipótesis biogeográficas y adaptativas.

realizado por Ma. Guadalupe Méndez Cárdenas

con número de cuenta 8934475-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Elena Alvarez-Buylla Rocas

Propietario

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Propietario

Biol. Alvaro Chaos Cador

Suplente

M. en C. Adrian Quijada Mascareñas

Suplente

Biol. Leon Patricio Martínez Castilla

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Con agradecimiento a mi madre y a mis hermanos por su apoyo y cariño.

A mis amigas Tarin, Claudia y Alejandra por lo que hemos compartido.

A todos mis amigos.

Con amor a César.

Agradezco a quienes revisaron esta tesis, por su valioso tiempo y sus comentarios:

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Dra. Elena Alvarez-Buylla Rocas.

M en C. Alvaro Chaos Cador.

M. en C Adrián Quijada Mascarenas.

Biol. León Martínez.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el financiamiento al proyecto

Agradezco profundamente a la Dra. Elena Alvarez-Buylla por todo su apoyo y paciencia en la realización de ésta tesis, y también por su ejemplo como investigadora.

Agradezco especialmente al Dr. Daniel Piñero por todos sus comentarios alentadores, por el tiempo que dedicó para que culminara este trabajo, por sus consejos, y sobre todo por la confianza depositada en mí y por iniciarme en la investigación.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a Rosalinda Tapia por introducirme al trabajo de laboratorio que fué fundamental en el desarrollo de este trabajo, y tambien pos su amistad brindada en los últimos años.

Agradezco a la Dra. Patricia Escalante y al Dr. Juan Carlos Morales por su gran ayuda para montar la *técnica de mapeo de sitios de restricción* y por sus comentarios.

Agradezco la ayuda brindada por Alvaro Chaos y Rocío Esteban en los análisis estadísticos

Agradezco a Todos mis compañeros del laboratorio de Genética Molecular y Evolución que de una u otra forma me ayudaron en la realización de esta tesis.

Rosalinda Tapia, Angeles Cortez, Alejandra Vazquez, Adrián Quijada, Sol Ortiz, Paty Delgado, Alvaro Chaos, León Martínez, Rodolfo Salas, Alicia Gamboa, Caroline Burgeff, Liz izquierdo, Francisco Vergara, Luis Mendoza, Miguel Angel Soto y América Castañeda.

También agradezco a todos mis amigos: Arturo Juárez, Lina Riego, Fernando, Carlos, Sergio López, Gilberto Avilés, Laura Tanaka, Gerardo Ríos y Julio.

Resumen

Capítulo I INTRODUCCION:

1.1 Antecedentes generales e importancia del estudio	1-3
1.2 Historia geológica en México; distribución, migración y registro fósil de los pinos	4-11
1.3 Sistemática del género <i>Pinus</i> y eventos de hibridización	12-17
1.4 Espaciador interno transcrito (ITS)	18-20
1.5 Análisis y reconstrucción filogenética	21-23
1.6 Tasas de sustitución	23-24
1.7 Filobiogeografía	24-26
1.8 Método comparativo	26-27
1.9 Objetivos	28-28

Capítulo II MATERIALES Y METODOS

2.1 Colecta de las especies de <i>Pinus</i> L. y extracción de DNA	29-30
2.2 Amplificación por PCR	30-31
2.3 Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP's)	31-32
2.4 Reconstrucciones filogenéticas utilizando los programas computacionales Mac Clade, PAUP, MEGA, COMPONENT y COMPARE 1.0	
2.4.1 Métodos de parsimonia y distancia Neighbor Joining	33- 34
2.4.2 Tasas de sustitución y calibración del árbol	34-36
2.4.3 Método filobiogeográfico	36-37
2.4.4 Método Comparativo	37-38

Capítulo III RESULTADOS y DISCUSION

3.1 Implicaciones sistemáticas	39-47
3.2 Evolución molecular	47-50
3.3 Hipótesis biogeográficas	50-55
3.4 Evolución morfológica	56-62
3.5 Implicaciones evolutivas de los probables híbridos	63-65

Conclusiones y Perspectivas	66-68
Literatura citada	69-76
Apendice I Lista de especies de pinos	77-77
Apendice II Antecedentes de las técnicas moleculares	78-81
Apendice III Base de datos en Mac Clade	82-83
Apendice IV Matriz de distancia	84-85

RESUMEN

En la clasificación del género *Pinus*, la ubicación de algunas especies se mantiene aún sin resolver debido a que presentan características morfológicas intermedias entre una subsección y otra e incluso entre los diferentes subgéneros. Por lo tanto, el uso exclusivo de los caracteres morfológicos no ayuda a la determinación de especies. El avance reciente en la sistemática molecular, nos proporciona marcadores que constituyen nuevos caracteres para la clasificación del género.

En el presente estudio, se analizó el espaciador transcrito interno (ITS) del DNA ribosomal nuclear (nrDNA) como marcador de los cambios evolutivos en 44 especies de pinos mexicanos y tres especies de Asia y Europa. Para tal objetivo, la región del ITS fué amplificada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se analizó la variación interespecífica a través del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's). Esta información se utilizó para la reconstrucción de cladogramas usando el método de parsimonia y el método de distancia Neighbor joining. Los dos métodos agruparon de la misma forma a los taxa, con valores de confiabilidad altos obtenidos mediante el método de "bootstrap", se encontró congruencia en la delimitación de las subsecciones Cembroides, Strobi, Oocarpae, Ponderosae y Sylvestris y una diferente ubicación respecto a clasificaciones antes propuestas para especies que han sido problemáticas taxonómicamente, como *P. nelsonii*, *P. rzedowskii*, *P. reflexa* y *P. lumholtzii*, entre otras.

Los análisis comparativos de caracteres morfológicos bajo las hipótesis de presión selectiva de herbivoría, estrés hídrico y dispersión, usando nuestra filogenia molecular, muestran una correlación significativa. Esta es mayor para el caso de los caracteres relacionados con la dispersión (tamaño y tipo de ala y tamaño de la semilla), menor para aquellos relacionados con la herbivoría (espina, yema y yema de invierno), y por último con el estrés hídrico (tamaño, número y forma de crecimiento de las acículas). Esto puede sugerirnos, que la presión selectiva ejercida por los dispersores es mayor que la relacionada con la herbivoría la cual a su vez es mayor que la presión debida al estrés hídrico.

Los eventos de divergencia o evolución por especiación, mostraron cierta relación con los fenómenos orogénicos. La especiación en los pinos estudiados, parece haber coincidido con el surgimiento de valles y montañas en el territorio mexicano, como es la aparición temprana de las Sierras de Baja California, el surgimiento de la Sierra Madre Oriental anterior a la Sierra Madre Occidental y la controversial provincia de Oaxaca, la cual aparece como la más ancestral. Sin embargo, datos preliminares sugieren que algunos linajes de pinos pueden ser el resultado de evolución reticulada.

El ITS detectó heterogeneidad en unidades transcritas como probable producto de hibridación o evolución reticulada. Esto se expresa como patrones de aditividad en el bandeo obtenido por RFLP's. La mayor frecuencia de estos patrones aditivos se presentó en la subsección Cembroides. Sin embargo, no toda la heterogeneidad intraespecífica es resultado de eventos de hibridación.

INTRODUCCION

El género *Pinus*, cuenta con aproximadamente 110 especies, siendo así, el género más grande de coníferas y con mayor distribución mundial. Los mayores centros de diversidad en especies son: la parte Norte y Central de América, con una particular concentración de especies en México, California, y el sureste de los EUA y el este de Asia con particulares concentraciones en China. En nuestro país los pinos ocupan un lugar muy importante dentro de la flora, encontrándose ampliamente distribuidos en la mayoría de los estados a excepción de Tabasco, Campeche y Yucatán (Shaw 1909, Standley 1925, Martínez 1948, Loock 1950, INIF/FAO 1967, Eguiluz 1978). Debido a su enorme potencial de adaptación los pinos se encuentran desde niveles cercanos al nivel del mar como *P. caribea* hasta el límite de la vegetación arbórea alrededor de los 4000 m de elevación como *P. hartwegii* (Little 1962).

En México, existe una gran diversidad de pinos; los cuales representan en total el 50% de todas las especies del mundo, 34 de ellas son endémicas a México (Perry; 1991) con un total de 57 especies (Martínez; 1992). El territorio mexicano se encuentra cubierto en un 15% por bosques de coníferas, en donde el 90% corresponde a *Pinus* L. Muchas de estas especies tienen importancia industrial. Se distinguen dos tipos de productos derivados de los pinos: los primarios que serían la madera, la resina (trementina) y las semillas, y los secundarios como son el carbón el aguarrás, la brea, el ácido piroleñoso, el alquitrán y el alcohol metílico (Martínez, 1992).

Estudios recientes basados en resultados de análisis de sitios de restricción y comparación de secuencias del genoma del cloroplasto (Strauss and Doerksen, 1990; Wang and Szmidt, 1993; Price and Strauss, 1997) además de estudios comparativos, morfológicos y bioquímicos, han reconocido dos grandes linajes de pinos: el subgénero *Strobos* (Haploxyton o pinos blandos, con un solo haz fibrovascular en las acículas) y el subgénero *Pinus* (Diploxyton o pinos duros con dos haces fibrovasculares en las acículas). Dentro de *Strobos* se reconocen dos secciones (Little and Critchfield 1969), Parrya (con umbo dorsal o abaxial en la escama del cono) y *Strobos* (con umbo terminal en las escamas del cono). Del subgénero *Pinus*, la Sección *Pinus*, con base en comparaciones del genoma de cloroplasto (Krupkin et al 1996) está dividido en dos grandes grupos y uno tercero más pequeño. Los dos primeros corresponden a Norte y Centroamérica y el tercero a Eurasia.

Debido a la gran importancia económica y ecológica de los pinos, la sistemática del género *Pinus* a recibido mucha atención. Hasta ahora la mayor parte de los estudios son de tipo morfológico, citológico, capacidad de entrecruzamiento, química de productos secundarios, electroforesis de proteínas, y únicamente en los últimos años se han hecho más análisis de sitios de restricción y comparaciones de secuencias de nrDNA que podrían ayudarnos a reconocer la delimitación de especies y taxa infraespecíficos que aún se mantienen sin resolver.

El uso de caracteres morfológicos para inferencias filogenéticas de especies de pinos, puede ser problemática en algunos casos pues estos presentan variación intraespecífica. Por ejemplo se sabe que existen diferencias en el tamaño de los conos, el número y tamaño de acículas, el tamaño de la semilla y

el ala en individuos de una misma especie dependiendo de las condiciones altitudinales e incluso latitudinales. Por lo tanto se tiene que definir hasta que punto deben considerarse a algunos caracteres morfológicos como transitorios o adaptativos sujetos a normas de reacción (homoplasias) y hasta cual pueden conceptuarse como fijos y de valor específico para el análisis filogenético (homologías). Por el contrario algunos ensayos moleculares proveen de evidencia estructural estudiando esencialmente algunos genes. Estos pueden distinguir entre homologías y homoplasias, ya que si las clasificaciones se basan en las relaciones filogenéticas, es decir evolutivas deben de reflejar solo verdaderas homologías mapeadas sobre ancestrías genealógicas (Brooks 1991).

En las últimas décadas, el desarrollo de la genética de poblaciones, la sistemática molecular y los métodos de análisis computacionales, nos ha permitido utilizar marcadores moleculares como una fuente de caracteres, para inferir relaciones filogenéticas de las especies y proponer clasificaciones que intenten ser mas naturales, es decir que sean lo suficientemente estables predecibles y robustas cuando necesitemos determinar la ubicación taxonómica de un nuevo organismo, y reflejen fielmente las relaciones filogenéticas.

Para entender estas relaciones filogenéticas es necesario comprender que la filogenia, o historia evolutiva, debe ser representada en su totalidad, por lo cual necesitamos conocer el orden de las ramas del árbol filogenético o patrones de divergencia (cladogénesis), así como la distancia y la transferencia genética o cambio acumulado (anagénesis, Avise 1994). Las relaciones filogenéticas, pueden establecerse a diferentes niveles jerárquicos, y para ello se utilizan diferentes marcadores moleculares, es decir marcadores moleculares, que nos permiten abarcar tanto aspectos microevolutivos como macroevolutivos. De éste modo, la filogenia se convierte en el eje central de la herencia, en donde solo la información genética que se transmite es informativa para tal estimación, cualquier estudio comparativo de variación biológica, depende de esta integración filogenética para su interpretación (Hillis y Bull, 1991).

En el presente trabajo nos enfocamos al análisis filogenético de 44 especies mexicanas del género *Pinus* L. usando, el ITS (espaciador transcrito interno) del nrDNA como marcador. Este tiene una buena resolución a nivel interespecífico. Se usó la técnica PCR- RFLP's con lo cual se obtuvo una matriz de caracteres para generar una filogenia que nos permitió contrastar hipótesis de evolución adaptativa contra hipótesis de evolución morfológica en algunos caracteres, analizar las implicaciones sistemáticas para el género en México, y bajo un análisis filobiogeográfico poner a prueba algunas hipótesis biogeográficas del género en México. De esta manera se exploró la resolución (capacidad de diferenciar entre dos especies) del ITS como marcador de los cambios evolutivos en el género *Pinus* en México a través de las tasas de substitución y las distancias genéticas entre dichas especies, así como de los probables eventos de hibridación detectados por patrones aditivos.

En general, los métodos de clasificación que se basan en marcadores moleculares o en caracteres morfológicos, debido a una falta de estandarización y unificación de los mismos:

- a) Caen en la centralización de la autoridad sistemática dentro de un pequeño número de investigaciones y descubrimientos para cada taxa.
- b) Existe una falta de formalización en cuanto a los procedimientos por los cuales se corrobora o refuta una clasificación propuesta, así como una falta de uniformidad en la cantidad de conocimiento existente entre los diferentes taxa para que estos puedan ser comparados.
- c) Falta de una orientación filosófica clara, sobre cuales aspectos de la evolución fueron reflejados en una clasificación en particular (Avice 1994).

El uso de marcadores moleculares nos brinda una fuente de información acerca de las relaciones filogenéticas que pueden existir entre organismos, a diferentes niveles taxonómicos sin embargo muchos de ellos no se encuentran exentos de homoplasias. Este es el caso de aquellos que surgen por evolución convergente, o caracteres con un pequeño número de estados de carácter *interconvertibles* que a veces presentan una tasa rápida de intercambio entre ellos (Avice, 1994). Por lo cual debemos tomar en cuenta que muchos de los caracteres no moleculares pueden complementar o ser un punto de partida para los estudios de sistemática molecular (Hillis, 1987). Muchas preguntas acerca de la delimitación de especies y *taxas infraespecíficos* (variedades) del género *Pinus* en México se mantienen sin resolver; por lo cual el presente ordenamiento de taxa es una aproximación de las probables relaciones filogenéticas existentes en algunas especies mexicanas del género *Pinus*, para las cuales su clasificación ha sido un tanto problemática.

El ITS, es miembro de una familia multigénica, sujeto a evolución concertada, que homogeneiza las secuencias de las diferentes unidades repetidas. Estas unidades repetidas del DNA ribosomal, puede estar en uno o diversos sitios del cromosoma. Su número varía entre 100 y 1000 según el grupo taxonómico. El que existan múltiples copias por genoma de rDNA abre la posibilidad de encontrar polimorfismos intraindividuales. Esta variación intraindividual, que pareciera ser un problema, podría contribuir a estudios sobre la estructura geográfica de la población, y a detectar patrones de introgresión, e hibridación Quijada et al (1997). Incluso Hamby y Zimmer (1992), consideran que la característica más importante dentro de estas familias es la homogeneización de las secuencias; de este modo todas las copias de un individuo serán rápidamente homogeneizadas y cada espécimen puede así ser caracterizado por un genotipo especificable e inequívoco. Los polimorfismos intraespecíficos, podrían dificultar la inferencia filogenética, especialmente cuando las tasas de especiación exceden las de homogeneización (durante la radiación adaptativa, o cuando ocurre hibridación) (Cohen et al., 1982; Susuki et al., 1986; Hillis y Davis, 1988; Hillis y Dixon, 1991). Sin embargo, el principal problema para interpretar a los marcadores genéticos que provienen de familias multigénicas involucra el conocimiento que se tiene sobre los mecanismos (conversión génica y entrecruzamiento desigual) por los que la evolución concertada homogeneiza las secuencias de DNA (Arnheim, 1983; Ohta, 1980 y Dover, 1983). En este estudio, ponemos principal atención en posibles casos de heterogeneidad intraespecífica.

1.2 Historia Geológica en México: distribución, migración y registro fósil de Pinus

El territorio Mexicano tiene una extensión de aproximadamente 2,000,000 Km² con una geología bien establecida en algunas regiones, mientras que en otras la información es sumamente polémica o simplemente no existe. Por tal motivo la vegetación puede ser usada como indicadora de los climas del pasado geológico así como de los fenómenos orogénicos y de aislamiento geográfico que se dieron, para ello es fundamental conocer el origen de la flora mexicana y su evolución, lo cual depende en primer lugar de la tectónica de placas que determinó el movimiento longitudinal y sobre todo latitudinal de los continentes así como el volcanismo y la orogenia (Cserna, 1960) y en segundo lugar a las características intrínsecas del grupo.

Siendo los movimientos tectónicos determinantes para la migración de las plantas así como para los eventos de vicarianza ó separación de una población por barreras geográficas, ecológicas etc. éstos, pueden determinar los eventos de especiación. A continuación se estipulan las conexiones que existieron entre Norteamérica y el resto de los continentes a partir del cretácico superior:

Norteamérica con Asia (cretácico tardío al terciario temprano) 97 m.a. a 58 m.a.;

Norteamérica con Europa (paleoceno) 65 m.a. a 58 m.a.;

Norteamérica con Sudamérica (eoceno y plioceno) 57 m.a. a 4 m.a.

A partir del cretácico los paleobotánicos consideran cuatro grandes regiones fitogeográficas (Brenner, 1976; Batten, 1984) que son gondwana y laurasia, divididas en norte y sur. En este esquema, México pertenece al sur de laurasia, la cual limita con la parte norte de la región gondwánica. Durante este período el territorio mexicano se encuentra invadido por mares epicontinentales y sólo existen áreas emergidas en el noreste y sur de México (Viniestra, 1992).

La invasión del mar en el cretácico terminal dividió en dos grandes provincias la parte norte de nuestro territorio: 1) la cuenca del noroeste que comprende las cuencas cretácicas de Sonora y Baja California y 2) la provincia hacia el noreste de México que comprende varias formaciones del cretácico tardío en los estados de Coahuila Nuevo León y Tamaulipas (Martínez E. y Ramírez E. 1996).

Durante el período mesozoico prevaleció una herencia florística gondwánica en el territorio nacional y para el terciario fué predominante la herencia laurásica; y fué hasta el paleoceno que las dos provincias norte y sur de laurasia pierden su individualidad al desaparecer el mar epicontinental que las separaba, a partir del terciario temprano, se forma una gran flora tropical conformada tanto por elementos holárticos como neotropicales desde el Ecuador hasta los 30° de latitud Norte (Axerold, 1979).

A partir del paleoceno, se empiezan a diferenciar dos grandes provincias florísticas, la de la Sierra Madre Occidental y la provincia de la planicie costera al noreste de México. Durante el eoceno el subcontinente norteamericano se separa de Europa, pero continúa la conexión del oeste de Norteamérica

con Asia (Briggs, 1987), que junto con el nacimiento de las montañas rocallosas dió como consecuencia que la flora del oeste norteamericano tenga muchas afinidades con la flora del sureste asiático.

Las formaciones que comprenden del eoceno al oligoceno en el estado de Chiapas, están caracterizados por una gran diversidad de componentes pantropicales y sobre todo neotropicales, que indican la cercanía de México con Sudamérica (Tomasini y Martínez, 1984), con predominancia de conjuntos palinológicos costeros; en los que ocasionalmente se encuentran taxa holárticos de pináceas que probablemente fueron transportadas de regiones elevadas del continente en donde la temperatura sería mas templada (Palacios, 1985). Estudios bioestratigráficos y palinológicos en la región de Tepexi de Rodríguez muestran una dominancia de *Pinus* hacia el eoceno superior (Martínez et al, 1996).

En el oligoceno, se produce un gran cambio climático con una drástica disminución en la temperatura (Miller et al 1987). Esto acentúa más los gradientes climáticos incrementando la diversidad de los tipos de vegetación, dando lugar al desarrollo de climas áridos; estudios palinológicos corroboran que las condiciones de sistemas de alta y baja presión propiciaron éstas condiciones de aridez al noroeste en donde existió una flora madro-terciaria que data desde el oligoceno a partir de la cual se originaron los desiertos (Martínez et al, 1996). En contraste Axelrod (1979), propone que la flora desértica es del cuaternario, con base en el registro fósil. Sin embargo el grupo de los pinos Cembroides, los cuales se adaptaron a zonas áridas, parecen divergir antes que los demás grupos del género *Pinus* en México, lo cual sugiere, que la datación propuesta por Martínez et al, (1996) puede ser cierta, ya que se tienen registros fósiles para pinos de la subsección cembroides desde el Mioceno, por lo cual su origen pudo haber sido anterior a éste período.

En el oligo-mioceno las pináceas son muy escasas a pesar de la existencia de la Sierra Madre Occidental que contenía ciertos elementos boreales entre ellos algunos del género *Pinus* (Tomassini y Martínez, 1984). Mientras tanto, en el sur de México se empiezan a establecer las floras neotropicales en las planicies costeras y los elementos holárticos en las serranías (Martínez y col., 1988). En el plioceno se encuentran evidencias de un clímax edáfico y climático de los pinares y encinares en las serranías de México desde finales del mioceno. Este tipo de vegetación transvolcánica ha predominado en las regiones montañosas de México.

Al sur del eje neovolcánico en donde actualmente se encuentra una vegetación xerófila, en los sedimentos pliocénicos se registra primero la presencia de sabanas y después un cambio hacia temperaturas mas bajas, con lo que las comunidades de afinidad sabanoide son sustituidas por pinares con elementos pleistocénicos (Martínez, 1992). Eventos tectónicos ocurridos durante el cuaternario, dieron origen al eje neovolcánico y a la formación de varias cuencas endorréicas; para este período se han hecho una serie de estudios palinológicos que muestran una dominancia de *Pinus L.*, el cual ha sido considerado un indicador de condiciones secas para la cuenca de México (Lozano S. et al 1991).

Con base en lo anterior; los cinturones climáticos de vegetación, se empezaron a definir a partir del mioceno (24- 5 m.a.), y fueron finalmente transformados por los cambios climáticos que pudieron

haberse producido en México. Estos cinturones climáticos de vegetación contienen una extensa cantidad de sitios endémicos para varios grupos taxonómicos incluyendo el género *Pinus*. Los mayores centros de endemismo se encuentran en el eje neovolcánico y la Sierra Madre del Sur (Rammamorthy, 1993)

En general se reconocen para el territorio Mexicano 11 provincias morfotectónicas delimitadas con base en aspectos geográficos, fisiográficos y de historia geológica (Ferrusquilla, 1978 citado en Rammamorthy, 1993). Estos son:

1) Península de Baja California. Se encuentran depósitos que datan desde el Cretácico tardío hasta el terciario temprano; la actividad volcánica que dió origen a las serranías de esta provincia se debe a la subducción de la placa hipotética de Farallon: durante el oligoceno hace 30 m.a. se forma el margen de esta placa con la placa norteamericana (Sinaloa, Nayarit); terminada la subducción, comienza la separación de la península y se desarrolla el golfo durante los últimos 4 m.a. En esta provincia quedan incluidas las sierras La Rumoras, S. de Juárez, S. de San Pedro Mártir y La Libertad, al sur La Giganta y San Lázaro.

En la parte norte se encuentran rocas del mesozoico, hacia el noroeste del cretácico medio del lado de la costa del Pacífico del cretácico tardío (99 a 66 m.a.). En la parte Sur La Giganta es del terciario tardío (mioceno tardío, plioceno temprano) de (15- 1.8 m.a.)

2) Planicies y Sierras del Noroeste. Comprende las costas del Pacífico, gran parte de Sonora y Sierras menores de Sinaloa; en las costas se encuentran rocas del cuaternario, y en Sonora del terciario temprano (66- 58 m.a.).

3) Sierra Madre Occidental. Esta se forma por la subducción de la placa de Farallon bajo la placa de Norte América aparentemente, esta subducción cesa hace 30 m.a., la edad isotópica varía de 100 a 45 m.a. Incluye partes de Sonora, Chihuahua, Durango, Sinaloa, Zacatecas, Nayarit y Jalisco.

Dentro del conjunto de serranías encontramos la Sierra Tarahumara, Cumbres del Gato, Tepehuanes, Sombrerete y Fresnillo).

4) Chihuahua-Coahuila Limitada al Norte por EUA-México, al oeste por la Sierra Madre Occidental, al sur por la Sierra Madre Oriental y al este por la costa del Golfo. Incluye dos terceras partes de Chihuahua, la mayor parte de Coahuila, la esquina noroeste de Nuevo León y el noreste de Durango; la subprovincia de Chihuahua esta formada por rocas del cretácico temprano (99- 144 m.a.) y las mesetas del terciario tardío (37-24 m.a.). La subprovincia de Coahuila las mesetas y cordilleras se formaron en el cretácico temprano, rocas del cretácico tardío se encuentran al noreste y sureste de Coahuila y Nuevo León se conforma por rocas del cretácico temprano.

5) Sierra Madre Oriental. Ha sido habitada por vegetación desde el Cretácico tardío; montañas y cordilleras asociadas a tierras bajas de México norte-centro y la prolongación oeste del área de Monterrey-Salttillo. El sector este incluye el norte de Querétaro, Hidalgo, este de San Luis Potosí, oeste de Tamaulipas, sur de Nuevo León sureste de Coahuila. El sector transversal incluye parte del sur de Coahuila, norte de Zacatecas y Durango.

Algunas hipótesis del origen de esta Sierra proponen que el basamento pertenece a la placa Americana del Norte y que existió una transgresión epicontinental durante el Jurásico tardío al Cretácico seguido de la subducción de la placa paleopacífica (Farallon), bajo la placa del norte, la cual causó un levantamiento eventual plegándose y produciendo una falla en la secuencia del jurásico tardío-cretácico

6) Costas y planicies del Golfo. Incluye Veracruz, Tabasco, Campeche, Tamaulipas y pequeñas porciones de Oaxaca y Chiapas. Las unidades mas viejas son del paleoceno (66-58 m.a.) y se encuentran en el sector norte (Veracruz y Tamaulipas) y al sur están las rocas del mioceno (24- 5 m.a.).

7) Planicie central. Incluye la mayor parte de Guanajuato, el oeste de Querétaro, el oeste de San Luis Potosí, el este de Zacatecas, Aguascalientes y Jalisco. Las rocas más viejas se encuentran restringidas a Zacatecas y emergieron antes del triásico tardío-temprano (165-144 m.a.) en tanto que el paisaje actual se mantiene desde el terciario tardío (mioceno tardío 5 m.a.)

8) Eje neovolcánico. Incluye partes del sur de Jalisco y Nayarit la mayor parte de Michoacán, el noreste de Colima, el oeste de Guerrero, Morelos , Distrito Federal y México, sur de Querétaro, Guanajuato, Hidalgo, Tlaxcala y norte de Puebla; comprende cenozoico medio y tardío; los volcanes Citlaltepetl, Popocatepetl y Nevado de Toluca son del cenozoico.

El cinturón comenzó a desarrollarse durante el terciario medio, durante el plio-cuaternario.(5 -1.8 m.a.)

9) Sierra Madre del Sur. Incluye al territorio sur del cinturón volcánico transversal de México y se extiende sobre el suroeste de Jalisco y Colima, sureste de Michoacán y estados de México, Morelos, Puebla , Guerrero y Oaxaca.

Es geológicamente la parte más compleja de México. Algunas hipótesis plantean que proviene de una parte de la placa norte americana o que al menos una porción lo es y las demás son placas pequeñas de afiliación desconocida o un mosaico de placas independientes de origen desconocido.

La regresión oceánica que pudo ocurrir durante el cretácico tardío debido a una subducción de alguna paleoplaca permitió que este territorio emergiera para el terciario temprano. Rocas del mesozoico tardío el terciario temprano documentan una posible actividad volcánica en la parte oeste; sólo la formación del Istmo parece ser mas reciente (plioceno, 5-1.8 m.a.) no así las sierras Mixteca- Zapoteca , de Chiapas y depresión del Balsas

10) Sierra Madre de Chiapas. Incluye el área ístmica de Oaxaca y Tabasco, la mayor parte de Chiapas consiste en placas del cuaternario, lo más antiguo se encuentra al noroeste de Chahuiles y pertenece al paleozoico.

11) Yucatán. Incluye a Quintana Roo, Yucatán y la mayor parte de Campeche; existe un registro prejurásico, pero es mas clara la historia de ésta provincia en los periodos comprendidos entre el cretácico y jurásico en donde se sabe, ocurrió una gradual emergencia de la plataforma.



Fig. 1 Mapa de las 11 provincias morfotectónicas propuestas por Ferrusquilla revisado en Rammamorthy (1990).

Existen diversas clasificaciones tanto geológicas como fisiográficas de tectónica de placas, etc. las cuales son muy similares en cuanto a la delimitación de zonas. El tiempo de datación geológica de estas zonas o provincias, al igual que las hipótesis de aparición o emergencia, se utilizarán como un parámetro proporcional (relativo) para relacionar la especiación de los pinos en México, con el tiempo de aparición de éstas Sierras.

1.2a Distribución de las especies del género *Pinus* en México

Los pinos tienen una amplia distribución en Norteamérica, Eurasia y norte de África, sin embargo es sólo hasta la parte sur de México donde se traslapan las zona neotropical con la neártica en donde se encuentra la mayor diversidad de pinos (Rammamorthy 1990).

Los pinos se localizan entre las latitudes 12° y 32° del trópico de Cáncer, pero vemos que la altitud es más importante para controlar el clima y con ello un factor que afecta la diversidad genética en los pinos, debido a que la temperatura aumenta rápidamente de 3000 a 1000 m, lo cual resulta en un cambio climático drástico en una corta distancia (Perry; 1991).

La distribución del género *Pinus* L. en el territorio Mexicano actualmente esta comprendida entre los 15 y 32 grados latitud norte. Hacia la parte noroeste en la península de Baja California el género esta representado por las especies *P. jeffreyi*, *P. monophylla*, *P. lambertiana*, *P. lagunae*, *P. quadrifolia*, *P. attenuata*, *P. radiata* y *P. muricata*. En los estados comprendidos dentro de la franja de la

Sierra Madre Occidental como serían Sonora, Sinaloa, Durango, Nayarit, Zacatecas y Chihuahua las especies más representadas son *P. pringlei*, *P. engelmannii*, *P. herrerae*, *P. lumholtzii*, *P. duranguensis*, *P. arizonica*, *P. cembroides* y *P. oocarpae*. En la franja de la Sierra Madre Oriental se encontrarían las especies *P. patula*, *P. pseudostrobus*, *P. pinceana* y *P. nelsoni*. Sobre el eje neovolcánico estarían las especies de *P. montezumae*, *P. lawsonii*, *P. hartwegii* y *P. rudis*. Hacia la Sierra Madre del sur y Chiapas encontramos las especies de *P. maximinoi*, *P. ayacahuite*, *P. chiapensis*, *P. patula* y *P. oaxacana*.

1.2b) Registro fósil y migración

De acuerdo a Florin (1963); el género *Pinus* y las pináceas en general, se originaron en el hemisferio norte durante el período jurásico de la era mesozoica y rápidamente después de ello el género *Pinus* se divide en dos grandes subgrupos conocidos ahora como subgénero *Strobus* y *Pinus*. Axelrod (1986), sugiere que las subsecciones se formaron durante el cretácico temprano y terciario, en combinación con la formación de nuevos hábitats secos y edáficamente pobres; y relaciona la radiación de los pinos con la asociación a micorrizas ectotrópicas.

La teoría más aceptada supone el origen del género en el continente laurásico, en donde al parecer se encontraron los ancestros de los pinos mexicanos, desde el cretácico tardío en donde se tienen registros fósiles similares a *P. devoniana* var. *cornuta* y otra serie de hallazgos que a continuación se describen:

El cono más antiguo del género *Pinus* L que se ha encontrado es *P. belgica* el cual data del cretácico temprano y tiene una mayor similitud con el subgénero *Pinus* sección *Pinus* (Alvin 1960). Un segundo tipo de fósil es descrito por Penny (1947), éste fósil parece ser el representante del subgénero *Strobus* es el *P. yezoensis* (forma monófila) y pertenece al cretácico tardío. Del mioceno tardío (25-12 m.a.) se tiene registro de polen de pino de la especie *P. foisy* el cual mantiene un parecido con la subsección *Oocarpae*, otros fósiles similares a esta subsección son:

<i>P. escalantensis</i> ;	oligoceno temprano con subsección <i>oocarpae</i>
<i>P. berglundii</i> ;	mioceno medio relacionado con subsección <i>oocarpae</i>
<i>P. burtti</i> ;	mioceno temprano similar a <i>P. greggi</i> y <i>P. patula</i>
<i>P. tiptoni</i> ;	mioceno medio similar a <i>P. patula</i> y <i>P. pringlei</i>
<i>P. celestomensis</i> ;	mioceno tardío, presenta características entre <i>P. attenuata</i> y <i>P. radiata</i>
<i>P. diegensis</i> ;	plioceno contiene características de <i>P. radiata</i>
<i>P. lindgrenii</i> ;	mioceno y plioceno mantiene características de <i>P. edulis</i> y <i>P. monophila</i> .

*oligoceno 37-24 m.a.

*mioceno 24-5 m.a.

*plioceno 5- 1.8 m.a.

Para el oligoceno se tiene registro de un fósil con características tanto del cono como morfoanatómicas, que indican una estrecha relación con el subgénero *Pinus*; éste tiene las paredes del

tejido no vascular del cono engrosadas, apófisis romboidal, umbo que termina en espina y semillas aladas; y se le dió el nombre de *P. avonensis*, el cual es muy similar a *P. belgica* del cretácico temprano. Sin embargo la descripción hecha por Miller (1969) de este último, también tipifica la sección *Cembra* del subgénero *Strobus*.

Los restos de pinos fósiles del eoceno muestran una estrecha relación con el subgénero *Pinus* sección *Pinus* subsección *Sylvestres* y con el subgénero *Strobus* secciones *Stobus* y *Parrya*. Estos dos fósiles son *P. arnoldii* y *P. similkameensis*, respectivamente (Miller 1973).

Siendo la Sierra Madre Occidental una continuación de las montañas del Oeste, se cree que fué la principal ruta de migración de los pinos, dentro de México y América Central, por lo que se propone que los pinos entraron a México por la Sierra Madre Occidental durante el cretácico tardío y comienzos del terciario (Mirov 1967). Otras hipótesis suponen que la invasión se dio más tarde a mediados del terciario y fué de los Apalaches hacia México por el Golfo y a lo largo de la Sierra Madre Oriental junto con otras angiospermas (Martin y Hacrel, 1957).

En el pleistoceno medio, Norteamérica, se encontraba conectada con el noreste de Asia al igual que con la parte norte de Europa a través de Groenlandia e Islandia. Estas conexiones proveían de rutas de migración para los pinos (Perry, 1991). Durante el cretácico los pinos estaban ampliamente distribuidos en lo que hoy es Canadá y E.U.A., diferenciados dentro de varias especies, dos de las cuales constituyen hoy los dos principales subgéneros *Pinus* y *Strobus* (Perry, 1991).

Las plantas migraron hacia el sur desde el sureste de EUA por el Golfo de México y de México hacia partes de América Central. Al mismo tiempo, también migraron del oeste de EUA por toda la costa oeste a través de las cordilleras.

En el período terciario, ocurrieron grandes levantamientos en el Oeste de Norte América, alterando radicalmente la topografía de la región, lo cual ocasionó la desaparición de muchas especies y otras quedaron reducidas a poblaciones relictuales (Perry 1991). El período cuaternario, vió el advenimiento de grandes glaciares y los bosques de Canadá se destruyeron, quedando algunas pocas especies refugiadas en Alaska, por lo que la migración hacia el sur fué ocasionalmente revertida, así como el avance y retroceso de los glaciares sobre un periodo de 1000 años.

En el plioceno, el Istmo emerge como un área relativamente baja, caliente y seca. Actualmente es una barrera parcial entre el crecimiento de los pinos en las montañas de Oaxaca y los de las tierras altas de Chiapas. Los altos de Chiapas continúan hacia el sureste por la costa del pacífico, hasta el límite con Guatemala y se fusiona con una cadena volcánica que continua a lo largo de la costa del Pacífico de Guatemala.

Siendo los pinos especies pioneras, en México, estas pudieron dispersar sus semillas rápidamente a través de corrientes de lava volcánica, lo que les permitió radiar a planicies centrales y hacia el Istmo de Tehuantepec; área que se encontraba cubierta por el mar del eoceno al mioceno (Schuchert 1935) y no es sino hasta el plioceno que se reanuda el contacto con América del sur.

Con base en las teorías anteriores, podríamos suponer que el subgénero *Strobos* , y en particular las especies de la subsección Cembroides, que se relacionan con climas áridos, pudieron tener un origen más antiguo en México, al igual que algunas especies que se encuentran hacia Oaxaca y Chiapas.

1.3 Sistemática del Género *Pinus*

Los pinos se han distinguido como un grupo monofilético con base en la forma de dimorfismo en los primordios, hojas aciculares contenidas en fascículos. También se han distinguido de otros miembros de la familia por sus conos con escamas leñosas, con regiones apicales especializadas, como el umbo y la apósis. Dentro del orden de las Coniferales se distinguen por características embriológicas y gametofíticas como son el desarrollo de tubos polínicos y las características del arquegonio.

Los géneros más parecidos a *Pinus* en la anatomía de la madera, la semilla y morfología de la escama del cono son: *Picea*, *Cathaya*, *Larix* y *Pseudotsuga*. Estos cinco géneros regularmente presentan árboles monóicos, con hojas aciculares, cada microsporófila con dos microsporangios, las escamas de los conos con brácteas más o menos libres, los granos de polen usualmente presentan dos alas, los canales resiníferos son verticales y horizontales en la madera , no existen vesículas de resina en el saco de la semilla, y las alas de las semillas no la envuelven. Pero los dos géneros más similares son *Picea* y *Cathaya*, sobre todo morfológicamente. Esto se debe probablemente a la retención de estados de carácter ancestral más que a que los tres géneros formen un grupo monofilético dentro de la familia. Dentro de las características fisiológicas tenemos a los mecanismos de polinización y de recepción del polen, y dentro de las morfológicas, la presencia de yemas de invierno, semilla con ala, brácteas cortas. Datos inmunológicos comparando proteínas de semillas (Price et al 1997); sugieren que los pinos y las piceas ocupan una posición relativamente basal en la filogenia de la familia.

Los pinos comenzaron a ser clasificados botánicamente hace algo más de doscientos años. La primera clasificación fué hecha por Linneo en su obra *Species Plantarum* (1753). Dietrich (1824) propuso la separación del género *Picea* de *Pinus* Duhamel en 1755 ya había reconocido 3 secciones basadas en el número de acículas por fascículo; otra importante clasificación propuesta por Spatch (1842) divide al grupo en cuatro secciones; Cembra, *Strobos*, *Eupitys*, y Taeda así como la propuesta por Endlicher (1847) que propone las siguientes secciones: Cembra, *Strobos*, *Pinaster*, Taeda, *Pseudostrobos* y *Pinea*. En 1880 Engelmann utiliza un mayor número de caracteres y reconoce dos secciones: *Strobos* y *Pinaster* estableciendo en *Strobos* 2 subsecciones (*Strobos* y Cembra) y *Pinaster* con 6 subsecciones . Mayr en 1890 reconoce 10 secciones creando 5 nuevas secciones (*Balfouria*, *Banksia*, *Khasia*, *Parrya* y *Sula*). La división del grupo en dos mayores grupos fué propuesta por Koehne (1893), basándose en la presencia de un solo haz fibrovascular (*Haploxylon* o pinos blandos) en contra de dos haces (*Diploxylon* o pinos duros) (Fig. 0)

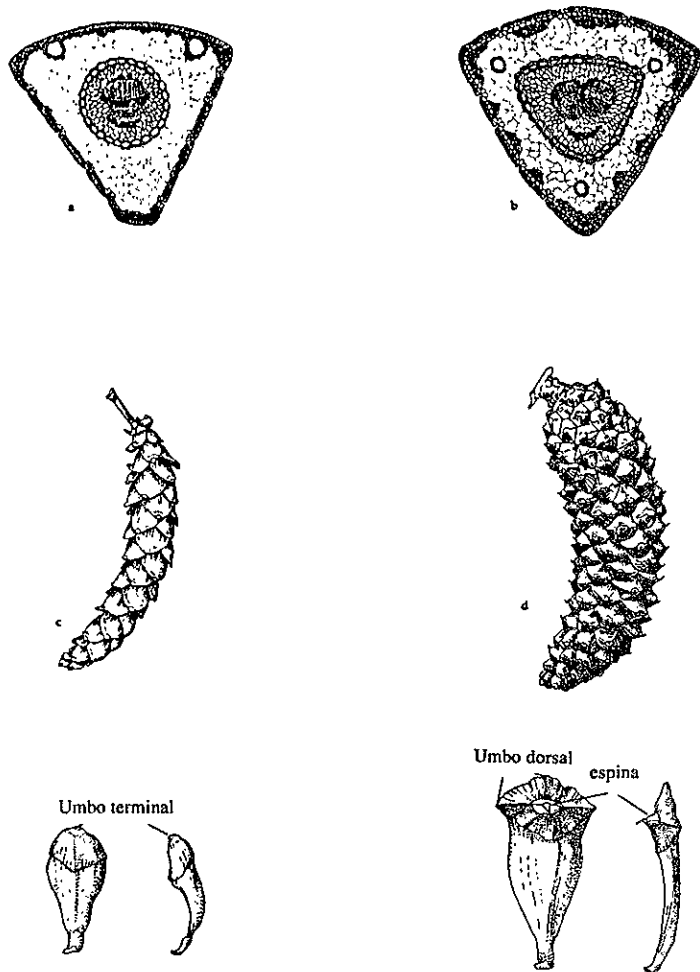


Fig (0). Esquema de las principales características morfológicas que delimitan a los dos subgéneros, *Pinus* y *Strobilus*. los esquemas de la izquierda corresponden al género *Strobilus*, a: es un corte de acícula en donde se observa un solo haz fibrovascular, c: cono característico de *Strobilus* con escamas con umbo terminal sin espina, del lado derecho el subgénero *Pinus* definido por dos haces fibrovasculares, cono típico, con umbo dorsal y espina

Van der Burgh, (1973), reconoce dos secciones solo que dentro de la sección Haploxyton aumenta dos subsecciones Aristatae y Nelsoniae con la única especie representativa y en la sección Diploxyton maneja cuatro subsecciones Leiophyllae (*P. leiophylla* y *P. chihuahuana*) Sula (*P. canariensis*, *P. leucodermis*, *P. heldreichii*, *P. roxburgii*) Lumholtzi (*P. lumholtzii*) y Pinea (*P. pinea*, *P. halepensis*).

Rushforth (1987) reconoce cuatro secciones de diploxyton (Subgénero *Pinus*): Pinaster (*P. brutia*, *P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. pinea*, y *P. roxburgii*) Leiophylla (*P. leiophylla* y *P. lumholtzii*) Taeda (todas las especies del norte de América excepto *P. resinosa* y *tropicalis*) y Pinus (incluye toda la subsección Sylvestres excepto *P. pinaster*).

Klaus (1989), propone diversos cambios a la clasificación de Van der Burgh, como por ejemplo el mover a *P. rzedowski* hacia una subsección monotípica Rzedowskiae; a las especies del mediterráneo como *P. brutia* y *P. halepensis* en una sola subsección halepenses, a la especie endémica *P. tropicalis* dentro de la subsección sylvestres, que por ahora está incluida en oocarpae y a *P. resinosa* en una nueva subsección monotípica.

Desde 1900, se han propuesto muchas clasificaciones del género *Pinus* de las cuales, cuatro han tenido mayor influencia en cubrir al género entero, Shaw, (1914); Pliger, (1926); Little and Critchfield, (1969); Van der Burgh, (1973). Todas estas clasificaciones se han hecho con base en los caracteres morfológicos como lo son las acículas, los conos, la presencia o ausencia de alas en las semillas, caducidad y persistencia de las vainas etc., así como de caracteres microscópicos.

La clasificación de Little & Critchfield, (1969), la cual utiliza información morfológica así como estudios de entrecruzamiento ha sido la más utilizada en las últimas décadas y comparte muchas de las delimitaciones en cuanto a secciones y subsecciones de la clasificación de Shaw o la de Pliger. Sin embargo, existe información sobre cruzamiento interespecífico y estudios más recientes que sustentan de manera más amplia la clasificación propuesta por Critchfield.

En cuanto a la sistemática del género en México, las descripciones habían quedado dispersas hasta que en 1909 George Russell Shaw edita su obra "The Pines of Mexico"; en la cual prevalece una tendencia exagerada a la reducción de especies, consignan para México 18 especies con 17 variedades, en tanto que Roetzl establece 82 especies (Martínez 1992). Estudios hechos por el Dr. Maximino Martínez 1984, asigna para México 39 especies, 18 variedades y 9 formas y Perry en 1991 reconoce 51 especies agrupadas en 10 secciones.

Como ya se había mencionado los caracteres que se han utilizado para la clasificación de los pinos son morfológicos, sin embargo presentan características intermedias o atípicas que a continuación se describen:

En cuanto al número de acículas por fascículo se encuentran en series de 2, 3 y 5 En el Subgénero *Strobos*, sección *Strobos* el número de acículas por fascículo es casi siempre 5 en la sección

Parrya de 1 a 5 teniendo un número específico par cada subsección excepto en la subsección Cembroides que va de 1 a 5. A excepción de *P. monophylla*, que tiene solo una acícula, y *P. quadrifolia* con 4. Entre los pinos Diploxylon o subgénero *Pinus* el número de acículas por fascículo es usualmente 2 en especies euroasiáticas, 3 en la subsección canariensis, de 2 a 3 en las del Noreste de América y muy diverso entre las especies del Noroeste y América central donde hay un rango de 2 a 8 y por arriba de 8 en *P. duranguensis*.

Las escamas del fascículo en la mayoría de las especies del subgénero *Strobos* sufren abscisión con excepción de *P. culminicola* y *P. nelsoni*. En el subgénero *Pinus* son persistentes excepto en las dos especies mexicanas de la subsección *Leiophylla*; lo cual sugiere una homoplasia. En cuanto a los fascículos decurrentes en los piñoneros existen condiciones intermedias (Carvajal and McVaugh, 1992).

El tamaño de la semilla y el grado de desarrollo de las alas también varía substancialmente entre grupos y especies de pinos y está asociada a un cambio en el modo de dispersión (Lanner, 1989). La pérdida o reducción de las alas parecen ser estados de carácter derivados dentro del género; las alas reducidas se presentan en *P. pinea*, *P. sabiniana* y *P. torreyana* del oeste de Norteamérica, las alas adnadas se encuentran en dos especies de la subsección Canarienses (Shaw 1914; Van der Burgh, 1973), al igual que en el subgénero *Strobos* en la subsección *Strobi* hay especies con alas bien desarrolladas o muy reducidas tales como en *P. armandii* y *P. flexilis*. Las alas de las semillas se pierden en la subsección *Cembrae* y en los pinos piñoneros de la subsección cembroides, aparentemente esto representa dos pérdidas convergentes en la historia del subgénero (Strauss and Doerksen 1990).

El único análisis filogenético explícito para la subsección Cembroides con base en datos morfológicos fué hecho por Malusa (1992). En él concluye entre otras cosas que la diversidad de especies que encontramos en México se debe principalmente a eventos de simpatria a diferencia de los eventos alopatricos que determinan la diversidad de pinos en EUA teniendo que las características edáficas en México, determinan la distribución de las diferentes especies de pinos piñoneros.

Los patrones cariotípicos son consistentes con la clasificación subseccional de Little y Critchfield sin embargo las tres especies de California de la subsección *Oocarpae* son muy similares una a la otra y mucho menos similar a los taxa mexicanos *P. greggii*, *P. patula*, *P. pringlei* y *P. oocarpae* lo cual es consistente con datos de entrecruzamiento y sitios de restricción en cloroplastos (Krupkin et al 1996). Esto ayuda a fundamentar que las especies de California se agrupen en una subsección separada llamada *Attenuata*.

Análisis de fragmentos de restricción en cpDNA, mtDNA y nDNA, (Strauss & Doerksen, 1990), encuentran que algunos miembros de la sección Parrya son más similares al subgénero *Pinus* que a la sección *Strobos*. A partir de datos isoenzimas *P. leiophylla* se agrupa con *P. oocarpa* y *P. pringlei* de la subsección *Oocarpae* (Karlamangala & Nickrent, 1989) esto se corrobora en el presente estudio. Estos datos también sugieren una estrecha relación entre las especies del mediterráneo (*P. brutia*, *P. halepensis*

y *P. pinea*). De tal modo que la sección *Pinea* y la sección *Pinus* delimitadas por Little & Critchfield (1969), no son grupos monofiléticos si incluyéramos a *P. sylvestris* subsección *Sylvestres*, ya que presentaría algunos taxa parafiléticos, tales como *P. halepensis* y *P. brutia*. Asimismo la Subsección *Leiophyllae* presentaría taxones parafiléticos como (*P. leiophylla* y *P. lumholtzii*).

Un estudio en 12 especies de pinos mexicanos con PCR-RFLP's confirma como grupo monofilético al subgénero *Pinus*. En el subgénero *Strobos*, sección *Strobos* las ramas basales quedaron poco resueltas; *P. nelsoni* queda en una posición aislada, lo cual podría corresponder a sus características morfológicas intermedias entre los dos subgéneros, Pérez de la Rosa et al (1995)

La comparación de secuencias del gen *rbcL* de cloroplasto (Wakasugi et al, 1994) sugieren que los subgéneros *Pinus* y *Strobos* son monofiléticos. *P. krempfii*, el cual se encuentra en el subgénero *Strobos*, parece ser mas similar a la subsección *Gerardianae* y a la subsección *Cembroides*, y no parece constituir un subgénero diferente como lo sugirió Ferré (1953) y Little & Critchfield (1969).

Análisis de RFLP's de 5S (Moran et al 1992) y 18S-5.8S 26S (Govindaraju et al., 1992) de unidades transcritas de rDNA encuentran que especies representativas de Norte América de las subsecciones Australes, Contortae, *Leiophyllae*, *Oocarpae*, *Ponderosae* y *Sabinianae*, del subgénero *Pinus* exhiben el mismo número de unidades transcritas y longitud que *P. radiata*. Mientras que las subsecciones europeas y asiáticas *Canariensis*, *Pineae* y *Sylvestres* tienen solo la longitud mas no el número de unidades transcritas que mantiene el subgénero *Strobos* (subsección *Cembrae*, *Cembroides*, *Gerardianae* y *Strobi*) el cuales tienen solo una corta unidad transcrita encontrada en otro género por la comparación del grupo externo.

Muchas evidencias indican que *Parrya* forma un grupo basal dentro del subgénero *Strobos*. Para miembros de la subsección *Cembroides* y *Rzedowkianae* es necesario tener más análisis moleculares.

Diversas evidencias argumentan una estrecha relación entre las subsecciones mexicanas *Leiophyllae* y *Oocarpae* (incluyendo *P. teocote* de subsección *Ponderosae*). Así como la separación de los pinos de las costas del Pacífico (subsección *Attenuata*) de la subsección *Oocarpae*.

En cuanto a los pinos piñoneros o cembroides todos ellos comparten entre sí características en común con excepción de *P. nelsoni*. Pocos se localizan en áreas montañosas y la mayoría más bien cubre extensas zonas áridas (Rammamorthy, 1990). Algunas de las especies de la subsección *Cembroides* que son muy diferentes al resto, deben ser consideradas como relictos del arquetipo *Cembroides* y dentro de ellas tenemos a *P. pinceana*, *P. nelsoni* y *P. maximartinezii* (Rammamorthy, 1990). Gran parte de las especies de ésta subsección se han considerado como meras variedades de *P. culminicola* (Silba, 1986) y a *P. quadrifolia* una especie híbrida (Lanner 1974).

Eventos de hibridación en el género

Cada vez es más clara la importancia de la hibridación como un fenómeno evolutivo en las plantas. Asimismo, se reconoce que la hibridación, puede constituir un mecanismo que induce eventos de especiación (Soltis y Soltis, 1993; Rieseberg y Wendel, 1993).

En los años 60's y 70's, la idea de que mucha de la variación morfológica y citológica en poblaciones de plantas, fuera atribuida a la introgresión o hibridación, era vista con escepticismo. Actualmente existen diversas revisiones sobre evolución poliploide que han sido recientemente publicadas, (Hilu, 1993; Soltis & Soltis, 1993) y se tiene un extenso registro de estos sucesos a nivel interespecífico e intergenérico en muchos grupos de plantas y animales para los cuales la hibridación se ha visto como un fenómeno común (Knoblock, 1972 en Avise).

Estos híbridos son morfológicamente intermedios, sin embargo la expresión parental contra la intermedia depende de la naturaleza del control genético de un carácter en particular (Rieseberg, 1995).

La hibridación natural, puede ocurrir esporádicamente en especies simpátricas o estar confinada a áreas de contacto geográfico, estas zonas de contacto o zonas híbridas pueden ser muy persistentes a causa de la "superioridad del híbrido". Es decir que el híbrido tiene una mayor adecuación en zonas de transición ecológica o bien por encontrarse en un equilibrio dinámico (Moore y Buchanan, 1985).

El avance más reciente en relación a la frecuencia de hibridación y su efecto en las hipótesis filogenéticas, lo constituye el descubrimiento de lo que se ha llamado "captura del cloroplasto" (Rieseberg, 1995). Esto es, cuando caracteres morfológicos o marcadores nucleares indican que una o varias poblaciones pertenecen a una especie particular, pero poseen el genoma de cloroplasto de otra especie; éste fenómeno tiene como consecuencia inmediata incongruencias entre hipótesis filogenéticas basadas en marcadores de núcleo y cloroplasto. Sin embargo el uso conjunto de estos dos marcadores, podría esclarecer estas incongruencias.

Estudios de evolución reticulada en *Paeonia*, proveen un ejemplo de la utilidad del ITS para reconstruir eventos de evolución reticulada, demostrando que puede ser muy informativo para detectar hibridación a través de patrones de aditividad nucleotídica en la secuencia del ITS en híbridos, tales patrones, deben ser interpretados con cuidado (Sang, 1995). Para ello es necesario comprobar si realmente se trata de segmentos adicionales pertenecientes a otra especie o a otro tipo de variación en el ITS. En este contexto el ITS abre la posibilidad de detectar eventos de evolución reticulada, donde otros marcadores (mtDNA o cpDNA) sugieren eventos de divergencia que entran en conflicto con la evidencia morfológica y biogeográfica (Powell, 1983; Wagner et al., 1987).

El potencial del ITS puede ser particularmente relevante en gimnospermas, especialmente en aquellas especies donde se sospechan eventos de introgresión. Asimismo, el ITS puede ser útil para obtener medidas de tasas de introgresión entre poblaciones naturales y para evaluar las consecuencias de la hibridación en el mantenimiento o pérdida de variación genética entre especies que ocurren en zonas híbridas (Quijada et al, 1997).

En el género *Pinus*, el único caso bien documentado de evolución reticulada es el de *P. densata*. Esta especie se originó como consecuencia de la hibridación entre especies que pertenecen a secciones diferentes (Wang et al., 1990; Wang y Szmidt, 1990). Algunos grupos dentro del género en donde se podrían detectar eventos de introgresión son los que se encuentran en el subgénero *Strobos*, el cual

presenta un mayor número de discrepancias, respecto a las relaciones filogenéticas de sus miembros. Por ejemplo el lugar que ocupan especies como *P. nelsonii*, *P. rzedowskii*, *P. maximarininezii* y *P. johanis* (Pérez de la Rosa et al., 1995) es controversial. Dentro del subgénero *Pinus* la subsección *Ponderosae* delimitada por Little y Critchfield, (1969) agrupa a diversas especies como *P. ponderosae*, *P. hartwegii* y *P. pseudostrobus* los cuales a su vez son muy similares a la subsección *Montezumae* propuesta por Martínez, 1984, sólo que difieren un poco en cuanto al cariotipo pero aparentemente están conectados por hibridación natural (Perry, 1991; Matos, 1995).

Esta capacidad de cruzamiento interespecífico se ha considerado un estado de carácter derivado compartido (sinapomorfía) más que un estado primitivo retenido (plesiomorfía); debido al aislamiento reproductivo y a las barreras genéticas, ésta capacidad de que dos pinos hibridicen es comúnmente interpretada como un indicador de una relación muy estrecha.

Los estudios que se han hecho de hibridación artificial muestran que especies como las tres de las costas del pacífico (*P. attenuata*, *P. muricata* y *P. radiata*) son muy similares entre sí. Esto se evidencia por cruza exitosas, entre ellas, y la dificultad para cruzarse con especies de otros taxa, incluyendo al resto de las especies mexicanas de la subsección *Oocarpae*. Sin embargo las especies de ésta subsección (*P. gregii*, *P. oocarpa* y *P. patula*) se pueden entrecruzar fácilmente entre ellas. Las especies de pinos *Montezumae* puestos por Van der Burg en la subsección *Pseudostrobi* y las especies más norteñas, *P. engelmannii*, *P. jeffreyi* y *P. ponderosa*, puestos en la subsección *Ponderosae* se entrecruzan en un número de diferentes combinaciones (Little y Righter, 1965), por ello el *P. montezumae* parece constituir una conexión en términos de cruzamiento y morfología entre el grupo del *pinus Ponderosa* y los grupos *Montezumae* y *Pseudostrobus* (Martínez, 1992). Híbridos tanto naturales como artificiales han sido bien documentados entre la especie *P. coulteri* de la subsección *Sabinianae* y *P. jeffreyi* de la subsección *Ponderosae* sugiriendo una fuerte relación que se había sugerido antes en la clasificación de Little y Critchfield (1969). Por otro lado también tenemos que *P. lawsonii* y *P. teocote* se entrecruzan con *P. patula* de la subsección *Oocarpae* y sin embargo se clasifican en grupos separados.

En resumen, dentro de la clasificación de Little y Critchfield (1969), el cruzamiento entre especies diferentes en una misma subsección ocurre en mayor proporción, que entre miembros de diferentes subsecciones excepto casos excepcionales como la hibridación entre especies de la subsección *Sabinianae* y *Ponderosae* así como entre *P. caribea* y *P. oocarpa*, subsección *Australiae* y subsección *Oocarpae*, respectivamente.

En el género *Pinus* como ya se mencionó anteriormente existen evidencias de fenómenos de hibridación natural así como híbridos inducidos sobre todo para el subgénero *Pinus*. Sin embargo análisis recientes en poblaciones de *P. rzedowskii*, sugieren un supuesto origen híbrido para esta especie (Quijada et al. 1997); al igual que para las especies *P. flexilis*, *P. griffithii*, *P. edulis*, y *P. cembroides*. En el presente estudio también se describirán algunas evidencias de probables eventos de hibridación detectados por patrones aditivos en el ITS sobre todo en el subgénero *Strobus*.

1.4. Espaciador Transcrito Interno (ITS)

El DNA ribosomal en eucariontes tiene dos espaciadores internos transcritos y las subunidades codificadoras, que son caracterizadas por su velocidad de sedimentación (S, por Svedburg). Los espaciadores transcritos separan a las subunidades 18S, 5.8S y 28S; el ITS1 localizado entre la subunidad pequeña 16S ó 18S y 5.8S *región codificadora* y el ITS 2 que se encuentra entre la 5.8S y la subunidad grande 23S ó 28S todas estas subunidades son conocidas como la unidad transcrita del nrDNA y cada una de ellas se encuentra flanqueada por dos espaciadores externos transcritos y separada por un espaciador no transcrito (NTS). El ITS comprende solo los dos espaciadores ITS1 e ITS2 y la subunidad pequeña, 5.8S. Fig. (2). Los espaciadores tanto internos como externos, contienen señales para procesar el rRNA, (van Nues et al., 1994; Watson et al., 1988).

La variación de tamaño reportada para el ITS en angiospermas es entre 560 y 700 pb en contraste con lo observado para coniferales, cicadales, ginkgoales y gnetales que va de 972 a 3125 pb. La mayor variación en tamaño del ITS se encuentra en la familia pinaceae y es de 1550-3125 pb. (Liston et al., 1996). Datos de secuenciación y mapeo indican que el ITS2 más la subunidad 5.8S permanecen conservadas en el tamaño por lo que el ITS1, sería el responsable de la variación en el ITS para gimnospermas. Debido a las propiedades tanto del ITS1 como del ITS 2, quizá este último resuelva mejor las relaciones filogenéticas a un nivel subseccional y el ITS1 a nivel de especie. Sin embargo, las diferencias genéticas que se observan en las familias genéticas, involucran tanto variación en la longitud debido al tamaño del espaciador como variación en las secuencias. Esto último, se puede evidenciar por los cambios en los sitios de enzimas de restricción (Schaul, 1985). Esta familia de genes repetidos, experimenta una rápida evolución concertada, vía entrecruzamiento desigual y conversión génica, (Baldwin et al., 1995; Wendel et al., 1995) que son los mecanismos responsables para la deriva molecular (Arnheim et al 1989, Hillis et al 1991 Wendel et al 1995). El ITS del nrDNA, se ha usado para el esclarecimiento de las relaciones entre taxa a niveles inter e intra-genéricos, así como intraespecíficos (Liston et al., 1996; Hamby y Zimmer, 1992) y se ha convertido en un importante locus nuclear para investigaciones en sistemática molecular (Baldwin et al 1995).

Son varias las ventajas que proporciona el uso de este marcador molecular. Dado que la región del ITS se encuentra altamente representada en el genoma, se puede amplificar con cantidades pequeñas de DNA. Las secuencias altamente conservadas dentro de la mayoría de los genes del nrDNA son muy útiles en el diseño de oligonucleótidos ("primers") "universales", lo cual facilita la amplificación de la región del ITS, mediante el uso de la PCR (Liston, 1992). Los espaciadores internos son la parte más variable de la región, y debido a que se encuentran flanqueando a la subunidad 5.8S, que es más conservada, se posibilita la alineación inambigua de esta región.

El ITS es generalmente homogéneo dentro de un genoma dado que experimenta una rápida evolución concertada, lo que permite la caracterización de un individuo por una sola secuencia de ITS (Karvonen y Savolainen; 1993 Shu et al., 1993). La evolución concertada y la recombinación sexual

tienden a promover la uniformidad del ITS dentro de individuos y entre individuos de poblaciones de la misma especie (Soltis y Kuzoff 1993). Por lo que en teoría, basta muestrear pocos individuos para establecer las relaciones filogenéticas entre distintas especies.

Otra característica importante es el arreglo en tandems repetidos distribuidos en uno de los diversos loci cromosomales llamadas regiones del organizador nucleolares o NORs (Hamby y Zimer 1992). El número de NOR's determina de alguna manera, la velocidad de los procesos de homogeneización. En angiospermas se encuentran entre uno o dos, mientras que el número de NOR's en algunas gimnospermas es de 10 a 12 (Karvonen y Savolainen, 1993). La tasa de homogeneización de secuencias por conversión génica y por entrecruzamiento desigual dependen del número de copias, del número de loci y de los cromosomas en los cuales se encuentran, de la localización de los loci en los cromosomas y la tasa de intercambio dentro y entre cromosomas (Dover, 1982; Wendel et al., 1995). Asimismo, la tasa de evolución de éstas familias, depende de la tasa de recombinación desigual.

Actualmente no se han estudiado con detalle las causas que originan la variación en el tamaño del ITS en gimnospermas. Estudios comparativos del ITS1 en plantas sin flor, pueden proporcionar evidencia sobre la existencia de restricciones funcionales en la región (Liston et al, 1996), y probablemente permitan esclarecer los mecanismos evolutivos responsables de la homogeneización. Dado que se desconocen tanto las restricciones funcionales como la fuente de variación en el tamaño del ITS1, no es posible determinar si la variación en el tamaño de este espaciador tiene un valor informativo para el establecimiento de las relaciones filogenéticas en las gimnospermas (Quijada et al, 1997).

Por otro lado, se sabe que la metilación juega un papel muy importante en la evolución de las unidades transcritas ribosomales y patrones de substitución del ITS debido a que induce desaminación, dando como resultado una baja estabilidad en la estructura secundaria del RNA. Sin embargo, la desaminación de citocinas en sitios metilados es una potente fuente de mutación y la selección natural parece mantener muchos sitios metilados a través de unidades ribosomales exceptuando al gen promotor (E. S. Bukler y Holsford, 1996).

A pesar de que la selección natural es importante en la evolución del ITS, la deriva génica, los cuellos de botella y los mecanismos evolutivos por si solos pueden jugar un papel muy importante, superando a la selección purificadora que preserva estable al ITS y convirtiéndose en una fuente de variación en plantas, modificando el número de copias ribosomales resultantes del entrecruzamiento desigual (E. Buckler y T. Holsford, 1996).

Se ha reportado que el ITS presenta variación a diferentes niveles es decir, en cuanto al número de unidades transcritas encontrado en el ITS-1 de tres especies de parásitos lo cual contribuyen a la variación de tamaño total en el ITS (Kane y Rollison 1994). En cuanto a la variación intraespecífica, se han realizado estudios en la familia Winteraceae donde se muestra que clones de algunas especies presentan mucha mayor divergencia que la que se encuentra interespecíficamente. (E. A. Zimmer, 1993).

Asimismo un estudio realizado para *P. rzedowskii* con RFLP's encontró evidencia de polimorfismo intraindividual (Quijada, 1996).

En el género *Pinus*, la región del ITS es excepcionalmente larga (3000 pb), solo superado por el género *Picea* (3400 pb, Bobola et al., 1994; Liston et al., 1996). El ITS en *P. pinea* (Marroco et al, 1996) es de 3037 pb y contiene 5 subunidades repetidas y organizadas en tandem. El mapeo de sitios de restricción sugiere la presencia de subunidades similares, en otras especies del subgénero *Pinus* (Liston et al 1996). También se ha observado que la variación dentro de secuencias parciales en el ITS1 en pinos es alta, similar a lo que ocurre en la región total del ITS en angiospermas (Liston et al., en prep.), pero la fuente de tal variación en la mayoría de las gimnospermas permanece aún sin conocerse.

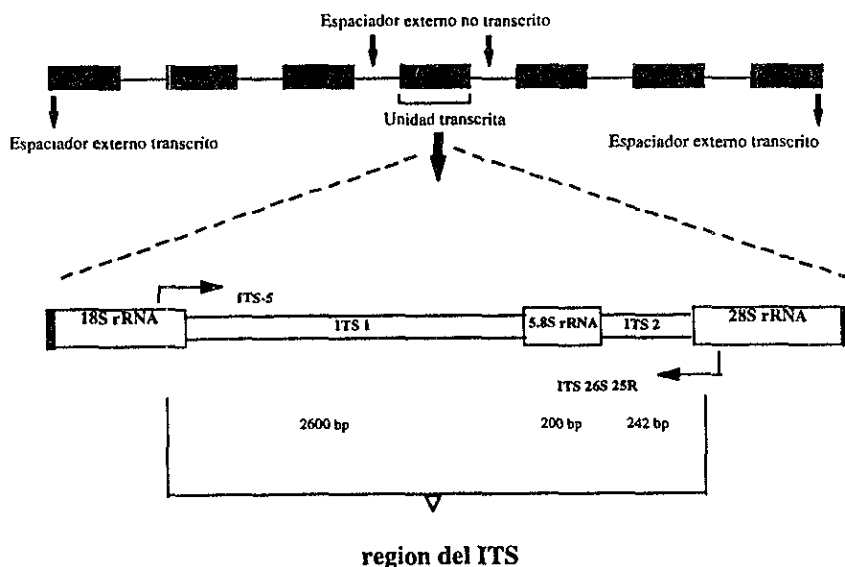


Fig. 2 Se muestra la unidad transcrita que se repite. Está formada por las tres subunidades codificadoras, los dos espaciadores internos que se transcriben (ITS), los espaciadores externos que se transcriben (ETS). Se muestra el lugar en donde se anclan los oligonucleótidos (ITS-5 e ITS 26S 25r) para amplificar las secuencias del ITS.

Como se mencionó en el capítulo anterior, el ITS1 es un locus muy útil para medir tasas de introgresión en zonas híbridas. Además nos proporciona una fuente de información adicional, que complementada con el uso de otros marcadores moleculares, permite establecer una conexión entre un enfoque microevolutivo y los procesos que dieron origen a las especies que constituyen la zona híbrida (Quijada et al., 1997).

1.5 Análisis y Reconstrucción Filogenética

Un árbol filogenético es un diagrama de ramificación que representa la secuencia de eventos de especiación. Con él se puede además, estimar el tiempo de divergencia de los organismos desde que compartieron el último ancestro común, dentro de un grupo, lo cual es una hipótesis de las relaciones genealógicas entre taxa y de su evolución, por lo que su valor depende de la cantidad y calidad de datos en los que se sustenta.

Dentro de la sistemática encontramos la discusión epistemológica y ontológica entre tres escuelas diferentes: Los sistemáticos evolutivos, los taxónomos numéricos o feneticistas y los cladistas o sistemáticos filogenéticos; como representantes de la primer escuela se encuentran Mayr y Simpson, la segunda por Sokal y Sneath y la última por Hennig (de Queiroz & Donoghue, 1988), quien propone el método de reconstrucción filogenética circular.

Hennig en 1950 bajo el criterio del grupo externo, permite diferenciar a las homologías especiales de las generales (Wiley 1981), y de esta manera el grupo interno será agrupado con base en las características especiales compartidas (apomorfías). Al mismo tiempo, nos da un eje de referencia temporal. Elige las reconstrucciones soportadas por un amplio número de características e interpreta los resultados inconsistentes como homoplasias (Brooks, 1991)

Desde el marco conceptual cladista, un agrupamiento natural contiene solo grupos monofiléticos, bajo éste esquema, una clasificación artificial nos muestra taxones artificiales que representan una unidad incompleta o inválida evolutivamente; como serían los grupos parafiléticos y polifiléticos.

Por todo lo anterior nos encontramos con diversas metodologías para inferir una filogenia así como diferentes conceptos y fines para lo cual se reconstruye una filogenia. Por ejemplo entre el cladismo y el evolucionismo (Mayr, 1904) la diferencia principal radica en que el cladismo se basa en el "ancestro común mas reciente" definiendo a las especies por la posición de caracteres derivados compartidos (autoapomorfías) y la monofilia del grupo, sin aceptar grupos artificiales. Los evolucionistas, también se basan en "el ancestro común más reciente" sólo que lo dan cabida a grupos artificiales; para ésta escuela, la clasificación debe ser consistente con la filogenia y representar a su vez el grado de diversificación y divergencia en términos de similitud (de Quieroz & Donoghue, 1988).

Por otro lado tenemos a la taxonomía numérica, la cual se basa exclusivamente en las similitudes fenéticas, entendiendo por fenético cualquier caracter utilizable en la clasificación, por lo tanto se encuentra libre de inferencias genealógicas.

Existen dos diferentes métodos para la reconstrucción de árboles uno es el método de parsimonia utilizado básicamente por los cladistas y evolucionistas y otro el de distancia con el cual se basan algunos evolucionistas así como feneticistas.

Los métodos de distancia, utilizan medidas de similitud o disimilitud con lo cual no suponen una conexión directa entre la similitud y las relaciones evolutivas. Un método de distancia es el de Neighbor

joining (Li y Graur, 1991), éste método, no asume que las tasas de substitución deban ser constantes. Este consiste en conectar de manera aditiva pares de OTU's en un fenograma y no requiere de una raíz para dar polaridad, sino simplemente establece relaciones de distancia que son computadas en una matriz de distancia en donde se comparan cada uno de los OTUS contra todos los demás y los dos que tenga el mayor puntaje o similitud serán considerados el primer par y para la siguiente búsqueda serán considerados como un solo OTU y así el proceso continua hasta agrupar a todos los OTU's, este método identifica de manera secuencial los pares de OTU's que minimicen el tamaño total del árbol (Li y Graur 1991).

Los métodos de parsimonia o evolución mínima involucran la identificación de un árbol tal que requiere el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias observadas entre OTU's bajo estudio, el árbol que se obtiene es un árbol de máxima parsimonia (Li & Graur, 1991).

Este método tiene varios supuestos importantes. El primero es que los caracteres deben ser independientes es decir la presencia o ausencia de un caracter no debe relacionarse o depender de otro caracter ya que esto nos llevaría a sobrepesar ciertos caracteres mas que otros.

Para poder establecer relaciones temporales de divergencia es necesario utilizar una raíz la cual generalmente es un grupo externo que va a dar una polaridad al cladograma, esta raíz es el ancestro común de todo los OTU's bajo estudio y va a definir el camino evolutivo dentro de grupo interno y funciona como un eje temporal (Li y Graur, 1991).

Un caracter es informativo siempre y cuando favorezca algunos árboles sobre otros y sólo son caracteres informativos, aquellos que estén compartidos por dos o mas de dos taxa.

Los cambios de caracter que están presentes en clados de diferente jerarquía dentro del grupo en estudio serian plesiomorfías (caracteres ancestrales compartidos) que no pueden indicar relaciones dentro del grupo; es decir solo las sinapomorfías (caracteres compartidos derivados) nos delimitan grupos monofiléticos.

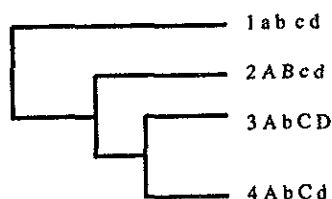


Fig. 3 Ilustra que el estado de caracter avanzado A, C (autopomorfías) delimita al grupo 2,3,4 y 3,4 respectivamente; mientras que el estado de caracter b presente en taxa 3 y 4 no puede delimitarlo como grupo ya que es un estado de caracter retenido primitivo que está presente también en el taxon 1 es decir es plesiomórfico.

Las homologías sólo se caracterizan a nivel de sinapomorfías que son caracteres compartidos derivados y por lo tanto de ancestría común bajo estricto criterio de monofilia según la perspectiva de Henning (Forey P.L. 1992).

Sin embargo estas homologías así como las analogías se definen según el nivel jerárquico. El mismo Henning argumenta que la ancestría común por sí misma no puede ser un criterio riguroso para justificar grupos taxonómicos

Frecuentemente se ha argumentado que los métodos de estado de carácter (parsimonia) son más poderosos que los métodos de distancia, puesto que al realizar matrices de distancia se pierde información dado que se hace sólo un promedio del número de caracteres compartidos entre el total. Sin embargo los métodos de parsimonia en algunos casos utilizan solo una fracción de los datos disponibles, por lo cual el método en ocasiones es menos eficiente que los de distancia (Saitou y Nei 1987), a menos que el número de sitios informativos sea muy grande entonces el método de parsimonia es generalmente más efectivo.

En el caso de que estemos utilizando información genética, nos enfrentamos al problema de que los patrones de ramificación de genes pueden diferir del de las especies en topología y en el tiempo de divergencia en el caso de que usemos genes parálogos.

1.6 Tasas de sustitución en el ITS

Un análisis filogenético con métodos de parsimonia, suponen que las tasas de evolución molecular son constantes a lo largo de los diferentes linajes, por lo tanto es importante obtener las tasas de sustitución, y mostrar que este supuesto se cumple.

Zuckerlandl y Pauling (1962) fueron los primeros en proponer que las secuencias de DNA evolucionan a tasas constantes. A este hecho se le conoce como reloj molecular y funciona bien bajo la teoría neutralista, es decir cuando la tasa de evolución neutral en secuencias génicas es proporcional a la tasa de mutación. Esta proporcionalidad, está definida por el grado de restricción funcional que tiene una secuencia (Kimura, 1983)

Sin embargo diferentes genes y diferentes secuencias dentro de genes, evolucionan a diferentes tasas (Li y Graur, 1991; Nei, 1987; Wilson, 1987) esta diferencia en las tasas se da a los diferentes niveles como serían; entre las diferentes posiciones nucleotídicas, entre genes no homólogos, entre intrones, exones y pseudogenes, y entre genomas de un linaje (Avice 1994).

Algunos argumentos en contra del reloj molecular, surgieron a partir de estudios, en donde se midió, la varianza empírica en las tasas de sustitución, y la media esperada, y se encontró que ésta última excede a la primera (Langley y Fitch, 1974; Ohta y Kimura, 1971) y esto ha sido interpretado en contra de la uniformidad del reloj molecular (Gillespie, 1986; Takahata, 1988), dado que la teoría neutralista supone, que la media en la tasa de sustitución debe ser igual a la varianza

A pesar de ello, la idea de las tasas de evolución constante prevalece y solo bajo éste supuesto los marcadores moleculares nos pueden brindar información de las relaciones de ancestría entre las especies y se puede hacer una calibración temporal a partir de datos paleontológicos o biogeográficos.

En el ITS, las tasas de sustitución que se han encontrado para la familia Winteraceae, Gossypium, Nicotiana, Tripsacum y Zea son heterogéneas, ya que existen genes parálogos que han derivado en pseudogenes, lo cual representa una limitante para su uso. Sin embargo, estos genes, pueden identificarse por la estabilidad termodinámica en su estructura secundaria, su alta tasa de sustitución y de este modo diferenciarse de los genes codificadores (Buckler, E.S. et al., 1996).

En cucurbitáceas se encuentran diferencias en el tamaño del ITS originadas por un número diferente de subunidades transcritas que va de nueve a cinco con una longitud aproximada de 760 pb. También se encuentran duplicaciones (probablemente por entrecruzamiento desigual) de regiones codificadoras incluyendo la región de transcripción y de terminación, lo que sugiere diferentes tasas de homogeneización y por tanto de sustitución en el ITS (Torres, 1993).

Un estudio sobre las tasas de evolución molecular en regiones no codificadoras de genomas de plantas encuentra que para el ITS la tasa de sustitución es de 0.776 mostrando ser el mas alto respecto a trnL, y NAD1b (Friar y Porter, 1997).

Datos sobre las tasas de sustitución para el ITS muestran que existen diferencias entre las tasas de intercambio intra e inter cromosomales (Lyckergaard y Clark, 1991).

1.7 Filobiogeografía

Una segunda estimación filogenética se sustenta en la reconstrucción biogeográfica, éstas relaciones filogeográficas, en las últimas décadas han sido reveladas a través de análisis moleculares.

La biogeografía trabaja bajo dos hipótesis principales una es la explicación de la distribución disyunta y especiación debido a fenómenos de vicarianza y otra es la hipótesis dispersionista (Avice 1994). La mayoría de las pruebas y en particular las que se desarrollan en escenarios vicariantes, han involucrado estimaciones filogenéticas usando caracteres tradicionales no moleculares (Cracraft, 1986) y no ha sido sino hasta los últimos años que los métodos moleculares han jugado un papel importante en los modelos biogeográficos de vicarianza (Bermingham et al. 1992).

Los patrones filogenéticos comienzan a ser comprendidos y comparables cuando estos se expresan en cladogramas de área, es decir cuando los taxa son substituidos por áreas; expresando así las interrelaciones de áreas como determinantes de la información filogenética (Humpries, 1986). De este modo un árbol de área representa la ancestría común de las biotas, del mismo modo que un árbol de taxa representa las relaciones de *ancestría común* entre especies. Generalmente los cladogramas de área pueden ser examinados comparándolos con otro grupo taxonómico no relacionado, endémico a las áreas relevantes y que presente un patrón equivalente al expuesto por el grupo en cuestión.

Las primeras aplicaciones cladistas a la biogeografía fueron hechas por Henning (1966) con la

finalidad de encontrar "centros de origen" relacionados a grupos monofiléticos, bajo el razonamiento de que existe una estrecha relación entre las especies y el espacio que cada una de ellas ocupa; es decir, hay patrones de dispersión únicos en cada especie independientes de su historia y otros como la vicarianza que pueden influir de manera más general en la evolución de diferentes grupos de organismos, (Humpries, 1986) estos dos factores se entremezclan dando lugar a historias evolutivas mas complejas.

Cuando nos encontramos con un patrón de distribución muy amplio, que presenta barreras geográficas y se repite en muchos grupos taxonómicos que no se encuentran relacionados, es poco probable que esto se haya debido a eventos de dispersión. La explicación más parsimoniosa, entonces, sería un escenario vicariante en donde las especies aparecieron antes de la formación de éstas barreras.

El método vicariante de biogeografía propuesto por Rosen (1976), consiste en marcar la distribución disyunta de componentes de grupos monofiléticos sobre un mapa. Uniendo estas áreas, bajo el supuesto de que las biotas son productos vicariantes, es decir fragmentos de una sola biota ancestral, éste autor considera que las hipótesis dispersionistas, son más inestables debido a que apelan a explicaciones individuales e independientes que son más difíciles de probar.

Existe una clara diferencia entre los escenarios vicariante y dispersionista. En el primer caso, existe la posibilidad de una relación entre la edad del taxa y la edad de las barreras limitantes, con lo cual las interpretaciones resultan sencillas. En el segundo caso cada especie, o grupo de organismos, se comporta de manera diferente, y la relación entre los patrones de distribución de cada grupo y su historia es más difícil de establecer, teniendo así un escenario mas complejo.

La solución para definir las relaciones de área, parte del método biogeográfico cladista propuesto por Platnick y Nelson (1978); el cual combina el método cladista de Henning, que pretende encontrar el "centro de origen", con el método panbiogeográfico de Croizat (1964) quien supone que los modelos de dispersión explican las disyunciones por migración, através de barreras preexistentes, y los modelos de vicarianza se explican por la aparición de barreras que fragmentaron especies ancestrales.

El método biogeográfico cladista, involucra primero la búsqueda de todos los grupos monofiléticos con taxa que se encuentran en por lo menos tres o más áreas similares. Los cladogramas son producidos para cada grupo de organismos, los nombres de los taxa son substituidos por las áreas en las que se encuentra cada taxon; las áreas sobre un cladograma indican la trayectoria del grupo. Finalmente, el éxito para encontrar un patrón vicariante en la naturaleza, depende de la frecuencia sobre la cual los factores comunes afectan la evolución y distribución de dos ó más grupos de organismos. Para encontrar estos patrones congruentes (Rosen ;1978, rev. en Humpries, 1986) es necesario eliminar componentes que no se encuentran bien resueltos en el cladograma.

En este estudio utilizamos para el análisis biogeográfico, el método desarrollado por Page R., (1993) que consiste en comparar árboles de especies y hospederos, especies y áreas, árboles moleculares y morfológicos etc. Se obtuvo un árbol de áreas, a través de una búsqueda heurística, a partir de la filogenia de especies y las áreas que ocupan cada especie, el programa realiza un consenso entre estos

dos datos. El programa que se utiliza es el COMPONENT 2.0 (1993); éste analiza, en el caso de los cladogramas de área, cual es el mejor cladograma de área, cuando trabajamos con dos diferentes especies, generando un solo cladograma que es el resultado de dos componentes. Sin embargo, también se puede realizar este análisis de componentes con un solo grupo de especies y las áreas. Es necesario poner atención en aquellas especies ampliamente distribuidas, ya que éstas son una fuente de ambigüedades y posiblemente nos hacen perder información valiosa.

1.8 Método comparativo.

Este método, tiene como objetivo, probar como los cambios evolutivos entre caracteres, están correlacionados a través de su historia evolutiva y consiste en la comparación de dos fenotipos a través de un rango de especies ó un fenotipo con un ambiente variable. Debido a que las especies forman parte de una estructura filogenética, tales comparaciones, no pueden verse a través de supuestos estadísticos independientes de tal distribución. *Dado que no puede excluirse la evolución convergente.* Los métodos estadísticos son poco útiles; debido a que la mayoría de las regresiones, correlaciones, tablas y métodos de contingencia, incluyen métodos no paramétricos, que suponen que los puntos de una distribución común, son independientes de su historia filogenética; esto ocasiona una sobreestimación en la significancia de la hipótesis a probar. Es decir, la presencia de un alto número de taxas que retienen estados de carácter primitivos aumentan los valores de correlación estadística simple, independiente de la filogenia, en contraste con análisis de correlación dependiente de la filogenia.

El método comparativo, requiere de una topología filogenética así como de saber el tamaño de las ramas; dadas estas condiciones, la filogenia especifica el tipo de contrastes entre las especies, contrastes que son significativamente independientes y que pueden ser usados en estudios de correlación o regresión.

Para caracteres continuos existen tres diferentes métodos: el de contraste independiente (CI) (Felsenstein, 1985), el de cambio potencial parsimonioso (Madisson, 1991) y de autocorrelación filogenética (Gittleman y Kot, 1990). En el primer caso, la asociación entre dos variables en una filogenia es probada por comparación estadística de la cantidad de divergencia en cada carácter a lo largo de cada rama y es el método utilizado en el presente trabajo y se basa en la hipótesis de que un carácter determinado en una especie, puede ser producto de una herencia filogenética en un nivel jerárquico, pero también puede ser producto de una adaptación en un nivel jerárquico superior (Harvey y Pagel, 1991)

Para estimar la relación entre dos caracteres continuos, se uso el método de contrastes independientes, el cual transforma los valores de distancia en varianza esperada. Este programa de simulación requiere de conocer la topología del árbol, el tamaño de las ramas, los valores de cada una de las dos características (la media total) el valor de inicio para cada característica (las dos características comienzan de cero porque la hipótesis nula de correlación es cero). El modelo asume que las relaciones esperadas entre fenotipos de diferentes especies, comparten una historia evolutiva, por lo tanto, la

longitud de las ramas sobre la filogenia, tendrá una relación con los cambios de carácter, es decir que éstos serán equivalentes a la matriz de similitudes esperadas entre fenotipos interespecíficos, y por último, que la variación intraespecífica es mucho menor a la variación interespecífica, lo cual esta incorporado explícitamente en el modelo. De este modo, los valores de distancia obtenidos en nuestro cladograma determinan sustancialmente los valores de correlación entre caracteres.

Cuando observamos que estados de carácter similares, han evolucionado de manera independiente (en grupos filogenéticamente lejanos) en ambientes similares, suponemos que existió un fenómeno de adaptación. Pero cuando se observa similitud entre especies relativamente cercanas se supone que dicha similitud se debe a una identidad por descendencia, asociada con restricciones filogenéticas (Martins y Hansen, 1996). Los métodos comparativos permiten distinguir los orígenes evolutivos independientes de los estados de carácter en aquellos casos de identidad por descendencia, por ello es necesario el uso de caracteres homólogos. El programa que se utilizó para éste análisis fué COMPARE 1.0 (Martins, E., 1995).

El análisis comparativo se realizó para probar las siguientes hipótesis:

Los pinos pueden dispersar sus semillas por viento o por aves, el desarrollo de alas probablemente surge como consecuencia de la dispersión por viento, y ocurre comúnmente en zonas altas, mientras que la dispersión por aves, comúnmente se ha considerado una adaptación bajo condiciones xéricas o de competencia (Tomback & Linhart, 1990) y se correlaciona con un tamaño mayor de la semilla. Asimismo el tamaño de la semilla parece determina el tamaño del ala es decir, semillas muy grandes, presentan una reducción de el ala o bien semillas muy pequeñas presentan alas más grandes. Algunas hipótesis sobre la pérdida del ala, han sido atribuidas a la selección por aves dispersoras (córvidos del género *Nucifraga*), en los pinos piñoneros; gracias a las cuales se pueden regenerar las poblaciones de pinos (Lanner, 1989). Con base en lo anterior nosotros esperamos que exista una fuerte correlación entre el tamaño de la semilla y el ala, así como con el tipo de dispersión y hábitat estos últimos, necesitarán ser codificados para su análisis.

En la segunda hipótesis la intensidad de la herbivoría determina la frecuencia con que se presentan los siguientes caracteres: yema (resinosa vs no resinosa y pubescente vs. glabra) y espina del cono (ausencia vs. presencia), esperando encontrar en aquellos pinos que habitan bajo condiciones xéricas y por lo tanto de mayor competencia, un mayor número de éstos caracteres, así como una mayor correlación entre estos.

Y por último, las condiciones de aridez conducen a una reducción en el número y tamaño de las acículas y determinan el tipo de crecimiento lo cual está estrechamente relacionado entre sí, Malusa, (1992); Farjon, (1996). Por lo que a mayor aridez se dará un crecimiento erecto con hojas rígidas; y en climas templados y húmedos, puede ir desde flexibles hasta colgantes con acículas largas y en un mayor número.

OBJETIVOS

- Analizar el polimorfismo que existe en los fragmentos de restricción (RFLP's) del espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal nuclear entre 44 especies del género *Pinus* en México y tres especies euroasiáticas.
- Utilizar esta base de datos para hacer la reconstrucción filogenética utilizando al ITS como marcador molecular con base en métodos de distancia y de parsimonia.
- Mapear sobre esta filogenia algunos de los caracteres que han sido utilizados para la clasificación de pinos, y plantear algunas hipótesis de evolución morfológica, utilizando el método comparativo.
- Contrastar algunas de las hipótesis biogeográficas de distribución de pinos en México con los eventos de divergencia que existen en la filogenia obtenida.
- Comprender algunas características de la evolución molecular del ITS en el género, tales como la distribución de distancias genéticas, tasas de substitución, y homogenización de secuencias.
- Con base en lo anterior explicar los polimorfismos encontrados, así como los probables eventos de hibridación que se detecten a través de RFLP's.

el rompimiento de las paredes celulares a través de la pulverización con nitrógeno líquido, para lo cual se usa un mortero, y el buffer de extracción. Una vez homogeneizado el tejido se centrifuga para eliminar el buffer que queda en el sobrenadante y se utiliza un buffer nuevo que formara el complejo ácido nucleico-CTAB. La muestra se vuelve a centrifugar y se resuspende el pellet con buffer CTAB2X, se incubaba a 60°C. Para separar los demás componentes celulares se utiliza cloroformo-octanol y volviendo a centrifugar, con lo que se obtienen tres fases, en la superior se encontrarán los ácidos nucleicos. Recuperada ya la fase superior que contiene el DNA, éste se precipita con isopropanol a -20° de 12 a 24 hrs.; se vuelve a centrifugar y se recupera el pellet el cual se disuelve en 100 o 200 ml de buffer TE, se almacena en congelación a -20°.

2.2 AMPLIFICACIÓN DEL ITS

Una vez extraído el DNA se amplificó el ITS utilizando los oligonucleótidos o "primers" ITS5 (White et al 1990) y el ITS 26S 25r (Nickrent et al., 1994): (son subunidades que se caracterizan por su velocidad de sedimentación; S, por Svedburg y r por ribosomal) (fig. 2).

El protocolo de amplificación que se siguió para el ITS de pinos se montó en el laboratorio y se basa en el protocolo de Liston (1992); con los siguientes reactivos: ddH₂O 70.5 µl, DMSO 2% 3µl, BSA 10mg/µl 2µl, Buffer 20 X 5 µl, MgCl₂ 25 mM 6 µl, dNTPs 10mM 4 µl, primer ITS5 50pM 2 µl, primer 26S25r 50 pM 2 µl, templado 5 µl y enzima taq 5U/ml 0.5 µl. Las características y función de cada reactivo se describen en el apéndice II.

Estas cantidades son las que se necesitan para amplificar el ITS de un sólo individuo, para hacer un número mayor de amplificaciones, se hizo lo siguiente:

Todos los reactivos anteriores exceptuando el templado y la enzima se añadieron en un tubo Eppendorf en el orden mostrado y según el número de muestras (especies) que queremos amplificar es por lo que se multiplica cada reactivo con los cuales se hace una solución conjunta que evite errores en el micropipeteo. Todo el procedimiento se realizó en frío: se toman 94.5 µl de ésta solución y para cada tubo de reacción, cuidando que la reacción final sea de 100 µl es decir; se agregan 5 µl, de DNA, habiendo agitado previamente a éste, y una vez terminado de poner todos los DNAs en cada tubo se colocan en el termociclador y se inicia el programa número 67 (Vázquez Lobo, 1996).

Con ello la temperatura comienza a subir hasta llegar a la necesaria para la desnaturalización de la doble hebra de ADN, permanece 5 ó 10 segundos y luego comienza a bajar a 72 °C en ese momento se añaden los 0.5 µl de la enzima y se vuelve a cerrar tanto los tubos como el termociclador, hasta que finalice el programa el cual mantiene en la memoria las temperaturas, el número de ciclos y su duración. El volumen final de la reacción es crítico ya que determina el tiempo en que se van a alcanzar las temperaturas requeridas.

Reacción en Cadena Polimerasa PCR

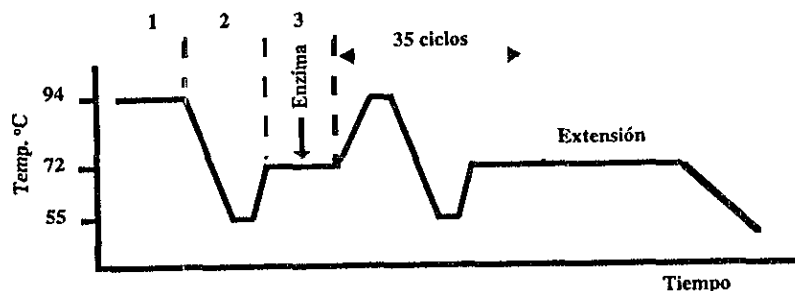


Fig. 4 . Diagrama de los ciclos, la temperatura y los tiempos necesarios para la amplificación por PCR del ITS

2.3 Método de digestiones totales con endonucleasas de restricción (RFLP's)

Una vez amplificada nuestra secuencia blanco para cada especie, se eligieron 9 enzimas que reconocieran 4 pb con la finalidad de obtener un mayor número de sitios informativos; la cantidad de enzima requerida varía según la endonucleasa de que se trate así como la temperatura y si es que necesita o no de BSA para su actividad.

Las condiciones utilizadas para cada enzima fueron las siguientes:

ENZIMA	CANTIDAD μl	TIEMPO hr	TEMPERATURA °C	BSA 1 μl
1000 μl=800U				
Alu I	0.630	6	37	
Bfa I	1.0	24	37	
BstU I	0.5	2	60	
Dpn II	0.5	6	37	
Hae III	0.5	6	37	
Hha I	0.25	6	37	X
Msp I	0.25	6	37	
Rsa I	0.5	6	37	
Taq	1.25	2	65	X

Se siguieron las especificaciones y se usaron los buffers según cada compañía. Dos unidades de enzima por microgramo de DNA son generalmente suficientes para llevar a cabo la digestión, la cual requiere de los siguientes reactivos: H₂O (depende de la cantidad de enzima y del BSA) , buffer 20x 2µl, BSA 10X 1µl, enzima de 1.25 s 0.25 según la enzima y 10 µl de ITS amplificado, Para tener un total de reacción de 20 µl

- 1) Mientras se corta el ITS amplificado, a la temperatura necesaria para que trabaje la enzima, se prepara un gel de 1.5 % de Agarosa en buffer 0.5X TBE (Tris base, Ácido bórico y EDTA); para su disolución se calienta hasta que quede completamente fundido y se agregan 10 µl de bromuro de etidio a concentración de 10mg/µl por 100ml de gel.
- 2) Una vez disuelta la agarosa y antes de que solidifique se vacía en un recipiente y se coloca un peine para formar las pozas; ya fría se retira cuidadosamente el peine de preferencia dentro de la cámara de electroforesis.
- 3) A cada muestra de digestión se le agrega buffer de cargado (0.25% de bromofenol y 30% de glicerol en agua) para facilitar el manejo del fragmento digerido; se toman las muestras mediante micropipetas y se colocan en cada una de las pozas del gel poniendo en cada extremo un marcador de peso molecular en este caso se utilizó el marcador de 100 pb
- 4) El gel se sumerge en una cámara para electroforesis que contiene un buffer 0.5X TBE por el cual pasa una corriente que va del polo negativo a positivo y hace que el DNA el cual es negativo se movilice hacia el polo positivo, permitiendo la separación de los fragmentos de pequeños a grandes; se utilizó una corriente de 100 a 120 volts durante 2 o 3 hr, esto varia dependiendo la concentración del gel; es decir entre mayor sea ésta, se requiere un voltaje mayor, o un mayor tiempo de corrida; esto último depende más del tamaño de los fragmentos que esperamos obtener.
- 5) Una vez corridas las muestras en el gel, éste se observa a través de una cámara de luz ultravioleta, la cual hace luminiscente al bromuro de etidio que a su vez tiene una alta afinidad por el DNA; hay que procurar que todas las bandas se hayan separado lo necesario para visualizarlas lo mejor posible.
- 6) Los resultados se registran mediante una fotografía polaroid o bien a través de un programa de digitalización de imágenes en computadora como Collage™ FOTODYNE, (1994), del cual también se obtiene una fotografía; lo que nos permite el análisis y corroboración de nuestros datos.

Mediante las fotografías obtenidas se calcula el tamaño de cada banda obtenida de la digestión para cada especie, utilizando como referencia marcadores de peso molecular entre los cuales están el de 100 pb y lambda λ (Hindi-Eco); estos marcadores son segmentos de DNA digerido en sitios específicos, que presentan fragmentos de peso y tamaño conocidos, y corren a la par de nuestras muestras, dándonos un parámetro del tamaño de cada banda. También podemos confirmar el tamaño total del amplificado, al sumar todos los fragmentos. Para el tamaño final, debemos considerar un rango entre 80 a 100 pares de bases más, debido a la secuencia que reconocen los "primers".

2.4 Reconstrucción filogenética, biogeográfica y método comparativo

2.4.1 Métodos de parsimonia y distancia

Se construyó una matriz de caracteres mediante el programa Mac Clade (Madisson & Madisson, 1992) a partir de cada fragmento; es decir, de manera vertical se enumeran los OTU's o taxa y de manera horizontal los caracteres. En este caso se usaron fragmentos y se codificó a la matriz con 1 y 0 para presencia y ausencia respectivamente. Esta matriz se metió al análisis filogenético con el programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony versión para Macintosh; desarrollado por Swofford; 1993 versión 3.04); dentro de éste programa existen tres tipos de búsqueda: exhaustiva, branch and bound y heurística, el uso de estos tres tipos de búsqueda depende del número de OTU's con que se trabaja así como la capacidad de memoria de la computadora y su velocidad.

Para poder dar polaridad al árbol se utilizó a *Picea* como grupo externo y se le dió el mismo tratamiento que a todas las especies de pinos, indicando en la búsqueda que ésta fuera tomada como grupo externo.

Para hacer más eficiente el método, se da la información al programa para que ignore los caracteres no informativos, el orden de adición de taxas no es de gran importancia en el caso de que no se tengan hipótesis de evolución a priori, lo cual es poco común para los caracteres moleculares, sin embargo en algunas ocasiones, cuando usamos datos morfológicos, se puede facilitar la adición, si se le da un orden; la adición puede ser al azar o por cercanía, (Li y Graur 1991). Cuando se define el grupo externo, por omisión, éste será el taxa por el cual se comience. A todos los caracteres se les dió el mismo peso.

Dado que el grupo de especies con las que se trabajó fué demasiado grande, la búsqueda exhaustiva no pudo aplicarse a toda la base de datos por lo que se hizo una búsqueda heurística la cual disminuye la certeza de una búsqueda óptima, pero también disminuye el tiempo de cómputo (Swofford 1993). Esta búsqueda consiste en la utilización de un árbol generado al azar para comenzar el proceso. Sobre él, se realizan los distintos rearrreglos para reducir el número de pasos. Al encontrar un árbol de menor longitud, se le adicionan taxa. Cuando no hay manera de mejorar el árbol se puede reiniciar con otro árbol; la búsqueda se puede optimizar realizando varias repeticiones iniciando con árboles distintos y especificando las opciones de arreglo de los clados.

Para estimar la confiabilidad estadística de los árboles se usó la técnica de "bootstrap" (Li y Zharkikh, 1994) el cual es un método de submuestreo o remuestreo en donde se van haciendo reemplazamientos, duplicando una columna completa de un carácter la cual va a remplazar a otra, con lo que se genera una matriz de caracteres diferentes, a partir de la cual se genera un nuevo árbol y así sucesivamente.

El nivel de confianza se estimó por el porcentaje de veces que la hipótesis filogenética se sustenta entre el número de replicas de bootstrap (Sanderson, 1995). Se usaron 100 réplicas para el análisis con todas las especies y 500 para los haplotipos diferentes y los valores de cada rama nos indican el porcentaje de veces que ese clado se mantuvo igual durante todas las réplicas.

Para poder hacer el análisis de los RFLP's a través del método de distancia, la matriz de datos codificada con 0 y 1 se sustituyó por una matriz de distancia para lo cual fué necesario estimar el número de fragmentos compartidos entre cada una de las parejas de especies contra todas las demás; éste análisis se llevo a cabo en el programa MEGA 1.02 (Kumar, et al 1993). Se usó la siguiente fórmula para estimar F que es el número de fragmentos compartidos

$$F = \frac{2mxy}{mx + my}$$

En donde "y" y "x" son las dos especies o taxa diferentes a comparar y mx, my son el número de fragmentos en total de cada taxa y mxy es el número de fragmentos compartidos. Después con la formula:

$$D = 1 - F$$

Convertimos los valores de similitud o fragmentos compartidos a valores de distancia genética. Para encontrar los valores de F y D antes mencionados se utilizó el programa Microsoft Excel 5.0; (1995)

La matriz de distancia se analizó en el programa MEGA 1.02 (Kumar et al, 1993). Se construyó un árbol con el método "Neighbor joining", sólo con los haplotipos sin utilizar grupo externo.

2.4.2 Tasas de sustitución y calibración temporal del árbol filogenético.

Una vez obtenida la F, se substituye en la formula $G = F/4$ (Gaut et al., 1997) y este valor se usa en la siguiente ecuación $G = [F(3-2G)]^{1/4}$ ésta ecuación se resuelve por un proceso de iteración obteniendo un valor de G el cual se substituye en la siguiente fórmula:

$$K = -(2/r) \ln(G)$$

en donde r = al número de pb que reconoce la enzima y K es la tasa de sustitución (Gaut et al., 1997). Para hacer tales estimaciones se utilizó el programa Microsoft Excel 5.0 (1995)

Conociendo las tasas de sustitución entre todas las especies se hizo una prueba de las distancias relativas entre especies del subgénero *Sirobus* vs *Pinus* y también dentro de cada subgénero; es decir entre subsecciones con el objeto de encontrar si existen diferencias significativas en las tasas de sustitución dentro del género *Pinus*.

El modelo que se utilizó para conocer las tasas relativas de sustitución, (Wilson, 1973) no necesita saber los tiempos de divergencia por lo que resuelve la controversia sobre la incongruencia entre el reloj molecular y el tiempo de divergencia. La lógica matemática es la siguiente:

$$K_{AC} = K_{OA} + K_{OC}$$

En donde C es el grupo externo, O es el último ancestro que compartieron A y B; K_{AC} es el número de sustituciones entre el grupo externo y una especie del grupo interno, K_{OA} es el número de sustituciones que han ocurrido en A desde la divergencia con la especie B y K_{OC} es el número de sustituciones que se han acumulado desde que divergió el grupo externo hasta antes de la divergencia entre las especies A, B del grupo interno.

La elección del grupo externo se hizo basándonos en la especie que se encontraba igualmente cercana (topológicamente) a las dos especies a comparar.

El tiempo que ha pasado desde que las especies A y B compartieron el último ancestro común, es por definición, igual en ambos linajes; de esta manera tenemos que K_{OA} y K_{OB} deberían de ser iguales a

$$\delta = K_{OA} - K_{OB},$$

en donde δ no puede ser diferente de 0; con lo cual tenemos:

$$\delta = K_{AC} - K_{BC}$$

Para saber si nuestro valor de δ es significativamente diferente de 0, se comparó con el error estandard; y si el valor absoluto de δ es mas de dos veces el error estandard será considerado significativo en un 5% (Gaut et al., 1997).

$$(K_{AC}-K_{BC}) / SE(K_{AC}-K_{BC})$$

La fórmula con la que se calculo el error estandard fué la siguiente: (Nei y Li, 1979).

$$SE = S/\sqrt{n}.$$

En donde $S = Nxy/No$: Nxy = número de fragmentos compartidos por las dos poblaciones y No =número total de sitios de restricción al tiempo cero

También se hizo un análisis que nos permitió saber si la tasa de sustitución es constante entre grupos monofiléticos, es decir entre, subgéneros y entre subsecciones; la fórmula que se utilizó fué la siguiente

$$r = d_{10} + d_{12} - d_{20} / d_{20} + d_{12} - d_{10}$$

En donde d_{10} es la distancia promedio de un grupo monofilético al grupo externo, d_{20} es la distancia promedio del otro grupo a comparar al mismo grupo externo y d_{12} es la distancia que existe entre los dos grupos que se comparan. La hipótesis nula supone que $r = 1$; sin embargo, debido a la varianza en r se utilizó el estimador estadístico Z (Li y Bousquet, 1992)

Una vez corroborado que no existen diferencias significativas en las tasas de sustitución entre cada rama del árbol filogenético; se utilizó el registro fósil así como el tiempo de algunos eventos morfotectónicos, para calibrar el árbol y darle un tiempo real de especiación, la suposición fundamental de esto es que opera un reloj molecular y la tasa es constante.

Se tomó el registro fósil del pino mas antiguo y de otros registros fósiles que se tienen para pinos viendo con que secciones o subsecciones los han relacionado por sus características morfológicas y de

que período datan. *P. canariensis*, la cual se distribuyen en islas oceánicas de las que se tiene el tiempo de aparición nos da una referencia en tiempo real de la distancia de esta especie respecto a su grupo más cercano. Se sabe que Tenerife, la isla más oriental, y la más antigua, tiene 15.7 m.a. de haberse formado (Aucochea et al, 1990, revisada en Thorpe et al., 1994), otra referencia geológica es la aparición de los Himalaya.

Con esta información se calculó el tiempo de divergencia según la distancia entre cada rama para todas las especies. Este tiempo se corroboró de nuevo con la datación de los registros fósiles mas recientes que se tienen de algunas subsecciones del género, como es el caso de la subsección *Oocarpae* para la cual se tienen registros relacionados con las siguientes especies; *P. greggii*, *P. patula*, *P. pringlei*, *P. attenuata*, *P. radiata*, y de la subsección *Cembroides* con la especie *P. edulis*. También se tiene registro fósil de especies relacionadas con la aparición de cada subgénero. El cálculo se hizo a partir de la fórmula

$$T = K/2r \text{ en donde } T2 = 2 K_{ab} (T1) / K_{ac} + K_{bc}$$

En donde K= distancia génica, T1= tiempo de divergencia respecto al grupo externo, (Takezaki, N. et al, 1995)

2.4.3 Método de análisis biogeográfico

Este análisis se hizo mediante el programa computacional Component (Page, 1993; versión 2.0 para Windows); el cual compara árboles y nos provee un rango de consenso, la comparación puede ser entre árboles de hospederos y parásitos, árboles génicos y árboles de especies, y es la primera propuesta para computar cladogramas de área para análisis biogeográficos.

Dicho análisis requiere de una base de datos que contenga ordenados en una columna las especies bajo estudio y cada una de las áreas que ocupa en la actualidad y otra base de datos en la misma hoja en donde se tenga a manera de texto la reconstrucción filogenética que elegimos; a partir de estos datos se obtiene un árbol a través de una búsqueda heurística y se hace un consenso estricto.

Una vez obtenido el árbol consenso, se da tiempo geológico a las áreas elegidas y se compara con el árbol de especies para contrastar nuestras hipótesis biogeográficas de vicarianza o dispersionismo.

La reconstrucción filogenética que se utilizó fué únicamente de las especies (30 especies y *Picea*) que representaban cada uno de los haplotipos diferentes para los dos subgéneros y que mantienen un rango de distribución restringido. Esta filogenia, también se utilizó para analizar cada subgénero por separado, es decir la filogenia se editó en dos partes. La codificación de áreas bajo la cual se trabajó fué la clasificación de las áreas geológicas de México presentada por Ridley (1996). Así mismo otro análisis que se hizo fué con aquellas especies del Subgénero *Strobos* y *Pinus* por separado; para lo cual se corrió

un nuevo árbol a través de una búsqueda branch and bound en el programa PAUP y se pasó a formato para hacer el análisis en el programa Component.

Un estudio sobre la historia biogeográfica de la región holártica (Enghoff, 1995) encontró que la relación disyunta de especies en un cladograma de área se da con mayor frecuencia en niveles taxonómicos más altos, es decir en taxa más antiguos, que reflejan las configuraciones paleocontinentales, a diferencia de un tipo de distribución continua que es característico de taxa más recientes.

La hipótesis de trabajo de este análisis es que si los eventos geológicos más importantes en México como son la aparición de Sierras y Valles, influyeron en la especiación del género *Pinus*, entonces la filogenia de áreas deberá coincidir con nuestra filogenia de especies. Con base en la hipótesis propuesta por Little y Critchfield, de que la aparición de el subgénero *Pinus* antecedió al subgénero *Strobus*, esperamos que el Subgénero *Pinus*, presente una distribución disyunta en contraste con una distribución continua para *Strobus*.

2.4.4 Método comparativo: mapeo de caracteres morfológicos sobre la filogenia

Para este análisis fué necesario utilizar la filogenia más robusta que se obtuvo y sobre de ella se analizó como se distribuyen algunas de las características morfológicas de interés con lo que se pretende analizar la evolución de características que se encuentran correlacionadas y/o que tienen que ver con algunas hipótesis adaptativas de los pinos.

- 1) Tipo de yema (glabra o pubescente)
 - resina en yema (ausente o presente)
 - espina en cono (ausencia o presencia)
- 2) Tamaño de la semilla (3mm., 6mm, 9mm, 12mm, 15, >15)
 - presencia de ala y tipo de esta (ausente, articulada, adnada y rudimentaria)
 - longitud del ala (1-5 mm, 6-10mm, 11-15mm, 16-20, 21-25mm > 25mm)
- 3) Número de hojas en fascículo (1, 2, 3, 4,)
 - tamaño de las acúculas (más de 30cm, 30cm, 25cm, 20cm, 15cm, 10cm, 5cm.)
 - tipo de crecimiento en la hoja (rígido erecto, colgante, flexible)

Estas características se ordenaron en una matriz en el programa Mac Clade (Madisson & Madisson, 1992). Los árboles que se obtuvieron en PAUP (Swofford, 1993), se exportaron a Mc Clade para poder observar la distribución de las características antes mencionadas y contrastarlas con nuestras hipótesis de evolución morfológica. (Fig. 10)

En este programa se mapeo la distribución de cada uno de los caracteres por separado. Después se hizo un análisis de correlación con el programa computacional COMPARE 1.0 dentro de cada grupo de los 9 caracteres para probar si la relación que suponen nuestras hipótesis es estadísticamente significativa.

Para ello se hizo lo siguiente: Se creó un archivo en el cual se guardó a manera de texto la topología del árbol sobre el cual se trabajó y otro archivo, el cual contiene los valores de distancia para cada rama del árbol. Por último se crearon nueve bases de datos diferentes; es decir que se formaron tres conjuntos de caracteres morfológicos, cada uno con tres características que se relacionan con cada una de las tres hipótesis que aquí proponemos y se analizaron las correlaciones para cada grupo de caracteres.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Implicaciones Sistemáticas

La reconstrucción filogenética que se obtuvo en nuestro análisis, tiene agrupaciones monofiléticas muy similar a clasificaciones antes propuestas; el análisis de Neighbor joining confirma la monofilia de los Subgéneros *Strobos* y *Pinus*. (Fig. 7)

Sin embargo el uso de *Picea mex.* como grupo externo tanto en el análisis de parsimonia, como el de distancia sugieren, en el primer caso, que el Subgénero *Strobos* no es monofilético, debido a que la subsección *Strobi* se agrupa con el subgénero *Pinus* en un clado parafilético, (Fig. 5,6), y en el segundo caso, la subsección *Sylvestres* se agrupa con el subgénero *Pinus*, en un clado parafilético. A pesar de lo anterior el orden en que aparecen los grupos y la delimitación de cada subsección, permanece igual en los dos métodos.

En cuanto a las reconstrucciones con el método de máxima parsimonia se encontró una resolución para la subsección Cembroides dentro del género en México, sustentada por valores altos de bootstrap en donde *P. nelsonii*, una especie problemática para su clasificación, propuesta como única representante de una nueva subsección *Nelsoniane*, (Van der Burgh; 1973); se agrupa como la especie mas ancestral del grupo de los cembroides con un valor de confiabilidad del 100% en 500 replicas. Sin embargo, tomando en cuenta que la distancia genética del clado *P. halepensis* y *P. brutia* respecto a la Sección *Pinus* es menor, a la distancia genética que presenta *P. nelsonii* respecto al grupo cembroides. Esto probablemente es la causa de su posible ubicación en una subsección diferente.

En contraste con análisis hechos por Pérez de la Rosa et al., (1995) *P. quadrifolia* y *P. pinceana* ocupan una posición ancestral dentro del grupo de los cembroides, pero solo *P. quadrifolia* presenta un valor de confiabilidad del 90% y una distancia de por lo menos la mitad respecto a *P. nelsonii*, mientras que *P. pinceana* se encuentra por debajo del 50%. Su posición cambia tanto en los árboles encontrados bajo el método de parsimonia como en el análisis de Neighbor joining, en el cual se encuentra a la base de *P. johannis* y *P. cembroides* que forman un grupo monofilético, diferente al de *P. maximartinezii*, *P. rzedowskii* y *P. edulis* como especie basal de ambas (Fig. 7).

Con base en estudios morfológicos (Klaus; 1989), al igual que para *P. nelsonii*, *P. rzedowskii* se ha propuesto como único representante de una nueva subsección *Rzedowskianae*. Sin embargo en el presente estudio, *P. maximartinezii* y *P. rzedowski* forman un clado monofilético consistente tanto para el método de distancia como para el de parsimonia, con un valor de bootstrap de 99%. Sin embargo la distancia con respecto a las demás especies del grupo cembroides no es tan grande como para crear una subsección diferente. Estos dos métodos sugieren que este clado es el mas reciente dentro del grupo.

La Subsección *Strobi*, que se resuelve casi en todas sus ramas excepto *P. strobiformis*, *P. ayacahuite* y *P. flexilis*, como se menciona anteriormente en el análisis de parsimonia, forma un grupo parafilético con el subgénero *Pinus* respecto al cual es más ancestral (Fig. 5,6).

P. reflexa que es considerada una variedad de *P. flexilis* (Martínez M. 1948), se separa como una especie basal de las tres especies antes mencionadas con un valor de confiabilidad de 77 y 81% respectivamente; *P. chiapensis* y *P. lambertiana* son las especies más ancestrales del grupo.

En cuanto al subgénero *Pinus*, este se agrupa en tres Subsecciones, dos para las especies mexicanas y una para las especies asiáticas, *Ponderosae*, *Oocarpae* y *Sylvestres* respectivamente.

En la Subsección *Oocarpae*, las especies se agruparon en dos clados monofiléticos, uno formado por *P. oocarpa*, *P. attenuata*, *P. herrerae*, *P. caribaea* y *P. radiata*; y otro grupo que además de incluir a *P. pringlei*, *P. patula*, *P. chihuahuana* y *P. greggii* también incluyó a *P. leiophylla* y *P. lumholtzii* que han sido clasificados dentro de la subsección *Leiophyllae* por Little & Critchfield; (1969), esto es congruente con análisis de isoenzimas y de cpDNA reportados por Karamangala & Nickrent; (1989) Krupkin (1996) respectivamente. Estos autores encuentran que *P. leiophylla* está estrechamente relacionado con *P. oocarpa* y *P. pringlei*.

Básicamente, *P. leiophylla* y *P. lumholtzii* han sido tratadas como una subsección aparte, con base en caracteres morfológicos como por ejemplo el fascículo decídúo, el cual sólo lo presentan los pinos del Subgénero *Strobos*, sin embargo filogenias basadas en DNA de cloroplasto implican que el carácter antes mencionado es una homoplasia entre los grupos (Krupkin et al., 1996)

Los dos grupos antes mencionados dentro de la Subsección *Oocarpae* presentan un valor de confiabilidad en 100 replicas de bootstrap, del 84 % para el primero y 85% para el segundo. Esto es congruente con la hipótesis de crear una nueva subsección *Attenuatae* que incluya las especies de las costas del pacífico (Van der Burgh, 1973; Krupkin, 1996). Sin embargo, la distancia genética entre estas dos subsecciones es corta.

Híbridos tanto naturales como artificiales se dan de manera exitosa dentro de la supuesta Subsección *Attenuatae*, la hibridación con las demás especies de pinos de la subsección *Oocarpae* es muy difícil. Sin embargo, en *P. muricata* las dos variedades que se han encontrado, son fuertemente incompatibles (Critchfield; 1967).

En este estudio, *P. muricata* el cual debiera agruparse con esta nueva subsección, se encuentra a la base de estos dos grupos y a una distancia considerable de *P. attenuata* y *P. radiata*, esta situación podría responder, al hecho de que las hibridaciones con esta especie sean menos frecuentes.

P. caribaea y *P. oocarpae*, se agrupan en esta nueva subsección, lo cual sugiere dos cosas, una que efectivamente como lo reportan Styles et al., (1982); y Krupkin et al., (1996) existe una relación filogenética muy estrecha con probables eventos de hibridación intersubseccional, ó simplemente *P. caribaea* es una variedad de *P. oocarpae*.

En cuanto a la subsección *Ponderosae* hubo poca resolución ya que 10 especies se agrupan en una politomía, solo *P. durangensis*, *P. jeffreyi* y *P. michoacana*, se resolvieron en el cladograma, aunque en

el análisis de bootstrap muestran una baja confiabilidad. En el análisis de Neighbor joining se resuelve un nuevo clado formado por *P. hartwegii* y *P. arizonica*.

El clado que incluye a las especies *P. brutia* y *P. halepensis*, obtuvieron un valor de bootstrap de 100 % mientras que *P. roxburgii* del 90%, esta última especie mantiene una distancia mayor respecto al clado (*P. brutia* y *P. halepensis*) que la distancia que existe entre las Subsecciones *Oocarpae* y *Ponderosae*, lo cual no corresponde con análisis de aloenzimas (Cankle et al., 1988; Klaus, 1989) que sugieren la inclusión de *P. roxburgii* en una nueva Subsección *Halepenses* que incluye a la especie *P. halepensis*. Rushforth, (1987) incluye a estas tres especies en la Sección *Pinaster*; Little & Crichtfield, (1969) separan a *P. roxburgii* en la Sección *Pineae* y a *P. halepensis* y *P. brutia* en la Sección *Pinus*.

Con base en lo anterior se ha propuesto que la Sección *Pineae* y la Sección *Pinus* no pueden ser grupos monofiléticos si incluimos a las dos especies antes mencionadas de la subsección *Sylvestres* dentro de la sección *Pinus*. Los análisis filogenéticos aquí presentados tanto de distancia como de parsimonia muestran una mayor relación entre *P. roxburgii* y la Subsección *Oocarpae* Sección *Pinus* y a *P. halepensis* y *P. brutia*, como un clado más ancestral con una distancia genética mayor, similar a la distancia genética entre las secciones del subgénero *Strobus* y *Pinus*, esto nos sugiere que *P. halepensis* y *P. brutia* podrían agruparse en una nueva sección; lo cual contrasta con la clasificación propuesta por Little & Crichtfield, (1969).

Estudios, con híbridos artificiales, muestran que *P. montezumae* se puede cruzar con diversas especies como *P. engelmanni*, *P. jeffreyi* y *P. ponderosa* (Little & Righer, 1965), lo que mantiene una conexión, en términos de entrecruzamiento entre *P. ponderosa* del grupo *Montezumae* y especies del grupo *Ponderosae* (Martínez, 1948) por lo que se ha incluido en la Subsección *Ponderosae*. En nuestro análisis *P. montezumae*, queda incluido en la misma Subsección, solo que al parecer presenta una tasa de sustitución nucleotídica en el ITS diferente a las demás especies.

Estudios de secuencias del ITS en pinos, muestran que la exclusión de algunos taxa de probable origen híbrido, modifica en gran medida la topología del árbol, es decir la posición de alguna o varias ramas (Liston et al en prep.).

En el presente estudio, se hicieron algunas pruebas excluyendo especies que presentan diferencias significativas en cuanto a las tasas genéticas, tales como *P. jeffreyi* y *P. muricata*, *P. lambertiana*, *P. montezumae* y *P. roxburgii* así como especies que tienen una posición poco estable en la filogenia; como es el caso de *P. michoacana*.

Dentro de estas seis especies, sólo *P. michoacana*, *P. montezumae* y *P. jeffreyi* han sido consideradas como especies que probablemente hibridizan con otras del mismo subgénero. Lo cual nos hace pensar que pudieran tener un origen híbrido y que han mantenido, la capacidad de entrecruzarse con las líneas que les dieron origen.

Excluyendo únicamente a *P. michoacana* de la filogenia de haplotipos, se dieron cambios considerables, los valores de bootstrap aumentaron para la subsección *Ponderosae*, pero ésta, disminuyó su resolución. La distancia genética de *P. jeffreyi* respecto a las especies más cercanas, aumentó considerablemente de 10 a 15, y cambió su posición en la filogenia, de estar a la base de la subsección *Ponderosae*, paso a formar parte de una politomía. *P. montezumae* se resolvió como una especie ancestral a este grupo, y disminuyó su distancia genética.

Otro cambio se dio cuando excluimos a *P. montezumae*, con lo que se resuelven mejor las especies *P. durangensis*, *P. jeffreyi* y *P. michoacana* dentro de un mismo clado, pero con valores mas bajos de bootstrap; sin embargo el clado formado por especies de la Subsección *Oocarpae* y *P. roxburgii* aumentan sus valores de confiabilidad.

La exclusión de ésta última especie también, ocasiona algunos cambios, el más notorio en la Subsección *Oocarpae* la cual queda sin resolver, y solo *P. muricata* se resuelve con una confiabilidad de 68 %; sin embargo el clado que mantiene las especies de la Subsección *Ponderosae* tiene una mayor resolución, presentando valores más altos que cuando excluimos a *P. montezumae*. Del mismo modo, los valores de confiabilidad que sustentan a las dos subsecciones del Subgénero *Pinus* aumentaron.

La ausencia de *P. jeffreyi*, ocasiona un cambio radical en la posición de *P. michoacana*, ubicándose a la base de todo el subgénero *Pinus*, con lo cual los valores de bootstrap también se modifican, aumentando para *P. muricata*, y para la Subsección *Ponderosae* la cual pierde resolución. La rama de *P. michoacana* muestra un valor de 61% de confiabilidad. Por último, la exclusión de *P. muricata*, desestabiliza las posiciones tanto de *P. jeffreyi* y *P. durangensis*, pero solo cuando mantenemos a *P. lambertiana* en el análisis, ya que cuando esta última es excluida junto con la otra, estas especies vuelven a una posición estable con valores de bootstrap confiables.

Una explicación alternativa a la hipótesis de que el origen híbrido y la capacidad de hibridizar de estas especies, modifica, la topología del árbol, puede ser el que se altera el número de sitios informativos, así como las distancias genéticas, las cuales hacen parecer más resuelta o no una filogenia. Sin embargo, es necesario explorar la variación que puede existir a nivel intraespecífico y corroborar si en realidad se trata de especies híbridas o no.

La primer filogenia que presentamos, sólo incluye los haplotipos diferentes, se obtuvo por un consenso de 4 reconstrucciones igualmente parsimoniosas, obtenidas de una búsqueda heurística por adición simple con el método bipartición y reconexión del árbol (TBR); ésta búsqueda, se repitió varias veces para los 4 modos diferentes de adición de taxa (como es, random con 100 réplicas, simple y por cercanía) y con los tres diferentes métodos (TBR, SPR y NNI), y siempre se obtuvo la misma topología.

El número de caracteres informativos que se tienen determinó la longitud del árbol, así como el número de árboles igualmente parsimoniosos, es decir que nuestra base de datos muestra suficientes caracteres informativos con los que el número de árboles iguales disminuyó.

Los índices de retención y de consistencia, describen que tan bien los datos mantienen el árbol y el bootstrap nos habla de la confiabilidad para cada rama. Estos valores son más altos para el subgénero *Strobus* que para el subgénero *Pinus*.

El segundo árbol, incluye todas las especies con que se trabajó, y al igual que para los haplotipos, éste se obtuvo de una búsqueda heurística simple en la cual se encontraron 8 árboles igualmente parsimoniosos con los que se generó un nuevo árbol por consenso estricto.

En este caso se muestra que algunas de las ramas en la subsección Cembroides y Ponderosae tienen una baja confiabilidad, es decir no aparecen resueltas en la búsqueda de bootstrap, debido a que los valores se mantiene por abajo del 50% y no aparecen en las ramas.

Comparado con los análisis de parsimonia, el método de distancia Neighbor joining muestra una resolución para cada rama además de agrupar en clados monofiléticos las especies *P. oocarpa* y *P. caribaea*, *P. hartwegii* y *P. arizonica*, *P. johannis* y *P. cembroides*, *P. maximartinezii* y *P. rzedowskii*. Sin embargo no podemos estar seguros de que estas relaciones muestren las verdaderas relaciones de ancestría entre las especies, debido a que el mismo método no supone estar reflejando la historia evolutiva, ya que se basa en las distancias genéticas únicamente.

En contraste con los árboles anteriores, Neighbor joining, mantiene la monofilia de los subgéneros, siempre y cuando no se incluya a *Picea* como grupo externo, si este es el caso, observamos que se forman dos grandes grupos, el primero contiene a todas las especies del Subgénero *Strobus*, a *Picea* en la base de este grupo seguido de las especies de la subsección Sylvestres del subgénero *Pinus*, y en el otro grupo quedan todas las especies del subgénero *Pinus* exceptuando las antes mencionadas. Sin embargo el agrupamiento entre las especies dentro de las diferentes subsecciones permanece igual que cuando no incluimos *Picea*.

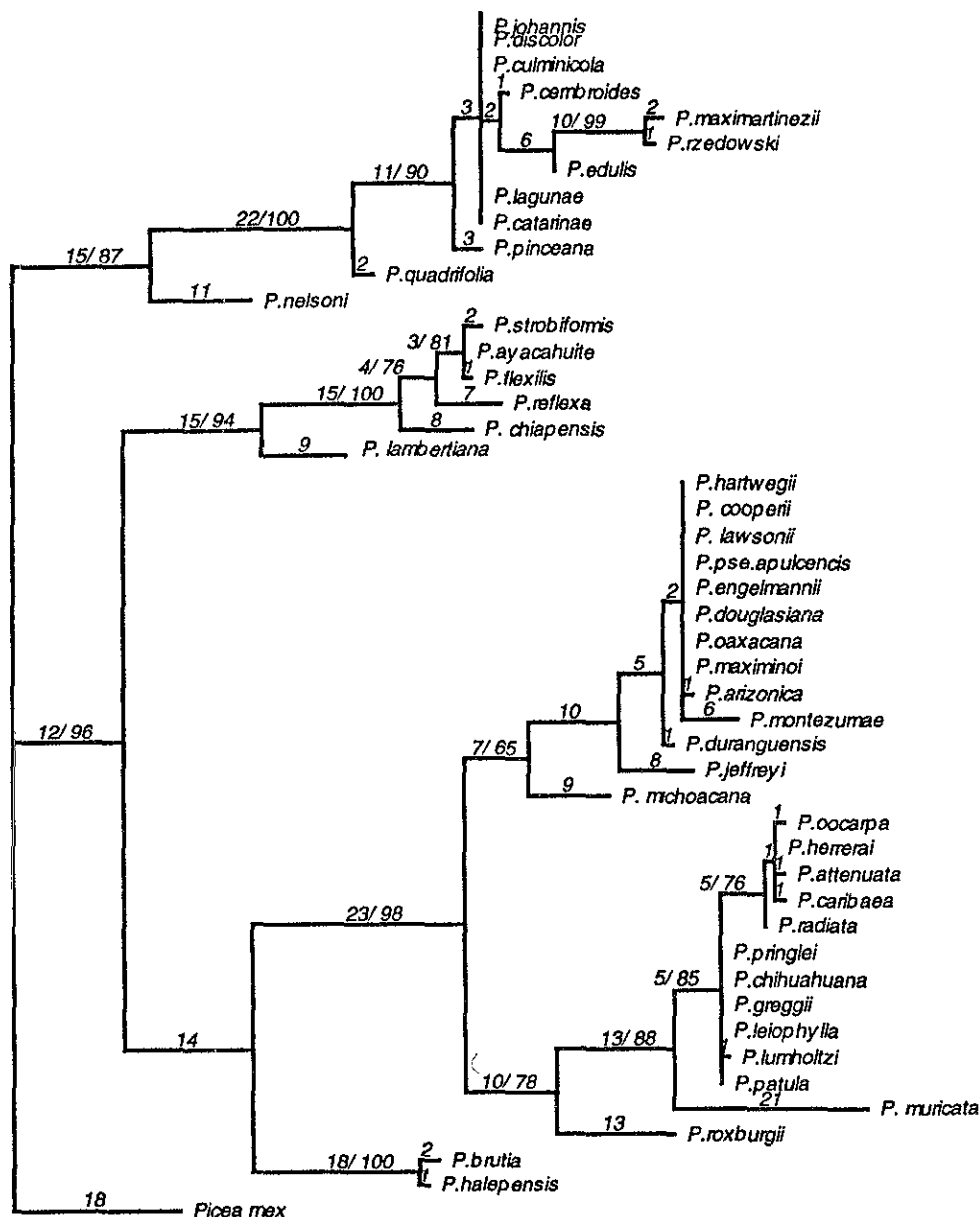


Fig 6. Reconstrucción filogenética de todas las especies estudiadas, mediante la búsqueda heurística por adición de secuencias al azar 100 replicas, (metodo de bipartición y reconexión del árbol). 100 réplicas de bootstrap (longitud= 362, CI= 0.462 RI= 0.881). Valores de distancia/ bootstrap

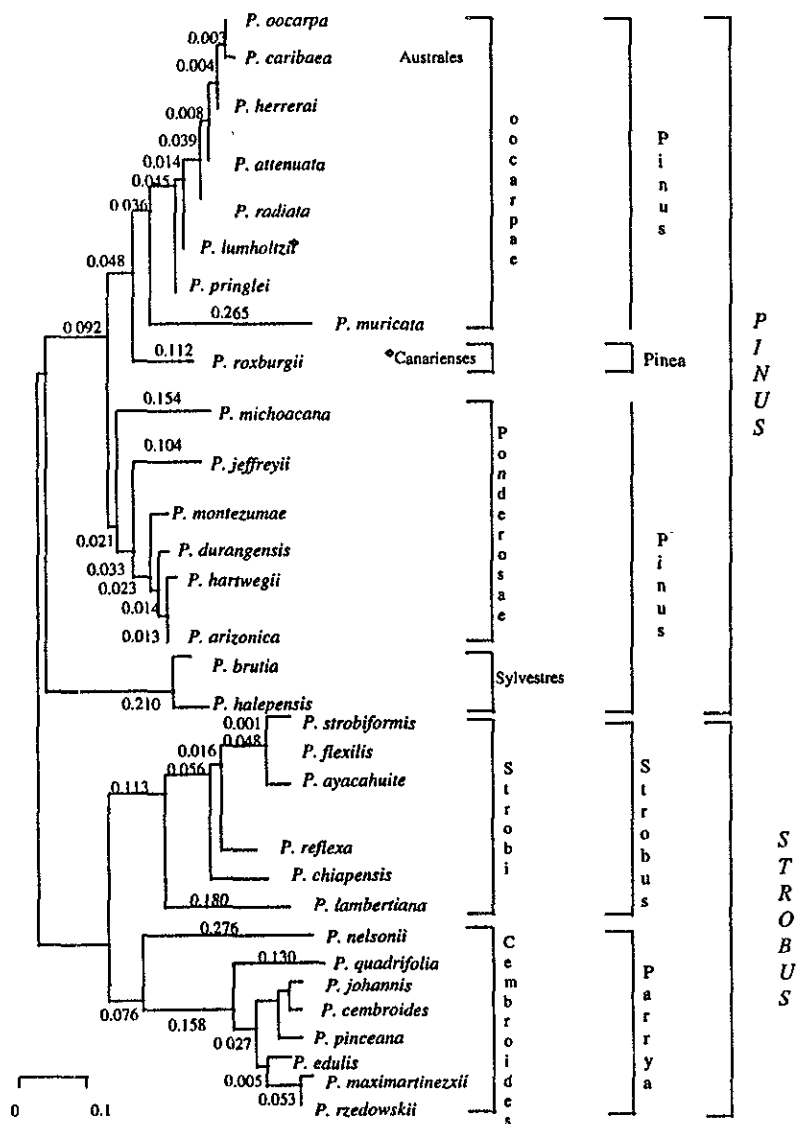


Fig. 7 Dendrograma reconstruido en función a la distancia, utilizando el método Neighbor Joining, los valores que se muestran son las distancias genéticas entre especies

3.2 Evolución molecular

Las tasas de sustitución que existen en 680 pb aprox. del ITS entre las diferentes especies del género calculadas de datos de secuencias (Piñero et al. en prep.) muestran ser generalmente constantes, por lo que su uso como marcador de los cambios evolutivos en el género *Pinus* resulta confiable. Con datos de RFLP's para el ITS total, se calculó la tasa de sustitución, entre grupos, es decir se comparó la tasa de sustitución (K) entre subsecciones y entre especies dentro de cada subsección y no se obtuvieron diferencias significativas, (Tabla 1 y 2) excepto en algunas especies como *P. michoacana*, *P. muricata* y *P. lambertiana*.

Sin embargo suponemos que las tasas de homogeneización, dentro de poblaciones, para las especies en las que se detectaron bandas extra, no puede ser mayor a la tasas de especiación; debido a que se encontró una mayor variabilidad entre diferentes individuos de una misma especie que entre especies diferentes (tabla 3).

Esto puede tener varias explicaciones; por un lado, la hipótesis de que probablemente estas variaciones intrapoblacionales se deban a fenómenos de evolución reticulada (Rieseberg, H., 1995; Soltis & Soltis, 1993). Por otro lado, el hecho de que algunos individuos presenten adiciones, mientras que otros se mantengan conservados, pueden ser producto de las diferencias en las tasas de homogeneización entre poblaciones consecuencia del grado de entrecruzamiento y flujo génico, así como de los mecanismos de homogeneización.

En contraste, el hecho de que diferentes especies muestren patrones idénticos; pudo deberse a que apenas están divergiendo; de este modo las diferencias acumuladas en el ITS son menores, o bien la tasa de homogeneización pudo ser más rápida, mostrando distancias tan cortas que aparecen como si fuera una politomía en la reconstrucción filogenética o bien como variedades de una misma especie (Shaw 1909 revisado en Martínez, 1984) y no especies diferentes como se ha propuesto. Se ha encontrado que dentro de las unidades repetidas que se transcriben en el rDNA existen pseudogenes que muestran una tasa más alta de sustitución que la de los genes que se transcriben (Buckler E.S. et al. 1996). Por lo tanto es posible que si la unidad que se está amplificando, a veces es el pseudogen y a veces el gen que se transcribe, podemos encontrar como artefacto de lo anterior, mayor variación intraespecífica y otras ocasiones poca resolución entre especies; algo interesante es que la menor resolución o variación interespecífica se encuentra en especies del subgénero *Pinus*, lo cual nos hace pensar que puede existir un menor número de éstos pseudogenes en tal subgénero.

Los clados que contienen a la subsección Cembroides y Strobis, pudieron tener un proceso de homogeneización a tasas mucho mayores que la tasa de especiación, con lo cual es posible identificar sinapomorfías con muestras relativamente pequeñas (Hillis y Mortiz, 1990).

Por lo tanto, encontramos que los taxa se resuelven de manera mucho más detallada en la filogenia de haplotipos, en el subgénero *Strobis* y además de encontrarse en una posición más basal, lo que nos

sugiere que presentan características más ancestrales. Esto corrobora la hipótesis de que algunas especies del grupo *Cembroides* son arquetipos del mismo.

Como mencionamos, en el Capítulo I, el ITS muestra diferencias no solo intraespecíficas sino intraindividuales en otros organismos. Por lo que el ITS en *Pinus* no se encuentra exento de ésta variación, sin embargo esto no ha sido comprobado.

La heterogeneidad en el espaciador, parece deberse a la variabilidad en el número de subunidades que se transcriben, que surgen por entrecruzamiento desigual; esto puede ocasionar una pérdida o un aumento en la longitud del ITS lo cual es evidente para *P. nelsonii* (Fig. 8).

Subsección	Cembroides	Strobi	Ponderosae	Oocarpae	Sylvestres
Cembroides	1				
Strobi	1.12	1			
Ponderosae	1.06	0.94	1		
Oocarpae	1.09	1.02	0.64	1	
Sylvestres	0.92	0.78	0.73	0.79	1

Tabla (1) Tasas de sustitución entre las diferentes subsecciones utilizando como grupo externo *Picea*, a excepción de la comparación entre *Ponderosae* y *Oocarpae* para la cual se utilizó *P. halepensis* como grupo externo.

	johannis	cembroides	pinceana	maximartinezii	edulis	rzedowskii
cembroides	-0.14563					
pinceana	0.467719	0.57925				
maximartinezii	0.268108	0.38635	0.413125			
edulis	0.296285	0.40925	0.435258	-0.167300		
rzedowskii	-0.39930	-0.28194	-0.25495	-0.841491	-0.66446	
nelsonii	-0.91808	-0.80169	-0.77497	-1.33147	-1.178816	-1.172406

Tabla (2a) valores sobre las tasas de sustitución, estimados a partir de la fórmula $Kac-Kbc/SE$, dentro de la subsección *Cembroides* usando como grupo externo *P. ayacahuite*.

	strobiformis	ayacahuite	flexilis	reflexa	chiapensis
ayacahuite	-0.220566				
flexilis	-0.181637	0.038984			
reflexa	-0.510063	-0.290457	-0.329344		
chiapensis	-0.469314	-0.249645	-0.288536	0.040757	
lambertiana	-3.596931	-3.323272	-3.372396	-2.940792	-3.007686

Tabla (2b) valores sobre las tasas de sustitución, estimados a partir de la formula Kac-Kbc/ SE, dentro de la subsección *Strobi* usando como grupo externo *P. cembroides*. *P. lambertiana* es la única especie que muestra una diferencia significativa en la tasa de sustitución la cual es mayor.

	hartwegii	arizonica	montezumae	jeffreyii	durangensis
arizonica	-0.07911199				
montezumae	-0.23151392	-0.15255261			
jeffreyii	-1.00074839	-0.9237529	-0.77231248		
durangensis	-0.3562579	-0.2772985	-0.12459968	0.65059104	
michoacana	2.17559907	2.22881258	2.32980422	2.87217779	2.3955148

Tabla (2c) valores sobre las tasas de sustitución, estimados a partir de la formula Kac-Kbc/ SE, dentro de la subsección *Ponderosae*, usando como grupo externo *P. oocarpa*. *P. michoacana* es la única especie que muestra una tasa de sustitución menor respecto a las demás.

	oocarpa	pringlei	lumbholtzii	radiata	herrerac	attenuata	caribaea
pringlei	-0.62154						
lumbholtzii	-0.55214	0.070157					
radiata	-0.15634	0.466605	0.396692				
herrerac	-1.95266	-1.36101	-1.42878	-1.80709			
attenuata	-2.07215	-1.48555	-1.55283	-0.14976	-0.129894		
caribaea	-0.23176	0.391036	0.321355	2.311720	1.735860	1.857422	
muricata	-6.55248	-5.93632	-6.01033	-6.34621	-4.39616	-5.65503	-6.32964

Tabla (2d) valores sobre las tasas de sustitución, estimados a partir de la formula Kac-Kbc/ SE, dentro de la subsección *Oocarpae*, usando como grupo externo a *P. hartwegii*. *P. muricata* muestra una

tasa de sustitución mayor. *P. caribaea* y *P. lumholtzii* pertenecen a otras subsecciones, *Australes* y *Leiophyllae* respectivamente.

	brutia	halepensis
roxburgii	0.01941694	
brutia	0.01948518	0.02009114

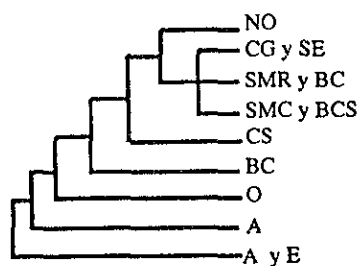
Tabla (2e) Tasas de sustitución estimadas para las especies de la subsección Sylvestres y Canarienses, especies que habitan en Asia y Europa. muestran que no existen diferencias significativas en la tasa de sustitución.

3.3 Hipótesis biogeográficas

Una de las hipótesis biogeográficas mas difundida, es que el tiempo de los eventos de vicarianza, es decir de la aparición de barreras geográficas o biológicas, debe coincidir con los eventos de aparición de las especies. En éste estudio trabajamos dos hipótesis principales, una que argumenta la aparición de diferentes especies tanto del subgénero *Strobus* como *Pinus*, debido a cuatro principales barreras geográficas: la Sierra de Juárez y San Pedro Mártir en Baja California, la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental, La Sierra Madre del Sur y el Eje neovolcánico transversal. Para probar ésta hipótesis se les dio tiempos geológicos a las diferentes serranías con base en análisis de rocas presentados por Ridley (1996) y se trabajó con las zonas geológicas propuestas; considerando que éste tiempo de datación isotópica no tiene una relación directa con la emergencia de tales barreras, sin embargo esto nos sugiere por lo menos un probable orden de aparición que se complementa con las hipótesis geológicas existentes. La segunda hipótesis es que la aparición del subgénero *Strobus* debió anteceder al subgénero *Pinus*.

Con respecto a la primera hipótesis y con base en la datación geológica de Ridley, encontramos, cierta congruencia para los análisis en donde se incluyeron al subgénero *Strobus* y *Pinus* juntos (Fig. 9a). Es decir, el tiempo de aparición de la zona de Baja California (BC) con una datación del paleozoico al cenozoico coincide con el orden de aparición en nuestra filogenia biogeográfica, y con la posición ancestral de las especies *P. quadrifolia* y *P. jeffreyi* , que se distribuyen en esta zona. La siguiente zona que comprende desde las costas de Colima hasta las de Oaxaca (CS) con una datación del paleozoico y un probable surgimiento en el terciario temprano; aparece después y es congruente con el orden filogenético que ocupan las especies que se distribuyen en ésta zona, como por ejemplo *P. chiapensis* y *P. michoacana*. La siguiente área que tiene una edad de 2 m.a. (cuaternario) y corresponde a las Planicies y Sierras del Noroeste y la provincia Chihuahua-Coahuila (NO), toma una posición mas ancestral que las zonas correspondientes al mesozoico y terciario; muy probablemente esto se deba a que en estas zonas se

encuentran las especies *P. pinceana* y *P. nelsonii*, las cuales ocupan posiciones ancestrales en el subgénero *Strobos*. Seguida de esta zona esta la Sierra Madre Occidental (SMC) que data del mesozoico al cenozoico y es en donde se distribuyen la mayor parte de las especies del subgénero *Pinus* y algunas especies del subgénero *Strobos*; la Sierra Madre Oriental (SMR) contiene un mayor número de especies del subgénero *Strobos* y menos de *Pinus* (cretácico hace 138 m.a.) y las costas de Tamaulipas, Veracruz, la Península de Yucatán y una gran parte de Chiapas, (CG y SE) (terciario hace 63 m.a.) quedan incluidas en una politomía.



Strobos y Pinus

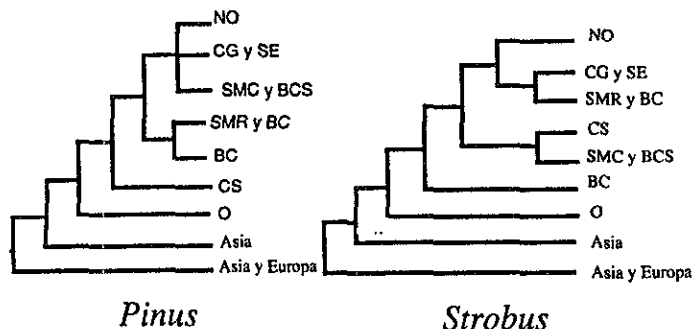
(Fig. 8A) Cladograma de área obtenido a partir de un árbol filogenético generado en el programa PAUP (Fig. 9) (editado como texto) incluyendo ambos subgéneros en el mismo análisis y usando como áreas geológicas las propuestas por Ridley (1996).

- NO= Planicies y Sierras del Noroeste, E. de Chihuahua, O de Coahuila y Planicie Central (2 m.a.)
 CG y SE=Costas y planicies del Golfo Península de Yucatán y Chiapas (63m.a.)
 SMR y BC= Sierra Madre Oriental y Baja California. (138m.a.)
 CP= Costas de Jalisco Guerrero, Michoacán y Oaxaca. (240 m.a.)
 SMC y BCS Sierra Madre Occidental, Eje neovolcánico y Baja California Sur (240 a 2 m.a.)
 BC=BajaCalifornia. (570 a 2 m.a.)
 O= Oaxaca (2500 m.a.)
 A= Asia, Ay E = Asia , Europa

A la base de todas las regiones de México, antes mencionadas se ubicó el área que comprende gran parte del estado de Oaxaca (O) y que data desde el precámbrico hace 2500 m.a. En esta región encontramos a la especie *P. michoacana* la cual ocupa también una posición ancestral dentro de la subsección *Ponderosae* del subgénero *Pinus*. Las áreas, de Eurasia y Asia (los Himalaya) , corresponden a las especies *P. brutia*, *P. hulepensis*, y *P. roxburgii* respectivamente.(Fig. 9a).

Como se observa, nuestra filogenia biogeográfica es congruente sólo en la posición de algunas zonas de Oaxaca y Baja California; pero no se resuelve en el caso de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental.

Sin embargo el análisis de los dos subgéneros por separado, sugiere eventos diferentes (Fig. 8b); es decir, en el caso del subgénero *Strobilus*, la región del (NO), aparece antes del surgimiento de la Sierra Madre Oriental y a las zonas del (CG y SE), pero posterior a todo esto es la aparición de las zonas CS, SMC y BCS. Baja California y Oaxaca mantienen la misma posición ancestral que en el análisis conjunto, sin embargo el subgénero *Pinus* es radicalmente diferente debido a que las áreas más recientes son NO, CG y SE, SMC y BCS las cuales quedan incluidas en una politomía. Anterior a esta politomía se resuelven en un clado SMR, BC y BC (Fig. 8b). A la base de estas zonas se encuentran dos áreas que corresponden al paleozoico y al precámbrico, la primera comprende parte de (CS) y la última a una gran parte del estado de Oaxaca, ésta última zona mantiene una gran complejidad geológica. Se ha planteado que una parte de la Oaxaquia, proviene de la placa Norte Americana y pequeñas subregiones de origen desconocido, son un mosaico de placas independientes. Nuestro estudio, muestra que Oaxaca se mantiene como el área más ancestral en todos los análisis, lo cual podría corroborarse con el origen a partir de la Placa Norte Americana.

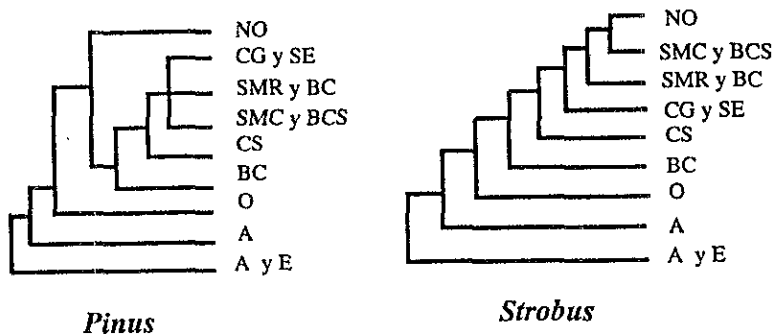


(Fig. 8 B) Cladogramas de área a partir del mismo árbol filogenético usado para el cladograma de la figura 8A pero que al editarse en COMPONENT, fué dividido en los dos subgéneros para su posterior análisis. Se usaron las áreas geológicas propuestas por Ridley (1996).

La relación geográfica de áreas que muestra el análisis por separado de los dos subgéneros, nos sugiere; según las hipótesis geológicas sobre la aparición de las serranías, una distribución (temporal) disyunta para el subgénero *Strobilus* y continua para *Pinus*. Sin embargo la datación geológica propuesta por Ridley (1996), es más congruente con el cladograma de área del subgénero *Strobilus* sugiriendo una distribución de tipo continuo, a diferencia de *Pinus* que mantiene un orden discontinuo, respecto a los tiempos geológicos.

Otro análisis fué hecho con una nueva reconstrucción filogenética para cada subgénero por separado, a través de una búsqueda heurística se obtuvieron los árboles consenso para *Strobos* y *Pinus*, (fig. 9) los cuales se utilizaron para el análisis de COMPONENT (Page, 1993). En éste estudio, el subgénero *Strobos*, presenta una distribución diferente ya que los cladogramas de área contienen un número mayor de especies analizadas, lo que permitió una mayor resolución de las áreas. El orden de las áreas en el cladograma, muestra una mayor correlación con las hipótesis de aparición de las zonas, teniendo la aparición del área, NO y SMC, BCS como el evento mas reciente, anterior a ello, las áreas de SMR, BC, CG, SE, CP, BC, O, Asia y Eurasia. El subgénero *Pinus* también muestra otro orden, manteniendo a la zona de Oaxaca como la mas ancestral, pero seguida de esta se encuentra el área NO (que pertenece al cenozoico), y como un evento posterior, la aparición del área BCN, seguida por la (SMR y BC) y sin resolución para las áreas (NE y SE, CS, SMC y BCS) que se ubican como las más recientes fig.(8C).

En este análisis a diferencia de los anteriores, para los dos cladogramas de área se mantuvo consistente la aparición de la SMR antes que la SMC, así como la posición ancestral de Oaxaca. La presencia del área de Oaxaca como la región más ancestral, nos sugiere hipótesis interesantes como la posibilidad de alguna ruta migratoria por el sur cuando Norteamérica se hallaba cercana a Asia (del cretácico tardío al terciario) o bien se debe a que la gran complejidad geológica que presenta esta zona deja abiertas otra serie de posibilidades a probar.



(Fig. 8 C) Cladogramas obtenidos, a partir de nuevas reconstrucciones filogenéticas generadas en PAUP por el método de búsqueda heurística adición simple y TBR, para cada subgénero editadas en el programa COMPONENT, para su posterior análisis, para el cual se usaron las áreas geológicas propuestas por Ridley (1996).

En conclusión, los análisis hechos para el subgénero *Pinus* tanto en la filogenia reconstruida por separado para cada subgénero (fig.9) ; como en la filogenia que fué dividida en subgéneros *Pinus* y *Strobos* (fig.5) al editarse en COMPONENT, mostraron ciertas incongruencias. La filogenia hecha de

nuevo para *Pinus*, el NO y CS se hallan en posiciones que no coinciden con la hipótesis de aparición, esto pudo deberse a que en el análisis se incluyeron un mayor número de especies que no son tan informativas filogenéticamente y esto trae consigo, el oscurecimiento de eventos que ofrecen más información. En contraste, el subgénero *Strobus* presenta una filogenia de áreas más congruente para el análisis con la filogenia reconstruida por separado (fig. 9B y 9C) y no así para la filogenia que se dividió al editarse (fig.5) la cual muestra una distribución disyunta que argumenta la aparición temprana de *Strobus* anterior a *Pinus*.

La hipótesis propuesta por Enghoff's (1995) utilizando información biogeográfica fundamentada sobre relaciones generales de área, y usando análisis de componentes, nos permitió, probar la radiación reciente del subgénero *Pinus* y anterior a esta una radiación del subgénero *Pinus*.

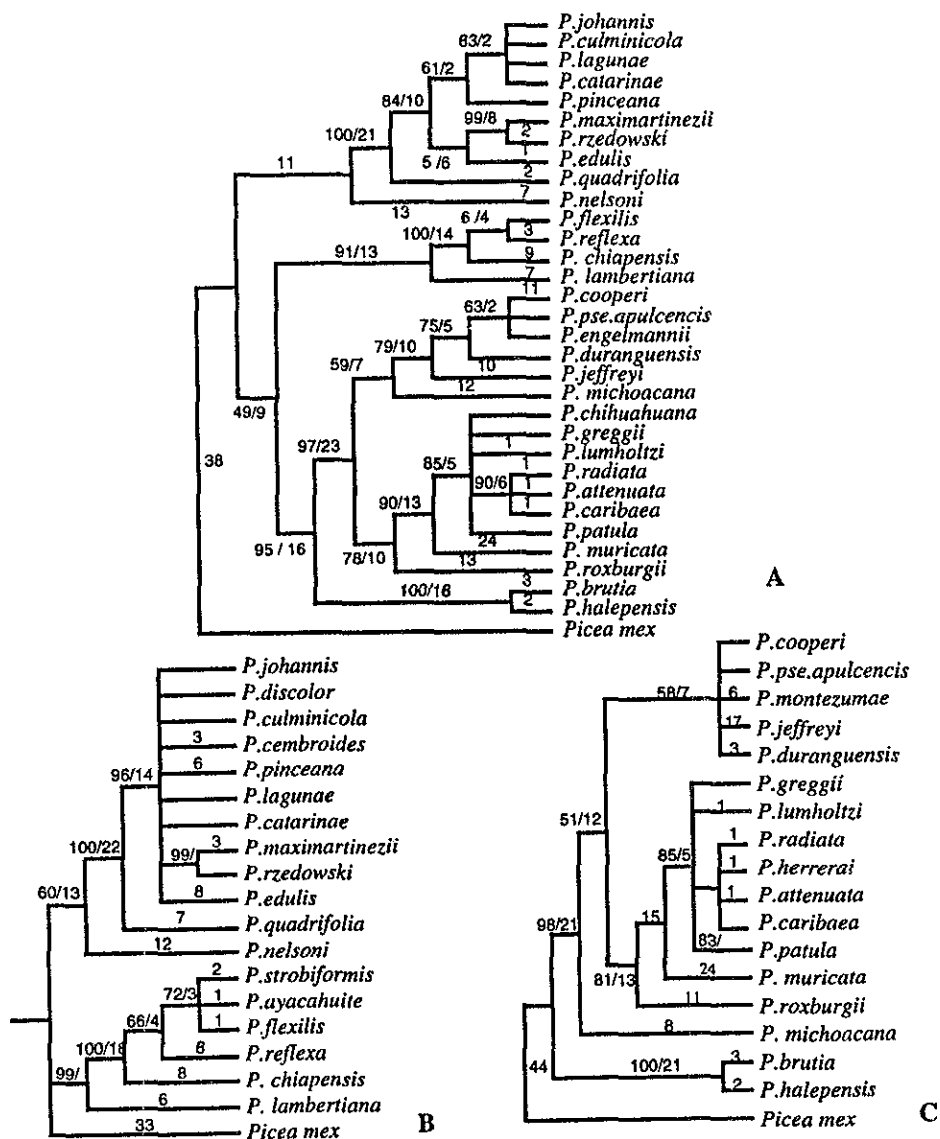


Fig. 9 Filogenias que se utilizaron para el análisis biogeográfico mediante el programa COMPONENT (Page, 1992). A) Filogenia en donde se incluyen ambos Subgéneros *Pinus* y *Strobos*. B) Subgénero *Strobos* y C) Subgénero *Pinus*. Las dos últimas filogenias se realizaron mediante la búsqueda Branch and Bound, y la primera a través de una búsqueda heurística en random addition sequences con 100 replicas los valores de Bootstrap o confiabilidad están a la izq. de la diagonal. El tamaño de los árboles fué el siguiente A=380, B=161 y C= 163

3.4 Evolución morfológica

Los análisis de contrastes independientes para los caracteres morfológicos de la yema, la espina del cono y las acículas, los cuales fueron mapeados sobre la filogenia molecular de haplotipos (Fig.5) muestran que algunos de ellos han evolucionado como consecuencia de presiones de selección (Tabla 3).

Tamaño de la semilla y ala

El ala resulta de la prolongación del endospermo, en ocasiones está totalmente adherida a la semilla, en cuyo caso se le llama adnada, otras veces lleva en su base dos ganchos formados de tejido higroscópico que, cuando el ambiente está seco, abrazan y sujetan a la semilla y cuando es húmedo se abre y se sueltan. En éste caso es un ala articulada, y pueden observarse en la mayoría de nuestros pinos, sin embargo existen alas ineficientes para la dispersión, es decir son muy pequeñas en relación al tamaño de la semilla, en tal caso se llaman rudimentarias

Para el caso del carácter de semilla alada o no alada se muestra claramente que la evolución fué en sentido de la pérdida del ala, es decir que el ancestro del género *Pinus* presentaba una semilla alada, que se pierde en el grupo de los cembroides o pinos piñoneros y que permanece en la subsección *Strobi* y el subgénero *Pinus*. (fig. 10a)

Se ha visto que el tamaño de la semilla tiene una cierta correlación con la presencia o ausencia y tamaño de las alas es decir que en ausencia del ala, la semilla tiende a ser mayor y viceversa. Esto se corrobora de manera cualitativa y cuantitativa con el mapeo del largo de la semilla sobre nuestra filogenia, obteniendo un índice de correlación significativo. El grupo de los piñoneros que en su totalidad no presentan ala, la semilla tiene un tamaño comúnmente de 15 mm. en algunos casos 12mm y excepcionalmente *P.maximartinezii* con mas de 15 mm. La única excepción es *P. rzedowskii*, que presenta un ala bien desarrollada pero también una semilla más pequeña que el promedio del grupo. El hecho que ésta especie se relacione muy estrechamente con *P. maximartinezii*, sugiere que ésta característica no pudo ser heredada de su ancestro mas próximo si no fué una adaptación al medio que se fijo. Ahora bien, si la hipótesis del origen híbrido de ésta especie es cierta, ya que mantiene características intermedias entre los dos subgéneros, esto nos llevaría a una explicación de tipo histórico basado en un evento de transferencia horizontal.

Las demás secciones presentan por lo general tamaños de semilla menores a 9 mm y solo *P. roxburgii*, *P. jeffreyi*, *P. arizonica* presentan un tamaño de 15 mm y tres especies de la sección *Strobus* *P. strobiformis*, *P. flexilis* y *P. reflexa* tienen semillas de 12 y 15 mm.

En los pinos la dispersión puede efectuarse a través del viento o por aves. Las alas probablemente se desarrollaron como consecuencia de la dispersión por viento, siendo típico de zonas con condiciones xéricas y/o zonas altas. En contraste, la dispersión por aves, comúnmente es considerada una adaptación bajo condiciones xéricas o de competencia (Tomback & Linhart, 1990), como es el caso de las especies de la subsección *Cembroides*, en este contexto las aves se verían beneficiadas y

seleccionarían a las semillas dispersando solo las más grandes las cuales proveen una mayor fuente energética.

Con respecto a estas características, la subsección *Strobi* presenta caracteres intermedios en algunas especies como *P. flexilis*, *P. strobiformis* y *P. reflexa* que presentan ala rudimentaria y otras que presentan ala adnada como *P. ayacahuite* y *P. chiapensis*. Esto nos sugiere dos hipótesis: 1) que el ala de la semilla sea una característica convergente y que la presencia de los diferentes tipos de ala tengan que ver con adaptaciones a las condiciones ambientales como son el clima húmedo o seco que se relacionan a su vez con los modos de dispersión y los dispersores 2) una explicación de tipo histórico en donde se sugiere que este grupo sea parafilético, es decir un grupo artificial que incluye dos o más grupos monofiléticos.

Excepciones a patrones históricos se presentan en las especies *P. rzedowskii* y *P. roxburgii*, las cuales muestran características contrarias (reducción de la semilla y aumento en el tamaño del ala) a la hipótesis de dispersión dependiente por aves que ocurre en ambientes xéricos (Tomback & Linhart, 1990). En los pinos piñoneros la dispersión se realiza por un grupo de aves (córvidos del género *Nucifraga*); gracias a las cuales se pueden regenerar las poblaciones de pinos (Lanner, 1989).

Otra relación contrastante en el mismo sentido a las anteriores, es entre *P. flexilis* y *P. ayacahuite*, en donde *P. flexilis* tiene un tamaño de semilla que va de 8 cm a 10 cm y el tamaño del ala varía de 30 a 40 mm, en el caso de *P. ayacahuite* la semilla va de 10 cm a 12 cm y el ala varía de 15 a 20 mm; lo mismo ocurre entre *P. arizonica* y *P. hartwegii* y *P. halepensis* y *P. brutia*. El hecho de que el pino piñonero *P. rzedowskii* no haya perdido el ala articulada podría explicarse por su probable carácter híbrido, intermedio entre los dos subgéneros. En conclusión, el mapeo de esta característica corrobora que el ancestro del género *Pinus* debió presentar semillas aladas y después ésta característica se perdió, además los análisis de correlación, son significativos.

Características de la yema y espina del cono

Evalúamos los caracteres de la yema de invierno, (resinosa vs no resinosa), la yema (pubescente vs. glabra) y la espina del cono (ausencia vs. presencia) los cuales están relacionados con la frecuencia e intensidad del herbivorismo. Si el herbivorismo es alto, se presentarán hasta tres de las características antes mencionadas, si la interacción no es importante, por lo menos se mantiene una de las tres características. Los índices de correlación encontrados entre los caracteres, de la yema y la yema de invierno fueron significativamente altos, lo cual puede sugerir, que se hallan bajo el mismo control génico. La presencia de resina comúnmente se relaciona con una yema glabra o viceversa, exceptuando algunos casos, en el mismo sentido, existe una correlación significativa entre la presencia de espina y la yema glabra, (tabla 3).

Por ejemplo en la figura (10 b) todos los pinos duros presentan espina, pero solo la mitad de éstos tienen también yemas resinosas; sólo *P. oocarpa* y *P. jeffreyi* presentan yemas pubescentes. Y solo *P.*

oocarpa tienen yemas pubescentes y resinosas además de espina. *P. lumholtzii* tiene espina y yema resinosa mientras que *P. pringlei* sólo presenta espina, lo cual nos sugiere diferentes grados de herbivorismo. Especies en la subsección *Strobi* no tienen espinas, pero usualmente sus yemas son pubescentes. *P. ayacahuite*, *P. flexilis*, y *P. strobis* tienen además yemas resinosas lo cual sugiere que la presión por herbivorismo en estas especies ha sido más intensa.

En el grupo de los cembroides ocurre lo mismo que en los pinos duros con la diferencia que en la mayoría de las especies además de presentar espina tienen resina con excepción de *P. rzedowskii* y *P. pinceana* que además presentan yemas pubescentes sugiriendo la misma explicación que para *P. lumholtzii* y *P. pringlei*. Estas observaciones nos sugieren que de los tres grupos (*Cembroides*, *Strobi*, y el Subgénero *Pinus*), los cembroides o pinos piñoneros se encuentran bajo un mayor ataque por herbivoría debido a que presentan por lo menos 2 de los tres caracteres relacionados a la defensa contra el herbivorismo fig. (10b)

Acículas

Se ha sugerido que existe una correlación entre el número de acículas por fascículo, su tamaño y el tipo de crecimiento con respecto al clima (Malusa, 1992; Farjon, 1996). En zonas áridas se espera una reducción del número y tamaño de las acículas lo cual parece conllevar a un crecimiento erecto de acículas rígidas. En climas templados, este crecimiento puede ir desde flexibles hasta colgantes con acículas largas y en un mayor número por fascículo. Sin embargo podemos encontrar casos concretos en donde existen combinaciones en diferentes sentidos. Por ejemplo, en la figura (10c) se ve que *P. teocote* y *P. patula* que son especies estrechamente relacionadas y que además tienen el mismo número de acículas, estas son de tamaños muy diferentes; 15 cm y 25 cm respectivamente, así como un crecimiento rígido y erecto para el primero, y colgante para el segundo.

Las especies *P. pringlei* y *P. lumholtzii* que son especies hermanas presentan acículas con características opuestas. La primera es erecta y de 25 cm de largo y la segunda presenta acículas colgantes de 30cm de largo. Sucede lo mismo para *P. ayacahuite* y *P. flexilis* y para *P. herrerae* y *P. attenuata* lo cual ilustra la hipótesis de reducción del tamaño de las acículas en especies de pinos que habitan zonas áridas y un crecimiento colgante y con hojas alargadas en pinos que viven en zonas de clima húmedo y templado.

De manera general, el grupo cembroides que en su mayoría habita en zonas áridas presenta un tamaño menor de acículas desde 5 cm hasta 10 cm, con excepción de *P. pinceana* cuyas acículas miden 15 cm de largo con un crecimiento de tipo colgante. *P. johannis* y *P. rzedowskii*; tienen un tipo de crecimiento flexible o colgante y presentan 3 y 4 acículas por fascículo respectivamente al igual que *P. pinceana*. *P. maximartinezii* y *P. rzedowskii* a pesar de ser especies muy cercanas, presenta características opuestas, como serían el contraste entre un crecimiento: flexible para *P. rzedowskii* y erecto para *P. maximartinezii*, lo cual no es congruente con el largo de las acículas que en el primer caso

es de 6-10 cm vs 8-10cm y 4 vs 5 acículas respectivamente. Esta misma incongruencia ocurre entre las especies *P. halepensis* y *P. brutia*.

Sin embargo el análisis comparativo sugiere una correlación significativa entre el tamaño de las acículas y el número pero no así para el número de acículas y tipo de crecimiento (tabla 3)

Resumiendo, se puede observar que para el síndrome de dispersión por aves los tres caracteres que se plantearon mantienen altos índices de correlación, siendo obvia la mayor relación entre semilla alada y tipo de ala; además existe una correlación muy similar entre tamaño de la semilla con respecto al tipo de ala y presencia de esta. Otra correlación significativa que existe es entre el tamaño de la semilla y tamaño del ala. En cuanto a las características de las acículas éstas también mantienen altos índices de correlación exceptuando la correlación entre el número de acículas y tipo de crecimiento, y la mayor relación la encontramos entre el tamaño y número de acículas. Para los caracteres que suponemos ejercen una función de defensa contra el ataque de herbívoros también se encontraron índices de correlación altos, exceptuando la relación que guarda la presencia de espina en el cono vs la yema de invierno.

	Tamaño de acículas	No. de acículas
Tamaño de acículas		
No. de acículas	0.4362	
Tipo de crecimiento	0.3405	-0.0498

	Tipo de ala	Tamaño de la semilla
Tipo de ala		
Tamaño de la semilla	0.5380	
Tamaño del ala	-0.0386	0.4549

	Espina en cono	Yemas
Espina en cono		
Yema	0.3642	
Yema de invierno	0.2089	0.4375

Tabla (3) Índices de correlación obtenidos por el método comparativo de contrastes independientes entre algunas características morfológicas relacionadas con el modo de dispersión, ambientes xéricos y defensa contra la herbivoría. Los números en negritas son los valores que muestran una correlación significativa

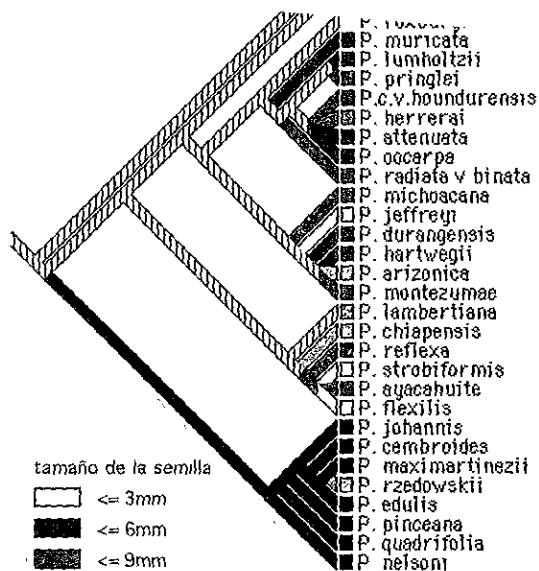
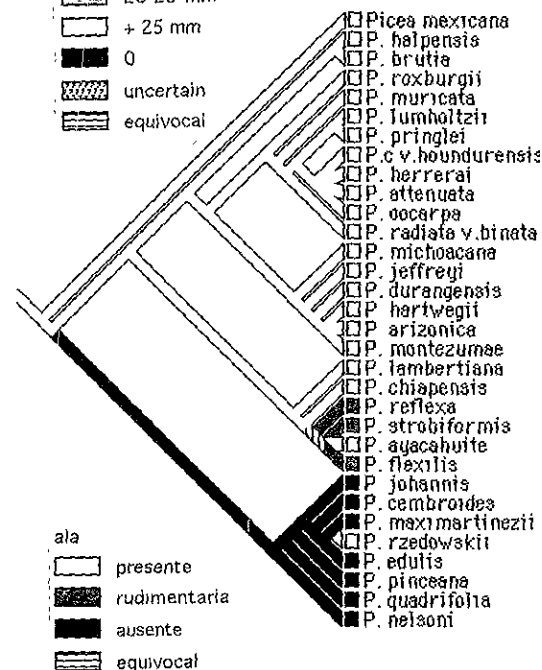
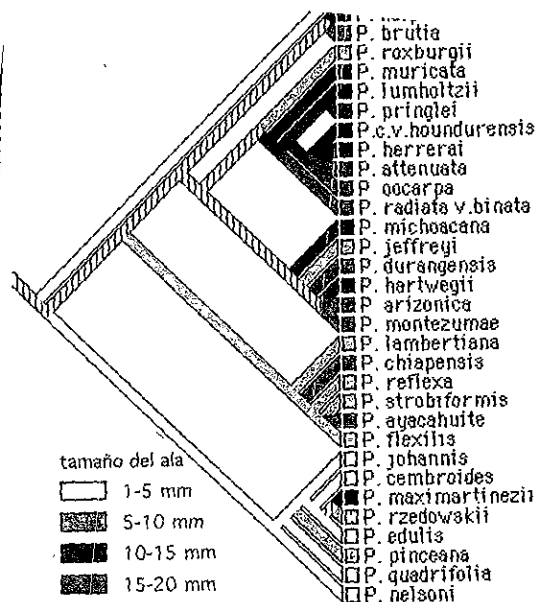


Fig. 10a Caracteres de la semilla relacionados con la hipótesis de dispersión por aves, mapeados sobre la filogenia de haplotipos.

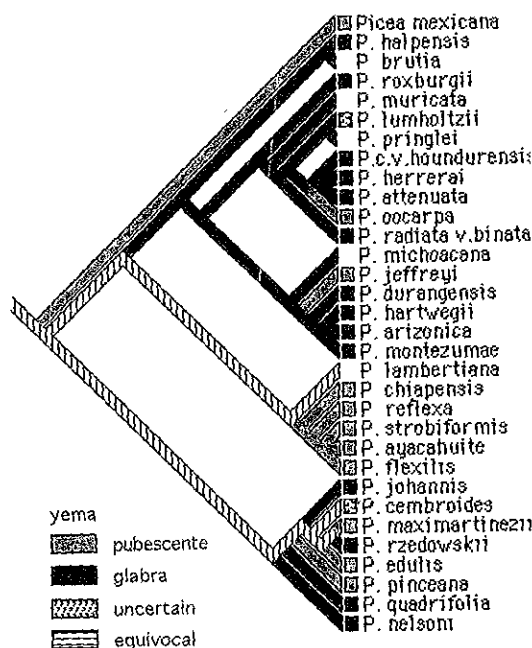
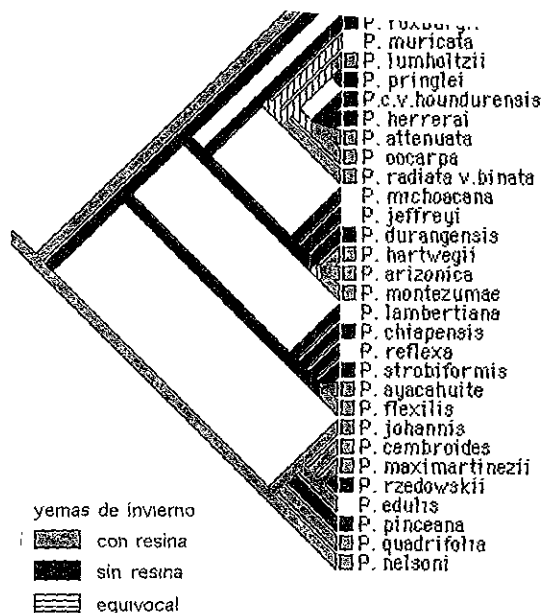
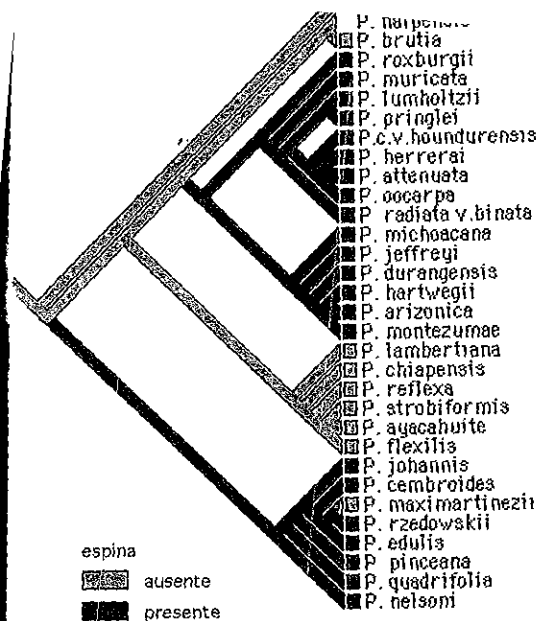
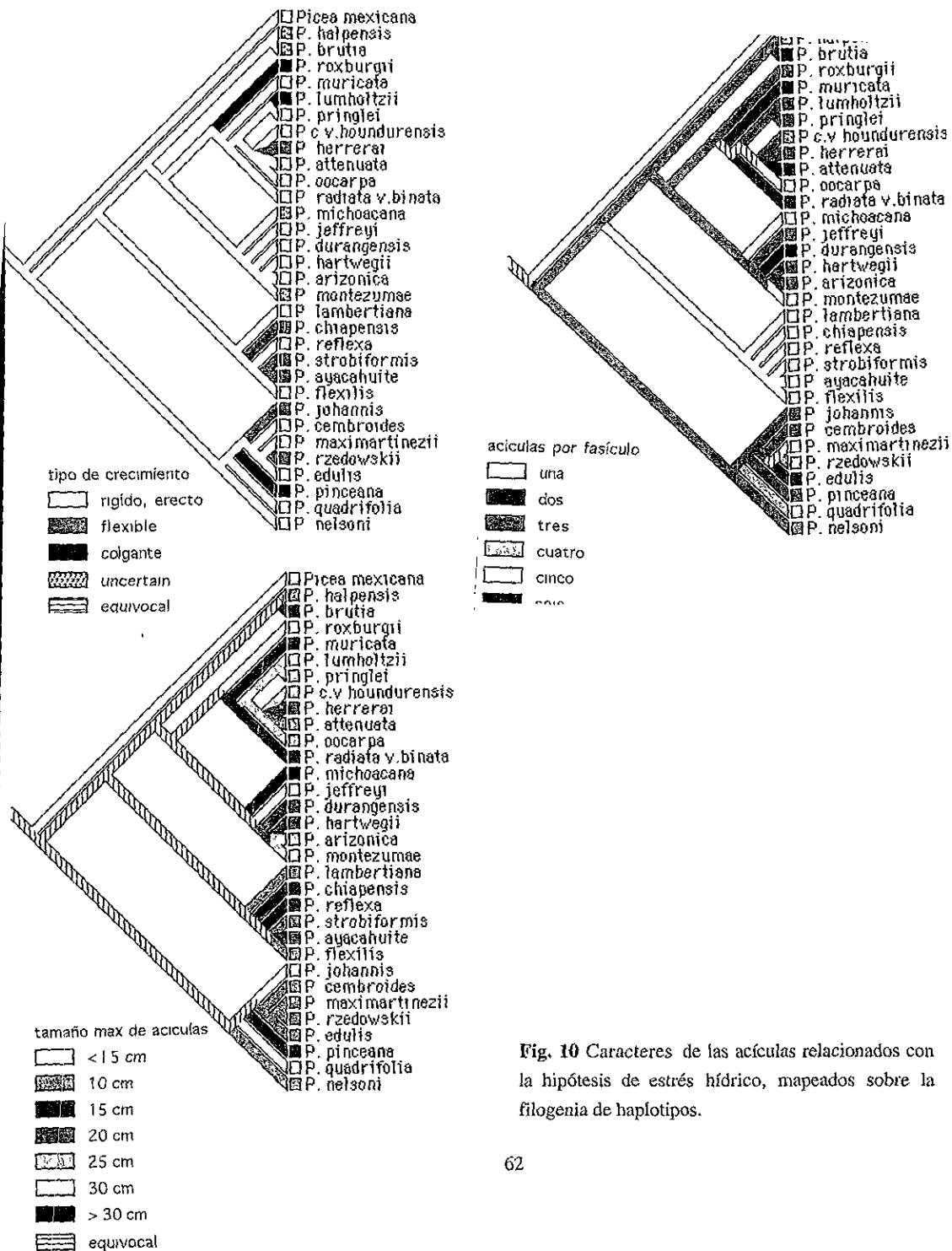


Fig. 10b Caracteres del cono y las yemas relacionados con la hipótesis de resistencia al herbivorismo mapeados sobre la filogenia de haplotipos.



3.5 Implicaciones evolutivas de una probable evolución reticulada

Se han reportado eventos de hibridación en el género *Pinus*, tanto artificiales como naturales (Lanner, 1974; Matos, 1995; Quijada A. et al en prep.). Tales eventos de una probable evolución reticulada se han encontrado en las siguientes especies:

P. quadrifolia, un híbrido entre *P. monophylla* y *P. juarensis*, *P. rzedowskii*, entre una especie del Subgénero *Strobis* y una de *Pinus* (Madrigal y Caballero, 1969; Perry, 1991). Estudios con la técnica PCR-SSCP en el ITS (Quijada, observ pers.), encuentra que especies como *P. johannis*, *P. nelsonii*, *P. maximartinezii* y *P. rzedowskii* Subsección *Cembroides*, al igual que *P. strobiformis*, *P. flexilis* y *P. griffithii*, Subsección *Strobi*, mostraron aditividad en las movilidades, lo cual sugiere complementariedad con probables líneas parentales.

El análisis de los fragmentos de restricción revelaron la presencia de bandas extra en las siguientes especies, *P. rzedowskii*, *P. cembroides*, *P. quadrifolia*, *P. maximartinezii* y *P. ayacahuite*. Patrones similares en otras especies de pinos se han observado con diversas enzimas Karvonen y Savolainen (1993). Bandas extra que nosotros observamos se obtuvieron varias veces en otras réplicas de digestiones, lo cual nos asegura que no fueron el resultado de digestiones parciales.

Comparando, los patrones de fragmentos de restricción entre todas las especies, se pudo observar que algunas de las bandas extra que presentan los probables híbridos, coinciden con algunas bandas que se encuentran en otras especies. Esto nos sugiere que alguna de estas especies que mantienen tales bandas son las probables líneas parentales. Sin embargo esto no lo podemos demostrar, únicamente con la correlación entre bandas de los RFLP's. Aún así, ésta información nos sugiere probables rutas a explorar, como por ejemplo, la relación que existe entre bandas extra de *P. cembroides* y *P. maximartinezii*, entre *P. johannis* y estas dos. También las bandas extra de *P. cembroides*, relacionadas con *P. hartwegii* en la enzima Dpn II lo cual sugiere eventos de introgresión entre subgéneros, al igual que la banda extra que muestra *P. rzedowskii* y que comparte con *P. michoacana* cortado con la enzima *RsaI* (Tabla 3).

Los patrones de restricción observados, podrían deberse a que algunas enzimas tienen diferente sensibilidad a la metilación enmascarando así, tanto pérdidas como ganancias de sitios de restricción (Hillis y Mortiz, 1990). En éste estudio solo se utilizó una enzima que se sabe es sensible a la metilación (DpnII) en la cual encontramos también bandas extra por lo cual será necesario hacer la prueba con la isoenzima correspondiente para descartar probables artefactos de la metilación.

Otras posibles explicaciones de estas bandas extra son: la variación intraespecífica debida a la existencia de variantes en unidades transcritas, que pueden contener un sitio extra o un sitio de menos de restricción a causa de una mutación en una de las dos líneas parentales, con lo cual las dos unidades transcritas mostrarán patrones diferentes en algunos fragmentos en tanto que los demás se mantendrá

conservados. Esto dará como consecuencia un aumento en el número de fragmentos total, sobrepasando los 3100 pb. Otra explicación sería que tales bandas son el producto de un evento de hibridación, en donde las dos especies parentales difieren sutilmente en el tamaño, o por mutación en algún sitio de restricción. Las diferencias por mutación, podrían estar ocurriendo a nivel intrasubseccional, es decir entre especies más relacionadas, en cambio, diferencias en el tamaño del ITS, en una de las líneas parentales ocurriría, con mayor frecuencia entre subsecciones o entre subgéneros. De esta forma, la detección de un híbrido por aumento en el tamaño del ITS en una de las líneas parentales, sugiere una distancia genética mayor entre las especies que dieron origen al híbrido, en contraste con un evento de mutación o adición de un solo nucleótido en una de las líneas parentales que dan lugar al híbrido lo cual se presentaría con mayor frecuencia entre especies de la misma subsección.

Estudios con el ITS en dos especies parentales sugieren que éstas, mantienen un ITS sutilmente diferente en tamaño (Marroco et al 1996) lo cual también se corrobora en este estudio, al menos entre dos o tres especies, siendo muy evidente la reducción en la longitud del ITS de *P. nelsonii*

La conservación de estas unidades transcritas en líneas parentales de híbridos, puede deberse al retraso en el proceso de homogeneización, lo cual mantiene diferentes arreglos del ITS; esto ya ha sido reportado y discutido para angiospermas (Suh et al, 1993; Baldwin et al, 1995; Sang et al 1995). También el número de organizadores nucleolares (NOR's) se relaciona con la velocidad de los procesos de homogeneización por lo tanto es más probable que en *Pinus* el cual mantiene largas secuencias de ITS se de una tasa de homogeneización más baja que en angiospermas. Del mismo modo, el hecho de que solo algunos individuos presenten adiciones mientras otra porción se mantiene conservada, puede ser consecuencia de diferencias en las tasas de homogeneización.

Sin embargo, el no encontrar tanta variación en las unidades transcritas entre las demás especies puede deberse a que el método de PCR esta favoreciendo a una sola unidad transcrita, y que ésta quizá sea la mas frecuente intracromosomalmente (Baldwin, 1992). Una observación interesante al respecto, es el hecho de que la mayor frecuencia de estas bandas extra se presentan en el grupo cembroides y en general en los pinos piñoneros.

La variación en la longitud detectada en *P. nelsonii*, sugiere que el ITS a través de entrecruzamiento desigual seleccionó en algunas poblaciones, al loci que mantiene el menor tamaño, es decir a la unidad transcrita que experimentó la pérdida de material genético, lo cual puede estar representado por la variación en el número de subunidades en el ITS1, por lo tanto, se tendrá que analizar si tal variación en el tamaño y en el número de subunidades es congruente, y si es que ambos tipos de loci están presentes en el mismo individuo, pero el método de PCR amplifica preferentemente uno solo, (Baldwin, 1992).

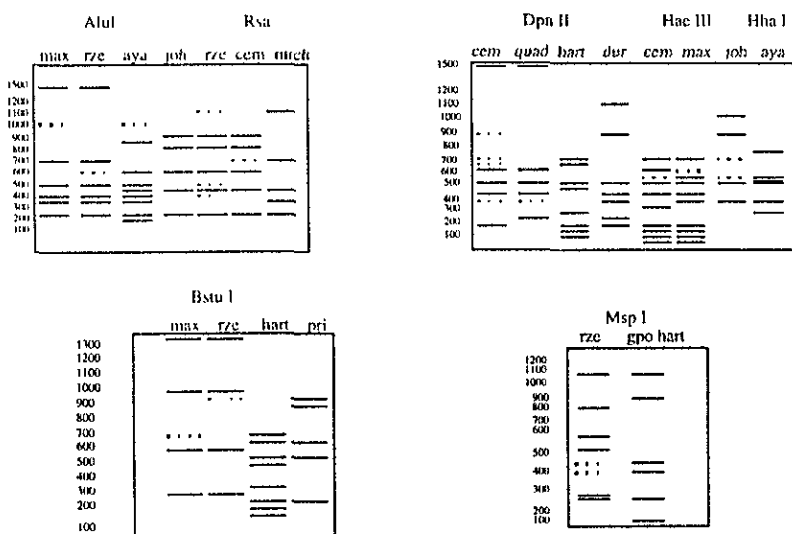


Fig. 11 Probables híbridos que se detectaron. Las especies híbridas son identificadas por las líneas puntuadas que hacen referencia a fragmentos extra que comparten con otras especies.

aya: *P. ayacahuite* hart: *P. hartwegii* cem: *P. cembroides* dur: *P. durangensis* flex: *P. flexilis*
eng: *P. engelmanni* mich: *P. michoacana* rze: *P. rzedowskii* pri: *P. pringlei* qua: *P. quadrifolia*
jho: *P. johannis* mont: *P. montezumae* nel: *P. nelsonii* max: *P. maximartinezii*
oax: *P. oaxacana* ref: *P. reflexa* halp: *P. halepensis* jeff: *P. jeffreyi*

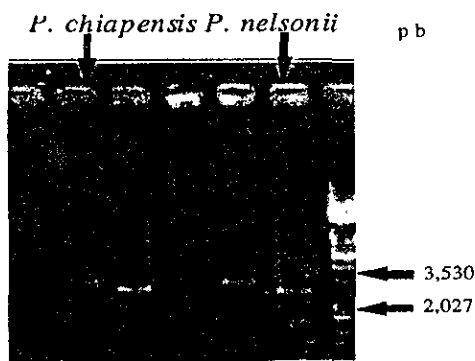


Fig 9. Amplificación del ITS por PCR que muestra la variación en longitud entre dos especies del subgénero *Strobus*.

CONCLUSIONES

El ITS, ha sido ampliamente utilizado como marcador molecular en la sistemática de muchas familias, géneros y especies, tanto de plantas como animales. Este marcador da una buena resolución a diversos niveles dependiendo del grupo, pero en general su poder se evidencia a nivel interespecífico. En éste estudio, se encontró que el ITS mediante el uso de PCR-RFLP's mantiene una mayor resolución entre subsecciones y no así entre especies, sobre todo dentro del subgénero *Pinus*, lo cual sugiere que existen más sitios conservados que se comparten entre especies. Esto se pudo deber a que las especies de las subsecciones *Oocarpae* y *Pinus* en México radiaron muy recientemente.

En cuanto la separación como grupos monofiléticos de los subgéneros *Pinus* y *Strobos*, ésta parece poco estable al incluir a *Picea* como grupo externo, lo que sugiere que la distancia entre éstos dos subgéneros se mantiene por un número pequeño de diferencias, es decir la distancia genética es corta, lo que se debe probablemente al método de RFLP's el cual solo muestrea algunos sitios informativos a lo largo de todo el ITS, o bien a que el grupo externo que se utilizó no fué el adecuado.

En el subgénero *Strobos*, la mayoría de las especies se resuelven dentro de las dos principales subsecciones, *Cembroides* y *Strobi*. La primera contiene al clado de las especies *P. rzedowskii* y *P. maximartinezii* las cuales parecen haber radiado al final de todas las especies del subgénero, y también agrupa a las especies *P. nelsonii* y *P. quadrifolia* las cuales mantienen una distancia genética mayor respecto al grupo *Cembroides*, que la distancia entre subsecciones. La segunda subsección muestra que las especies *P. reflexa* y a *P. chiapensis* están bien diferenciadas y no son variedades como se ha propuesto. Estas especies ocupan sitios ancestrales junto con *P. lambertiana*.

En el subgénero *Pinus* las especies se resuelven en tres subsecciones: *Oocarpae*, *Ponderosae* y *Sylvestres*. *P. caribaea* y *P. roxburgii* consideradas pertenecientes a otras subsecciones, mantienen una mayor relación con *Oocarpae*. En este análisis *P. caribaea* es muy similar a *P. oocarpae*. A pesar de la menor resolución que muestra el subgénero *Pinus*, la subsección *Oocarpae*, mantiene una distancia genética mayor respecto a las especies consideradas dentro de una nueva subsección *Attenuatae*.

Sin embargo, será necesario el secuenciamiento del ITS, la incorporación de datos morfológicos, bioquímicos, de entrecruzamiento, y una adecuada codificación de estos caracteres, para conocer de manera más precisa las relaciones entre el género. Así como un análisis a nivel de poblaciones para estar seguros de que la variación génica interespecífica es mayor a la intraespecífica.

Nuestros datos biogeográficos, corroboran la probable aparición de las primeras especies en el área de Baja California, la cual se encontraba unida al noreste de México y pudo haber sido una de las principales rutas de migración, seguida por la Sierra Madre Oriental. Sin embargo la región de Oaxaca que se mantiene ancestral a todas ellas, requiere de una explicación diferente. Muchas de las áreas que ocupan posiciones ancestrales dado que en ellas se distribuyen especies con una ubicación filogenética ancestral, son congruentes con nuestras hipótesis de aparición de las barreras geográficas. Las áreas en

las que se distribuyen las especies *P. halepensis*, *P. brutia* y *P. roxburgii*, aparecen antes que cualquier área del territorio mexicano, lo cual es consistente con el probable origen asiático del género. La hipótesis propuesta por Enghoff's la cual se puso a prueba en éste estudio, sugiere que el subgénero *Strobus*, probablemente apareció antes que el subgénero *Pinus*.

Los análisis biogeográficos aquí presentados, muestran que el género *Pinus* en México, puede brindarnos una valiosa información sobre algunos aspectos de la geología del territorio que aún se desconocen y que han ocasionado polémica. La exploración sobre la adecuada delimitación geográfica de las áreas a estudiar, así como el tiempo geológico de aparición de tales áreas ayudarán a descifrar como se dió la migración dentro del territorio y cuales fueron las principales rutas y las barreras geográficas que ocasionaron la especiación.

Respecto al análisis comparativo entre caracteres morfológicos mapeados sobre la filogenia molecular, encontramos entre el número de acículas y tamaño de las mismas existe una correlación significativa lo que puede deberse a que se encuentran bajo las mismas presiones de selección, como son las condiciones de aridez. Del mismo modo el tamaño del ala y el tamaño de la semilla se correlacionan significativamente, sugiriendo una misma presión selectiva, que en este caso podría ser el tipo de dispersor. Y por último encontramos que caracteres como son las espinas en los conos y el tipo de yema se encuentran correlacionados entre sí con excepción de yema de invierno y espina en el cono, lo cual nos sugiere que existe un equilibrio entre el número de caracteres presentes y la intensidad de la herbivoría. Asimismo, se observó que la correlación entre caracteres relacionadas con la dispersión es mayor que la correlación entre caracteres de defensa contra la herbivoría, y a su vez ésta es mayor que la correlación encontrada entre los caracteres relacionadas con un ambiente xéricos. Lo cual sugiere una mayor presión de selección por los dispersores, y no tanto en el herbivorismo y el estrés hídrico.

Sin embargo, será necesario establecer la mejor manera para caracterizar los ambientes (clima, dispersores, competencia, herbivorismo, etc.) que probablemente estén relacionados a la evolución de los caracteres morfológicos en pinos, de éste modo, nuestro estudio por un lado, nos da una aproximación sobre el tipo de caracteres que se encuentran correlacionados sobre la filogenia, lo cual sugiere que puedan estar bajo las mismas características selectivas (dispersión, herbivorismo y clima), o bien regularse mediante los mismos mecanismos genéticos y por otro nos ubica especies en donde sería interesante explorar estos patrones.

Pero aún nos queda por explorar si todos los patrones observados están relacionados a causas adaptativas o algunos de ellos se relacionan con probables eventos de evolución reticulada.

El ITS, presentó una tasa constante de substitución entre subsecciones, lo cual sugiere a su vez mismas tasas de homogeneización tanto intraespecífica como intraindividual. Sin embargo es necesario conocer de que manera están actuando estos procesos (entrecruzamiento desigual y conversión génica) sobre las familias multigénicas incluso entre poblaciones. En contraste a lo anterior el análisis sobre las

tasas de substitución entre especies, mostraron tasas significativamente diferentes en las siguientes especies, *P. muricata*, *P. michoacana* y *P. lambertiana*, por lo cual no podemos, asumir hipótesis evolutivas, si no hasta conocer a que se deben estas diferencias en las tasas de substitución.

Las distribuciones de las distancias génicas entre el subgénero *Pinus* y el subgénero *Strobilus*, mostraron que este último, contrario a lo que se esperaba mantiene en proporción distancias menores entre algunas especies, sin embargo la distancia entre grupos de especies es mayor, a diferencia de lo que ocurrió en el subgénero *Pinus*, en donde al parecer las distancias entre las especies es mayor pero se mantiene homogénea entre los diferentes grupos, una explicación a esto puede ser que en el subgénero *Pinus*, se incluyeron un mayor número de subsecciones, así como también, especies extranjeras. Esto probablemente sugiere que dentro del subgénero *Strobilus*, pudieron haberse dado varias, radiaciones, en donde las especies divergieron rápidamente, y grupos más recientes, en donde a penas se esta dando radiación, contrario a lo que ocurre en el subgénero *Pinus* en el cual las distancias aunque aparentemente mayores, presentan una homogeneidad que sugiere un estado de radiación reciente.

Los patrones de aditividad (bandas extra) encontrados en las especies *P. rzedowskii*, *P. cembroides*, *P. quadrifolia*, *P. maximartinezii* y *P. ayacahuite* nos dan una idea de las probables líneas parentales a explorar, las cuales pueden ser entre especies incluso de diferentes subgéneros como *P. hartwegii* o *P. michoacana* o dentro del mismo subgénero como *P. johannis*, sin embargo será necesario determinar cual de todo el conjunto de especies que presentan el mismo patrón que complementa las bandas extra en los probables híbridos es el mas factible, por ejemplo el que se encuentre a una distancia geográfica más cercana o con el cual presente mas características morfológicas compartidas etc.

En el caso del subgénero *Strobilus*, en donde se encontró el mayor número de patrones de aditividad es decir de bandas extra, será también necesario explorar más a fondo, la naturaleza de tal variación intraespecífica e incluso intraindividual, tanto en la longitud como es el caso de *P. nelsonii*, como en el número de subunidades en una unidad transcrita, y de esta manera, saber si existe variación significativa dentro de especies y/o individuos, y de que forma esto cambiaría nuestras conclusiones. De éste modo se podrá determinar en poblaciones que relaciones microevolutivas, limitan el análisis macroevolutivo.

Referencias

- Alvin, K.L. (1960). Further conifers of the Pinaceae from the Wealden Formation of Belgium. Mem. Inst. Roy. Sci. Nat. Belg. **146**: 1-39.
- Arnheim, N. (1983). *Concerted evolution of multigene families*. Pp. 38-61 in M. Nei and R.K. Koehn, eds. Evolution of genes and proteins. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Avice, J.C. (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall U.S.A. 511 pp.
- Axelrod, D.I. (1979). *Age and origin of Sonoran Desert Vegetation*. Occ. Pap. Calif. Acad. Sci. **132**: 1-74
- Axelrod D.I. (1986). *Cenozoic history of some western American pines*. Annals of the Missouri Botanical Garden **73**: 565-641.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell, and M.J. Donoghue. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Miss. Bot. Gard. **82** :247-277.
- Bermingham, E., S. Rohwer, S. Freeman, and C. Wood. (1992). *Vicariance biogeography in the Pleistocene and speciation in North American wood warblers: a test of Menger's model*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 6624-6628.
- Bobola, M.S., D.E. Smith, and A.S. Klein. (1992). Five major nuclear ribosomal repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *P. mariana*. Mol. Biol. Evol. **9**:125-137.
- Brooks D.R. y Mc Lennan D.H. (1991) Evolution ecology and behavior. The University of Chicago Press 433pp.
- Briggs J. S. (1987). Biogeography and Plate Tectonics Developments. En: Paleontology and Stratigraphy **10**: 195-199.
- Buckler, E.S. & Holtsford, T. P. (1996). *Zea Ribosomal repeat Evolution and Substitution Patterns*. Mol. Biol. Evol. **13**: 623-632
- Conkle, M.T., Schiller, G. y Grundwald, C. (1988). *Electrophoretic analysis of diversity and phylogeny of Pinus brutia and closely related taxa*. Systematic Botany **13**: 411-424.
- Carvajal, S., & McVaugh, R. (1992). Pinus. In flora Novo-Galiciana: a descriptive account of the vascular plants of western Mexico. Vol. 17. ed. W.R. Anderson, pp. 32-100. Ann. Arbor, MI. The University of Michigan Herbarium.
- Cserna Z. (1960). "Orogenesis in Time and Space in Mexico, Nicht eizlen im Buchhandel erhaltlich, pp 595-605.
- Cracraft, J. (1986). *Origen and evolution of continental biotas: speciation and historical congruence within the Australian avifauna*. Evolution **40**: 977-996.
- Critchfield, W.B. (1967). Crossability and relationships of the closed-cone pines.

- Silvae Genetica 16: 91-97.
- De Queiroz, K. & M.J. Donoghue. (1988). *Phylogenetic systematics and the species problem*. Cladistics 4: 317-338.
- Dietrich, A. G. (1824). *Flora der Gegend um Berlin*. Berlin: G.E. Nauck.
- Donahue, J.K. and Arizmendi. (1986). *Natural range of P. chiapensis and P. ayacahuite Found to Overlap in Ixtlán, Oaxaca, México*. CAMCORE technical note No. 1 North Carolina State University.
- Dover, G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299:111-116.
- Dover, G. (1989). Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics* 122: 249- 252.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Duhamel Du Monceau, H. L. (1755). *Traité des Arbres et Arbustes qui se cultivent en France en pleine terre*. Tome 2. Paris: Guerin & Delatour.
- Eguiluz, P.T. (1978). *Enayo de integración de los conocimientos sobre el género Pinus en México*. Tesis Profesional, U.A.CH. Chapingo, México.
- Eguiluz Piedra, T. (1988). Distribución natural de los pinos en México. Nota técnica 1. Chapingo, México: Centro Genético Forestal.
- Endlicher, I. L. (1847). *Synopsis coniferarum*. Sangalli: Scheitlin & Zollikofer.
- Engelmann, G. (1880). *Revision of the genus Pinus, and description of Pinus elliotii*. Transactions of the Saint Louis Academy of Science 4: 161-189.
- Enghoff, H. (1995). *Historical biogeography of the holartic: area relationships, ancestral areas, and dispersal of non-marine animals*. Cladistics. 11: 223-263.
- Ferré, Y. (1953). *Division du genre Pinus en quatre sous-genres*. Compte rendu de l'Académie des Séances des Sciences, Paris 236: 226-228.
- Ferrusquilla -Villafranca I. (1993). Geology of Mexico: a synopsis. In: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J, eds. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. New York: Oxford University Press 3-107.
- Forey, P.L. Humpries, C.J., Kitchig I.L., Scotland R.W., Siebert D.J. y Williams P.M. (1992). *Cladistics: a practical course in systematic*. Oxford University Press Inc New York
- Gillespie, J.H. (1986). *Variability of evolutionary rates of DNA*. *Genetics* 113: 1077-1091.
- Govindaraju, D., Lewis, P. & Cullis, C. (1992). *Phylogenetic analysis of pines using ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms*. *Plant Systematics and Evolution* 179: 141-153.

- Hamby, R.K. and E.A. Zimmer. (1992). Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. Pp 50-91 in Molecular systematics of plants, eds. P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle. New York: Chapman & Hall.
- Hennig, S. (1966). *Phylogenetic Systematics*. Univ of Illinois Press, Urbana.
- Hillis, D.M. (1987). *Molecular versus morphological approaches to systematics*. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18: 23-42
- Hillis, D.M., Mortiz, C., Porter, C.A., and Baker, R. J. (1991). *Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA*. Science 251: 308-310.
- Hillis, D.M. & J.J. Bull. (1991). Of genes and genomes. Science 254: 528-558.
- Hillis, D.M. & C. Mortiz. (1990). *Molecular Systematic*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hilu, K.W. (1983). The role of single-gene mutations in the evolution of flowering plants. *Evolutionary Biology* 26: 97-128.
- Humphries, C.J., Parenti L.R., (1986). *Cladistic Biogeography*. Ed. Oxford. University Press New York, 98 pp.
- INIF FAO (1967). *Seminario y viaje de estudios de coníferas latinoamericanas*. Pub. Exp. 1. México.
- Karvonen, P. & Savolainen, O. (1993). Variation and inheritance of ribosomal DNA in *Pinus sylvestris* L. (Scots pine). *Heredity* 71: 614-622.
- Karamangala, R.R., & Nickrent, D.L. (1989). An electrophoretic study of the representatives of subgenus *Diploxylon* of *Pinus*. *Canadian Journal of Botany* 67: 1750-1759.
- Kimura, M. (1983). *The neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, England.
- King K, Torres R.A., Zentgraf U., & Hemleben V. (1993) Molecular evolution of the intergenic spacer in the nuclear ribosomal RNA genes of cucurbitaceae. *Journal of Molecular Evolution* 36 (2): 144-152.
- Klaus, W. (1989). Mediterranean pines and their history. *Plant Systematics and Evolution* 162: 133-163.
- Knoblach, I.W. (1972). Intergenéric hibridization in flowering plants. *Taxon* 21: 97-103.
- Koehne, E. (1893). *Deutsche Dendrologie*. Stuttgart: Ferdinand Enke.
- Krupkin, A.B., Liston, A. & Strauss, S.H. (1996). Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*, Pinaceae) from chloroplast DNA restriction site analysis. *American Journal of Botany*, 83 (4) : 489-498
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. (1993). MEGA: Molecular Evolutionary analysis, versión 1.02. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Landre, P. A., D.H. Gelfand y R.M. Watson. (1995). En : *PCR Strategies*. Innis, M.A. Gelfand, D.H. y Sninsky, J.J. (eds.) 3-16 p. Academic Press. San Diego. 373 pp.

- Lanner, R.M. (1974). *A new pine from California and the hybrid origin of Pinus quadrifolia*. The Southwestern naturalist, **19** (1): 75-95.
- Lanner, R.M. (1990). *Biology, taxonomy, evolution, and geography of stone Pines of the world* Pp. 14-24 in Proceedings- Symposium on whitebark pine ecosystems: Ecology and management of a high mountain resource, Mar. 29-31, 1989. Gen Tech. Rep. INT -270. U.S.D.A., forest Service
- Li, W-H & Graur, D. (1991). *Molecular Evolution*. Sinauer, Massachusetts. 284 pp.
- Li, W.H. y A. Zharikikh. (1994). What is the bootstrap technique?. Syst. Biol. **43** (3): 424-430.
- Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum*, ed. 1 Stockholm: Impensis Laurentii Salvii.
- Lyckegaard EMS; Clark A.G.(1991). Evolution of ribosomal RNA gene copy number on the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Molecular Biology and Evolution. **8** (4): 458-474
- Liston, A., W.A. Robinson, J.M. Oliphant, and E. Alvarez-Buylla. (1996). Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers of non-flowering seed plants. *Systematic Botany* **21**(2): 109-120.
- Little, E.L., & Critchfield, W.B. (1969). *Subdivisions of the genus Pinus*. USDA Forest Service Miscellaneous Publication 1144. Washington, D.C.
- Little, E. L., Jr. & Righther, F.I. (1965). *Botanical descriptions of forty artificial pine hybrids*. USDA Forest Service Technical Bulletin 1345. Washington, D. C.
- Loock, E.E.M. 1950. *The pines of Mexico and British Honduras*. Dept. Agr. and For. Bull. 26 South Africa.
- Lozano-García M.S. Xelhuantzi López Ma. Susanay Martínez Hernández Enrique. 1992. Metodología, alcances y limitaciones del análisis palinológico del Cuaternario del centro de México. Instituto de Geología UNAM pp 77-89.
- Maddison, W.P. & D.R. Maddison. (1992). *Mac Clade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
- Malusa, J. (1992) Phylogeny and biogeography of the pinyon pines (*Pinus subsect. Cembroides*). *Systematic Botany* **17**: 42- 66.
- Martínez, M. (1992). *Los pinos Mexicanos*, 3 ed. Ediciones botas. México D.F. 361 pp.
- Martínez, M (1948). *Los pinos Mexicanos*, ed. 2. México D.F.: Ediciones Botas.
- Martínez Hernández Enrique y Ramírez Arriaga Elia, (1996). Palaeorología de angiospermas de la flora mexicana durante el mesozoico y terciario. Algunas evidencias palinológicas. Boletín de la Sociedad Botánica de México **58**: 87-97
- Martínez Hernández E. Lozano-García S., Tomassini C. y H. Hernández, (1988). Simposio sobre diversidad biológica de México 3-7 Octubre, Oaxtepec Morelos Mexico, pp. 9-12.
- Martínez Hernández E. (1992). La vegetación y el clima de México. Historia del cretácico al terciario, basada en evidencias palinológicas. *Ciencia* **43** : 69-72.

- Marrocco, R. M., Gelati, M. T., & Maggini, F. (1996). Nucleotide sequence of the internal transcribed spacers and 5.8S region of ribosomal DNA in *Pinus Pinea* L. DNA Sequence The Journal of Sequencing and Mapping 5.
- Matos, J.A. (1995). *Pinus hartwegii* and *P. rudis*: A critical assessment. Systematic Botany 20: 6-21
- Mayr, E. (1904). Evolution and the diversity of life. The Belknap Press of Harvard Univ. Press. Cambridge, Massachussets and London, England. 721 pp.
- Miller, C.N. (1969). *Pinus avonensis*, a new species of petrified cones from the Oligocene of Montana. Am. Jour. Bot. 56: 972-978.
- Miller, C. N. (1973) Silicified cones and vegetative remains of *Pinus* from the Eocene of British Columbia. Contrib. Univ. Mich. Mus. Paleontol. 24: 101-118.
- Miller, C.N. & Malinky J. M., (1986). Seed cones of *Pinus* from the late cretaceous of New Jersey, USA. Rev. of Paleobotany and Palynology, 46: 257-272.
- Miller, C.N Jr. (1992). Silicified *Pinus* remains from the miocene of Washington. American Journal of Botany 79 (7): 754-760.
- Miller K.G., Fairbanks R. G. y Mountain G.S. (1987). Tertiary oxygen isotope synthesis, sea level history, and continental margin erosion. Paleoceanography 2: 1-19
- Mirov, N. T. (1967) The Genus *Pinus*. Ronald Press. New York. 602 pp.
- Morales, J.C. J.C. Patton y J.W. Bickman (1993). Partial enconuclease digestion mapping of restriction sites using PCR-amplifide DNA. Research 2: 228-233.
- Moran, G.F., Smith, D., Bell, J.C., & Apples, R. (1992). *The 5S RNA genes in Pinus radiata and the spacer region as a probe for relationships between Pinus species*. Plant Systematics and Evolution 183: 209-221.
- Moore, W.S. & D.B. Buchanan. (1985). *Stability of the northern flicker hibryd zone in historical times implications for adaptive speciation theory*. Evolution 39: 135-151.
- Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American.
- Nei, M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York
- Nelson, G. & N.I. Platnick. (1981). Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariance. Columbia Univ, Press, New York.
- Ohta, T. & M. Kimura. (1971). On the constancy on the evolutionary rate of cistrons, J. Mol. Evol. 1: 18-25.
- Ohta, T. (1980). Evolution and Variation of Multigene Families. Springer Verlag, Berlin.
- Page, R.D.M. (1993). COMPONENT. Ver. 2.0. The Natural History Museum, London.
- Palacios Chavez, R, Estudio Palinológico y Paleoeológico de las floras fósiles del Mioceno inferior a principios del Mioceno medio de la region de Pichucalco Chiapas, Mexico (1985). (Tesis doctoral, Esc. Nac de Cs Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México,

- Perez de la Rosa, J., Harris, S.A., & Farjon, A. (1995). Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theor. App. Genet.* **91**: 1101-1106.
- Perry, J.P., (1991) *The pines of Mexico and Central America*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Pliger, R. (1926). *Pinus* in A. Engler & K. Prantl, die natürlichen Pflanzenfamilien, Vol. XIII, pp. 331-342. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Powell, J.R. (1983). *Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: evidence from Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 492-495.
- Price, R.A., Olsen-Stojkovich, J. & Lowenstein, J.M. (1987). Relationships among the genera of Pinaceae: an immunological comparison. *Systematic Botany* **12**: 91-97.
- Quijada A., Alvarez-Buylla, E., Liston, A. 1996. *Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S region in Pinus rzedowskii*. 14th North American Forest Biology Workshop. Université Laval, Québec City, Canada. Abstracts Pp 157.
- Rammamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J, eds. (1993). *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. New York: Oxford University Press.
- Rieseberg, L.H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82** (7): 944-953.
- Rieseberg, L. H. & J.F. Wendel. (1993). Introgression and its consequences in plants. In: *Hybrid Zones and the evolutionary Process*, R.G. Harrison (ed), Oxford Univ. Press, Oxford, England. pp. 70-109.
- Rosen, D.E. (1978). *Vicariant patterns and historical explanation in biogeography*. *Syst. Zool.* **27**: 159-188.
- Rushforth, K. (1987). *Conifers*, London: Helm.
- Rzedowsky, J. (1978). *Vegetación de México*. Editorial Limusa: México, D.F. 432 pp.
- Saitou, N. & M. Nei. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sang T., D.J. Crawford, and T.F. Stuessy. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6813-6817.
- Shaw, G. R. (1914). *The Genus Pinus*. Publications of the Arnold Arboretum 5. Forage Village, Massachusetts: The Murray Printing Co.
- Shaw, R.G. (1909). *The pines of Mexico*. Arnold Arboretum No. 1. Boston
- Soltis, P.S. and R.K. Kuzoff. (1993). ITS sequence variation within and among populations of *Lomatium grayi* and *L. laevigatum*. *Mol. Phyl. Evol.* **2**: 166-170.
- Spatch, E. (1842). *Histoire Naturelle des Végétaux*. Vol. XI. Paris: Roret.
- Standley, P.C. (1925) *Trees and shrubs of Mexico*. U.S. Natl. Herbarium.

- Strauss, S.H. & Doerksen, A.H. (1990). Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution* **44**: 1081–1096.
- Styles, B.T., Stead, J.W., y Rolph, K.J. (1982). *Studies of variation in Central American pines 2. Putative hybridization between Pinus caribaea and P. oocarpa*. *Turrialba* 32: 229–242.
- Styles, B. T. (1993) Genus *Pinus*: A Mexican parview. In T. P. Rammamorthy et al., eds. *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*, pp. 397– 420. New York: Oxford University Press.
- Suh, Y., L.B. Thien, H.E. Reeve, and E.A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Am. J. Bot.* **80**: 1042–1055.
- Swofford, D. L. (1993). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Versión 3.1 Computer program distributed by The Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois.
- Viniegra-Osorio F. (1992) *Geología Histórica de México*. Facultad de Ingeniería, División de Ingeniería en Ciencias de la tierra, Universidad Nacional Autónoma de México, 213 p.
- Takahata, N. (1988). *More on the episodic clock*. *Genetics* **118**: 387–388.
- Takezaki N., Razahetsky A. & Nei M. 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 823–833
- Tomassini-Ortiz A.C. y Martínez Hernández E. (1984). *Palinología del Eoceno-Oligoceno de Simojovel, Chiapas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología, Paleontología Mexicana* 50: 61p.
- Van der Burg, J. (1973). *Holzer der niederheinischen Braunkohlenformation, 2. Holzer der Braunkohlengruben "Maria Theresia" zu Herzogenrath, "Zukunft west" zu Eschweiler und "Victor" (Zulpich Mitte) zu Zulpich. Nebst einer systematisch-anatomischen Bearbeitung der Gattung Pinus L.* *Review of Paleobotany and Palynology* **15**: 73–275.
- Van Nues, R.W., J. M. J. Rientjes, C. A. F. M. Vandersande, S.F. Zerp, C. Sluiter, J. Venema, R. J. Planta, and H. A. Raué. (1994). *Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of Saccharomyces cerevisiae precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA*. *Nucleic Acids Res.* **22**: 912–919.
- Wagner, D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghai-Maroofo, S.M. Williams, B.P. Dancik, & R.W. Allard. (1987). *Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2097–2100.
- Wang X.-R., & Szmidt, A.E. (1993). Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian *Pinus* species (Pinaceae). *Plant Systematics and Evolution* **188**: 197–211.

- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudsuki T., & Sugiura, M. (1994). *Loss of all ndh genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine Pinus thunbergii*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **91**: 9794-9798.
- Wang, X.-R., A.E.Szmidt., A. Lewandowski, Z. -R Wang. (1990). Evolutionry analysis of *Pinus densata* Masters, a putative Tertiary hybrid. 1 Allozyme variation. Theoretical and Applied Genetics **80**: 635-640
- Wang, X.-R., and A.E.Szmidt. (1990). Evolutionry analysis of *Pinus densata* Masters, a putative Tertiary hybrid. 2 A study using species-specific chloroplast DNA markers. Theoretical and Applied Genetics **80**: 641-647
- Wendel, J.F., A. Schnabel, and T. Seelanen. (1995). Bi-directional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). Proc.Natl. Acad. Sci. USA **92**:280-284.
- Wilson AC, Ochman H, Prrager EM. (1987). Molecular time scale for evolution. Trends Genet. **3**: 241-247.
- Wiley, E.O. (1981). Phylogenetics. Jhon Wiley and Sons, New York.
- Zuckerkindl E, Pauling L. (1962). *Molecular disease, evolution, and genic diversity*. In : Kasha M, Pullman B (eds)Horizons in biochemistry. Academic Press, New York, pp 189-225.

APÉNDICE I

Lista de especies y origen

S. Strobilus

ss. Strobus

P. lambertiana	B.C.N.
P. flexilis	N.L.
P. strobiformis	
P. ayacahuite	Chih
P. reflexa	Chih
P. chiapensis	Chiap

S. Parrya

ss. Cembroides

P. cembroides	B.C.S.
P. edulis	B.C.N.
P. quadrifolia	B.C.N.
P. culminicola	N.L.
P. maximartinezii	Zac.
P. pinceana	Coah.
P. nelsonii	S.L.P.
P. catarinae	N.L.
P. lagunae	N.L.
P. johansii	Zac.
P. discolor	S.L.P.
P. rzedowskii	Mich.

S. Pinus

ss. Leiophyllae

P. leiophylla	Mex
P. lumholtzii	Dgo.
P. chihuahuana	Chih.

S. Pinus

ss. Oocarpae

P. radiata	Mex.
P. attenuata	B.C.N.
P. muricata	B.C.N.
P. patula	
P. greggii	Coah.
P. oocarpa	Mex.
P. pringlei	Gro.
P. herrerae	Gro.

S. Pinus

ss. Ponderosae

P. jeffreyi	B.C.N.
P. engelmannii	Dgo.
P. duranguensis	Dgo. Chih.
P. cooperi	Dgo.
P. montezumae	Qro.
P. hartwegii	N.L.
P. michoacana	Jalisco
P. pseudostrobus	Chls.
P. douglasiana	Mex
P. teocote	Veracruz
P. lawsonii	
P. arizonica	Chih.
P. oaxacana	Mex.
P. maximinoi	Gro.

S. Pinus

ss. Australes

P. caribaea	Hond
-------------	------

ss. Sylvestres

P. halepensis	
P. brutia	

S. Pinus

ss. Canarienses

P. roxburghii	
---------------	--

APÉNDICE II

Antecedentes de las técnicas moleculares

2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es un método inventado por Kary Mullis en 1987, que junto con otros investigadores del Departamento de Genética Humana en Cetus, utilizaron originalmente ésta reacción para la amplificación de la *beta-globina* y para el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme (Saiki et al 1985).

La PCR es un método "in vitro" para la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA, usando dos "primers" (oligonucleótidos) que hibridan en cadenas opuestas y flanquean la región de interés en el DNA blanco. Una serie de ciclos repetitivos involucran la desnaturalización del templado, el alineamiento de los "primers" y la extensión de los fragmentos alineados por la DNA polimerasa, dando como resultado la acumulación exponencial de un fragmento específico cuyos términos están definidos por los extremos 5' de los primers. Debido a que la extensión de los productos sintetizados en un ciclo pueden servir como templados del siguiente, el número de copias del DNA blanco se duplica aproximadamente en cada ciclo. Inicialmente se usaba el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* para extender los primers pero esta enzima era inactivada por las altas temperaturas requeridas para la desnaturalización del templado en cada ciclo. Consecuentemente en cada ciclo tenía que añadirse enzima fresca. La introducción de una

DNA polimerasa termoestable (la taq polimerasa) aislada a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*, transformó la técnica de PCR hacia una reacción simple y robusta, la cual ahora puede ser utilizada automáticamente en un termociclador.

El principal inconveniente durante la implementación de las técnicas de amplificación de regiones específicas del DNA, se debe a que los parámetros que a continuación se describen utilizados para el incremento de la especificidad de la amplificación implican un decremento en la concentración del resultado de la amplificación.

Las cantidades o concentraciones de los factores que se utilizan en la PCR determinan en gran medida la eficiencia con que se da la reacción y de igual manera son el origen de muchos problemas al hacer la amplificación

Estos factores determinantes son los siguientes:

DNA templado 100ng; Buffer Rep. 20X: Tris-HCl, pH 8.3 200 mM KCl 1M tween20 0.10% , NP-40 0.10% 1X MgCl₂ 25 1.5 mM dNTP: 0.1mM de cada dATP, dTTP, dCTP, dGTP 100 µM Oligonucleótidos primers: 50 pM por cada uno (ITS5, ITS 26r25s) 2 µ Polimerasa termoestable: 5 U/µl 0.5 µl = 2.5 U Agua bidestilada: ddH₂O BSA 10 mg/ml 0.2 mg/ml (Medio para que la enzima funcione y DMSO 0.2% (impide la formación de estructuras secundarias)

Parámetros de los Ciclos de Amplificación

Básicamente para realizar una reacción de amplificación de DNA por PCR se requiere de tres temperaturas correspondientes a tres pasos en cada ciclo de amplificación:

Desnaturalización. Como se ha mencionado anteriormente, la temperatura de desnaturalización varía dependiendo de la riqueza en composición de pares de bases, que recae generalmente entre los 85 y los 95°C (Lewin, 1994). En general se usan temperaturas por arriba de los 90°C, por lo cual el tiempo de desnaturalización debe ser corto (entre 5 y 15 segundos por ciclo) para evitar amplificaciones inespecíficas. Aunque se ha reportado que el tiempo de vida medio de la enzima es de 45 a 96 minutos a 95°C y de 9 minutos a 97.5°C, es recomendable no dejar largos tiempos arriba de los 90°C, para evitar la inactivación de la enzima.

La desnaturalización incompleta debida a bajas temperaturas provoca que las hebras se vuelvan a cerrar ocasionando así una disminución del producto, pero también altas temperaturas o largos períodos hacen que se pierda la actividad enzimática llegando así a una vida media de 2 Hr 40 min a 92.5 grados y de 5 minutos a 97.5 (Landre et al 1995).

La desnaturalización consiste en la pérdida de los puentes de hidrógeno de la molécula de ADN y los puentes disulfuro que se forman entre bases púricas y pirimídicas a través de altas temperaturas. El tiempo y temperatura de desnaturalización, depende de la concentración de guaninas y citosinas que tenga nuestra secuencia blanco, las condiciones normalmente utilizadas son de 30 segundos a 95°C

Alineamiento de los "primers": la temperatura y el periodo de tiempo requerido para tal evento dependen del tamaño y la concentración de la amplificación de los primers.

En el alineamiento los primers podría requerir unos pocos segundos a concentraciones de 0.2mM para el reconocimiento y unión; incrementando la temperatura se discrimina en contra del incorrecto pegado de primers y se reduce la extensión inespecífica de nucleótidos incorrectos en el extremo 3' de los primers.

La temperatura y el tiempo de alineación dependen de la naturaleza de los primers y de la región a amplificar. En general se usan temperaturas entre los 40° y 60° C (Saiki 1989). Para hacer una amplificación más específica se requieren temperaturas mas cercanas a los 60° y tiempos cortos (10 a 15 segundos). Pero, al hacer este tipo de restricciones se corre el riesgo de eliminar la amplificación.

Extensión del "primer": el tiempo de extensión depende del tamaño y la concentración de la secuencia blanco, la temperatura que se utilice 72 ° C es la temperatura con que se trabaja, la tasa de incorporación de nucleótidos, lo cual depende del pH del buffer, la concentración de sales y la naturaleza del templado; sin embargo, ésta velocidad puede variar en la presencia de DMSO (dimetil sulfoxido) y glicerol (Landre

et al 1995) un tiempo de 1 minuto a 72° es suficiente para que los productos de 2 Kb en tamaño se amplifiquen, aunque un tiempo largo en extensión puede ayudar en los primeros ciclos, si la concentración del sustrato es muy baja y en los últimos, cuando el producto concentrado excede la concentración de la enzima. Los tiempos amplios de extensión así como bajas temperaturas y altas concentraciones de dNTPs favorecen amplificaciones inespecíficas (pegado inespecífico de los primers y la extensión de nucleótidos incorporados erróneamente) por lo cual se deben usar los primers largos a solo dos temperaturas: de 55° a 75° para alineación y de 94 ° a 97° C para la extensión.

2.2 Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP's)

Entre los marcadores basados en la información del DNA se encuentran los RFLP's (Dowlin et al., 1990; Saghai -Maroof et al ., 1995)

Este método implica el corte del DNA con una endonucleasa de restricción, la cual es una enzima que se pega a un dúplex de DNA en secuencias particulares de oligonucleótidos que generalmente son de 4, 5 y 6 pares de bases y que son palindrómicas es decir, reconocen la misma secuencia en los dos sentidos de 5'a 3'o de 3'a 5'.

Originalmente, éstas enzimas se purificaron de bacterias, sin embargo no se encuentran solo confinadas a éstos organismos sino que también se han aislado de virus, algas etc.; (New England Biolabs Catalog 1995) se ha creído que su función biológica es proteger las células de DNA ajeno, actuando como endonucleasas, pero así como éstos organismos codifican enzimas, también hacen modificaciones a su propio DNA para evitar ser digerido; a través de la enzima metyltransferasa se metila uno de los nucleótidos de la secuencia y de esta manera la enzima no reconocerá el sitio donde corta, a esto se le llama sistemas de modificación restricción (SMR), y por lo menos existen tres diferentes tipos que se distinguen por la composición de subunidades, el tipo de secuencias reconocidas y los cofactores necesarios para la actividad ; el 93% de las enzimas pertenece al tipo II al tipo IIS el 5% y al I el 1%.

Las enzimas que aquí se utilizaron son del tipo II que reconocen secuencias simétricas de DNA de doble cadena y cortan dentro de éstas, dejando un extremo 3 OH' de un lado de corte y del otro un fosfato 5', éstas enzimas requieren solo de magnesio para su actividad. La variedad de secuencias que reconocen es ilimitada, pero no reconocen menos de cuatro o mas de ocho bases específicas, esto refleja un balance entre el beneficio de reconocer secuencias muy frecuentes de DNA ajeno y el costo de protegerse esas mismas secuencias en el DNA propio (New England Biolabs Catalog 1995).

Dependiendo del tipo de enzima que utilizemos obtendremos diferentes números de fragmentos. Generalmente cuando una secuencia se encuentra muy representada en un segmento de DNA se obtienen varios fragmentos que tienden a ser muy pequeños por lo cual es necesaria la utilización de geles que permitan la separación de los fragmentos, por ejemplo los geles de agarosa nos permiten un rango entre

los 300 y 20,000 pb, en cambio uno de poliacrilamida nos permite una resolución entre 10 y 1000 pb; otro tipo de agarosa es el Metaphor para resolución más fina de 200 a 800 pb; inclusive llega a tener la misma resolución de bandas pequeñas a una concentración de 1.8% de la que tiene un gel de poliacrilamida a 5.5%. (FMC Bioproducts 1993)

En los RFLPs, la proporción de fragmentos en común puede ser usada para estimar la tasa de sustitución o patrones de divergencia (Nei and Li, 1974); como la relación entre estos dos factores es curvilínea, pequeños errores en el número de fragmentos en común modificarían en gran medida las tasas de sustitución. Por lo que, el uso de los sitios de restricción es más confiable, en cuanto a que disminuye la probabilidad de obtener sitios por convergencia lo cual es más común en los fragmentos.

Protocolo para la purificación de productos de PCR mediante el paquete de QIA Gen.

Se prepara un gel de agarosa/TBE 0.5X (tris borato 45 mM, EDTA 1mM) 1.5% teñido con 10µl de bromuro de etidio 10mg/ml.

Se corre todo el producto de PCR a 80 V durante 2-4 hr aproximadamente.

Con una navaja estéril se corta la banda deseada en el transiluminador de UV con luz de trabajo

Se pesa el segmento de agarosa cortado y se coloca en un tubo eppendorf el segmento debe pesar como máximo 400 mg

Si 100mg = 100 µl, se añaden tres volúmenes del buffer QX1 a un volumen de gel

Se incuba a 50 durante 10 min para disolver el gel

Se añadió lo correspondiente a un volumen de isopropanol frío

Se midió el pH y si era mayor de 7.5 se reducía con acetato de sodio 3M pH 5

Se coloca toda la muestra en la columna superior y se centrifuga a 10 000 g.

Se elimina el contenido de la columna inferior y se monta de nuevo bajo la columna superior

Se lava con 0.75 ml de buffer PE el tubo superior y se centrifuga a 10000 g 1 min.

Se elimina el líquido de la columna inferior y se coloca la columna superior en un tubo eppendorf limpio y sin tapa, centrifugando a máxima velocidad durante un minuto.

Se agregan 50 µl de TE 1X o agua bidestilada y se centrifuga a máxima velocidad 1 minuto este paso se puede repetir añadiendo 20 µl más .

APENDICE III

Tedes	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16															
	M80	M100	M150	R250	R450	R500	R620	R700	R800	R900	R950	R980	R990	R995	R998	R999
1	P. johanis	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
2	P. discolor	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
3	P. culmicola	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
4	P. cambricola	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
5	P. peronea	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
6	P. peronea	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
7	P. catenata	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
8	P. atrobiformis	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
9	P. ayscathae	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
10	P. flexilis	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
11	P. maximiliani	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
12	P. edulis	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
13	P. rzedowskii	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
14	P. nelsoni	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
15	P. quadrifolia	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
16	P. reflexa	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
17	P. hartwegii	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	P. cooperi	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	P. lewisii	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	P. jessii	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	P. schimperi	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	P. douglasiana	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	P. oaxacana	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	P. maximiliani	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	P. arizonica	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	P. montezumae	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
27	P. jefreyi	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	P. dumaguana	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
29	P. oocarpa20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	P. pinnatifida	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	P. chilensis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	P. pinnatifida	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	P. fasciculata	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	P. lumbellii	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	P. radialis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	P. hirsuta	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	P. attenuata	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	P. pubula	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	P. caribaea	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
40	P. bruta	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
41	P. halepensis	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
42	P. roxburghii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	P. Michauxii	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
44	P. Chiriquensis	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
45	P. leucantha	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
46	P. nuncata	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	Picea max	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0

Tedes	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16															
	R100	R150	R200	R250	R300	R350	R400	R450	R500	R550	R600	R650	R700	R750	R800	R850
1	P. johanis	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	P. discolor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3	P. culmicola	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4	P. cambricola	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5	P. peronea	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6	P. peronea	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	P. catenata	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
8	P. atrobiformis	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
9	P. ayscathae	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
10	P. flexilis	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
11	P. maximiliani	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
12	P. edulis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13	P. rzedowskii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
14	P. nelsoni	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	P. quadrifolia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16	P. reflexa	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
17	P. hartwegii	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	P. cooperi	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	P. lewisii	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	P. jessii	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	P. schimperi	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	P. douglasiana	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	P. oaxacana	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	P. maximiliani	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	P. arizonica	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	P. montezumae	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	P. jefreyi	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
28	P. dumaguana	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	P. oocarpa20	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	P. pinnatifida	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	P. chilensis	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	P. fasciculata	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	P. lumbellii	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	P. radialis	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	P. hirsuta	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	P. attenuata	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	P. pubula	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	P. caribaea	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	P. bruta	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	P. halepensis	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	P. roxburghii	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	P. Michauxii	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	P. Chiriquensis	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
44	P. leucantha	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	P. nuncata	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	P. nuncata	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	Picea max	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3		113	114	119	110	102	103	104	105	106	107	108
		0122	0120	0130	0110	0112	0115	0118	0119	0122	0126	0128
1	P. johannis	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
2	P. discolor	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
3	P. culminicola	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
4	P. combroides	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
5	P. pinosana	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
6	P. legumae	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
7	P. castanea	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
8	P. strobiliformi	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
9	P. psacchale	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
10	P. flexilis	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
11	P. masimartin	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
12	P. edulis	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
13	P. rzedowskii	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
14	P. nelsoni	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
15	P. quadrifolia	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	P. reflexa	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
17	P. hartwegii	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
18	P. cooperi	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
19	P. lawsoni	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
20	P. psae. pulcher	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
21	P. engelmanni	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
22	P. douglasiana	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
23	P. oaxacana	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
24	P. masimartini	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
25	P. erionota	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
26	P. montezumae	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
27	P. jeffreyi	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
28	P. duranguensis	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
29	P. coccapa20	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
30	P. pringlei	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
31	P. chihuahuensis	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
32	P. Greggii	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
33	P. leophylla	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
34	P. lumbholtzi	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
35	P. radicata	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
36	P. herrerae	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
37	P. attenuata	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
38	P. schubertii	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
39	P. caribaea	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
40	P. bruta	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
41	P. halepensis	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
42	P. roxburgii	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
43	P. Michoacana	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
44	P. Chiapensis	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
45	P. lambertian	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
46	P. muricata	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0
47	Picea mex	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4		109	110	111	0127	0128	0129	0
1	P. johannis	0	0	0				
2	P. discolor	0	0	0				
3	P. culminicola	0	0	0				
4	P. combroides	0	0	0				
5	P. pinosana	0	0	0				
6	P. legumae	0	0	0				
7	P. castanea	0	0	0				
8	P. strobiliformi	0	1	0				
9	P. psacchale	0	1	0				
10	P. flexilis	0	1	0				
11	P. masimartin	0	0	0				
12	P. edulis	0	0	0				
13	P. rzedowskii	0	0	0				
14	P. nelsoni	0	0	0				
15	P. quadrifolia	0	0	0				
16	P. reflexa	0	1	0				
17	P. hartwegii	1	0	1				
18	P. cooperi	1	0	1				
19	P. lawsoni	1	0	1				
20	P. psae. pulcher	1	0	1				
21	P. engelmanni	1	0	1				
22	P. douglasiana	1	0	1				
23	P. oaxacana	1	0	1				
24	P. masimartini	1	0	1				
25	P. erionota	1	0	1				
26	P. montezumae	1	0	1				
27	P. jeffreyi	1	0	1				
28	P. duranguensis	1	0	1				
29	P. coccapa20	0	1	1				
30	P. pringlei	0	1	1				
31	P. chihuahuensis	0	1	1				
32	P. Greggii	0	1	1				
33	P. leophylla	0	1	1				
34	P. lumbholtzi	0	1	1				
35	P. radicata	0	1	1				
36	P. herrerae	0	1	1				
37	P. attenuata	0	1	1				
38	P. schubertii	0	1	1				
39	P. caribaea	0	1	1				
40	P. bruta	0	1	1				
41	P. halepensis	0	1	1				
42	P. roxburgii	1	0	1				
43	P. Michoacana	0	0	1				
44	P. Chiapensis	0	1	0				
45	P. lambertian	0	0	0				
46	P. muricata	0	1	1				
47	Picea mex	0	0	0				

fragmentos de restricción
nueve endonucleasas:
ae III, Hha I, Msp I, Rsa
ierda están todas las
n el primer renglon todos
on con cada una de las
cada con 0 y 1 , ausencia

Apéndice IV

Distancia géométrica

joh	cem	pin	strobi	aya	flex	max	edu	ize	nel	qua	refl	hart	ari
joh													
cem	0.03876												
pin	0.056	0.09375											
strob	0.543307	0.553558											
aya	0.5625	0.572519	0.574803										
flex	0.559055	0.569231	0.571429	0.015625	0.007752								
max	0.173554	0.177419	0.116667	0.57377	0.577236	0.536	0.109244						
edu	0.064516	0.070866	0.121951	0.52	0.535683	0.536	0.109244						
ize	0.147541	0.152	0.107438	0.560976	0.580645	0.536	0.109244						
nel	0.570093	0.563636	0.584906	0.592593	0.59633	0.536	0.109244						
qua	0.183333	0.186992	0.193277	0.519835	0.638344	0.536	0.109244						
refl	0.587302	0.596899	0.6	0.11811	0.109375	0.536	0.109244						
hart	0.714286	0.705426	0.712	0.669291	0.65625	0.536	0.109244						
ari	0.716535	0.692308	0.714286	0.671875	0.658915	0.536	0.109244						
mont	0.69697	0.674074	0.694656	0.578947	0.567164	0.536	0.109244						
jeff	0.6875	0.679389	0.685039	0.627907	0.615385	0.536	0.109244						
dur	0.712	0.71875	0.725806	0.619048	0.606299	0.536	0.109244						
ooc	0.6875	0.694656	0.700787	0.596899	0.584515	0.536	0.109244						
prin	0.685039	0.692308	0.698413	0.59375	0.581395	0.536	0.109244						
lunth	0.700787	0.707692	0.714286	0.625	0.612403	0.536	0.109244						
rad	0.698413	0.705426	0.712	0.622047	0.609375	0.536	0.109244						
heir	0.696	0.703125	0.709677	0.619048	0.606299	0.536	0.109244						
alte	0.671875	0.679389	0.685039	0.612403	0.6	0.536	0.109244						
car	0.6557381	0.648	0.659421	0.593496	0.580645	0.536	0.109244						
brut	0.679389	0.685657	0.692308	0.621212	0.609023	0.536	0.109244						
halap	0.658333	0.634921	0.655738	0.677419	0.664	0.536	0.109244						
rox	0.583333	0.593496	0.596639	0.157025	0.147541	0.536	0.109244						
mich	0.584905	0.59633	0.580952	0.271028	0.271777	0.536	0.109244						
chlap	0.771929	0.777778	0.769912	0.704348	0.696655	0.536	0.109244						
lamb	0.72477	0.69643	0.72222	0.74545	0.74775	0.536	0.109244						
mur													
Picea													

mont	eff	dur	toc	pin	lumh	rad	hent	alte	car	brut	halep	rox	mch	chia	lamb	muf
0.185185																
0.068702	0.134328															
0.25	0.312977		0.259843													
0.297711	0.358209	0.307682		0.055118												
0.292308	0.353383	0.302326	0.047619	0.007752												
0.261538	0.323308	0.271318	0.015873	0.03876	0.046875											
0.255814	0.318182	0.265625	0.008	0.046875	0.047619											
0.265625	0.312977	0.259843	0.016129	0.055118	0.047619	0.007874	0.008									
0.282443	0.328358	0.261538	0.023622	0.061538	0.054264	0.015873	0.015625	0.023622								
0.186992	0.492063	0.469016	0.528412	0.52459	0.520661	0.53719	0.533333	0.529412	0.52459	0.548387						
0.504	0.515625	0.483871	0.553719	0.548387	0.544715	0.560976	0.557377	0.553719	0.548387	0.548387						
0.268657	0.357664	0.278195	0.246154	0.218045	0.227273	0.242424	0.236641	0.246154	0.246154	0.246154	0.44	0.448819				
0.265714	0.271318	0.248	0.344282	0.36	0.354839	0.33871	0.333333	0.333333	0.327869	0.344	0.487179	0.478992	0.359375			
0.691057	0.619048	0.639242	0.630252	0.606557	0.603306	0.636364	0.633333	0.630252	0.622951	0.561404	0.568966	0.532	0.629332			
0.688073	0.625	0.666866	0.733333	0.703703	0.700935	0.738318	0.735849	0.733333	0.722222	0.64	0.647059	0.711712	0.728155			
0.521368	0.55	0.517242	0.451328	0.241379	0.252174	0.288957	0.298246	0.292035	0.689655	0.648148	0.680509	0.445378	0.585586	0.719626	0.723404	
0.696443	0.704335	0.711171	0.759226	0.747751	0.747751	0.745646	0.761647	0.777778	0.72816	0.733333	0.719281	0.71698	0.75281	0.74509	0.83505	