



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE Pinus pinceana USANDO COMO MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES DE CLOROPLASTO (cpSSR's)

290550

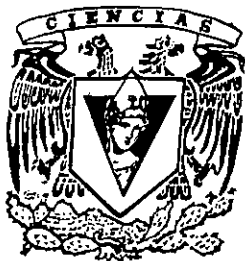
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGA

PRESENTA:

ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DANIEL I. PIÑERO DALMAU

MÉXICO, D.F.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

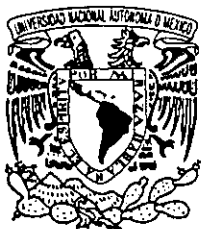


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Estructura genética de poblaciones de Pinus pinceana usando
como marcadores moleculares microsátélites de cloroplasto (cpSSR's)"

realizado por Ana Elena Escalante Hernández

con número de cuenta 9650446-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Daniel Piñero

Propietario Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Luis Enrique Eguiarte Fruns

Propietario M. en C. Patricia Delgado Valerio

Patricia Delgado Valerio

Suplente Biol. Alejandra Vázquez-Lobo Yurén

Alejandra Vázquez-Lobo Yurén

Suplente Dr. Francisco Molina Freaner

Francisco E. Molina F.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz



Dra. Edna María Suárez Díaz DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

ÍNDICE DE CONTENIDO

Pág.

Agradecimientos 7

Resumen 8

Abstract 9

Capítulo 1. Introducción General 10

ANTECEDENTES 10

• Genética de poblaciones 10

○ Variación genética 11

✓ Fuentes de variación 11

○ Diferenciación genética 12

○ Modelos de mutación en genética de poblaciones 13

✓ F_{st} y el modelo de alelos infinitos 13

✓ R_{ST} y el modelo de mutación paso a paso 14

○ Flujo genético 14

• Distancias genéticas 15

• Distancias geográficas 16

• Marcadores moleculares en el estudio de la variación y flujo genéticos 16

○ Microsatélites 18

✓ Modelos de mutación y microsatélites 21

• Reproducción y sistema genético en pinos 22

○ Sistema reproductivo 22

○ Sistema genético 23

• Descripción de la especie 23

○ Clasificación y morfología 23

○ Distribución y ecología 24

• Historia del Grupo Cembroides 28

JUSTIFICACIÓN 29

OBJETIVOS 30

• Generales 30

• Particulares 30

HIPÓTESIS 31

Capítulo 2. Métodos 32

• Material biológico 32

• Extracción de DNA 32

• Microsatélites 33

○ Marcaje radioactivo 33

○ Amplificación de microsatélites 34

○ Electroforesis en geles de poliacrilamida 37

• Captura de datos 38

ÍNDICE DE CONTENIDO

Pág.

- Análisis de datos 38
 - Variación genética 38
 - ✓ Diversidad de genes (H) 39
 - ✓ Media del número de diferencias por pares de haplotipos (π) 39
 - ✓ Estimado indirecto del tamaño poblacional 39
 - Estructura genética, flujo genético y tiempos de coalescencia 39
 - ✓ Estructura genética 40
 - ✓ Flujo genético 41
 - ✓ Tiempos de coalescencia 42
 - Distancias genéticas 43
 - Distancias geográficas 44
 - Asociación entre estructura genética y distancia geográfica 44
 - Demografía histórica 44
 - ✓ Inferencia de la historia poblacional a partir de filogenias moleculares 44
 - ✓ Distribución Mismatch 46

Capítulo 3. Resultados 48

- Variación genética 48
- Estructura genética, flujo genético y tiempos de coalescencia 51
 - Estructura genética 51
 - Flujo genético 54
 - Tiempos de coalescencia 55
- Distancias genéticas 56
- Distancias geográficas 58
- Asociación entre estructura genética y distancia geográfica 58
- Demografía histórica 61
 - Inferencia de la historia poblacional a partir de filogenias moleculares 61
 - Distribución Mismatch 67

Capítulo 4. Discusión 68

- Variación genética 68
- Estructura genética, flujo genético y tiempos de coalescencia 72
 - Estructura genética 72
 - Flujo genético 75
 - Tiempos de coalescencia 76

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
• Distancias genéticas y geográficas, relación entre estructura genética y distancia geográfica	77
• Modelos de mutación para genética de poblaciones usando microsatélites	80
• Historia de la especie	80
o Inferencia de la historia poblacional a partir de filogenias moleculares	80
o Distribución Mismatch	82
• Conservación	82
• Perspectivas	82
Capítulo 5. Conclusiones	84
Apéndice 1	85
Bibliografía	86

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
TABLAS	
Tabla 1 Técnicas para analizar fragmentos de DNA y sus posibles aplicaciones a diferentes problemas de sistemática molecular.	17
Tabla 2 Cinco clases de secuencias simples repetidas en tandem (SSR's).	17
Tabla 3 Características morfológicas de <i>Pinus pinceana</i> .	24
Tabla 4 Poblaciones analizadas de <i>Pinus pinceana</i> en México.	26
Tabla 5 Volumen y concentraciones de los reactivos para realizar la reacción de PCR.	35
Tabla 6 Secuencias de los cebadores de cloroplasto de <i>Pinus thunbergii</i> utilizados para la amplificación de los microsatélites de <i>Pinus pinceana</i> en México.	36
Tabla 7 Alelos encontrados para cada locus de cpSSR en <i>Pinus pinceana</i> , codificados de acuerdo con su composición en número de pares de bases (pb).	48
Tabla 8 Frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	49
Tabla 9 Frecuencias alélicas encontradas para cada locus de cpSSR en las poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	49

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Pág.

TABLAS

Tabla 10	Valores de diversidad genética y tamaño poblacional estimado para las poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	51
Tabla 11	Resultados de la prueba de AMOVA con el método de distancia correspondiente al número de alelos diferentes = F_{st} , aplicada a una estructura de 6 poblaciones en 3 grupos (de 2 poblaciones cada uno) de <i>Pinus pinceana</i> en México.	52
Tabla 12	Resultados de la prueba de AMOVA con el método de distancia correspondiente a la suma de las diferencias cuadradas del tamaño de haplotipos = R_{st} , aplicada a una estructura de 6 poblaciones en 3 grupos (de 2 poblaciones cada uno) de <i>Pinus pinceana</i> en México.	53
Tabla 13	Valores de diferenciación genética entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México obtenidos a partir del número de diferencias entre los haplotipos de las poblaciones (F_{st}).	54
Tabla 14	Valores de diferenciación genética entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México obtenidos a partir de la suma de las diferencias cuadradas en el tamaño de los haplotipos entre las poblaciones (R_{st}).	54
Tabla 15	Número absoluto de migrantes (M_F) entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México, calculado a partir de F_{st} .	55
Tabla 16	Número absoluto de migrantes (M_R) entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México, calculado a partir de R_{st} .	55
Tabla 17	Tiempos de coalescencia entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México, obtenidos según Slatkin (1995) a partir de F_{st} .	56
Tabla 18	Tiempos de coalescencia entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México, obtenidos según Slatkin (1995) a partir de R_{st} .	56
Tabla 19	Distancias genéticas normalizadas de Nei (D_A), según el modelo de alelos infinitos (F_{st}) para poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	57
Tabla 20	Distancias genéticas normalizadas de Nei (D_A), según el modelo de mutación paso a paso (R_{st}) para poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	57
Tabla 21	Distancias geográficas en km. entre todas las poblaciones analizadas de <i>Pinus pinceana</i> en México.	58

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Pág.

TABLAS

Tabla 22	Coeficientes de correlación (r) entre los valores obtenidos para diferenciación genética (F_{st} y R_{st}), número de migrantes (M), distancia genética (D_A) y tiempos de divergencia obtenidos según el modelo de alelos infinitos y según el modelo de mutación paso a paso para las poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	61
Tabla 23	Valores de variación genética (H_e) para varias especies de <i>Pinus</i> así como otras especies.	70
Tabla 24	Valores de diferenciación genética entre poblaciones de diferentes especies	73

FIGURAS

Figura 1	El modelo de islas de Wright.	15
Figura 2	Generación de duplicaciones o deleciones por error en el apareamiento durante la replicación entre repeticiones contiguas.	20
Figura 3	Distribución de las poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> incluidas en el presente estudio.	27
Figura 4	Muestra de las bandas que se observan en una placa radiográfica resultado de la exposición de geles de poliacrilamida con muestras de amplificadores radioactivos de microsatélites de cloroplasto de <i>Pinus pinceana</i> (locus Pt 63718 alelos 93 y 95).	37
Figura 5	Inferencia de la historia poblacional a partir de filogenias moleculares.	45
Figura 6	Correlación entre el número de migrantes entre poblaciones calculado a partir de F_{st} (M_F) y la distancia geográfica entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	59
Figura 7	Correlación entre el número de migrantes entre poblaciones calculado a partir de R_{st} (M_R) y la distancia geográfica entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	59
Figura 8	Correlación entre la distancia genética normalizada de Nei (D_A) para el modelo de alelos infinitos y la distancia geográfica entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	60
Figura 9	Correlación entre la distancia genética normalizada de Nei (D_A) para el modelo de mutación paso a paso y la distancia geográfica entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México.	60
Figura 10	Árbol de Neighbor-Joining obtenido a partir de las distancias genéticas (D_A) entre poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> en México bajo el modelo de alelos infinitos (F_{st}).	62

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Pág.

FIGURAS

- Figura 11 Árbol de Neighbor-Joining obtenido a partir de las distancias genéticas (D_A) entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México bajo el modelo de mutación paso a paso (R_{st}). 62
- Figura 12 Número de linajes existentes a través del tiempo estimado a partir de las distancias de Nei con el modelo de alelos infinitos (F_{st}) para las poblaciones estudiadas de *Pinus pinceana* en México según el método de Nee *et al.* (1996). 63
- Figura 13 Número de linajes existentes a través del tiempo estimado a partir de las distancias de Nei usando el modelo de mutación paso a paso (R_{st}) para las poblaciones estudiadas de *Pinus pinceana* en México según el método de Nee *et al.* (1996). 63
- Figura 14 Árbol de Neighbor-Joining obtenido a partir de las diferencias en tamaño de los haplotipos de microsatélites de cloroplasto de *Pinus pinceana* en México. 64
- Figura 15 Número de linajes existentes a través del tiempo estimado a partir de las diferencias en tamaño entre los haplotipos de microsatélites de cloroplasto de *Pinus pinceana* en México según el método de Nee *et al.* (1996). 65
- Figura 16 Red de haplotipos de microsatélites de cloroplasto que representa las diferencias en el número de pasos entre individuos de poblaciones mexicanas de *Pinus pinceana*. 66
- Figura 17 Distribuciones observadas y esperadas del número de diferencias entre pares de individuos de todas las poblaciones de *Pinus pinceana* en México de acuerdo con el modelo de expansión súbita de Rogers (1995) o distribución *mismatch*. 67
- Figura 18 Relación entre valores de heterocigosis obtenidos mediante análisis genéticos con isoenzimas (Molina-Freaner *et al.* 2001; Ledig *et al.* manuscrito en preparación) y con microsatélites de cloroplasto para algunas poblaciones mexicanas de *Pinus pinceana*. 71
- Figura 19 Comparación entre los valores de distancia genética por pares de poblaciones obtenidos con isoenzimas (Ledig *et al.* manuscrito en preparación) y con microsatélites de cloroplasto para algunas poblaciones mexicanas de *Pinus pinceana*. 79
- Figura 20 Árboles de distancia genética entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México. a) Según Ledig *et al.* (2001 manuscrito en preparación). b) Según Molina-Freaner *et al.* (2001). 79

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos al Dr. Daniel Piñero Dalmau por su gran apoyo y dirección a lo largo de este trabajo, así como por su confianza y paciencia durante todo el tiempo que tardó la realización del mismo.

Agradezco también a Rocío Esteban por su valiosa ayuda y apoyo en la parte técnica del trabajo. Quiero dar las gracias especialmente a Argelia Cuenca por su apoyo y solidaridad a lo largo de todo este proyecto. También gracias a Patricia Delgado por su ayuda y a cada uno de los integrantes del laboratorio de Genética y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM que de una u otra manera forman parte de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial al laboratorio de la Dra. Ma. Teresa Tusié de la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría y en particular al Dr. Antonio Ulises López Gutiérrez por su valiosísimo apoyo que fue de crucial importancia para desarrollar este estudio.

Agradezco el apoyo de mi familia, especialmente de mis padres Víctor Escalante Robleda y Ma. del Pilar Hernández Guerrero quienes han sido el principal apoyo durante toda mi vida académica y personal y a quienes dedico este trabajo como culminación de sus esfuerzos en mi formación profesional. Agradezco también a mi hermana Mariana Escalante Hernández quien me ha permitido ver con más objetividad a la ciencia.

Agradezco a mis maestros y a mis amigos, especialmente a Paola Gómez Priego y a Rocío Montes de Oca Ruiz quienes han estado cerca o lejos pero, de cualquier manera, al pendiente y apoyándome en este trabajo y con quienes compartí la mayor parte de mi formación como bióloga.

Por último y muy especialmente agradezco el apoyo, cariño y comprensión de Rodrigo González Chauvet pues me ayudó siempre a no abandonar la idea de este trabajo y quien es una parte muy importante de mi vida. Agradezco también el interés de toda su familia al respecto de este trabajo y de lo que implica el haberlo concluido.

RESUMEN

Pinus pinceana es una especie de pino mexicana perteneciente al grupo *Cembroides* (pinos piñoneros). Se encuentra distribuida en zonas montañosas y áridas, característica poco común entre los pinos. Se conocen pocas poblaciones de *Pinus pinceana* en un rango limitado de distribución en México y se considera una especie rara y en probable peligro de extinción (Perry 1991) o sujeta a protección especial (Diario Oficial 2000).

El presente estudio abarca 6 poblaciones de la especie (que representan todo el rango geográfico que ocupa) y en él se obtuvieron varios estimadores genéticos a partir del análisis de 4 microsatélites polimórficos de cloroplasto (Pt 30204, Pt 71936, Pt 63718 y Pt 110048). Los estimadores se calcularon bajo dos modelos de mutación diferentes, el modelo de alelos infinitos en donde el estimador principal de la estructura genética es F_{st} y el modelo de mutación paso a paso en donde el estimador principal de la estructura genética es R_{st} .

Los resultados obtenidos muestran que *Pinus pinceana* presenta niveles altos de heterocigosis en términos globales ($H=0.8237$), sin embargo la heterocigosis de las poblaciones es muy heterogénea (H de 0 a 0.7579). La estructura genética se relaciona fuertemente con la distribución geográfica y el flujo genético entre poblaciones está directamente relacionado con la distancia geográfica entre ellas, esto se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia revelado tanto por el modelo de alelos infinitos como por el de mutación paso a paso. La estructura genética es de 3 grupos con 2 poblaciones cada uno y la variación total de la especie está representada en más de un 78% por la variación que existe entre grupos según el modelo de alelos infinitos y en más de un 93% según el modelo de mutación paso a paso. La diferenciación genética entre grupos es notable, no así la diferenciación entre poblaciones de un mismo grupo (nula), por lo que la estrategia de conservación deberá consistir en rescatar al menos una población de cada parche, aquéllas con más variación. En general todos los estimados que surgen del modelo de alelos infinitos tienden a subestimar la diferenciación entre poblaciones y grupos en comparación con los estimados que surgen del modelo de mutación paso a paso. En cuanto a la historia de la especie, los análisis de árboles de distancia y de distribución mismatch generan un panorama en el que se observa que la especie está en un proceso de fragmentación (Nee *et al.* 1996) y que no ha experimentado ningún evento de crecimiento súbito (Rogers 1995). Es probable que la estructura actual en parches sea resultado de la fragmentación de una distribución continua original, debida a cambios climáticos en el Pleistoceno. Finalmente, el uso de microsatélites de cloroplasto resultó mucho más poderoso para revelar la variación y la estructura genética de la especie que las isoenzimas utilizadas en estudios anteriores con la misma especie.

ABSTRACT

Pinus pinceana (*Pinus* subsection *Cembroides*) is a pinyon pine distributed in the dry rocky hills of Mexico. *P. pinceana* is known only from approximately 10 populations, all of which are small. The species is considered as rare and probably endangered by Perry (1991), and is listed as in need of special protection (Diario Oficial 2000).

The present study examined 6 populations representing the entire geographic range of the species (Coahuila, San Luis Potosí, Querétaro e Hidalgo). We obtained several genetic estimators by the analysis of 4 polymorphic chloroplast microsatellites (Pt 30204, Pt 71936, Pt 63718 and Pt 110048). All the calculations were made under two different mutation models, the infinite alleles model with F_{st} as the main genetic structure estimator, and the stepwise mutation model with R_{st} as the main genetic structure estimator.

The results indicate that *P. pinceana* has high levels of total variation ($H = 0.8237$), but at the population level this variation is very heterogeneous (H from 0 to 0.7579). The genetic structure is strongly related to the geographic distribution, and the genetic flow between populations is directly associated with the geographic distance between them. This is consistent with a pattern of isolation by distance and was supported by both the infinite alleles and stepwise mutation models. The genetic structure has three groups of two populations each, with the variation between groups accounting for 78 and 93 percent of the total variation in the infinite alleles model and stepwise mutation model, respectively. Genetic differentiation between groups is important and differentiation between populations within the same group is negligible. This haplotype distribution suggests a conservation strategy where at least the most variable population from each group should be protected.

In general all the estimations obtained by the infinite alleles mutation model tend to underestimate the differentiation between populations and groups in comparison to the stepwise mutation model. Interpretation of the distance trees and analysis of the mismatch distribution reveals a scenario in which *P. pinceana* is in a fragmentation process (Nee *et al.* 1996) and has not passed through a significant expansion event (Rogers 1995). The present distribution of *P. pinceana* is probably the result of the fragmentation of a previously continuous distribution caused by a climatic change during the Pleistocene. Finally, the chloroplast microsatellites proved to be a more powerful molecular marker than allozymes (in previous studies) for revealing variation and genetic structure in *P. pinceana*.

ANTECEDENTES

GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones tiene dos vertientes principales que, aunque relacionadas, pueden distinguirse una de la otra. La primera se dedica a determinar la estructura genética de las poblaciones y tiene un enfoque práctico; la segunda presenta un enfoque básicamente teórico y se encarga de modelar matemáticamente las diferentes fuerzas evolutivas que moldean y afectan a las poblaciones.

La base fundamental de la genética de poblaciones se resume en la Ley de Hardy-Weinberg, que describe una población diploide en equilibrio y que existe bajo los siguientes supuestos: apareamiento al azar (panmixia), ausencia de mutación, sin deriva génica (tamaño infinito de población), sin migración y sin selección, es decir, una población que no evoluciona. El objetivo de la Ley de Hardy-Weinberg es establecer un punto de referencia a partir del cual comparamos poblaciones reales, las cuales esperamos que no estén en el equilibrio que plantea Hardy-Weinberg. Es a partir de esta comparación que se puede empezar a investigar cuáles son las causas que hacen que la población real se aparte del equilibrio y decir cuál o cuáles de las fuerzas evolutivas están ejerciendo la influencia principal en la estructura genética y en el devenir evolutivo de dicha población.

El equilibrio Hardy-Weinberg es expresado en una ecuación (la expansión del binomio $(p+q)^2$) que incluye las frecuencias genotípicas esperadas en una población diploide para un solo locus, esto es, la frecuencia genotípica para los homocigos de cada alelo (AA y aa) y la frecuencia genotípica para el heterocigo (Aa). Según la ecuación de equilibrio Hardy-Weinberg, dadas ciertas frecuencias de los alelos (A y a) y en ausencia de fuerzas evolutivas, las frecuencias genotípicas se deben mantener constantes de generación a generación. Esto es:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

donde $p = f(A)$

$$q = f(a)$$

$$p^2 = f(AA) = D$$

$$2pq = f(Aa) = H$$

$$q^2 = f(aa) = R$$

Dado que p y q son frecuencias alélicas y estamos hablando de una población diploide, $p + q = 1$ (Hartl 1989).

Variación genética

La variación entre individuos de una misma especie fue originalmente descrita a nivel morfológico, esto es la variación fenotípica. Esta variación fue la que llamó la atención de los naturalistas en el siglo XIX, entre ellos Darwin, quien la registró y estudió, lo cual le llevó a las conclusiones sobre el origen y evolución de las especies, plasmadas en *El Origen de las Especies* (1859). Con la integración a la teoría evolutiva de los estudios sobre la herencia de Mendel, ya en el siglo XX, se tienen las herramientas para entender los mecanismos genéticos involucrados en la evolución, y se empieza a estudiar también la variación genotípica (a nivel de información genética).

Posteriormente, con los nuevos estudios moleculares del DNA, se conoce, el alto nivel de variación entre individuos de una misma especie o polimorfismo. Tal variación puede existir en uno o más niveles de variación fenotípica (Griffiths *et al.* 1996). Se considera que un carácter (morfológico o genotípico), es polimórfico cuando existe más de una forma de ese carácter en la población. Para estudios sobre genética de poblaciones se considera polimorfismo (P) cuando el carácter más frecuente no excede una frecuencia de 95% en la muestra estudiada (Delgado *et al.* 1999). Aparte de P , otro estimador muy utilizado de la variación genética, es la heterocigosis esperada (H_e) en una población. Esto significa que es necesario determinar el valor de $2pq$ o H , valor que se encuentra entre 0 y 1 (por tratarse de una frecuencia), en donde el valor máximo bajo equilibrio Hardy-Weinberg es de 0.5 (Hartl 1989). En el caso de genomas haploides también es posible estimar la variación genética, el estimador que se usa es llamado H o diversidad de genes por Nei (1987) y es el equivalente a H_e en datos diploides.

Fuentes de variación

Por un lado existen tres fuentes que generan nueva variación genética en una población: mutación, recombinación y migración. Por otro lado, existen otras dos fuerzas evolutivas que reducen la variación de las poblaciones, la deriva génica y la selección. Las reducciones más importantes en la variación genética de las poblaciones se han visto generadas, por reducciones drásticas en el tamaño efectivo de sus poblaciones (deriva génica) conocidas como cuellos de botella, en los cuales ocurre un muestreo aleatorio de individuos y su correspondiente información genética. Estos individuos sobrevivientes del cuello de botella son a partir de los cuales las poblaciones volverán a crecer en número de individuos. Sin embargo, en muchas ocasiones son tan pocos los individuos restantes que el apareamiento logra rápidamente que se fijen alelos en la población, reduciendo la variación genética drásticamente, y aunque el número de individuos en la población llegue a ser relativamente grande, el número de variantes genotípicas en la población es pequeño. Es verdaderamente muy difícil que la mutación, recombinación y migración logren recuperar rápidamente la variación perdida por cuellos de botella, es más probable que llegue la extinción a una recuperación genética de las poblaciones porque la recuperación de la variación es función del

tamaño de la población. La mutación tardará $4Nu$ generaciones en recuperar la variación.

Altos niveles de homocigosis pueden deberse a uno o una serie de cuellos de botella en la historia de las poblaciones. Para el caso particular de detectar variación en poblaciones que se supone que han pasado por cuellos de botella, los marcadores de DNA de genomas haploides y heredados uniparentalmente (ej. genoma del cloroplasto en pinos) son indicadores más sensibles de grandes reducciones en el tamaño poblacional porque tienen un tamaño efectivo poblacional dos veces más pequeño que el de genomas nucleares diploides en especies monoicas (caso de los pinos; Mitton 1993). Los genomas haploides que son transmitidos sólo a través de uno de los padres, también retienen un registro clonal de nuevas mutaciones, mientras que este registro es oscurecido en genomas que recombinan las contribuciones genéticas de ambos padres en cada generación (Echt *et al.* 1998).

Diferenciación genética

En muchas especies, sobre todo en aquellas que ocupan regiones geográficas muy amplias, o en las que dentro de su distribución existen barreras geográficas considerables tales que no es posible la migración, o ésta es muy limitada, hay subdivisión poblacional, es decir, el comportamiento no es de una población única con apareamiento al azar.

Cuando las poblaciones se dividen, eventualmente se diferencian genéticamente. Existe un parámetro que nos ayuda a determinar el grado de diferenciación genética entre las poblaciones y, de alguna manera es un reflejo del aislamiento que existe entre ellas, este parámetro es conocido como *Fst*.

Fst es un estimado que surge a partir de la original *F* de Wright. Esta *F* es simplemente un cálculo que nos permite determinar a partir de la ecuación general de Hardy-Weinberg si existen desviaciones del equilibrio debidas a violaciones al supuesto de apareamiento al azar, lo cual puede ser debido a altos niveles de endogamia o a subdivisión poblacional (Gillespie 1998). Mientras que *F* nos da una idea de la estructura de la especie, *Fst* nos indica la porción de la variación que se debe a la diferenciación entre las subpoblaciones.

Fst se define como una medida de la diferencia que existe entre la probabilidad de tomar al azar dos alelos idénticos dentro de una subdivisión y la probabilidad de tomar al azar dos alelos idénticos en toda la especie (Gillespie 1998). De este modo, si las probabilidades son iguales *Fst* será 0 y la conclusión será que no hay subdivisión, entre mayor sea el valor de *Fst*, mayor será la subdivisión poblacional, si *Fst* es igual a 1 significa que hay una subdivisión total, que cada subdivisión presenta una estructura genética diferente y para diferentes alelos. La ecuación que define a *Fst* según Wright (1951) es:

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

Donde $F_{st} > 0$

H_t = es la heterocigosis esperada del total de las poblaciones para todos los loci.

H_s = es el promedio de la heterocigosis esperada de cada una de las poblaciones para todos los loci .

Modelos de mutación en genética de poblaciones

F_{st} y el modelo de alelos infinitos

F_{st} es una medida de la subdivisión poblacional, F_{st} es definida según Wright (1951) como en el párrafo anterior.

F_{st} siempre es mayor o igual a cero. Si la población está en equilibrio Hardy-Weinberg, $F_{st} = 0$ (Hartl & Clark 1989). Esta definición de F_{st} se ajusta a un modelo de mutación de alelos infinitos (Wright 1949; Kimura & Crow 1964), el cual supone que toda mutación crea un nuevo alelo o un alelo que no existe en la población en ese momento (Li 1997). Además este modelo supone tasas de mutación relativamente bajas, lo cual es razonable para muchos loci de isoenzimas, no así para los de microsatélites (Slatkin 1995).

Con loci tan variables como los de microsatélites, tanto H_T como H_S pueden ser muy cercanos a 1, y por ello F_{st} muy pequeña. F_{st} no considera que en dos poblaciones la heterocigosis sea alta y debida a alelos diferentes en cada caso, F_{st} será pequeña a pesar de que la diferenciación sea clara entre ambas poblaciones. Por el otro lado, los loci de microsatélites tienen una tasa de mutación alta, lo que puede generar convergencia de alelos y en dado caso podría parecer que los alelos de dos poblaciones son iguales aunque provengan de microsatélites predecesores diferentes, por lo que F_{st} también en este caso será pequeña (1999).

Bajo este modelo de alelos infinitos, la mutación borra la memoria del estado alélico anterior, por lo que una similitud extrema entre poblaciones medida con F_{st} puede ser sólo atribuida a migración o a una asociación histórica (Slatkin 1995).

Entonces, de acuerdo con el modelo de alelos infinitos que se utiliza para derivar F_{st} , no se considera la historia de los alelos que se originan por mutación de los microsatélites, los cuales son más parecidos entre sí entre menor número de diferencias tengan en el número de repeticiones.

R_{st} y el modelo de mutación paso a paso

Basándose en que en el caso de los microsatélites las tasas de mutación son altas y que este proceso no borra la información acerca del estado ancestral, Slatkin (1995) sugiere un estimador de diferenciación entre poblaciones para loci muy variables que se ajuste a un modelo de mutación paso a paso (Ohta & Kimura 1973) con memoria del estado ancestral. Este estimador es R_{st} (Slatkin 1995):

$$R_{st} = (\bar{S} - \bar{S}_W) / \bar{S}$$

donde: \bar{S}_W = 2 veces la varianza promedio de tamaño de alelo en cada población.
 \bar{S} = 2 veces la varianza estimada del tamaño de alelo en todas las poblaciones.

En el modelo de mutación paso a paso los posibles estados alélicos se visualizan como los componentes de una línea, una mutación causa que el estado del alelo se mueva un paso a la derecha o a la izquierda. Sin embargo ni este modelo ni el de alelos infinitos pueden distinguir la posible convergencia de alelos.

Flujo genético

El flujo génico uniformiza a las poblaciones de una especie y contrarresta la diferenciación genética que pudiera ocurrir por el aislamiento geográfico. Al mismo tiempo, el flujo génico promueve la dispersión de genes y con ello recombinación a lo largo del área de distribución de la especie (Slatkin 1987).

Es difícil (en sentido práctico) hacer estimaciones directas del flujo genético, ya que se requiere conocer el número de migrantes entre las poblaciones. Para ello, en el caso de plantas, es necesario hacer mediciones y captura de polen y semillas. Sin embargo, existen modelos matemáticos que permiten hacer estimaciones indirectas del flujo genético entre las poblaciones. Entre estos modelos está el modelo de islas de Wright, que permite calcular el flujo genético (Nm) a partir de F_{st} .

El modelo de islas de Wright supone una muy pequeña migración entre parches o islas para prevenir deriva génica. En este modelo una población grande es fragmentada en varias subpoblaciones dispersadas geográficamente como islas en un archipiélago (Hartl 1980). Se asume que cada subpoblación es suficientemente grande y con un pequeño pero suficiente número de migrantes entre islas como para prevenir deriva génica.

En el modelo de islas las principales fuerzas evolutivas son migración y deriva génica. Son estas dos fuerzas las que probablemente son las más fuertes en el

modelamiento del estado actual de las poblaciones de *Pinus pinceana*. Bajo este modelo de islas, eventualmente se alcanza un equilibrio, determinado por el tamaño de la población (N) y el número de migrantes por generación (m) (Gillespie 1998). En este modelo en el que la migración se aproxima a un patrón de islas, en donde la población está en equilibrio y la variación en todos los loci es neutra (Gillespie 1998), F_{st} puede estimarse de la siguiente manera:

$$F_{st} = 1/(1+4Nm)$$

donde N = tamaño poblacional (tamaño de las islas)
 m = número de migrantes por generación

De este modo si conocemos el valor de F_{st} podemos saber el flujo genético entre poblaciones (Nm). En esta última ecuación se integran los parámetros N y m porque ambos son determinantes en la deriva génica y por lo tanto en el valor de F_{st} , ya que si existe una deriva importante (N y m pequeñas) el valor de F_{st} será muy grande, lo que indicará gran diferenciación entre las subdivisiones.

El modelo de islas de Wright (1951), menciona que si Nm es mayor a 1 se debe esperar poca diferenciación, porque la migración no permite que se presente deriva génica. Sin embargo Kimura (1983) argumenta que en algunos casos con valores de Nm mayores a 5 se puede seguir detectando cierta diferenciación genética.

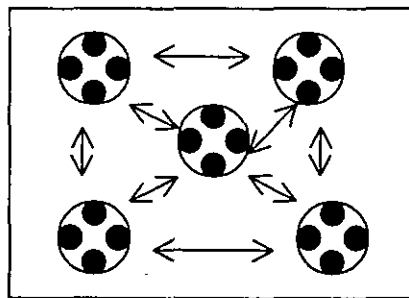


Fig. 1 . El modelo de islas de Wright (Hartl 1980).

DISTANCIAS GENÉTICAS

Existen muchas propuestas sobre como medir la distancia genética, sin embargo todas se relacionan de alguna manera con F_{st} . Una de las medidas de distancia genética más utilizada es la D de Nei (1975). La base de esta medida es la identidad genética normalizada (I), que expresa la probabilidad de que al escoger al azar un alelo en 2 poblaciones diferentes (X y Y), resulten ser alelos idénticos, en relación a la probabilidad de hallar alelos idénticos tomados al azar dentro de cada una de las poblaciones (Hartl 1989), esto es:

$$I = J_{XY} / (J_{XX}J_{YY})^{1/2}$$

Donde:

$J_{XX} = \sum p_i^2$; probabilidad de hallar 2 alelos idénticos tomándolos al azar en la población X.

$J_{YY} = \sum q_i^2$; probabilidad de hallar 2 alelos idénticos tomándolos al azar en la población Y.

$J_{XY} = \sum p_i q_i$; probabilidad de hallar 2 alelos idénticos tomando al azar uno de la población X y uno de la población Y.

A partir de las identidades genéticas, se puede conocer la distancia genética (D), de la siguiente manera:

$$D = -\ln (I)$$

Las identidades y distancias genéticas se obtienen para pares de poblaciones. La identidad (I) toma valores que van de cero si no comparten alelos, hasta 1 si las frecuencias alélicas son idénticas. La distancia (D), tiene un valor de cero si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, y de infinito si no comparten ningún alelo (Hedrick 1983).

DISTANCIAS GEOGRÁFICAS

Para calcular la distancia lineal que separa a las poblaciones muestreadas, se construye una matriz con las coordenadas en grados de latitud y longitud (obtenidas con un GPS y cartas del INEGI), las cuales se transforman de grados a kilómetros. Ya con la ubicación de las coordenadas en kilómetros se logra establecer las distancias entre poblaciones con un simple sistema de triangulación o método de las coordenadas proyectadas de Mercator (Le Corre *et al.* 1997).

MARCADORES MOLECULARES EN EL ESTUDIO DE LA VARIACIÓN Y FLUJO GENÉTICOS

Las diferencias genéticas entre individuos en el número y/o patrones de fragmentos de DNA pueden estudiarse a través de métodos distintos. Entre ellos está el análisis de microsatélites (Tabla 1).

Estudios moleculares del genoma de diversos organismos han revelado la existencia de diferentes tipos de secuencias repetidas en tandem, las cuales se agrupan bajo el nombre de **secuencias simples repetidas en tandem (SSR's)**, estas son 1) satélites, 2) minisatélites, 3) repeticiones pequeñas en tandem (short tandem repeats), 4) microsatélites y 5) arreglos *Alu* (Li, 1997). La diferencia principal entre ellas es el número de unidades de repetición que presentan (Tabla 2).

Tabla 1. Técnicas para analizar fragmentos de DNA y sus posibles aplicaciones a diferentes problemas de sistemática molecular (Dowling, *et al.* 1996)

Tipo de cambio en la secuencia		Mutación Puntual		Copias o macroindeles (inserciones y/o deleciones)		
		Sitios de Restricción	SSCP DGGE	RAPDs	VNTRs (<10pb)	Microsatélites PCR (<5pb)
Ensayos						
Nivel de aplicación		← Amplio →		← Intraespecífico →		
Tipos de aplicación	Sistemas de apareamiento	+	++	-/++	+++	+++
	Diversidad	+++	++	+	+	+++
	Paternalidad	++	++	+	+++	+++
	Parentesco	++	++	-	+/++	+++
	Variación geográfica	+++	++	+	++	++
	Zonas híbridas y límites de especies	+++	++	+++	-	-
Filogenia	+++	-	-	-	-	

Tabla 2. Cinco clases de secuencias simples repetidas en tandem (SSR's) (Li 1997)

	Clase	Tamaño de la unidad de repetición (pares de bases)	Tamaño del arreglo (unidades de repetición)	Distribución en el genoma
	Satélites	2-100s	≥100s	Centrómeros Heterocromatina
VNTR	Minisatélites	9-100	10-100	Dispersa Subtelomérica
VNTR	Repeticiones pequeñas En tandem	3-5	10-100	Dispersa
VNTR	Microsatélites	1-2 y hasta 5	10-100	Dispersa
VNTR	Arreglos <i>Alu</i>	1-5	10-40	Dispersa

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats.

Microsatélites

Los microsatélites son SSR's del tipo VNTR, cuya unidad de repetición puede ir de una a cinco pares de bases. Se encuentran en el núcleo de eucariontes y sus organelos (cloroplasto y mitocondria), así como parcialmente en procariontes y eubacterias (Hamada 1982; Gebhard 1983; Tautz 1984; Gross 1986; Greaves 1985; Schèfer 1986). Pueden clasificarse en 3 familias: puros, compuestos e interrumpidos (Jarne 1996), por ejemplo, en el caso de un microsatélite trinucleótido:

Puro	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
Compuesto	CAGCAGCAGCAGCATCATCATC
Interrumpido	CAGCAGTTCAGCAGCAGTTCAG

Los SSR's, se encuentran dentro de los marcadores moleculares más polimórficos debido a sus altas tasas de mutación (Dallas 1992; Weber & Wong 1993; Di Rienzo *et al.* 1994; Ellegren 1995). Algunos minisatélites humanos presentan tasas de mutación por gameto de hasta 0.052 (Jeffreys *et al.* 1988), siendo que los valores promedio de mutaciones puntuales espontáneas por generación en un gene giran alrededor de $\times 10^{-6}$ (Griffiths *et al.* 1996). Esto hace que los SSR's, particularmente que los microsatélites sean considerados como un marcador molecular muy útil para detectar la variación genética, a tal grado que es posible identificar individuos de una población con unos pocos loci (Tautz 1989).

Por su alta resolución en la identificación de variantes entre individuos, la técnica de microsatélites se aplica con éxito a nivel intraespecífico para evaluar sistemas de cruce, diversidad, parentesco y variación geográfica (Dowling *et al.* 1996). El análisis de microsatélites (Tautz 1989; Powell *et al.* 1996a), ha provisto también una técnica poderosa para estudiar la diversidad genética y flujo génico en poblaciones naturales de árboles (Chase, *et al.* 1996; Dow & Ashley 1996; Dawson *et al.* 1997; White & Powell 1997a,b).

La existencia de polimorfismo de SSR ha sido recientemente documentada en cloroplastos de pinos (Powell *et al.* 1995a; Vendramin *et al.* 1996). La combinación de datos de sitios polimórficos en el genoma haploide no recombinante y heredado uniparentalmente del cloroplasto, ofrece ser un ensayo robusto y altamente informativo para el análisis de la diversidad en poblaciones naturales de especies de plantas (Provan *et al.* 1998), así como para el monitoreo de flujo genético vía polen y análisis de paternidad (Vendramin *et al.* 1996). La variación en microsatélites de cloroplasto se ha usado con éxito para estudiar la estructura genética de poblaciones de pinos raros que han pasado por cuellos de botella, como el caso específico de *Pinus resinosa* (Echt *et al.* 1998). En esta especie no se pudo detectar previamente la variación con ningún otro marcador molecular, y la distribución en histogramas de las frecuencias alélicas reveló los cuellos de botella por los que pasaron las poblaciones (Echt *et al.* 1998).

La abundancia de polimorfismos en microsatélites se debe al sistema de mutación de estos, que es el apareamiento erróneo durante la replicación (*slippage mispairing*), lo cual explica también el hecho de que las secuencias que flanquean a los microsatélites sean tan conservadas, ya que este mecanismo de mutación no causa cambios en las secuencias flanqueantes (Fig.2), al contrario que otros mecanismos de mutación como es la recombinación desigual (*unequal crossing-over*) (Li 1997). De hecho el que las secuencias flanqueantes sean tan conservadas es lo que permite amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) las secuencias de microsatélites.

El apareamiento erróneo es uno de los mecanismos por los que pueden ocurrir inserciones o deleciones en el DNA. Este tipo de mecanismo ocurre en regiones del DNA donde existen pequeñas repeticiones contiguas (Li 1997). La figura 2 muestra que durante la replicación del DNA, puede ocurrir error debido al apareamiento erróneo entre las repeticiones cercanas y el error puede resultar en una deleción o duplicación de un segmento de DNA, dependiendo si el error ocurre en el extremo 5' o 3' con respecto a la unidad de repetición (Li 1997).

Apareamiento normal durante la replicación de DNA

5'---AATCCTAGTA TA TA 3' (hija)
 3'---TTAGGATCAT AT AT GTGCTTAA---5' (parental)

1ª. replicación
 Error en el apareamiento

1ª. replicación
 Error en el apareamiento

AG
 T T
 C A
 5'---AATC TA TA 3'
 3'---TTAGGATCAT AT AT GTGCTTAA---5'

5'---AATCCTAGTA TA TA 3'
 3'---TTAG G T AT AT GTGCTTAA---5'
 A A
 TC

La replicación continua insertando unidades de TA

La replicación continua después de la escisión de repeticiones de TA no apareadas

AG
 T T
 C A
 5'---AATC TA TA TA CACGAATT---3'
 3'---TTAGGATCAT AT AT GTGCTTAA---5'

5'---AATCCTAGTA TA TA CACGAATT - 3'
 3'---TTAG AT AT GTGCTTAA - 5'
 G T
 A A
 TC

2ª. Vuelta de replicación
 La cadena hija se vuelve la parental:

2ª. Vuelta de replicación
 La cadena hija se vuelve la parental:

5'---AATCCTAGTA TA TA TACACGAATT---3'
 3'---TTAGGATCAT AT AT ATGTGCTTAA---5'

5'---AATCCTAGTA TA CACGAATT - 3'
 3'---TTAGGATCAT AT GTGCTTAA - 5'

Resultado: Duplicación de una repetición.

Resultado: Deleción de una repetición.

Figura 2. Generación de duplicaciones o deleciones por error en el apareamiento durante la replicación entre repeticiones contiguas (Li 1997).

Modelos de mutación y microsatélites

Existen dos modelos de mutación principales, el primero es el modelo de alelos infinitos (Wright 1949; Kimura & Crow 1964) y el segundo es el modelo de mutación paso a paso (Ohta & Kimura 1973).

En el modelo de alelos infinitos se supone que toda mutación crea un alelo nuevo o un alelo que no existía hasta ese momento en la población (Li 1997). Este modelo hace supone que el proceso de mutación borra cualquier memoria del estado alélico previo (Slatkin 1995). En el modelo de mutación paso a paso el proceso de mutación tiene "memoria". Alelos de tamaños similares son menos diferentes que alelos muy distintos en su tamaño (Jarne & Lagoda 1996).

Los análisis de variación de tamaño de los diferentes alelos encontrados en diferentes loci de microsatélites, obtenidos a partir de datos reales y de simulaciones (Valdés, *et al.* 1993), apuntan a que el cambio en el número de repeticiones sigue el modelo de mutación de paso a paso (stepwise mutation model) de Ohta y Kimura (1973). Los datos de Valdés *et al.* muestran que la distribución de frecuencias del tamaño de los alelos es multimodal. Esta distribución multimodal pudiera surgir de la subdivisión poblacional, de la migración o por selección. Sin embargo Valdés *et al.* (1993) muestran que la distribución multimodal surge en una población que se aparee al azar sin migración y sin selección bajo un modelo de mutación paso a paso. Se han aplicado este mismo tipo de simulaciones al modelo de alelos infinitos (Chakraborty & Daiger 1991; Harding *et al.* 1993; Shriver *et al.* 1993) pero estas simulaciones no se ajustan tan bien a los datos reales como las simulaciones bajo el modelo de mutación paso a paso (Li 1997).

Los resultados de simulaciones apuntan entonces a que en los análisis estadísticos de diversidad genética es necesario ponderar el hecho de que los alelos con menor diferencia en longitud de microsatélites son más cercanos que aquellos con mayor diferencia. Esto provee una relación lineal entre la distancia genética basada en la longitud de los alelos y el tiempo de divergencia entre las moléculas (Di Rienzo *et al.* 1994; Slatkin 1995; Goldstein *et al.* 1995a,b; Feldman *et al.* 1997).

La justificación para el uso de microsatélites en el análisis de la genética de poblaciones de una especie como *Pinus pinceana* se fundamenta en ejemplos como el de *Pinus resinosa* (Echt 1998). Esta es una especie de pino rara, al igual que *Pinus pinceana*, en la que no pudo encontrarse variación con isoenzimas (Fowler & Morris 1977; Allendorf *et al.* 1982; Simon *et al.* 1986; Mosseler *et al.* 1991) y se encontró una limitada diversidad usando RAPD's (Mosseler *et al.* 1992; DeVerno & Mosseler 1997), los cuales son, en general, altamente polimórficos entre las coníferas. En contraste con estos resultados, el análisis de diversidad usando microsatélites de cloroplasto como marcadores moleculares reveló una diversidad genética considerable (H_e de 0.314 a 0.920; Echt *et al.* 1998).

REPRODUCCIÓN Y SISTEMA GENÉTICO EN PINOS

Sistema Reproductivo

El sistema reproductivo del género *Pinus* es exclusivamente sexual y son en su mayoría monoicos (los árboles en edad reproductiva portan estructuras masculinas y femeninas), por lo que la autocruza podría darse con relativa facilidad (Ledig 1998).

El sistema de cruce se refiere, generalmente, a los niveles de cruce interna o endogamia (autocruza y cruces consanguíneas) y de cruce externa. En el caso de la mayoría de las especies de pinos, ni la separación espacial ni la separación temporal de los sexos son barreras fuertes, por lo que la endogamia es común dando como resultado el que los parientes tiendan a estar agrupados y que se sigan dando cruces entre familiares (Coles & Fowler 1976; Tigerstedt *et al.* 1982). Además, la autoincompatibilidad parece estar ausente en la mayoría de las especies. Sin embargo, en pinos hay altos niveles de cruce externa medidos con marcadores morfológicos e isoenzimas (0.91 a 0.98); Schemske & Lande 1985; Ledig 1998). Parte de la explicación se encuentra en las observaciones sobre embriones que revelan que existe selección en contra de embriones resultado de endogamia (Plessas & Strauss 1986). En general, en estudios de diversas especies de la familia Pinaceae (Franklin 1970) en todos los estadios de desarrollo existe mayor mortalidad en individuos resultado de autocruza en comparación con los de cruce externa.

Sin embargo, el sistema de cruce en los pinos es lo suficientemente flexible para permitir endogamia en algunos árboles aislados. Esta flexibilidad es importante para las especies en colonización y facilita la invasión de nuevos hábitats. Los pinos en localidades exóticas a menudo escapan, estableciendo colonias a distancia de la fuente de semillas (Ledig 1998). Por ejemplo, individuos dispersos de *Pinus radiata* en Nueva Zelanda, establecieron colonias a más de 3 Km de distancia de los árboles que produjeron las semillas; además se han encontrado colonias de *P. contorta* a 16-18 Km de la fuente de semillas. Estos colonizadores fueron rodeados por una segunda generación. Bannister (1965) argumenta que la progenie podría ser en gran medida producto de autocruza, y cualquier generación sucesiva sería el resultado de cruce entre hermanos (Ledig 1998). A pesar de que existe cruce entre parientes y autocruza, la variación genética que existe en los pinos es alta, algunos estimados de variación (Cornelius 1994), los colocan dentro de los organismos con mayor variación con valores de heterocigosis de 0.17 (en humanos, por ejemplo es de 0.05) (Gillespie 1998; Ledig 1998).

Sistema Genético

Los pinos, como se ha dicho, pueden autofecundarse cuando invaden nuevos hábitats (de ahí su éxito en la invasión) y también, una vez establecidos, pueden generar variación a través de diferentes estrategias genéticas (Ledig 1998):

- 1) Selección negativa de embriones, plántulas y árboles resultado de autocruza o endogamia, favoreciendo la cruce externa.
- 2) La cruce externa incrementa inmediatamente la recombinación y, en consecuencia, la variación.
- 3) Hibridización común, esto es que, las barreras ante la cruce con otras especies son débiles, sin embargo estas cruces rara vez llevan a especiación, porque los híbridos normalmente permanecen en contacto con sus padres, por ello uno de los resultados de la hibridización es la introgresión (los híbridos presentan genes "nuevos" adquiridos de otra especie pero no llegan a diferenciarse tanto de la especie original como para catalogarse como nueva). El resultado genético de la hibridización es un aumento de variación a través del flujo interespecífico de genes.
- 4) Debido a que los pinos son árboles longevos, acumulan muchas mutaciones en sus células somáticas a lo largo de su vida, las cuales pueden pasar a las células germinales (ya que éstas se originan de células somáticas).

El flujo genético en pinos ocurre a través del polen y de las semillas, con la característica particular de que en los pinos los cloroplastos son heredados a través del polen parental (Neale & Sederoff 1989), y la mitocondria es heredada a través del óvulo. La herencia paterna del DNA de cloroplasto, la herencia materna del DNA de mitocondria y la herencia biparental del DNA nuclear sugiere maneras de rastrear la descendencia y cruce de los pinos como no es posible hacerlo en otros organismos (Ledig 1998).

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Clasificación y morfología

Pinus pinceana es una especie de pino que pertenece al llamado grupo de los pinos piñoneros. Su clasificación varía de un autor a otro, aún está en duda su posición dentro del grupo pero no su estatus específico. Sin embargo ya que esta situación no es de relevancia para el presente estudio, la especie será considerada de acuerdo con la siguiente clasificación (Farjon & Styles 1997):

- gen. *Pinus*
 - subgen. *Strobus*
 - sec. *Parrya* (Mayr)
 - subsec. *Cembroides* (Engelmann)
 - *Pinus pinceana*

Las características morfológicas de la especie se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características morfológicas de *Pinus pinceana* (Perry 1991)

Caracteres	Descripción
El árbol	Pequeño de 4-10 m de alto. Copa gruesa, irregularmente redondeada. Las ramas son bajas, irregularmente espaciadas en el tronco, largas, flexibles, colgantes, a menudo llegando casi al suelo. Los árboles jóvenes tienen una densa y redondeada copa que se extiende casi hasta el suelo dando al árbol una apariencia arbustiva.
Corteza	En los árboles maduros es delgada, dividida por delgadas fisuras horizontales y longitudinales que forman placas que parecen escamas. En los árboles jóvenes la corteza es delgada, suave y de un color grisáceo.
Ramas	De color gris claro, suaves, delgadas, largas y pendientes; las bases de las brácteas de las hojas no son decurrentes. Las hojas nacen en grupos al final de las ramas.
Hojas	En fascículos de 3, ocasionalmente 4, los márgenes son enteros, delgadas, de 6-14 cm de longitud, pendientes, verde grisáceo. Estomas en las superficies dorsal y ventral. 2 canales de resina (dorsal y ventral). Haz vascular único. Las vainas de las hojas son recurvadas en roseta y posteriormente deciduas.
Conillos masculinos (conos del 1er. Año)	Nacen solos o en pares en pedúnculos largos y delgados. Son de color café amarillento. Las pequeñas escamas quilladas transversalmente con una pequeña espina.
Conos	Ovalados. De 5-10 cm de longitud, colgantes, simétricos. De color naranja brillante. Dehiscentes y tempranamente deciduos, el pedúnculo no cae con el cono.
Escamas ovulíferas	Gruesas, duras, con apófisis levantadas, con quillas transversales. Umbo dorsal con una espina pequeña, gruesa y decidua.
Semillas	De café a café amarillento. Sin alas. De 10-12 mm de longitud y de 5-6 mm de ancho, la testa es gruesa y dura. Las semillas son colectadas como comida.
Madera	Debido al crecimiento lento de este árbol, la madera no es muy resinosa. Se usa como leña.



Distribución y Ecología

En general los pinos no viven en zonas muy áridas sino en zonas con una precipitación media anual mayor a 300-400 mm de precipitación media anual. Sin embargo, en México se encuentran las únicas especies que viven en condiciones áridas, *P. pinceana* y *P. nelsoni*. Además de raras, estas dos especies, pueden

encontrarse pronto en peligro de extinción (Perry 1991) o sujetas a protección especial (Diario Oficial 2000). México debe ser un especial foco de atención para la conservación ya que casi la mitad de las 111 especies de pinos reconocidas por Price *et. al.* (Ledig 1998) son nativas de México (Ledig 1998).

Pinus pinceana es una especie que vive en un limitado rango de distribución geográfica, en zonas montañosas y colinas áridas y semiáridas en donde los pinos, en general, no crecen (Perry 1991). El rango altitudinal varía entre 1,500 a 2,300 m. La precipitación en estas áreas es de 300-400 mm anuales y entre los meses de Junio a Octubre. La temperatura promedio en el año es de alrededor de 18°C. Los meses más fríos son Diciembre y Enero y los más calientes Mayo y Junio (Perry, 1991). Se encuentra regularmente acompañada por *Yuca*, *Agave*, *Opuntia*, *Quercus*, *Oocarpus*, *Juniperus* y de vez en cuando por *Pinus cembroides* (Farjon & Styles 1997).

En cuanto a su distribución podemos decir que, sólo se han encontrado individuos esparcidos en colinas secas y rocosas y montañas de la Sierra Madre Oriental (Fig. 3), principalmente en el estado de Coahuila y como poblaciones dispersas en los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Querétaro e Hidalgo (Perry 1991). Estas poblaciones son muy pequeñas por lo que se supone puede estar en peligro de extinción (Perry 1991) o quedar en la categoría "sujeta a protección especial" ¹ (Diario Oficial 2000). Además, estas poblaciones no son muy cercanas y están separadas por aproximadamente 200 km una de la otra.

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

Las aves que normalmente tienen este mutualismo con los pinos (particularmente del subgénero *Strobus*), son de la familia Corvidae del género *Corvus* (Lanner 1998). Sólo existen estudios formales sobre la dispersión por aves en dos especies de pinos piñoneros: *Pinus edulis* y *Pinus monophylla* cuyas semillas son dispersadas por 4 córvidos (*Aphelocoma coerulescens*, *Cyanocitta stelleri*, *Gymnorhinus cyanocephalus*, *Nucifraga columbiana*; Lanner 1998). Estas aves tienen la capacidad de llevar 5, 18, 50 y 90 semillas respectivamente y volar distancias que van de locales (*A. coerulescens* y *C. stelleri*), a 1-5 Km (*G. cyanocephalus*), hasta 5-15 km (*N. Columbiana*; Vander Wall 1990). Numerosas coadaptaciones de los pinos y aves sugieren mutualismo (Marzluff & Balda 1992). Debido a que se han observado morfología y comportamiento similares entre otros

¹ Aquella especie o población que podría llegar a encontrarse amenazada por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación o la recuperación y conservación de poblaciones de especies asociadas. (Esta categoría puede incluir a las categorías de menor riesgo de la clasificación de la Unión Internacional de la Naturaleza, UICN) (Diario Oficial 2000).

piñoneros y su coexistencia con los mismos córvidos u otros relacionados, se sugiere que el mutualismo con estas aves para la dispersión de semillas es el mismo para todos los miembros del grupo *Cembroides*, por ejemplo: *P. maximartinezii*, *P. nelsonii* y *P. pinceana* (Lanner 1998).

Un estudio previo (Molina-Freaner *et al.* 2001) detectó 5 poblaciones de esta especie, conformadas cada una por más de 1000 individuos maduros. Estas son: 1) San Joaquín 2) Huizache 3) Cuauhtémoc-1 4) Cuauhtémoc-2 5) Guadalcázar. En el presente estudio se estudiaron todas las poblaciones anteriores y dos más (Tabla 4 y Fig. 4). Las poblaciones reportadas como Cuauhtémoc.1 y Cuauhtémoc.2 se analizaron como una sola pues se consideró que por estar a menos de 1 km de distancia son una sola. Existen algunas poblaciones más, sin embargo el muestreo de este trabajo es particularmente importante para el estudio de la genética de poblaciones de la especie, porque abarca poblaciones que existen a lo largo de su distribución de manera equitativa para el norte, centro y sur (aunque existen reportes de poblaciones más al norte).

Tabla 4. Poblaciones analizadas de *Pinus pinceana* en México.

Población	Estado	Latitud	Longitud	Altitud	# ind. este estudio	Ho (Molina-Freaner <i>et al.</i> 2001)	Ho (Ledig <i>et al.</i> en preparación)
Sierra de Parras	Coahuila	25°21.425' N	102°10.819' W	1737 m	31	—	0.137 a 0.156
Cuauhtémoc	Coahuila	25°16.35' N	100°57.77' W	2250 m	32	0.027 a 0.198	0.135 a 0.172
Huizache	San Luis Potosí	22°53.92' N	100°29.20' W	1480 m	30	0.196	—
Guadalcázar	San Luis Potosí	22°40.00' N	100°30.00' W	3000 m	20	0.193	0.143
San Joaquín	Querétaro	20°55.00' N	99°38.00' W	2080 m	15	0.328	0.103
Tolantongo	Hidalgo	20°38.108' N	98°59.11' W	1800 m	26	—	—
Todas						0.216	0.144

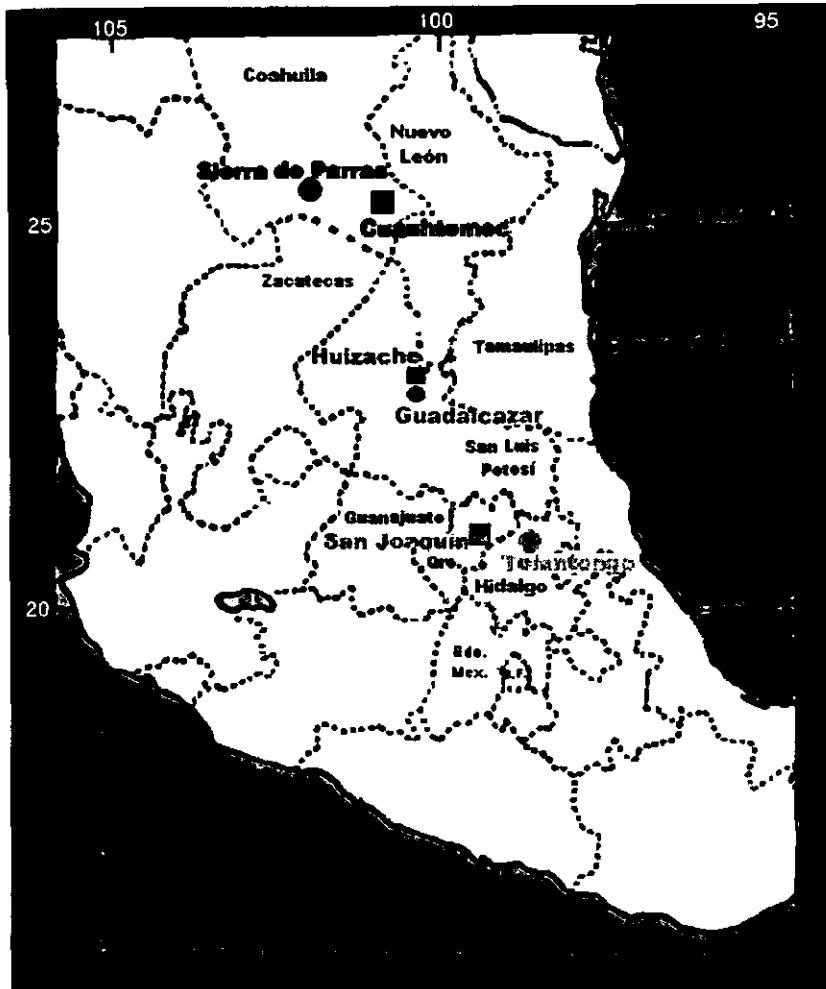


Fig. 3. Distribución de las poblaciones de *Pinus pinceana* incluidas en el presente estudio.

La variación genética encontrada con estudios de isoenzimas en poblaciones de *P. pinceana* es suficiente para no ser considerada en peligro de extinción por falta de opciones genéticas (Molina-Freaner *et al.*, 2001). Además se ha observado que todas las poblaciones tienen adultos, por lo que todos los árboles contienen conos femeninos (Molina-Freaner *et al.* 2001). Los resultados fundamentales de este estudio son: 1) el número de individuos para cada población es mucho mayor que el citado por Perry (1991), más de 6000 individuos maduros. 2) Todas las poblaciones se encuentran produciendo conos, lo cual indica que la pérdida de semillas y plántulas, no se debe a características fenológicas de la especie (posibles alteraciones reproductivas) de la misma sino a algún aspecto extrínseco, como podría ser la depredación. 3) La variación genética encontrada con estudios de isoenzimas es suficiente ($H_o = 0.216$) (Tabla 4) para no ser consideradas en peligro de extinción por falta de opciones genéticas, sin embargo, si no se logra implementar alguna estrategia de conservación, el efecto de factores demográficos podría acelerar la pérdida de varias de las poblaciones (Molina-Freaner *et al.* 2001).

Otro estudio reciente usando isoenzimas (Ledig *et al.*, manuscrito en preparación) muestra también valores altos de variación genética ($H_o = 0.144$) (Tabla 4).

Tanto en el estudio de Molina-Freaner *et al.* (2001) como en el de Ledig *et al.* (en preparación) los valores de F_{st} obtenidos revelan estructuración genética (0.247 y 0.152 respectivamente).

HISTORIA DEL GRUPO CEMBROIDES

Basados en el registro fósil y evidencia geológica, Millar (1998) argumenta que la subsección *Cembroides* es una de varias originadas en México o Centroamérica en el Eoceno temprano (hace 55 m.a.), y que parte de la especiación del grupo ocurrió durante el Pleistoceno (2 m.a.). Ambos momentos geológicos están relacionados con cambios climáticos muy importantes en la historia de la Tierra.

Dentro de varias de las subsecciones del género *Pinus* radiación y especiación son recientes y se han atribuido a surgimiento activo de montañas iniciado en el Eoceno (Eguiluz Piedra 1985; Axelrod 1986; Karamangala y Nickrent 1989; Lauria 1991), así como a los cambios climáticos que han sido los más profundos del Terciario (Burchardt 1978; Wolfe 1978; Miller *et al.* 1987; Parrish 1987; Singh 1988; McGrowran 1990; Prothero & Berggren 1992), y que supuestamente dieron lugar a cambios en la distribución geográfica y radiación del género.

Según Millar (1998), los cambios climáticos del terciario hicieron que las distribuciones de los de pinos cambiaran latitudinalmente y que se expandieran y contrajeran en su distribución altitudinal varias veces desde el Mesozoico tardío (90-70 m.a.) hasta el Terciario medio (30-25 m.a.). Así, durante los periodos fríos del Eoceno las poblaciones de pinos aparentemente se expandían y cuando las temperaturas aumentaban, las poblaciones se contraían. Debido a estos cambios de temperatura, los pinos encontraron varios refugios en donde (al final del Paleogeno 30-25 m.a.) se dió la evolución de las mayores subsecciones de *Pinus* (Axelrod 1986; Millar & Kinloch 1991).

Los linajes antiguos del grupo *Cembroides* debieron haberse concentrado en el refugio de México/Centroamérica, específicamente en el oeste de Norteamérica y América Central, en donde se dió una radiación importante del género. De hecho, el pulso de mayor radiación de *Cembroides* que está ocurriendo ahora puede haberse iniciado entonces (Terciario temprano a medio 30-25 m.a.) (Millar 1998). En México y Centroamérica existen de 10 a 16 especies endémicas de *Cembroides* (Zavarin 1988), lo que muestra que estos cambios climáticos y de distribución geográfica fueron de mucha importancia para la radiación no sólo del género sino de las subsecciones.

El Pleistoceno ha sido también uno de los momentos de mayores cambios en la historia de la Tierra. En ciertos aspectos puede equipararse a los cambios

profundos del Eoceno. En el Pleistoceno se dieron climas fluctuantes que iban de climas templados a condiciones glaciares (en el Eoceno los cambios iban de climas templados a climas tropicales). Sin embargo, parece que el Pleistoceno no generó cambios drásticos en la distribución geográfica de los pinos, pues para ese momento existían ya muchas montañas que permitieron generar refugios locales para climas desfavorables, sin necesidad de concentrar las poblaciones en regiones separadas o disjuntas (Millar 1998). La dificultad para separar los taxa de *Cembroides* implica relaciones cercanas y esto ha llevado a algunos botánicos a la conclusión de que este grupo es relativamente joven (Millar 1998). La especiación en *Balfourniana* y *Cembroides*, por ejemplo, parece haber ocurrido en el Pleistoceno (Millar 1998).

JUSTIFICACIÓN

Dentro del género *Pinus*, los pinos piñoneros (*Cembroides*) son una de las subsecciones que, según Millar (1998) se originaron en México y tienen a más de la mitad de sus especies representadas aquí, desde el norte de Coahuila y Tamaulipas hasta Puebla (Zavarín 1988). Dentro de estas especies se encuentra *Pinus pinceana*, especie en probable peligro de extinción en nuestro país. Las poblaciones de *P. pinceana* son pocas y, en muchos casos, perturbadas además de presentar una distribución fragmentada que sugiere aislamiento por distancia. Además de las implicaciones que tiene el estudio de la genética de las poblaciones de *P. pinceana* en cuanto a estrategias de conservación, los resultados que se obtengan también pueden ayudar a reconstruir su historia reciente y contribuir al entendimiento del proceso de radiación y especiación en el grupo de los pinos piñoneros.

Además, es cierto que se han hecho ya estudios sobre la genética de poblaciones de *P. pinceana* usando como marcadores moleculares isoenzimas (Molina-Freaner *et al.* 2001; Ledig *et al.* manuscrito en preparación), sin embargo los resultados obtenidos muestran estructuración de la variación genética pero no permiten ver con claridad el patrón geográfico de la variación ni hacer inferencias históricas sobre el origen de esa estructura. Es por esto que ahora se plantea la posibilidad de analizar la genética de las poblaciones de *P. pinceana* usando marcadores moleculares más sensibles a la variación y en consecuencia más informativos sobre el origen de la estructura observada, de patrones geográficos de la variación y de la estrategia de conservación a seguir.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Determinar la estructura genética de poblaciones de *P. pinceana* bajo dos modelos diferentes de mutación (alelos infinitos y mutación paso a paso).
- Establecer si la distribución geográfica actual de la especie es el resultado de un proceso de deriva génica por migración y colonización o por la fragmentación de las poblaciones (debida a procesos naturales o intervención humana).
- En el caso de encontrar datos que apoyen que *P. pinceana* se encuentra en peligro de extinción, elaborar una propuesta para activar la conservación de la especie.

Objetivos Particulares

- Realizar las colectas necesarias para tener muestras de todas las poblaciones de *P. pinceana*.
- Estandarizar las condiciones experimentales para amplificar y analizar los microsatélites de cloroplasto de pino, para el caso particular de *P. pinceana*.
- Estimar los niveles de variación y flujo genético de las poblaciones de *P. pinceana* mediante el análisis de microsatélites de cloroplasto.
- Estimar las distancias genéticas entre las poblaciones.
- Relacionar los datos sobre distancia genética con las distancias geográficas entre las poblaciones para:
 1. determinar si existe o no aislamiento reproductivo por distancia entre ellas.
 2. determinar si existe un patrón de distribución geográfica relacionado con la distancia genética, lo que nos permitirá establecer si la situación genética actual de *P. pinceana* se debe a deriva génica, por fragmentación o por un proceso de colonización.

HIPÓTESIS

- Las poblaciones de *P. pinceana* son relativamente pequeñas y con distribución fragmentada, por lo que es de esperarse que a nivel intrapoblacional exista poca variación y a nivel interpoblacional alta variación por aislamiento entre parches.
- De acuerdo con los datos paleontológicos, es posible que la distribución actual de *P. pinceana* sea resultado de la fragmentación de sus poblaciones originales debido a los cambios climáticos del Pleistoceno. Es por esto que se espera encontrar la mayor variación entre que dentro de las poblaciones, sin ningún patrón geográfico que indique migración para colonizar nuevos hábitats.
- De acuerdo con los datos reales y simulaciones previas (Valdes *et al.* 1993), el modelo de mutación paso a paso es el que se ajusta de mejor manera al proceso de evolución de los microsátélites. Es por esto que se espera que los resultados bajo el modelo de mutación paso a paso tengan un significado biológico más claro y real que los que resulten del modelo de alelos infinitos.

MÉTODOS

- **Material biológico**

Las muestras de las poblaciones estudiadas se colectaron entre 1995 y 1999 por Patricia Delgado y en 1998 por David Gernandt. Las poblaciones estudiadas son 6 (Tabla 4) y representan toda la distribución reportada de *Pinus pinceana* de acuerdo con Perry (1991) y probablemente casi todas las poblaciones que existen. El número promedio de individuos colectados por población fue de 25.7 (rango de 15 a 32).

Las coordenadas registradas para cada población se obtuvieron con la ayuda de un localizador vía satélite (GPS) y con cartas geográficas escala 1:250,000 del INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, <http://www.inegi.gob.mx>).

Las muestras colectadas se limpiaron con agua y cloro (4% máximo 10 min), después fueron almacenadas en bolsas de plástico individuales en un congelador a -70°C (REVCO Scientific, Inc.).

- **Extracción de DNA**

La extracción del DNA se realizó utilizando el protocolo de extracción "CTAB mini-prep" modificado por Vázquez-Lobo (1996). Este protocolo consiste en moler finamente las hojas en un mortero con nitrógeno líquido. Aproximadamente un gramo del tejido pulverizado se muele, nuevamente, con 1 ml de buffer de extracción CTAB2X (Tris-HCl 100mM pH8, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, CTAB 2% y b-ME 0.3%) con el objeto de romper las paredes celulares y extraer el DNA. La mezcla de CTAB2X y tejido se recupera en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifuga a 10 000 rpm durante 8 min a 4°C. Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 ml de buffer CTAB2X. Una vez resuspendido, se incuba en un baño a 60°C durante 10 min. Posteriormente se agregan 600 µl de cloroformo:octanol 24:1 y se agita hasta homogeneizar para después centrifugar a 7000 rpm durante 15 min (hasta que el sobrenadante quede transparente). El sobrenadante se recupera (aproximadamente 600 µl) y traslada a un tubo nuevo, el DNA aquí se precipita con aproximadamente 500 µl de isopropanol frío y se deja reposar de 30 min a 12 horas a -20°C. A continuación se centrifuga a 9 000 rpm durante 5 min a 4°C y se elimina el sobrenadante. El DNA (pellet) puede limpiarse agregando 1 ml de etanol 70% frío y centrifugando a 7 000 rpm durante 5 min a 4°C. Por último, tras eliminar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol (30 min aproximadamente) el pellet se resuspende con 200 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1mM).

Las muestras de DNA obtenidas se dividieron en 2 grupos, uno se almacenó en un congelador a -70°C (REVCO Scientific, Inc.) y el otro se mantuvo a -20°C para utilizarlo constantemente en los experimentos.

Para verificar la calidad del DNA extraído, se corrieron $5\ \mu\text{l}$ de cada muestra en electroforesis en geles de agarosa TBE 0.5X 0.8% durante 1 h a 120 Volts constantes.

- **Microsatélites**

Todos los pasos que se siguen en el proceso de amplificación y visualización de los microsatélites son explicados en las secciones que se describen a continuación.

a) Marcaje radioactivo

La visualización de los microsatélites se logró mediante la incorporación del isótopo radioactivo Fósforo 32 [^{32}P] a los cebadores o *primers* utilizados, a este procedimiento se le denomina marcaje radioactivo, y en él se sustituye el fósforo 5' del último nucleótido de la secuencia del primer por el isótopo radioactivo [^{32}P].

Los cebadores sirven como ancla para iniciar la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), éstos se unen a la parte de DNA que les es complementaria y a partir de ahí se inicia la polimerización de una nueva cadena complementaria de DNA, por lo que el *primer* queda incluido en el fragmento amplificado y al estar marcado con radioactividad, podemos ver los fragmentos a través de una autoradiografía (Figura 4). Debido a esto, es necesario sintetizar los cebadores con la secuencia que flanquea a los microsatélites que deseamos analizar, deben sintetizarse los cebadores complementarios de ambas cadenas (cebador *F*, *forward* y cebador *R*, *reverse*). Se ha secuenciado todo el genoma de cloroplasto *Pinus thunbergii* e identificado todos los microsatélites que existen en él y, como resultado, se han podido sintetizar los cebadores para cada uno de los 20 microsatélites que existen en este organelo (Wakasugi *et al.* 1994).

La reacción de marcaje radioactivo se realizó en un volumen de $25\ \mu\text{l}$ (suficiente para 35 reacciones de amplificación), el cual contenía $16\ \mu\text{l}$ de cebador *F* $10\ \mu\text{M}$ (sintetizado por pedido a $48\ \text{nmol}$ por Life Technologies, Gibco BRL), $5\ \mu\text{l}$ de buffer de intercambio 5X (5X Exchange Reaction Buffer 1ml de Life Technologies, Gibco BRL), $0.5\ \mu\text{l}$ de Cinasa T4 (T4 kinase $200\ \text{U}/\mu\text{l}$ de Life Technologies, Gibco BRL), $0.5\ \mu\text{l}$ de $\gamma\text{-ATP}$ [^{32}P] ATP Aqueous solution 10mCi/ml) y $3\ \mu\text{l}$ de agua bidestilada estéril. La mezcla se incubó en un termociclador (PTC- Programmable Thermal Controller de MJ Research Inc.) durante 10 min a 37°C (para que se llevara a cabo la reacción de intercambio del P 5' del último nucleótido del primer por el P

radioactivo) y 10 min a 65°C (para inactivar a la enzima T4 y así detener la reacción) .

b) Amplificación de microsatélites

Primero fue necesario cuantificar el DNA extraído con un fluorómetro (Hoeffer DyNA Quant 200 Fluorometer). La cuantificación se hizo según el protocolo de cuantificación "low range" del fluorómetro (10-500 ng/μl). La concentración más apropiada para la amplificación de microsatélites es de 25 ng/μl, por lo que las extracciones por arriba de esta concentración fueron diluidas con agua bidestilada estéril.

La amplificación de microsatélites se realizó mediante la reacción de PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller de MJ Research Inc.), en un volumen total de reacción de 25 μl. La solución que se preparó para realizar esta reacción, por individuo, fue la siguiente: 2.5 μl de buffer para PCR 10x (10X PCR Buffer minus Mg 1 ml de Life Technologies, Gibco BRL), 1.25 μl de MgCl₂ 50 mM (50 mM Magnesium Chloride 1 ml de Life Technologies, Gibco BRL), 0.2 μl de la mezcla 20 mM de los 4 dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato) (Ultrapure dNTP Set (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 100 mM solutions de Pharmacia Biotech), 0.54 μl de cebador *F* no marcado 10 μM (sintetizado por pedido a 48 nmol por Life Technologies, Gibco BRL), 0.71 μl de cebador *F* marcado con [³²P] (de la reacción de marcaje radioactivo), 1.3 μl de cebador *R* 10 μM (sintetizado por pedido a 48 nmol por Life Technologies, Gibco BRL), 0.05 U de Taq polimerasa (Taq DNA Polymerase 125 U, 2.5 U/μl de Life Technologies, Gibco BRL), 25 ng de DNA genómico y el volumen de agua bidestilada estéril necesario para lograr un volumen total de 25μl (Tabla 5).

Las reacciones así preparadas se realizaron en un termociclador (MJ Research PTC-100 Programmable Thermal Controller) usando los siguientes ciclos:

- i) desnaturalización inicial a 95°C por 5 min.
- ii) 80°C por 5 min.
- iii) 26 ciclos de:
 - desnaturalización a 94°C por 1 min.
 - alineamiento a 55°C por 1 min.
 - extensión a 72°C por 1 min.
- iv) extensión final a 72°C por 5 min.

Tabla 5. Volumen y concentraciones de los reactivos utilizados para realizar la reacción de PCR.

Reactivo	Concentración original	Volumen a tomar	Concentración en la reacción
Buffer para PCR	10 X	2.5 μ l	1 x
MgCl₂	50 mM	1.25 μ l	2.5 mM
dNTPs	20 mM	0.2 μ l	0.16 mM
Primer Fγ	6.4 μ M (de la reacción de marcaje)	0.71 μ l	0.18 μ M
Primer F	10 μ M (dilución 1:10, del stock 100 μ M)	0.54 μ l	0.216 μ M
Primer R	10 μ M (dilución 1:10 del stock 100 μ M)	1.3 μ l	0.52 μ M
Taq Polimerasa	2.5 U/ μ l	0.02 μ l	0.05U
DNA		El necesario para tener 25 ng en el volumen total de la reacción.	1ng/ μ l
H₂O		El necesario para completar un volumen de reacción de 25 μ l	

Se probaron 11 cebadores de los 20 microsatélites que existen en el cloroplasto de los pinos. De estos se escogieron 4 por ser polimórficos. El criterio sobre el polimorfismo necesario para incluir los resultados en el análisis fue el de que el alelo más frecuente encontrado no tuviera una aparición mayor al 97%. Los microsatélites fueron amplificados con cebadores específicos de las regiones flanqueantes que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de los cebadores de cloroplasto de *Pinus thunbergii* utilizados para la amplificación de los microsatélites de *Pinus pincea* en México.

Sobre la línea gruesa se encuentran los cebadores que resultaron polimórficos.

Código *	Secuencia de los primers (5'-3') F (forward) R(reverse)	Localización #	Especies **	Tamaño del producto de PCR	Número de unidades de repetición
Pt 30204	TCATAGCGGAAGATCCTCTTT CGGATTGATCCTAACCATACC	<i>ClpP</i>	Pt PI	145 140	(A) ₁₂ (G) ₁₀ (A) ₉ (G) ₈
Pt 71936	TTCATTGGAAATACACTAGCCC AAAACCGTACATGAGATTCCC	IRF169	Pt PI	148 146	(T) ₁₆ (T) ₁₄
Pt 63718	CACAAAAGGATTTTTTTTTCAGTG CGACGTGAGTAAGAATGGTTG	<i>rpl2</i>	Pt PI	93 92	(T) ₁₀ (T) ₉
Pt 110048	TAAGGGGACTAGAGCAGGCTA TTCGATATTGAACCTTGACA	<i>rps12</i> intron	Pt PI	88 87	(T) ₁₀ (T) ₉
Pt 1254	CAATTGGAATGAGAACAGATAGG TGC GTTGCACTTCGTTATAG	<i>psbA-trnK</i> (UUU) espaciador	Pt PI	74 72	(T) ₁₇ (T) ₁₅
Pt 9383	AGAATAAACTGACGTAGATGCCA AATTTTCAATTCCTTCTTTCTCC	<i>trnG (UCC)</i> intron	Pt PI	87 84	(T) ₉ AG(A) ₁₀ (T) ₇ AG(A) ₉
Pt 15169	CTTGATGGAATAGCAGCC GGAAGGGCATTAAAGTCATTA	<i>Rps2</i>	Pt PI	118 115	(C) ₈ (T) ₉ A(T) ₉ (C) ₈ (T) ₁₄
Pt 87268	GCCAGGGAAAATCGTAGG AGACGATTAGACATCCAACCC	<i>TrnI(GAU)-trnA(UGC)</i> espaciador	Pt PI	165 167	(T) ₁₄ (T) ₁₀ C(T) ₅
Pt 26081	CCCGTATCCAGATATACTTCCA TGGTTTGATTCATTCGTTTCAT	<i>rpoB</i>	Pt PI	112 109	(T) ₁₄ (T) ₁₁
Pt 36480	TTTTGGCTTACAAAATAAAAGAGG AAATTCCTAAAGAAGGAAGAGCA	<i>PsbJ-petA</i> espaciador	Pt PI	147 145	(T) ₁₁ (T) ₉
Pt 41093	TCCCGAAAATACTAAAAAGCA CTCATTGTTGAACTCATCGAGA	ORF119	Pt PI	78 78	(T) ₁₁ (T) ₁₁

*El código se refiere a la posición de la base 5' del primer F en la secuencia publicada del cpDNA de *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et.al.* 1994)

La localización se refiere a *Pinus thunbergii*

** *Pinus thunbergii* (Pt), *Pinus leucodermis* (PI).

c) Electroforesis en geles de poliacrilamida

Después de añadir 5 µl de buffer de carga (95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de xileno-cianol) a cada una de las muestras producto de PCR, estas se desnaturalizaron a 94°C por 5 min en el termociclador. Después de desnaturalizadas, las muestras se colocaron en hielo para después cargar 5 µl de cada una en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% que contienen TBE 1X y urea 7 M. Se corrieron las muestras con un marcador de peso molecular de 10 pb (10 pb ladder 1 µg/µl, Life Technologies, Gibco BRL), así como la secuencia de un plásmido originado del fago PUC18 (obtenida con el kit de secuenciación dsDNA Cycle Sequencing System de Life Technologies, Gibco BRL) a 100 W constantes durante 2 h.

Posteriormente los geles fueron transferidos a papel filtro 3 MM (Whatman), secados al vacío y a 80°C constantes durante 2 h en una secadora de geles (Model 583 Gel Dryer BioRad) y con la ayuda de una bomba de vacío (BioRad Hydrotech Vacuum Pump). Una vez secos los geles, se expusieron a película de rayos X (Película Radiográfica JUAMA) durante 24h sin pantallas intensificadoras.

El resultado de este tratamiento fueron las bandas correspondientes a los diferentes productos de PCR, los cuales pueden variar en tamaño desde 1 pb como se muestra en la figura 4.

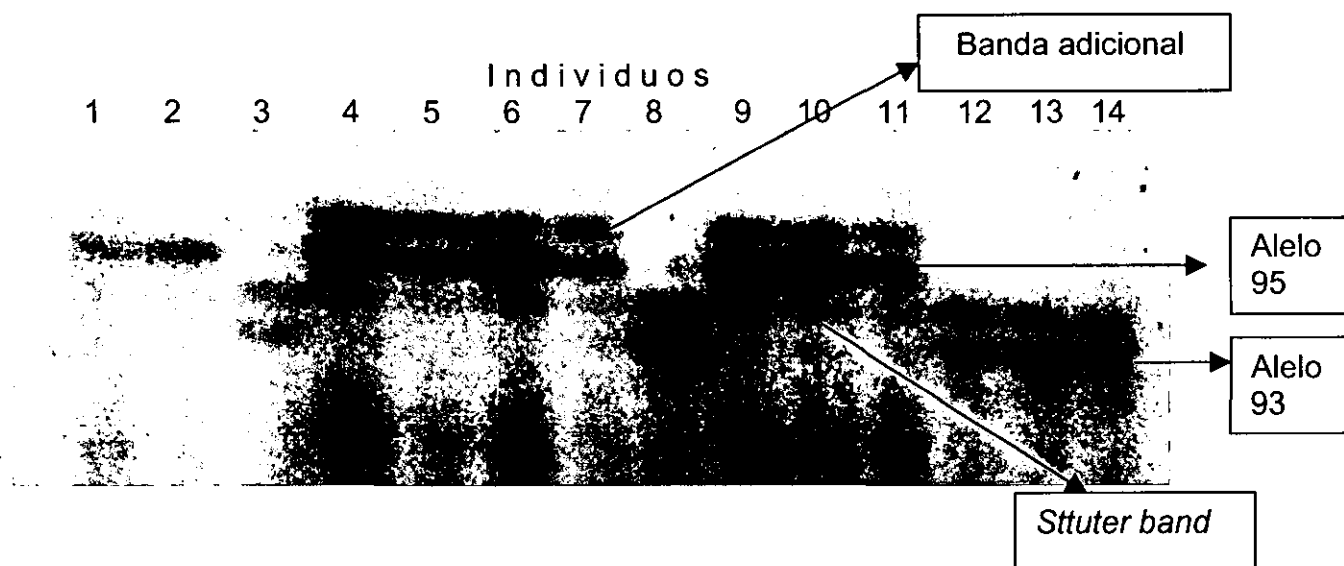


Fig. 4. Muestra de las bandas que se observan en una placa radiográfica resultado de la exposición de geles de poliacrilamida cargados con muestras de amplificadas radioactivas de microsatélites de cloroplasto de *Pinus pincea* (locus Pt 63718, alelos 93 y 95).

- **Captura de datos**

Los alelos encontrados para cada loci se distinguieron por su peso molecular. En todas las reacciones de PCR en donde se amplifican microsatélites aparecen artefactos (*stutter bands*), ya que con frecuencia la polimerasa no amplifica una o varias unidades de repetición (Hoelzel 1998). Este tipo de bandas se encuentran siempre por debajo de la banda que corresponde al microsatélite. Los tamaños de los fragmentos se establecieron con el peso molecular de la banda más intensa (y de mayor tamaño). Además de estas bandas "artefacto", se presentó (en la mayoría de los casos), una banda adicional justo arriba de la banda más intensa, esta banda es el resultado de la actividad de transferencia terminal de la *Taq* polimerasa (Schlötterer 1998), con la cual se añade una adenina al producto de PCR (Figura 4).

El análisis de las bandas que aparecen en las placas radiográficas, arroja una matriz en donde se registra el individuo junto con los pesos moleculares de las bandas que genera el PCR para cada uno de los microsatélites como en el ejemplo a continuación:

Individuo	Microsatélite 1	Microsatélite 2	Microsatélite 3	Microsatélite 4
X	139	126	122	189

Esta primera matriz debe ajustarse a los lineamientos del programa de computadora que se utilice para el análisis. En este caso la matriz se construyó para poder ser analizada por el programa "Arlequin" ver. 2.000 (Schneider *et al.* 2000). A partir de esta primera matriz se construyen matrices diferentes que resultan de los datos que van arrojando los diferentes análisis y que se van adecuando al tipo de resultados que se requiera obtener.

- **Análisis de datos**

Variación genética

Se registró la variación genética utilizando las frecuencias alélicas por locus para cada población e identificando con esto la existencia de alelos privados. También se registró, para cada una de las poblaciones y en total, la diversidad y frecuencia de haplotipos resultado de la combinación de los alelos existentes para cada loci, así como la aparición de haplotipos únicos y compartidos entre poblaciones (cada haplotipo es diferente y resulta de la combinación de los diferentes alelos que existen para cada locus).

Se usaron 2 estimadores para registrar la variación genética: 1. Diversidad de genes (H) y 2. La media del número de las diferencias por pares de haplotipos (π). Además se hizo un estimado indirecto del tamaño de las poblaciones.

Diversidad de genes (H)

H es el equivalente en datos haploides de la heterocigosis esperada (H_e) de datos diploides. Debido a que los datos moleculares obtenidos son haploides, es imposible obtener un estimado directo de la variación genética.

$$H = (n/n-1) \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

donde n = número de copias de genes en la muestra, k = número de haplotipos, p_i = frecuencia del haplotipo i en la muestra (Nei, 1987, p. 180).

Media del número de diferencias por pares de haplotipos (π)

La media del número de diferencias por pares de haplotipos en la muestra es dada por:

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j d_{ij}$$

donde d_{ij} = estimado del número de mutaciones ocurridas desde la divergencia de los haplotipos i y j , k = número de haplotipos, p_i = frecuencia del haplotipo i , p_j = frecuencia del haplotipo j (Tajima 1983 y 1993).

Estimado indirecto del tamaño poblacional

Existen varios métodos para estimar el parámetro $\theta = 2Mu$, donde M es igual a N en datos haploides y a $2N$ en datos diploides (N es el tamaño de la población) y u es la tasa promedio de mutación. El programa utilizado calcula θ a partir de la homocigosis esperada y su valor fue utilizado para hacer un estimado del tamaño poblacional. Asumiendo que la u es una constante en $\theta = 2Nu$, θ es igual al tamaño poblacional multiplicado por dos veces la tasa de mutación, esto es un valor del tamaño poblacional (si bien subestimado por la multiplicación con u).

Estructura genética, flujo genético y tiempos de coalescencia

Para todos los estimadores utilizados se probaron dos modelos de evolución diferentes, uno es el modelo de alelos infinitos (Wright 1949; Kimura & Crow 1964) y otro es el modelo de mutación paso a paso o *stepwise mutation model* (Ohta & Kimura 1973). En el caso del primero, el estimador principal de la diferenciación genética es F_{st} y en el segundo es R_{st} , y es a partir de estos valores que se calculan el número de migrantes y los tiempos de coalescencia.

Estructura genética

La estructura genética de la población fue investigada por un análisis molecular de varianza (AMOVA) como ha sido definido por Cockerham (1969, 1973) y extendido por otros (Weir y Cockerham 1984; Long 1986) con la diferencia de que este análisis en particular toma en cuenta el número de mutaciones entre haplotipos moleculares (Excoffier *et al.* 1992). Este análisis fue realizado para probar la estructura genética con los índices de fijación F_{st} y R_{st} :

1.- Al estimar los índices de estructura genética la opción para estimar los estadísticos F_{st} en todos los loci (Weir & Cockerham 1984; Michalakis y Excoffier 1996) es simplemente el conteo del número de alelos diferentes entre parejas de haplotipos:

$$F_{st} = d_{XY} = \sum_{i=1}^L \delta_{XY}(i)$$

donde, $\delta_{XY}(i)$ = la función de Kronecker y es igual a 1 si los alelos del locus (i) son idénticos para ambos haplotipos y 0 en el caso contrario.

2.- Al estimar los índices de estructura genética la opción para estimar un análogo de la R_{st} de Slatkin (1995) es la suma de las diferencias cuadradas entre dos haplotipos:

$$R_{st} = d_{XY} = \sum_{i=1}^L (a_{Xi} - a_{Yi})^2$$

donde:

a_{Xi} = número de repeticiones del microsatélite en el locus i del individuo x.

a_{Yi} = número de repeticiones del microsatélite en el locus i del individuo y.

A partir de estas ecuaciones se realiza todo el AMOVA y todos los resultados son referidos a F_{st} o a R_{st} según sea la opción que se haya elegido.

Para este análisis es necesario definir grupos de poblaciones, lo que significa establecer una estructura genética que será probada con el análisis de varianza (AMOVA). En esta prueba se realiza un análisis jerárquico de varianza, el cual divide la varianza total en componentes de covarianza debidos a diferencias interpopulacionales, intrapopulacionales y entre grupos de poblaciones.

Los componentes de covarianza (σ^2) se usan para calcular los índices de fijación, definidos originalmente por Wright (1951, 1965) en términos de coeficientes de autocruza.

En el caso haploide se asume que el vector de la frecuencia del haplotipo i de la población j en el grupo k es una ecuación lineal de la forma:

$$x_{ijk} = x + a_k + b_{jk} + c_{ijk}$$

El vector x es el valor esperado y desconocido de x_{ijk} , los efectos son a para el grupo, b para las poblaciones y c para los haplotipos dentro de una población, dentro de un grupo, los cuales se asumen aditivos, al azar, independientes y con elementos de covarianza asociados: σ_a^2 , σ_b^2 , σ_c^2 respectivamente.

La varianza molecular total (σ^2) es la suma de las covarianzas:

$$\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2$$

En el caso de una estructura genética jerárquica simple (individuos haploides en poblaciones), la forma jerárquica del algoritmo lleva a obtener F_{st} o R_{st} (según sea el modelo supuesto).

Los índices de fijación se obtienen a partir de las varianzas obtenidas. En el caso de tener una estructura de grupos de poblaciones, además de F_{st} se obtienen F_{ct} y F_{sc} :

$$F_{st} = (\sigma_a^2 + \sigma_b^2) / \sigma^2 = \text{diferenciación entre todas las poblaciones.}$$

$$F_{sc} = \sigma_b^2 / (\sigma_b^2 + \sigma_c^2) = \text{diferenciación entre poblaciones de un grupo.}$$

$$F_{ct} = \sigma_a^2 / \sigma^2 = \text{diferenciación entre grupos.}$$

La significancia de los índices de fijación es probada usando una permutación no paramétrica (Excoffier *et al.* 1992) realizándose 1000 permutaciones para tener valores confiables en las probabilidades finales.

Otro resultado que surge del análisis de AMOVA es una matriz de F_{st} por pares de poblaciones, esta matriz refleja las diferencias entre poblaciones a partir de las diferencias entre haplotipos calculadas según F_{st} o R_{st} .

Flujo genético

Los valores del número de migrantes entre poblaciones (M) se estiman a partir de los valores de F_{st} o R_{st} obtenidos por el AMOVA. En estos cálculos existen ciertos supuestos: se supone que 2 poblaciones de tamaño N extraídas de un gran número de poblaciones intercambian una fracción m cada generación y que la tasa de mutación u es despreciable comparada con m . En estos supuestos para datos haploides se obtiene que $M=Nm$.

En el caso de M a partir de F_{st} (M_F), Slatkin (1995) define la siguiente ecuación para su estimación:

$$M_F = \frac{1}{4} [(1/F_{st}) - 1]$$

Para el caso de M a partir de R_{st} (M_R), la ecuación que Slatkin (1995) ha derivado para este cálculo es:

$$M_R = [(d_s - 1) / 4d_s] / [(1/R_{st}) - 1]$$

donde d_s = número de subpoblaciones, y en el caso de las R_{st} 's obtenidas por pares de poblaciones d_s es 2.

El programa que hace los cálculos obtiene M_F y M_R con la ecuación siguiente, la cual deriva de las dos anteriores (Excoffier 2000):

$$M = (1 - F_{st}) / 2F_{st}$$

En donde F_{st} es igual al índice de fijación que resulte de AMOVA, ya sea a partir de las diferencias entre haplotipos (F_{st}) o a partir de las diferencias cuadradas en el tamaño (R_{st}). Pero en cualquier caso los valores de M están directamente relacionados con los índices de fijación.

Tiempos de coalescencia

Para estimar los tiempos de coalescencia entre poblaciones, la base se encuentra en una matriz de valores de F_{st} (o R_{st}) por pares de poblaciones, arrojada gracias al AMOVA. Estos valores de F_{st} (o R_{st}) entre pares de poblaciones resultan de las diferencias entre haplotipos que existen entre las mismas y pueden usarse como estimador de distancias genéticas entre poblaciones "a corto plazo", con la aplicación de una transformación para linearizar la distancia con el tiempo de divergencia (Slatkin 1995).

La linearización de la distancia dada por F_{st} y el tiempo de divergencia es explicada por Slatkin (1995). Para hacer esta aproximación Slatkin considera ciertos supuestos: un modelo demográfico simple donde dos poblaciones haploides de tamaño N divergieron hace τ generaciones de una población del mismo tamaño. Estas dos poblaciones han permanecido aisladas desde entonces, sin intercambiar migrantes. Bajo estas condiciones, F_{st} puede expresarse en términos de coalescencia:

$$F_{st} = (f_0 - f_1) / (1 - f_1) = (\bar{t}_1 - \bar{t}_0) / \bar{t}_1$$

- donde f_1 = probabilidad de identidad por descendencia de dos genes tomados de dos poblaciones diferentes.
 f_0 = probabilidad de identidad por descendencia de dos genes tomados de la misma población.
 \bar{t}_1 = la media del tiempo de coalescencia de dos genes tomados de dos poblaciones diferentes.
 \bar{t}_0 = la media del tiempo de coalescencia de dos genes tomados de la misma población.

Por lo que al conocer F_{st} podemos conocer los tiempos de coalescencia, los cuales aparecen en una matriz por pares de poblaciones. La misma ecuación aplica para el caso de R_{st} .

La ecuación anterior puede simplificarse (Excoffier 2000) en:

$$D = \tau / N$$

Donde D = distancia proporcional al tiempo de divergencia.

τ = número de generaciones desde la divergencia.

N = tamaño poblacional.

Esta expresión de la divergencia es de gran utilidad pues permite ver automáticamente si en la divergencia el factor más importante es el tiempo (aislamiento) o el tamaño de las poblaciones (deriva genética).

Distancias genéticas

También en este caso, se determinaron las distancias genéticas tanto para el modelo de alelos infinitos como para el de mutación paso a paso.

Las distancias genéticas de Nei (Nei & Li 1979) se estimaron de la siguiente manera:

$$D = \bar{\pi}_{12} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k'} x_{1i} x_{2j} \delta_{ij}$$

$$D_A = \bar{\pi}_{12} - [(\bar{\pi}_1 + \bar{\pi}_2) / 2]$$

donde

D = distancia de Nei no corregida.

D_A = distancia de Nei corregida.

k = número de haplotipos distintos en la población 1.

k' = número de haplotipos distintos en la población 2.

x_{1i} = frecuencia del haplotipo i en la población 1.

x_{2j} = frecuencia del haplotipo j en la población 2.

δ_{ij} = número de diferencias entre el haplotipo i y j .

Los valores de distancia genética utilizados fueron los de D_A .

Distancias geográficas

Para calcular la distancia lineal que separa a las poblaciones muestreadas, se construye una matriz con las coordenadas en grados de latitud y longitud (obtenidas con un GPS y cartas del INEGI), las cuales se transforman de grados a kilómetros. Ya con la ubicación de las coordenadas en kilómetros se logra establecer las distancias entre poblaciones con un simple sistema de triangulación. Esto corresponde al cálculo euclidiano de distancias entre poblaciones mediante sus coordenadas Mercator proyectadas (Le Corre *et al.*, 1997).

Asociación entre estructura genética y distancia geográfica

Se realizaron correlaciones entre las distancias genéticas y geográficas de las poblaciones, entre las distancias genéticas y el número de migrantes y entre las distancias geográficas y el número de migrantes.

Se realizó la prueba de Mantel (1967; Smouse *et al.* 1986) para verificar que las matrices de valores de distancias genéticas de Nei y de distancias geográficas realmente están correlacionadas.

La prueba de Mantel consiste en probar la significancia de la correlación entre dos o más matrices mediante permutaciones que permiten obtener una distribución empírica nula del coeficiente de correlación. De esta manera si el coeficiente de correlación entre las matrices es alto en el caso en que la relación entre ellas no pueda ser explicada por una distribución azarosa de los datos, podemos decir que existe una correlación real entre los valores.

El análisis de los datos se realizó con el programa "Arlequín, A Software for Population Genetics Data Analysis. Ver. 2.000".

Demografía histórica

Esta es una aproximación a la historia de las poblaciones usando datos genéticos los cuales nos pueden informar sobre cambios demográficos pasados.

Inferencia de la historia poblacional a partir de filogenias moleculares

Este método de inferencia se basa en la teoría de coalescencia de la genética de poblaciones (Nee *et al.* 1996), la cual ha sido probada como una poderosa herramienta para estudiar muestras pequeñas de secuencias de poblaciones (Hudson 1990) para hacer inferencias sobre la historia dinámica de las poblaciones.

En primer lugar es necesario construir un árbol de distancias genéticas entre las poblaciones estudiadas. Se construyeron tres árboles, todos mediante el método de reconstrucción de Neighbor-Joining en el programa PHYLIP. Dos de los árboles

se refieren a las distancias genéticas entre poblaciones, uno de ellos se construyó con las distancias de Nei obtenidas dentro del modelo de alelos infinitos y el otro con las distancias de Nei obtenidas dentro del modelo de mutación paso a paso. El tercer árbol se construyó con los haplotipos encontrados y las distancias entre ellos son el número de repeticiones de diferencia.

Para realizar una interpretación histórica de los datos genéticos es necesario crear una representación gráfica de los tiempos de coalescencia (distancias genéticas) y el número de linajes presentes en estos tiempos. El tiempo de las gráficas es la distancia genética de cada nodo del árbol de distancias y los valores del número de linajes son el número de ramas que existan en cada uno de los nodos.

Las dos representaciones básicas de la historia de las poblaciones son las que se muestran en la figura 5. En las representaciones gráficas es conveniente invertir la perspectiva temporal y pensar en la filogenia como un árbol "creciendo". En cualquier caso, la pendiente de la curva en cualquier punto es la tasa a la cual cada rama produce nuevas ramas. En el caso de la curva superior se observa un caso de crecimiento exponencial de las poblaciones en donde la aparición de las ramas sucedió bastante tiempo atrás y en el presente sólo se registra crecimiento. En el caso de la curva inferior vemos aparición reciente de ramas, esta curva indica tamaño constante de la población, la cual no está creciendo en el presente y se encuentra fragmentada.

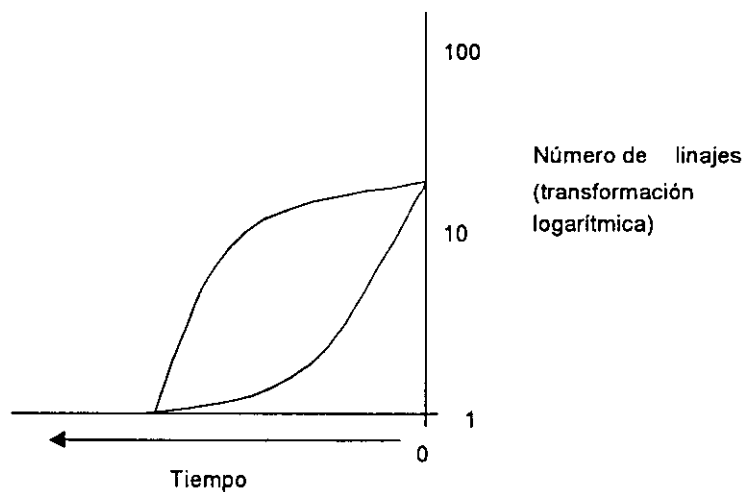


Fig. 5. Inferencia de la historia poblacional a partir de filogenias moleculares. Cuando los linajes a través del tiempo en una gráfica semilogarítmica, en donde el eje de los linajes es el que ha sido transformado, la dirección de la concavidad de la línea superior representa el patrón esperado para una muestra de poblaciones que sigue un crecimiento exponencial a lo largo del tiempo que cubre las coalescencias en la filogenia, mientras que la línea inferior es la esperada para una población de tamaño constante fragmentada (Nee *et al.* 1996).

Finalmente se realizó un dibujo representando a todos los haplotipos unidos por líneas equivalentes al número de diferencias entre sí, lo que permite agruparlos de acuerdo con su distancia en número de mutaciones y darnos una idea del haplotipo o haplotipos ancestrales y ver cuales son las poblaciones que los poseen. A esta representación la llamamos red de haplotipos.

Distribución *Mismatch*

En lugar de usar árboles filogenéticos también se puede trabajar con las frecuencias relativas de pares de individuos en la muestra que difieran por un sitio i nucleotídico, donde $i = 0, 1, \dots$ (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992). La distribución de las frecuencias de dichas diferencias se ha llamado "distribución de las diferencias genéticas pareadas" o "distribución mismatch" (Hartl & Clark 1989; Harpending *et al.* 1993).

Una distribución de mismatches es una tabulación del número de diferencias por pares entre todas las secuencias de DNA en una muestra (en este caso de diferencias en tamaño del microsatélite) (Harpending 1994). En una población que ha sido estacionaria por un largo tiempo esta distribución de secuencias de DNA no recombinantes se vuelve "arrugada" y errática, mientras que una población que ha estado creciendo genera distribuciones de mismatches suaves y con un pico.. El grado de "arrugamiento" es estimado por un parámetro llamado índice de arrugamiento (*raggedness*), en donde valores pequeños (1×10^{-3} a 5×10^{-2}) indican poco arrugamiento y por lo tanto expansión súbita y valores grandes (5×10^{-2} en adelante) representan poblaciones que no han crecido súbitamente (Harpending *et al.* 1993). La posición del pico refleja el tiempo en el que la población creció (Harpending 1994).

El modelo que se usó para realizar el análisis de distribución *mismatch* fue el modelo de Rogers (1995) o de expansión súbita, el cual utiliza la distribución de mismatches para estudiar la demografía histórica y reduce la historia de la población a tres parámetros: N_0 , N_1 y t (N_0 = tamaño poblacional inicial referido a número de hembras; N_1 = tamaño poblacional posterior al crecimiento o decrecimiento de la población inicial; t = número de generaciones entre N_0 y N_1) sólo puede dar información sobre tres parámetros compuestos: $\theta_0 = 2uN_0$, $\theta_1 = 2uN_1$ y $\tau = 2ut$. Estos parámetros miden el tamaño poblacional de hembras en unidades de $1/2u$ individuos y el tiempo desde la explosión (τ) en unidades de $1/2u$ generaciones (Rogers 1995). Asume que θ_1 tiende a infinito, lo que implica que no existen eventos de coalescencia posteriores a la expansión, lo cual es sólo razonable si la expansión es grande. Con esta suposición es posible derivar los estimadores del momento de tiempo hacia la expansión (τ) y el parámetro de mutación (θ_0) como:

$$\bar{\theta}_0 = (v - m)^{-1/2}$$

$$\tau = m - \bar{\theta}_0$$

donde m = media de la distribución mismatch.

v = varianza de la distribución mismatch.

De esta manera el programa Arlequín ver 2.000 realiza una simulación a partir de los datos reales de media y varianza de diferencias entre individuos y compara esta distribución llamada *esperada* con la distribución real u *observada* para probar así el modelo de expansión súbita. Si los valores de la distribución observada y esperada son significativamente diferentes, los datos no se ajustan al modelo y la distribución en un histograma resulta multimodal; el caso en donde los datos se ajustan al modelo de expansión súbita mostraría histogramas unimodales.

RESULTADOS

Los análisis de variación genética, estructura genética y demografía histórica se realizaron con un total de 154 individuos, 25.7 individuos en promedio por población, 6 poblaciones (Tabla 4) y 4 microsatélites de cloroplasto en total (se probaron 11 cebadores distintos), los cuales resultaron polimórficos (Tabla 6) y por lo tanto informativos sobre la variación de las poblaciones de *Pinus pinceana* estudiadas. Los cebadores utilizados fueron: Pt30204, Pt71936, Pt63718 y Pt110048 (Vendramin *et al.* 1996) los cuales se presentan en la tabla 6.

Todos los análisis se realizaron a partir de los diferentes haplotipos compuestos por los alelos en los cuatro diferentes loci mencionados (tabla 7).

Variación genética

Los alelos encontrados para cada locus, se distinguieron por su peso molecular como función del número de pares de bases (Tabla 7). Los diferentes loci presentaron diferente número y tamaño de alelos como puede verse en la tabla 7.

Tabla 7. Alelos encontrados para cada locus de cpSSR en *Pinus pinceana*, codificados de acuerdo con su composición en número de pares de bases (pb).

Microsatélite	A l e l o s				
Pt30204	150	151	154	156	157
Pt71936	147	148	152		
Pt63718	93	95			
Pt110048	91	92	93	95	

Como expresión de la variación genética se reportan a continuación las frecuencias alélicas (Tabla 9) para cada locus en cada población. Los alelos de cada microsatélite presentan una frecuencia diferente en cada población, incluso existen alelos privados para algunas poblaciones, esto es, alelos que sólo se encuentran en una población. Por ejemplo los alelos 157 del microsatélite Pt30204 y 95 del microsatélite Pt110048 sólo están presentes en la población de Cuauhtémoc y el alelo 93 del microsatélite Pt110048 sólo está en la población de Sierra de Parras (Tabla 9).

Otra muestra de variación la encontramos en los haplotipos que aparecen en la Tabla 8. En esta lista encontramos 2 haplotipos predominantes (1 y 5), los cuales a su vez son los que aparecen en un mayor número de poblaciones (3). En el caso del haplotipo 1, las poblaciones que lo presentan son las que se encuentran más hacia el norte del país (Sierra de Parras y Cuauhtémoc) junto con una de las poblaciones centrales (Huizache); mientras que el otro haplotipo más frecuente se encuentra en las poblaciones más sureñas (San Joaquin y Tolantongo), así como en la misma población central que comparte el haplotipo 1 (Huizache). Además en cualquiera de los dos casos, el haplotipo en cuestión es el más frecuente en cada población o incluso el único (Tolantongo).

Tabla 8. Frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las poblaciones de *Pinus pinceana* en México.

SP=Sierra de Parras; C=Cuauhtémoc; H=Huizache; HG=Guadalcázar; SJ=San Joaquín; T=Tolantongo.

Los haplotipos que están marcados con negritas son los compartidos por un mayor número de poblaciones.

#	Haplotipos				Frecuencia de los haplotipos						
	Microsatélites				Poblaciones (frecuencia / individuos)						
	Pt30204	Pt71936	Pt63718	Pt110048	SP	C	H	HG	SJ	T	Total
1	156	147	95	91	0.61/19	0.56/18	0.03/1				0.25/38
2	157	147	95	91	0.26/8	0.41/13					0.14/21
3	154	147	93	95		0.03/1					6.5x10 ⁻³ /1
4	156	148	93	91			0.13/15	0.3/6			0.065/22
5	150	152	93	92			0.03/4		0.93/14	1.0/26	0.266/10
6	156	147	93	91			0.5/1	0.35/7			0.14/41
7	150	152	93	91			0.03/1				6.5x10 ⁻³ /1
8	157	147	93	91			0.23/7	0.25/5			0.078/12
9	157	148	93	91			0.03/1				6.5x10 ⁻³ /1
10	151	148	93	91				0.05/1			6.5x10 ⁻³ /1
11	157	147	93	92				0.05/1			6.5x10 ⁻³ /1
12	151	152	93	92					0.07/1		6.5x10 ⁻³ /1
13	156	147	95	93	0.065/2						0.013/2
14	156	147	95	92	0.065/2						0.013/2
Número de individuos por población					31	32	30	20	15	26	154

Tabla 9. Frecuencias alélicas encontradas para cada locus de cpSSR en las poblaciones de *Pinus pinceana* en México (SP=Sierra de Parras; C=Cuauhtémoc; H=Huizache; HG=Guadalcázar; SJ=San Joaquín; T=Tolantongo).

Alelos	Microsatélites														# ind
	Pt 30204					Pt 71936			Pt 63718		Pt 110048				
	157	156	154	151	150	152	148	147	95	93	95	93	92	91	
Pob.															
SP	0.26	0.74	---	---	---	---	---	1.00	1.00	---	---	0.07	0.03	0.90	31
C	0.31	0.66	0.03	---	---	---	---	1.00	0.97	0.03	0.03	---	---	0.97	32
H	0.27	0.67	---	---	0.07	0.07	0.17	0.77	0.03	0.97	---	---	0.03	0.97	30
HG	0.3	0.65	---	0.05	---	---	0.3	0.7	---	1.00	---	---	0.05	0.95	20
SJ	---	---	---	0.07	0.93	1.00	---	---	---	1.00	---	---	1.00	---	15
T	---	---	---	---	1.00	1.00	---	---	---	1.00	---	---	1.00	---	26
Total															154

Además de los datos anteriores contamos con el estimador *H* (Tabla 10) utilizado para determinar la diversidad genética, el cual muestra que, en el caso del análisis con todos los loci, la variación total es alta (0.8237 ±0.0140), a pesar de que en algunas poblaciones (San Joaquín y Tolantongo) es prácticamente nula (0.1333 y 0.0000).

Por otro lado, la diversidad por locus, en el caso de Pt30204 es muy similar a la de todos juntos, pues se mantiene el mismo patrón anterior en donde las poblaciones con menor diversidad son San Joaquin y Tolantongo (0.1333 y 0.0000), lo mismo sucede para Pt110048 (0.0000 y 0.0000). En el caso de Pt63718 y Pt71936, la diversidad total se explica sólo gracias a 2 poblaciones, en el caso de Pt71936 sólo hay diversidad en Huizache y Guadalcázar (0.3931 y 0.4789) y en el caso de Pt63718 la diversidad se concentra en Cuauhtémoc y Huizache (0.0625 y 0.0667).

Como puede verse la diversidad en las poblaciones puede variar mucho (0.0625-0.7579), dependiendo de la población y el locus que se analice. Sin embargo, la diversidad genética total considerando todos los loci o uno por uno, no llega a variaciones de un orden de magnitud como en el caso de la diversidad por poblaciones, que va de 0.4435 para el locus Pt110048 a 0.8237 para todos los loci (Tabla 10).

En el caso del estimador de variación π , los valores de diversidad mantienen más o menos el mismo patrón que se registra con H , con la notable diferencia que los errores para cada valor son muy altos, en muchos casos son iguales al valor de π y en otros incluso mayores (Tabla 10).

La diversidad de haplotipos también coincide con los valores de H , pues los valores altos de diversidad por ejemplo en Huizache (0.6966) se encuentran junto con los valores más altos de diversidad de haplotipos (7), en el caso de Tolantongo, con diversidad de 0.000, sólo se encuentra 1 haplotipo (Tabla 10).

Los estimados indirectos de tamaños poblacionales ($N = 2Nu$), tienen una relación directa con la diversidad que se presenta en las poblaciones, lo cual es de esperarse, pues los cálculos de θ se hacen a partir de la homocigosis esperada, así es que las poblaciones más diversas tiene tamaños poblacionales relativamente grandes (Guadalcázar con $H=0.7579$, y $\theta=8.03$), lo contrario sucede con las poblaciones con variación relativamente pequeña (Tabla 10). El tamaño poblacional en este caso nos muestra que la deriva génica es heterogénea en las poblaciones y de ahí la heterogeneidad en la diversidad genética dentro de las mismas.

Por último, cabe hacer notar que en general las poblaciones que mantienen los valores de diversidad más altos son Huizache y Guadalcázar (poblaciones que se encuentran en el centro de la distribución de *Pinus pinceana*).

Tabla 10. Valores de diversidad genética y tamaño poblacional estimado para las poblaciones de *Pinus pincea* en México.

Población	Diversidad genética (H ; π) (el valor superior corresponde a H y el inferior a π)					No.de Haplo -tipos	N	$\theta=2Nu$ (estimado del tamaño de la población)
	Todos los loci	Pt30204	Pt71936	Pt63718	Pt110048			
Sierra de Parras	0.5677 (+0.0783)	0.3957 (+0.0781)	0	0	0.2409 (+0.0975)	4	31	2.175986
	0.63656 (+0.5108)	0.3957 (+0.3791)	0	0	0.2409 (+0.2834)			
Cuauhtémoc	0.5343 (+0.0447)	0.5343 (+0.0447)	0	0.0625 (+0.0577)	0.0625 (+0.577)	3	32	1.805204
	0.5968 (+0.489)	0.5343 (+0.456)	0	0.0625 (+0.1367)	0.0625 (+0.1367)			
Huizache	0.6966 (+0.0694)	0.4966 (+0.799)	0.3931 (+0.0985)	0.0667 (+0.0613)	0.0667 (+0.0613)	7	30	4.930011
	1.023 (+0.7041)	0.4966 (+0.4363)	0.3931 (+0.378)	0.0667 (+0.1416)	0.0667 (+0.1416)			
Guadalcázar	0.7579 (+0.0495)	0.5105 (+0.0907)	0.4789 (+0.0720)	0	0.1 (+0.088)	5	20	8.030247
	1.0895 (+0.7464)	0.5105 (+0.45)	0.4789 (+0.4324)	0	0.1 (+0.1775)			
San Joaquín	0.1333 (+0.1123)	0.1333 (+0.1123)	0	0	0	2	15	0.165680
	0.1333 (+0.2099)	0.1333 (+0.2099)	0	0	0			
Tolantongo	0	0	0	0	0	1	26	0
	0	0	0	0	0			
Total	0.8237 (+0.0140)	0.6471 (+0.0204)	0.5060 (+0.0327)	0.4866 (+0.0151)	0.4435 (+0.0317)	14	154	15.58649
	2.083185 (+1.1712)	0.64059 (+0.5053)	0.50598 (+0.4319)	0.4866 (+0.4215)	0.4435 (+0.398)			

Estructura genética, flujo genético y tiempos de coalescencia

Estructura genética

La estructura genética que se analizó con el AMOVA, tanto con el método que se refiere a F_{st} como el que se refiere a R_{st} (Tablas 11 y 12), consistió en una estructura de tres grupos con dos poblaciones cada uno, los cuales se determinaron a partir de la distribución geográfica de las poblaciones (Fig. 3). Usando este criterio, la estructura fue la siguiente: grupo 1 (al norte), con las poblaciones Cuauhtémoc y Sierra de Parras; grupo 2 (al centro), con las poblaciones Huizache y Guadalcázar; y grupo 3 (al sur), con las poblaciones San Joaquín y Tolantongo.

En el caso del AMOVA a partir de F_{st} (Tabla 11), el mayor porcentaje de la variación total lo encontramos entre grupos (78.40%) y el valor de F_{ct} que

corresponde al índice de fijación (medida de la diferenciación) entre grupos es de 0.78399. En cuanto al índice de fijación entre poblaciones de un mismo grupo (F_{sc}) podemos decir que resultó notablemente bajo (0.00401), así como el porcentaje de la variación total que se encuentra entre las poblaciones que pertenecen al mismo grupo (0.09%). Por otro lado el porcentaje de la variación total que se encuentra dentro de las poblaciones es de 21.51%. Finalmente, el principal índice de fijación o F_{st} , el cual refleja el nivel de diferenciación entre todas las poblaciones es de 0.78486. Todos los estimados son significativos en un 90% o más (Tabla 11). De acuerdo con esto se puede decir que la estructura genética propuesta se acepta.

Los resultados obtenidos con el AMOVA a partir de R_{st} (Tabla 12) son similares al anterior, en donde la variación entre grupos representa el mayor porcentaje de la variación total (93.30%) y el valor de F_{ct} (diferenciación entre grupos) resultó de 0.93295. El índice de fijación entre poblaciones dentro de cada grupo tuvo un valor de -0.03186 (F_{sc}) y el porcentaje de la variación total que corresponde a las poblaciones dentro de los grupos es de -0.21% . El porcentaje de la variación total que corresponde a la diversidad dentro de las poblaciones es de 6.92%. Por último el valor de diferenciación entre todas las poblaciones (F_{st}) expresado en términos de R_{st} es de 0.93082. Todos los estimados son significativos en un 90% o más (Tabla 12). En este caso la estructura propuesta también se acepta.

Tabla 11. Resultados de la prueba de AMOVA con el método de distancia correspondiente al número de alelos diferentes = F_{st} , aplicada a una estructura de 6 poblaciones en 3 grupos (de 2 poblaciones cada uno) de *Pinus pinceana* en México.

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	% de variación
Entre grupos	2	$\sigma_a^2 = 1.10591$	78.40
Entre poblaciones dentro de grupos	3	$\sigma_b^2 = 0.00122$	0.09
Dentro de poblaciones	148	$\sigma_c^2 = 0.30348$	21.51
Total	153	$\sigma^2 = 1.41061$	
Índices de fijación			
$F_{sc} = 0.00401$			
$F_{st} = 0.78486$			
$F_{ct} = 0.78399$			
Valores de significancia			
σ_c^2 y F_{st} ($P = 0.00000$)			
σ_b^2 y F_{sc} ($P = 0.00000$)			
σ_a^2 y F_{ct} ($P = 0.06452 + 0.00779$)			

Tabla 12. Resultados de la prueba de AMOVA con el método de distancia correspondiente a la suma de las diferencias cuadradas del tamaño de haplotipos = R_{st} , aplicada a una estructura de 6 poblaciones en 3 grupos (de 2 poblaciones cada uno) de *Pinus pinceana* en México.

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	% de variación
Entre grupos	2	$\sigma_a^2 = 19.73132$	93.30
Entre poblaciones dentro de grupos	3	$\sigma_b^2 = -0.04517$	-0.21
Dentro de poblaciones	148	$\sigma_c^2 = 1.46318$	6.92
Total	153	$\sigma^2 = 21.14933$	
Indíces de fijación $F_{sc} = -0.03186$ $F_{st} = 0.9382$ $F_{ct} = 0.93295$			
Valores de significancia σ_c^2 y F_{st} ($P = 0.00000$) σ_b^2 y F_{sc} ($P = 0.00000$) σ_a^2 y F_{ct} ($P = 0.05376 + 0.00726$)			

Se obtuvieron los valores de diferenciación genética con el estimador F_{st} entre pares de poblaciones. En la Tabla 13 puede verse que las poblaciones más cercanas geográficamente (Tabla 21), Guadalcázar y Huizache (25.76 km) tienen entre ellas los valores de F_{st} más bajos (-0.1189, no significativamente diferente de 0); mientras que las poblaciones más alejadas geográficamente (Tabla 21) que son Sierra de Parras y Tolantongo (613.33 km) tienen un valor de F_{st} de 0.91237, el cual no es estrictamente el valor mayor pero no es significativamente diferente del más grande (0.91673, entre Cuauhtémoc y Tolantongo).

Los valores de diferenciación genética por pares de poblaciones a partir de R_{st} se presentan en la Tabla 14. En forma similar al caso de la diferenciación entre pares de poblaciones a partir de F_{st} , los valores más altos (0.99225) se encuentran entre las poblaciones más alejadas geográficamente (Sierra de Parras y Tolantongo). La misma correspondencia encontramos entre las poblaciones más cercanas geográficamente (Huizache y Guadalcázar) con valores de diferenciación de -0.03411 (no significativamente diferente de 0).

Tabla 13. Valores de diferenciación genética entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México obtenidos a partir del número de diferencias entre los haplotipos de las poblaciones (F_{st}).

* = valores significativamente diferentes de cero ($P < 0.01$)

Población	Sierra de Parras	Cuauhtémoc	Huizache	Guadalajara	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0					
Cuauhtémoc	0.02750	0				
Huizache	0.53812 *	0.53140 *	0			
Guadalajara	0.57543 *	0.57048 *	-0.1189	0		
San Joaquín	0.88143 *	0.88732 *	0.75646 *	0.77288 *	0	
Tolantongo	0.91237 *	0.91673 *	0.81068 *	0.83677 *	0.03873	0

Tabla 14. Valores de diferenciación genética entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México obtenidos a partir de la suma de las diferencias cuadradas en el tamaño de los haplotipos entre poblaciones (R_{st})

* = valores significativamente diferentes de cero ($P < 0.01$)

Población	Sierra de Parras	Cuauhtémoc	Huizache	Guadalajara	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0					
Cuauhtémoc	-0.02196	0				
Huizache	0.44623 *	0.41007 *	0			
Guadalajara	0.66230 *	0.58268 *	-0.03411	0		
San Joaquín	0.98960 *	0.97882 *	0.89828 *	0.96253 *	0	
Tolantongo	0.99225 *	0.98358 *	0.91906 *	0.97271 *	0.03873	0

Flujo genético

Debido a que los valores del número de migrantes entre poblaciones (M) se obtienen a partir de los valores de F_{st} o R_{st} de acuerdo con el modelo de mutación considerado, se mantiene la relación que existe entre la diferenciación entre poblaciones y la distancia geográfica (ver Tabla 21) entre ellas como se muestra en las Tablas 15 y 16. Siendo así, es lógico que tanto en el caso de M_F (M a partir de F_{st}) como en el de M_R (M a partir de R_{st}), los valores mayores de M se encuentren entre las poblaciones más cercanas geográficamente (Huizache y Guadalajara), siendo tanto M_F como M_R determinados como de un valor infinito; así también las poblaciones más lejanas geográficamente (Sierra de Parras y Tolantongo) son las que presentan el menor flujo entre ellas ($M_F = 0.04802$ y $M_R = 0.00390$, nuevamente en el caso de M_F no es el valor menor pero no es significativamente diferente del menor).

Por otro lado, debido a las consideraciones que se toman en cuenta para calcular F_{st} y R_{st} , regularmente F_{st} presenta valores mayores que R_{st} y el valor del número de migrantes calculado a partir de F_{st} es, lógicamente, sobreestimado. Esta situación se observa al comparar las Tablas 15 y 16 pues en la mayoría de los casos (66%), los valores de M calculados a partir de R_{st} (Tabla 16) resultan menores que los calculados a partir de F_{st} (Tabla 15).

Tabla 15. Número absoluto de migrantes (M_F) entre poblaciones de *Pinus pincena* en México, calculado a partir de F_{st} .

Población	Sierra de Parras	Cuauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras						
Cuauhtémoc	17.68421					
Huizache	0.42917	0.44091				
Guadalcázar	0.36892	0.37646	Infinito			
San Joaquín	0.06726	0.06349	0.16098	0.14693		
Tolantongo	0.04802	0.04542	0.11677	0.09754	12.40909	

Tabla 16 . Número absoluto de migrantes (M_R) entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México, calculado a partir de R_{st} .

Población	Sierra de Parras	Cuauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras						
Cuauhtémoc	Infinito					
Huizache	0.62050	0.71931				
Guadalcázar	0.25495	0.35810	Infinito			
San Joaquín	0.00525	0.01082	0.05662	0.01947		
Tolantongo	0.00390	0.00835	0.04403	0.01403	12.40909	

Tiempos de coalescencia

Al igual que el cálculo de M , los tiempos de coalescencia derivan de valores de F_{st} o R_{st} , de hecho las matrices de tiempos de coalescencia derivan directamente de las matrices de diferenciación genética entre poblaciones (Tablas 13 y 14), por lo que es obvio que los valores de coalescencia menores que se ven en las Tablas 17 y 18 (0.00 para F_{st} y 0.00 para R_{st}) se encuentran entre las poblaciones menos diferenciadas genéticamente, con mayor número de migrantes y con una menor distancia geográfica entre ellas (Huizache y Guadalcázar) (ver Tabla 21), lo contrario ocurre para las poblaciones más lejanas geográficamente (Sierra de Parras y Tolantongo) con los valores de coalescencia mayores (10.412 para F_{st} y 128.05154 para R_{st} , en el caso de F_{st} no se trata del valor estrictamente mayor pero no es significativamente diferente del mayor).

Por último es importante notar que los tiempos de coalescencia obtenidos a partir de R_{st} son, en la mayoría de los casos, más grandes que los obtenidos por F_{st} (66%), lo cual puede deberse a la subestimación que hace F_{st} de la diferenciación entre poblaciones y por lo tanto los tiempos en los que coalescen los haplotipos de las poblaciones son menores. De esta manera, si consideramos una generación de pinos como de 50 años, todas las poblaciones coalescen hace sólo 520 años en el modelo de alelos infinitos y hace 6402.6 años en el modelo de mutación paso a paso.

Tabla 17. Tiempos de coalescencia entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México, obtenidos según Slatkin (1995) a partir de F_{st} .

Los valores están expresados en número de generaciones.

Población	Sierra de Parras	Cauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0					
Cauhtémoc	0.2827	0				
Huizache	1.16505	1.13401	0			
Guadalcázar	1.35532	1.32816	0.000	0		
San Joaquín	7.43361	7.87476	3.10606	3.40293	0	
Tolantongo	10.4120	11.11906	4.28208	5.12630	0.04029	0

Tabla 18. Tiempos de coalescencia entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México, obtenidos según Slatkin (1995) a partir de R_{st} .

Los valores están expresados en número de generaciones.

Población	Sierra de Parras	Cauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0					
Cauhtémoc	0.000	0				
Huizache	0.80580	0.69511	0			
Guadalcázar	1.96118	1.39626	0.000	0		
San Joaquín	95.1688	46.2045	8.83112	25.68489	0	
Tolantongo	128.052	59.89557	11.35546	35.54310	0.000	0

Distancias genéticas

Las distancias genéticas de Nei normalizadas (D_A ; Nei & Li 1979) obtenidas tanto para el modelo de alelos infinitos como para el de mutación paso a paso se muestran en las Tablas 19 y 20 respectivamente. Nuevamente las poblaciones más lejanas geográficamente son las más lejanas genéticamente (Sierra de Parras y Tolantongo), con valores de 3.61720 para el modelo de alelos infinitos y de 68.7979 para el modelo de mutación paso a paso (los valores no son estrictamente los mayores pero no significativamente diferentes de los mayores que son entre Cauhtémoc y Tolantongo 3.63911 y 69.72984 para F_{st} y R_{st} respectivamente); de este mismo modo la relación entre distancia genética y

geográfica se mantiene en las poblaciones más cercanas geográficamente (Huizache y Guadalcázar), en donde la distancia genética es cero en ambos modelos.

Las Tablas 19 y 20 muestran también el número de diferencias entre individuos dentro de una misma población para el caso del modelo de alelos infinitos y de mutación paso a paso, respectivamente. Estos valores son una manera de presentar la diferenciación intrapoblacional. La población con mayor número de diferencias dentro de sí es Guadalcázar (1.08947) en el modelo de alelos infinitos (Tabla 19) y Huizache (9.08966) en el modelo de mutación paso a paso (Tabla 20) y la más homogénea es Tolantongo (0.0000) en ambos casos (Tablas 19 y 20).

Tabla 19. Distancias genéticas normalizadas de Nei (D_A), según el modelo de alelos infinitos (F_{st}) para poblaciones de *Pinus pinceana* en México.

Bajo la diagonal: número promedio (corregido) de diferencias entre poblaciones.

En la diagonal: número promedio de diferencias dentro de las poblaciones.

* = valores significativamente diferentes de cero ($P < 0.01$)

Población	Sierra de Parras	Cuauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0.63656 *					
Cuauhtémoc	0.01741	0.59677 *				
Huizache	0.96270 *	0.90991 *	1.02299 *			
Guadalcázar	1.09666 *	1.03656 *	-0.0129	1.08947 *		
San Joaquín	3.55054 *	3.57245 *	2.29295 *	2.33526 *	0.13333 *	
Tolantongo	3.61720 *	3.63911 *	2.35517 *	2.40526 *	0.00000	0.00000

Tabla 20. Distancias genéticas normalizadas de Nei (D_A), según el modelo de mutación paso a paso (R_{st}) para poblaciones de *Pinus pinceana* en México.

Bajo la diagonal: número promedio (corregido) de diferencias entre poblaciones.

En la diagonal: número promedio de diferencias dentro de las poblaciones.

* = valores significativamente diferentes de cero ($P < 0.01$).

Población	Sierra de Parras	Cuauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0.98495 *					
Cuauhtémoc	-0.03280	2.10282 *				
Huizache	3.99926 *	3.80168 *	9.08966 *			
Guadalcázar	4.07459 *	3.83954 *	-0.18658	3.83684 *		
San Joaquín	67.9634 *	68.88401 *	54.673 *	58.22491 *	0.13333 *	
Tolantongo	68.7979 *	69.72984 *	55.45517	59.03158 *	0.00000	0.0000

Distancias geográficas

Las distancias geográficas calculadas por pares de poblaciones se muestran en la Tabla 21. Según estos cálculos las poblaciones más cercanas geográficamente son Huizache y Guadalcázar, separadas por sólo 25.76 km y las más lejanas son Sierra de Parras y Tolantongo, separadas por 613.33 km.

Tabla 21. Distancias geográficas en Km. entre todas las poblaciones analizadas de *Pinus pinceana* en México.

Población	Sierra de Parras	Cuauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0					
Cuauhtémoc	122.10	0				
Huizache	320.90	267.47	0			
Guadalcázar	342.37	292.61	25.76	0		
San Joaquín	554.31	500.92	235.74	212.51	0	
Tolantongo	613.33	550.89	292.45	271.44	71.93	0

Asociación entre estructura genética y distancia geográfica

Se probó la correlación entre el número de migrantes a partir de F_{st} (M_F) y la distancia geográfica, se encontró una relación inversamente proporcional con un coeficiente de correlación de $r = 0.8316$ ($P < 0.01$); (Figura 6). La misma correlación se realizó entre el número de migrantes a partir de R_{st} (M_R) y la distancia geográfica y se encontró una relación inversamente proporcional con un coeficiente de correlación de $r = 0.8304$ ($P < 0.01$); (Figura 7).

También se probó la correlación entre la distancia genética normalizada de Nei (D_A) y la distancia geográfica entre poblaciones, tanto para el caso del modelo de alelos infinitos (Figura 8) como para el de mutación paso a paso (Figura 9). En ambos casos se encontró una relación directamente proporcional, en el caso del modelo de alelos infinitos el coeficiente de correlación es $r = 0.8630$ ($P < 0.01$) (Figura 8) y en el caso del modelo de mutación paso a paso el coeficiente de correlación es de $r = 0.6818$ ($P < 0.01$); (Figura 9).

Se aplicó la prueba de Mantel para verificar la correlación entre la distancia geográfica y genética de las poblaciones y el resultado apoya esta correlación. El coeficiente de correlación entre las matrices de alelos infinitos (Tabla 19) y de distancia geográfica (Tabla 21) es de 0.810121 ($P < 0.01$) con 1000 permutaciones y el coeficiente de correlación entre las matrices de D_A según el modelo de mutación paso a paso (Tabla 20) y de distancia geográfica (Tabla 21) es de 0.638010 ($P < 0.05$). Lo que permite suponer que la estructura genética de *Pinus pinceana* se ajusta probablemente a un modelo de aislamiento por distancia entre poblaciones.

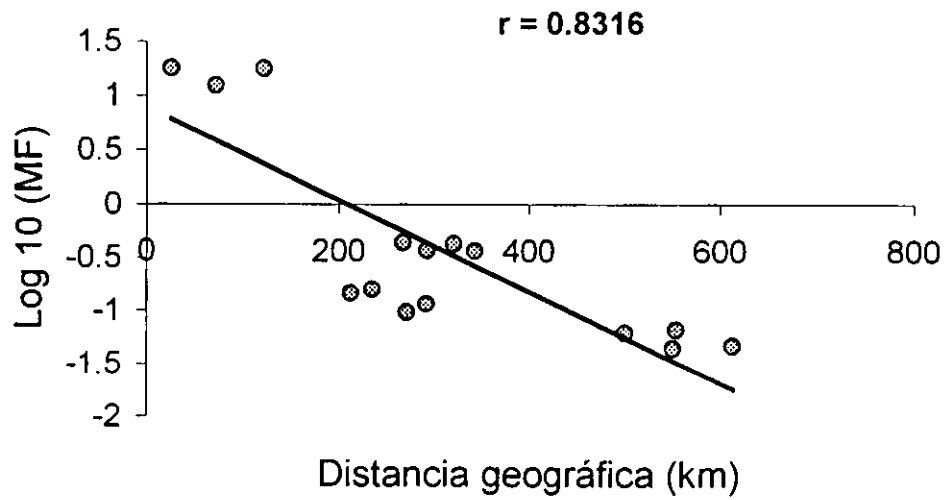


Fig 6. Correlación entre el número de migrantes entre poblaciones calculado a partir de F_{st} (M_F) y la distancia geográfica entre poblaciones de *Pinus pincea* en México.

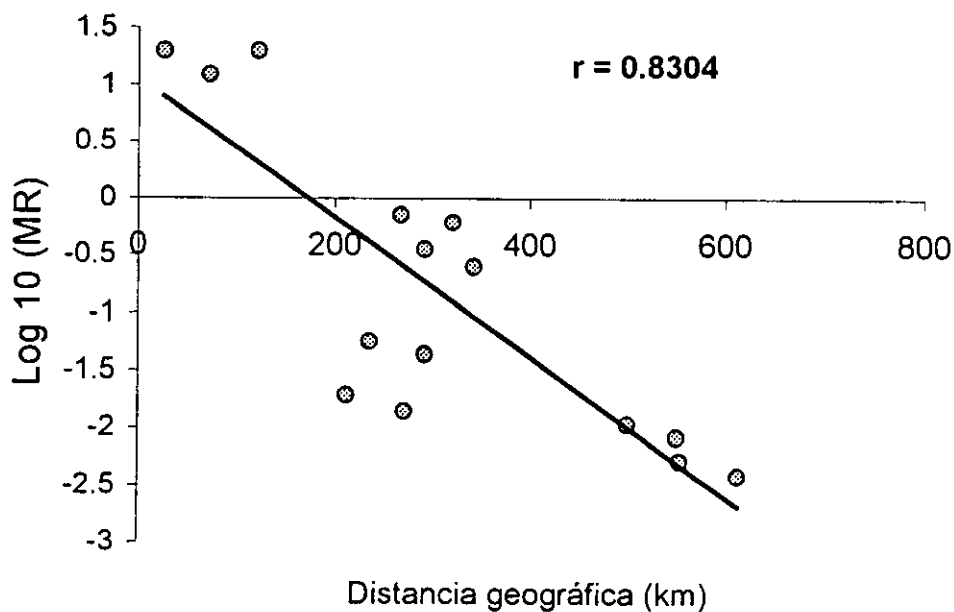


Fig 7. Correlación entre el número de migrantes entre poblaciones calculado a partir de R_{st} (M_R) y la distancia geográfica entre poblaciones de *Pinus pincea* en México.

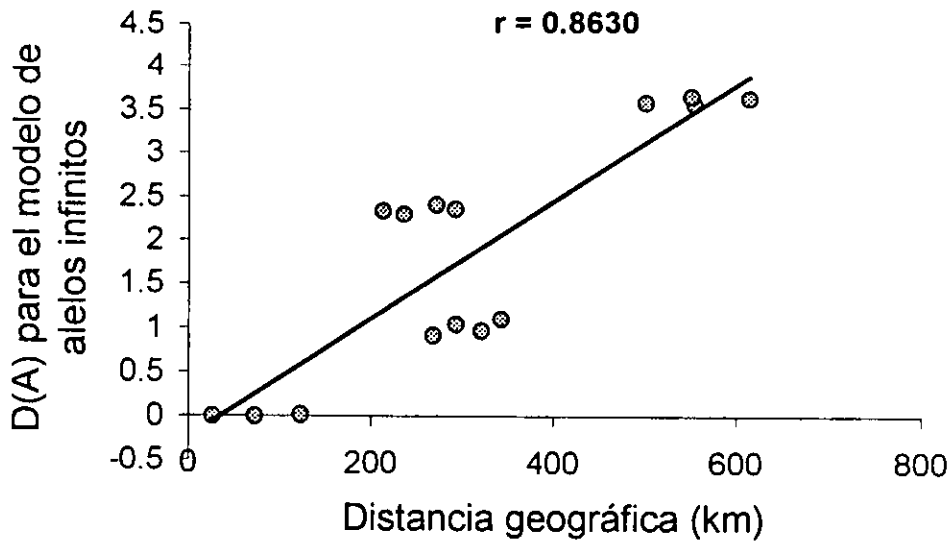


Fig. 8. Correlación entre la distancia genética normalizada de Nei (D_A) para el modelo de alelos infinitos y la distancia geográfica entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México.

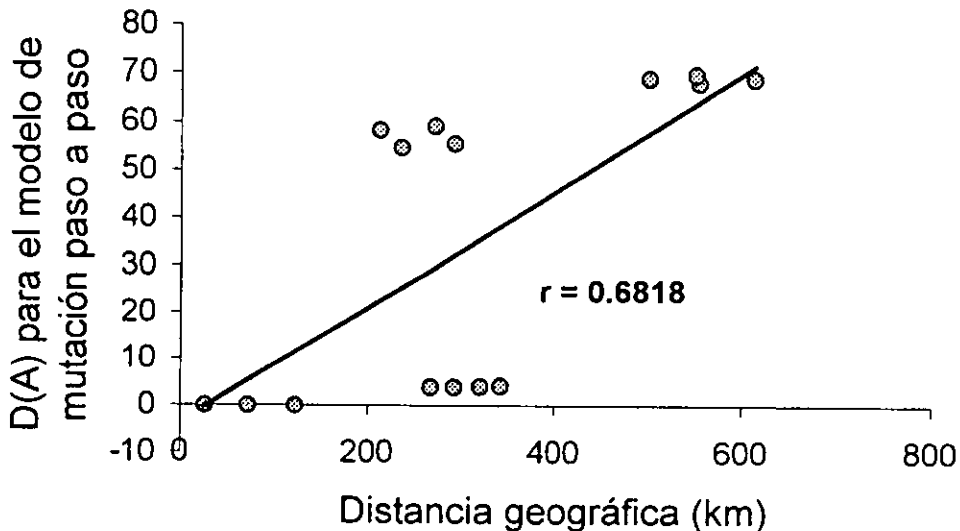


Fig.9 . Correlación entre la distancia genética normalizada de Nei (D_A) para el modelo de mutación paso a paso y la distancia geográfica entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México.

Por último se probó la correlación entre los valores de diferenciación genética (F_{st} y R_{st}), número de migrantes (M), distancia genética (D_A) y tiempos de divergencia (Tabla 22) obtenidos según el modelo de alelos infinitos y según el modelo de mutación paso a paso. Se encontraron coeficientes de correlación (r) con valores altos (todos mayores a 0.5 y significativos para $P < 0.01$), lo que nos muestra que los valores obtenidos de una u otra manera se encuentran fuertemente relacionados.

Tabla. 22. Coeficientes de correlación (r) entre los valores obtenidos para diferenciación genética (F_{st} y R_{st}), número de migrantes (M), distancia genética (D_A) y tiempos de divergencia obtenidos según el modelo e alelos infinitos y según el modelo de mutación paso a paso para las poblaciones de *Pinus pinceana* en México.

* Valores significativos para $P < 0.01$.

Modelo de alelos infinitos	Modelo de mutación paso a paso	r
Parámetros	Parámetros	
F_{st}	R_{st}	0.9798 *
M_F	M_R	0.995 *
D_A (entre poblaciones)	D_A (entre poblaciones)	0.9534 *
D_A (dentro de poblaciones)	D_A (dentro de poblaciones)	0.78301*
Tiempo de coalescencia	Tiempo de coalescencia	0.8726 *

Demografía histórica

Los resultados obtenidos en este apartado apoyan nuevamente la clara estructuración de las poblaciones de *Pinus pinceana* en México como se muestra a continuación.

Inferencia de la historia poblacional a partir de filogenias moleculares

Las figuras 10 y 11 muestran los árboles que representan las distancias genéticas entre poblaciones bajo los modelos de alelos infinitos y mutación paso a paso respectivamente. Ambos árboles fueron construidos bajo los criterios de Neighbor-Joining. Las Figuras 12 y 13 muestran la interpretación histórica de los datos genéticos, la Figura 12 se construyó a partir del árbol de distancias genéticas (Fig. 10) obtenidas a partir de F_{st} y la Figura 13 se construyó a partir del árbol de distancias genéticas (Fig. 11) obtenidas a partir de R_{st} . La topología de los árboles no cambia cuando se enraizan con cualquiera de las dos poblaciones centrales, las cuales se encuentran en la base del árbol no enraizado (Figuras 12 y 13). En ambos casos encontramos la representación de una historia de poblaciones de tamaño constante, es decir, que no están creciendo y sí están originando nuevas ramas a partir de las existentes. La velocidad a la que se está dando la fragmentación corresponde a la pendiente de la curva, que en el primer caso es de -0.272 y en el segundo de -0.0098, los valores negativos no tienen ningún significado biológico, se deben a la manera de presentar la curva por lo

que lo más adecuado es observar el valor absoluto de las pendientes. En cualquiera de las dos curvas, la tasa de aparición de nuevas ramas parece ser lenta. Estos datos indican pues poblaciones que no están creciendo y que se están fragmentando lentamente.

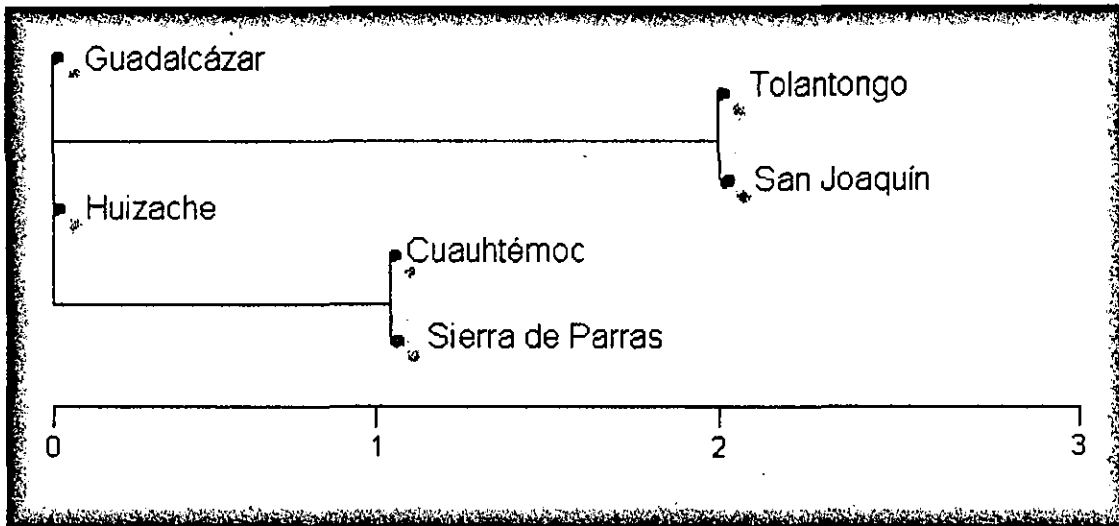


Fig. 10. Árbol de Neighbor-Joining obtenido a partir de las distancias genéticas (D_A) entre poblaciones de *Pinus pinceana* bajo el modelo de alelos infinitos (F_{st})

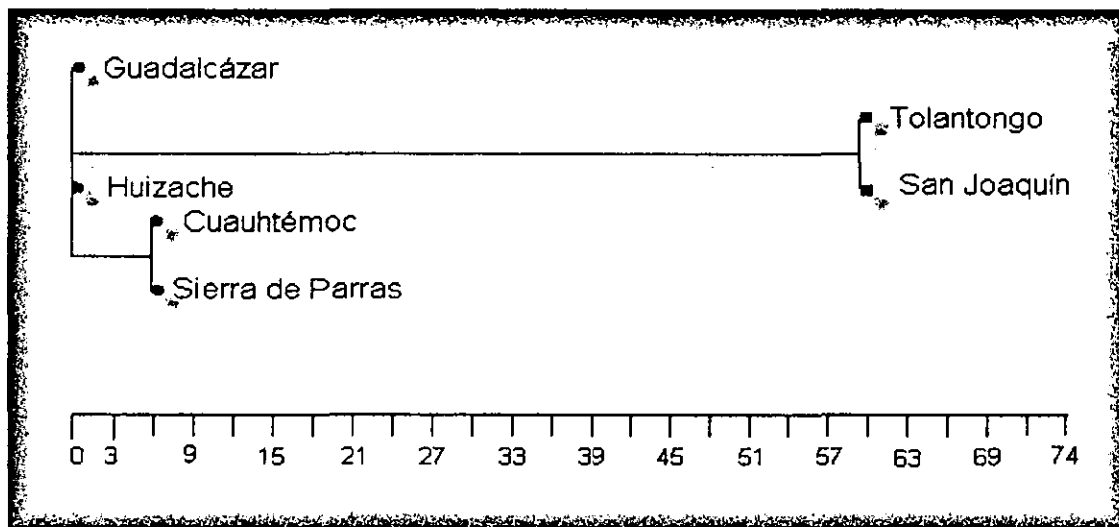


Fig. 11. Árbol de Neighbor-Joining obtenido a partir de las distancias genéticas (D_A) entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México bajo el modelo de mutación paso a paso (R_{st}).

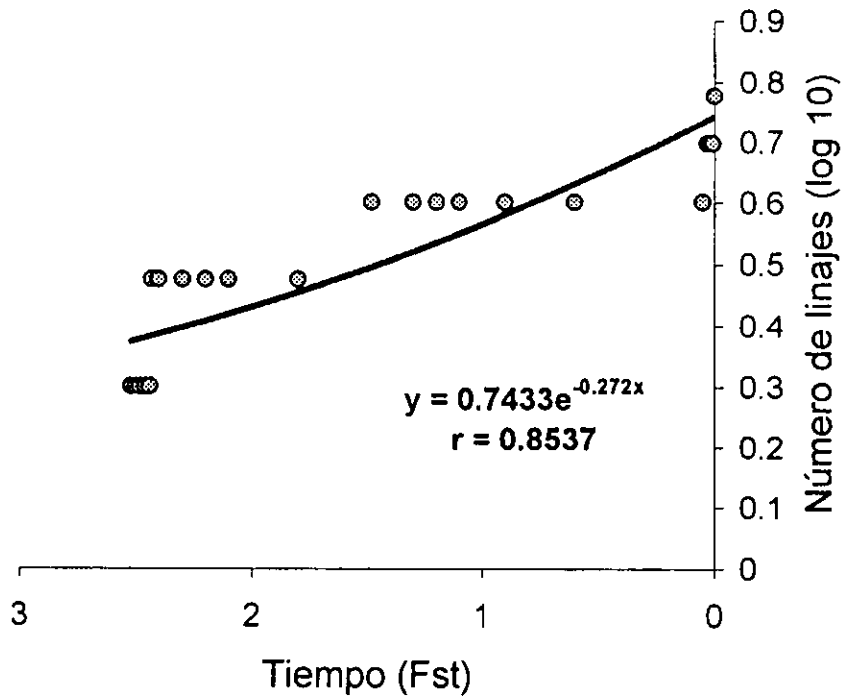


Fig. 12. Número de linajes existentes a través del tiempo estimado a partir de las distancias genéticas de Nei con el modelo de alelos infinitos (F_{st}) para las poblaciones estudiadas de *Pinus pinceana* en México según el método de Nee *et al.* (1996).

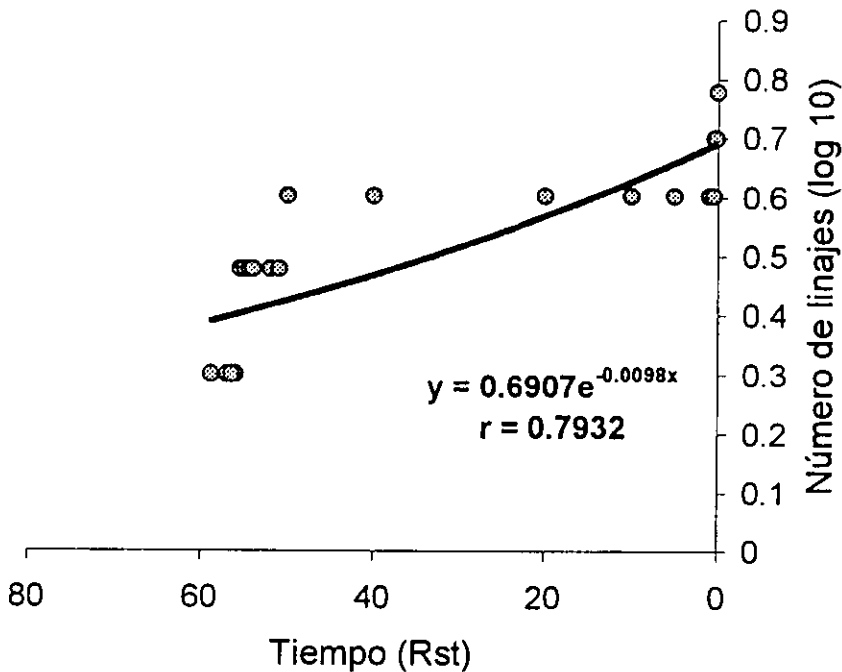


Fig. 13. Número de linajes existentes a través del tiempo estimado a partir de las distancias genéticas de Nei usando el modelo de mutación paso a paso (R_{st}) para las poblaciones estudiadas de *Pinus pinceana* en México según el método de Nee *et al.* (1996).

La figura 14 muestra el árbol de distancias entre haplotipos construido bajo los criterios de Neighbor-Joining. En esta representación se observan más o menos agrupados los haplotipos según la población a la que pertenecen y la topología no cambia si se enraiza con los haplotipos 6, 8, 9 o 4 (presentes en Huizache). La historia de los haplotipos sigue el mismo patrón que el de las poblaciones, una curva exponencial con una pendiente pequeña (0.051) que representa fragmentación de las poblaciones (Figura 15).

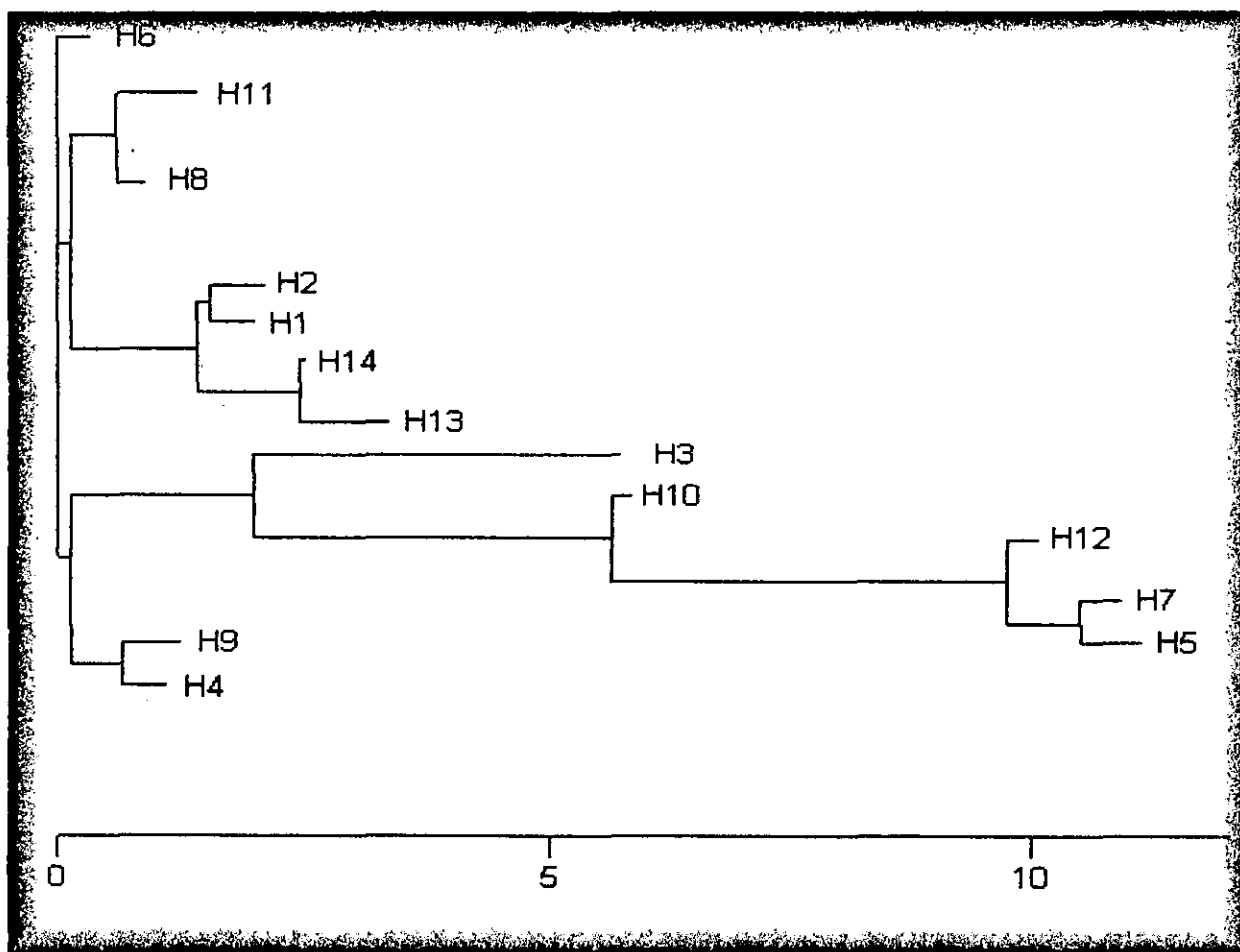


Fig. 14. Árbol de Neighbor-Joining obtenido a partir de las diferencias en tamaño de los haplotipos de microsatélites de cloroplasto de *Pinus pinceana* en México.

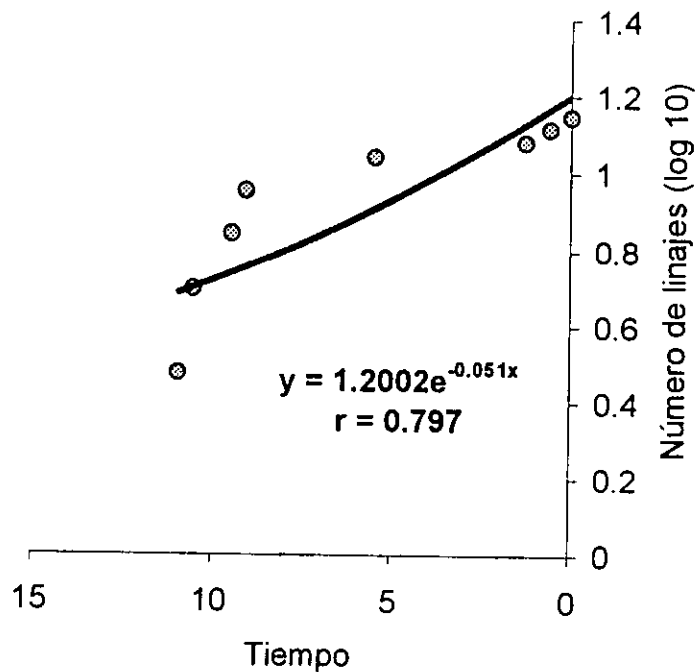
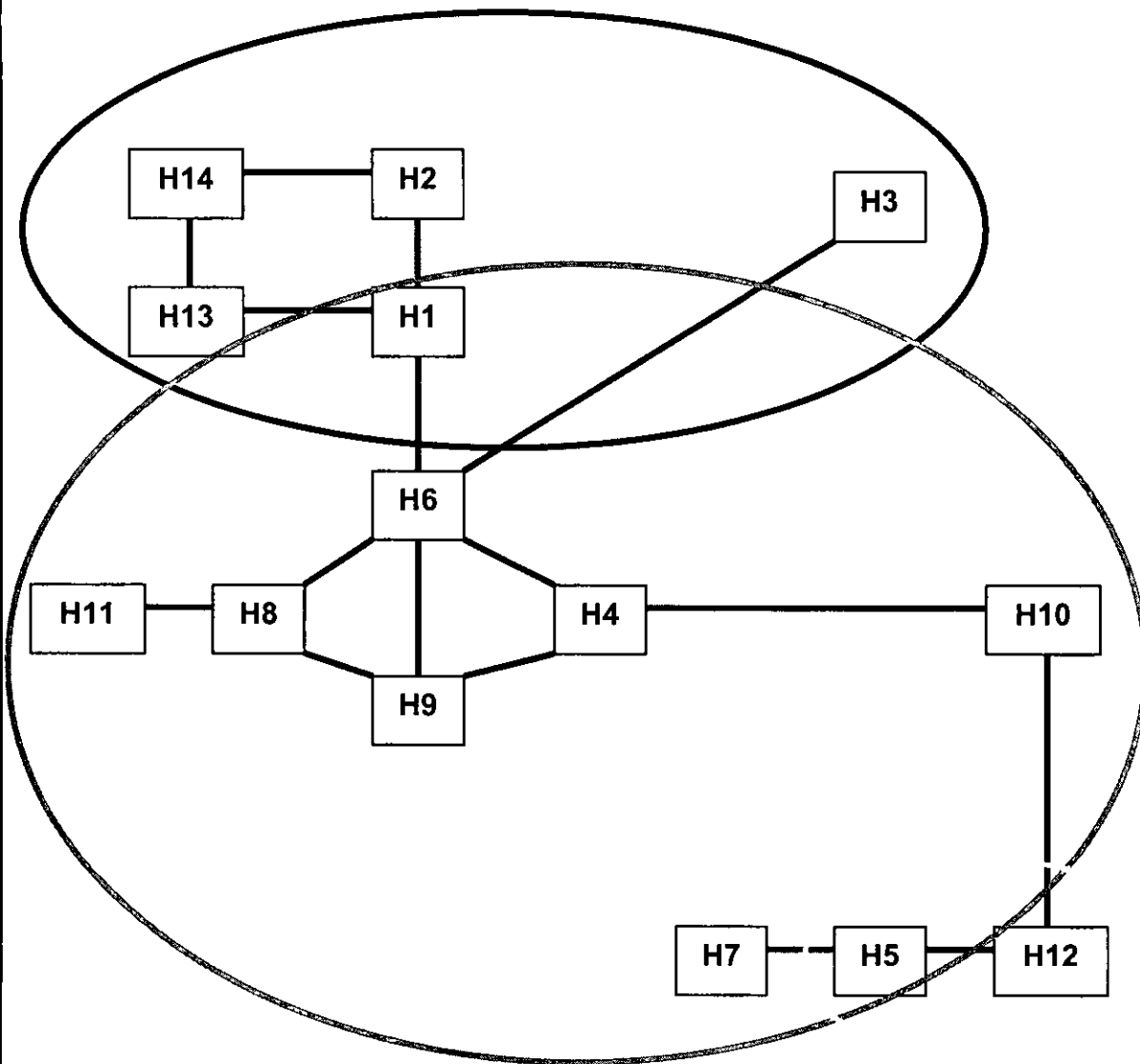


Fig. 15. Número de linajes existentes a través del tiempo estimado a partir de las diferencias de tamaño entre haplotipos de microsatélites de cloroplasto de *Pinus pinceana* en México según el modelo de Nee *et al.* (1996).

Finalmente la red de haplotipos construida a partir del número de diferencias en tamaño entre haplotipos que se muestra en la Figura 16, nos muestra 3 grupos de haplotipos que corresponden con los parches de poblaciones. Además de la estructura geográfica observada en la Figura 16 se observa una radiación de haplotipos a partir de algunos de los haplotipos de las poblaciones del centro.



1

Figura 16 . Red de haplotipos de microsatélites de cloroplasto que representa las diferencias en número de pasos entre individuos de poblaciones mexicanas de *Pinus pinceana*. El tamaño de las líneas que unen los cuadros indica el número de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos.

Cada círculo de color representa un grupo de dos poblaciones: el rosa se refiere a las poblaciones del centro, Huizache y Guadalcázar; el rojo incluye a las poblaciones del Norte, Sierra de Parras y Cuauhtémoc; el amarillo representa a las poblaciones del sur, San Joaquín y Tolantongo.

Distribución *Mismatch*

La distribución del número de diferencias entre individuos se presenta en la Figura 17 junto con la distribución esperada de estas diferencias de acuerdo con el modelo de expansión súbita de Rogers (1995). De esta distribución resultan varios picos en el número de diferencias observadas, esto es una distribución multimodal, característica de una población en equilibrio demográfico, que no ha pasado por momentos de expansión como sería el caso de la distribución esperada (unimodal).

Otros datos que arrojó el análisis *mismatch* fueron el tamaño poblacional antes de la expansión (la cual parece no haber sucedido) que es de 31.473 ($2Nu$) y el índice de arrugamiento que resultó alto, de 0.101.

La lista de datos que se utilizó para crear la figura 17 se encuentra en el apéndice 1.

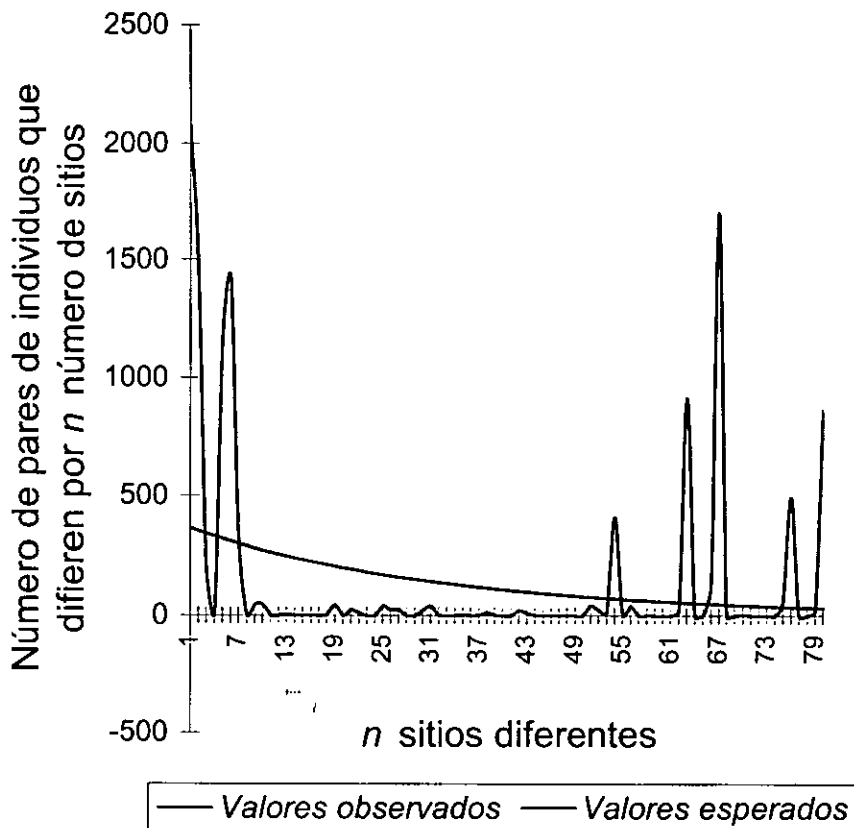


Fig. 17. Distribuciones observadas y esperadas del número de diferencias entre pares de individuos de todas las poblaciones estudiadas de *Pinus pincea* en México de acuerdo con el modelo de expansión súbita de Rogers (1995) o distribución *mismatch*.

DISCUSIÓN

Variación genética

La variación genética que se refiere a las frecuencias de haplotipos y de alelos en las diferentes poblaciones (Tablas 8 y 9) sigue, al igual que los valores de heterocigocidad y número de haplotipos por población (Tabla 10), un patrón geográfico en el que las poblaciones del centro son las que tienen valores de variación mayores y son las que comparten haplotipos y alelos tanto con las poblaciones del norte como con las del sur, mientras que las del sur y las del norte no lo hacen en general. Lo anterior nos indica que el flujo de información entre poblaciones está determinado por la distancia geográfica. Por otro lado, el hecho de compartir alelos o haplotipos probablemente se debe a que todas las poblaciones fueron una en su origen y que después esta población original se fragmentó. Esta fragmentación pudo iniciar la divergencia de las poblaciones y en algunas se han generado nuevos y únicos alelos y haplotipos resultado del aislamiento. Cabe hacer notar que también es posible que en algunos casos los alelos y haplotipos compartidos sean resultado de convergencias evolutivas debido a la alta tasa de mutación de los microsatélites.

En cuanto a la estimación de la heterocigocidad, tenemos 3 valores (Tabla 10), el valor de H , el valor de π y el número de haplotipos por población y totales. En adelante nos enfocaremos a discutir los valores de H pues parece inconveniente usar como indicador de diversidad el valor de π porque en la mayoría de los casos el error del valor llega a ser muy alto y en algunos casos mayor o igual al valor calculado de π .

Los valores de H por poblaciones y por locus van desde 0 (Tolantongo cualquier locus) hasta 0.5343 (Cuauhtémoc, locus Pt 30204). Resulta obvio que la distribución de la variación es bastante heterogénea. Dependiendo del locus que se tome en cuenta la variación será mayor en diferentes poblaciones, en términos generales, es decir tomando en cuenta todos los loci, las poblaciones con valores más altos de heterocigocidad son Guadalcazar (0.7579±0.0495) y Huizache (0.6966±0.0694), le siguen Sierra de Parras (0.5677±0.0783) y Cuauhtémoc (0.5343±0.0447), por último San Joaquín (0.1333±0.11) y Tolantongo (0). El mismo patrón se cumple para el número de haplotipos: Huizache 7, Guadalcazar 5, Sierra de Parras 4, Cuauhtémoc 3, San Joaquín 2 y Tolantongo 1 (ver Tabla 10). En general, al observar la variación como H o número de haplotipos volvemos a ver el mismo patrón geográfico que con las frecuencias alélicas y de haplotipos, las poblaciones centrales presentan la mayor variación pues están en posibilidad de tener flujo de información con todas las demás al estar al centro de la distribución. La disparidad en variación que existe entre las poblaciones del norte y las del sur, especialmente en el caso de Tolantongo, me parece que sólo cuenta con una explicación y esta es que al momento de la fragmentación o fragmentaciones que rompieron la distribución original de la especie, el número de individuos que quedaron en los diferentes parches fue tan dispar como la variación

genética entre las poblaciones actuales, en el caso de Tolantongo la reducción poblacional debió ser particularmente drástica y la deriva genética resultante muy rápida, no así en los casos de Sierra de Parras, Cuauhtémoc, Huizache y Guadalcázar, que aún si el flujo génico entre ellas fuera muy alto, si la reducción poblacional al momento de la fragmentación hubiera sido más drástica no hubieran podido alcanzar niveles altos de variación. Un estimado del tamaño de cada población (Tabla 10) se ajusta a lo mencionado anteriormente, pues las poblaciones con mayor tamaño tienen la mayor variación y viceversa. Además, en el caso particular de la población de Tolantongo en donde la variación es nula (Tabla 10) y en donde encontramos un solo haplotipo (Tabla 8). Además de la deriva génica ocasionada por cambios climáticos, existen observaciones que nos indican una perturbación humana de la zona, esto debe tener un efecto extra en la drástica reducción de la variación genética de la población.

Tomando en cuenta todos los loci y todas las poblaciones, el valor de H encontrado es de 0.8237 (± 0.014), un valor alto al compararlo con otros estudios similares (Tabla 4 y 23). Este valor indicaría, si se presentara solo, que la variación de la especie es muy alta pero el estado de la especie en cuanto a diversidad va mucho más allá de un valor de variación total, como hemos visto anteriormente. Es por esto que resulta muy importante analizar la diversidad de las especies a niveles particulares, es decir de poblaciones, pues esto nos da un panorama mucho más claro y real de la condición del grupo y, en el caso particular de la conservación nos da una visión más real del estado genético y de la estrategia a seguir con la especie. Ya que los valores en *Pinus pinceana* (en general) son notablemente altos aún dentro de los estimados obtenidos con microsatélites podemos decir que a pesar de la fragmentación de la especie en parches sí existe mucha variación y que ésta puede rescatarse buscando poblaciones que representen la mayor parte de esta variación.

Estudios previos con isoenzimas en *P. pinceana* (Molina-Freaner *et al.*, 2001; Tabla 4 y 23) revelaron una heterocigosidad de 0.216, que en el caso de este marcador se trata de un valor notablemente alto, lo que coincide con los resultados del presente estudio con microsatélites de cloroplasto, sin embargo con isoenzimas no es posible distinguir el patrón geográfico pues no se incluyen las poblaciones de Tolantongo y Sierra de Parras y los valores de variación entre Cuauhtémoc, Guadalcázar y Huizache son casi iguales (alrededor de 0.19) y el valor para San Joaquín es muy alto (0.328).

Es de notar que la variación encontrada con microsatélites en casi todos los casos presentados en la Tablas 4 y 23, es mucho mayor que la variación encontrada con isoenzimas (Fig. 18), por lo que resultan incomparables estudios hechos con estos dos marcadores. Por último cabe notar, que la alta variación de los microsatélites, permite revelar variación que en otros tiempos y con otros marcadores hubiera permanecido oculta, en el caso particular de *P. pinceana* es muy probable que un estudio con isoenzimas no hubiera revelado las pequeñas variaciones entre poblaciones y no hubiera permitido vislumbrar el patrón

geográfico de esta variación o simplemente se hubiera requerido mucho más trabajo y muchos más loci para reconocer este patrón.

Tabla 23. Valores de variación genética (H_e) para varias especies de *Pinus* y otras especies.

Especie	H_e	Marcador	Referencia
<i>Pinus engelmanni</i> (pino)	0.10	Isoenzimas	Bermejo (1993)
<i>Pinus muricata</i> (pino)	0.12	Isoenzimas	Millar <i>et al.</i> (1988)
<i>Pinus attenuata</i> (pino)	0.13	Isoenzimas	Millar <i>et al.</i> (1988)
<i>Pinus banksiana</i> (pino)	0.14	Isoenzimas	Brown & Moran (1981)
<i>Pinus washoensis</i> (pino)	0.15	Isoenzimas	Niebling & Conkle (1990)
<i>Pinus rigida</i> (pino)	0.15	Isoenzimas	Guries & Ledig (1982)
<i>Corvus kubaryi</i> (cuervo)	0.162	SSR's	Tarr & Fleischer (1999)
<i>Pinus maximinoi</i> (pino)	0.17	Isoenzimas	Mathenson, Bell & Barnes (1989)
<i>Pinus oocarpa</i> (pino)	0.19	Isoenzimas	Mathenson, Bell & Barnes (1989)
<i>Pinus pinceana</i> (pino)	0.216	Isoenzimas	Molina-Freaner <i>et al.</i> (2001)
<i>Pinus rzedowskii</i> (pino)	0.22	Isoenzimas	Delgado <i>et al.</i> (1999)
<i>Centrocercus urophasianus</i> (perdiz de cuerpo pequeño)	0.26425	SSR's	Oyler-McCance <i>et al.</i> (1999)
<i>Pinus caribaea</i> (pino)	0.27	Isoenzimas	Mathenson, Bell & Barnes (1989)
<i>Pinus flexilis</i> (pino)	0.32	Isoenzimas	Schuster, Alles & Mitton (1989)
<i>Pinus leucodermis</i> Ant. (pino)	0.411	cpSSR's	Powell <i>et al.</i> (1995)
<i>Falco peregrinus</i> (halcón)	0.45	SSR's	Nesje <i>et al.</i> (2000)
<i>Centrocercus urophasianus</i> (perdiz de cuerpo grande)	0.6638	SSR's	Oyler-McCance <i>et al.</i> (1999)
<i>Macaca sylvanus</i> (macaco)	0.67±0.07	SSR's	Segesser <i>et al.</i> FALTA CITA (Argelia)

Tabla 23. Valores de variación genética (H_e) para varias especies de *Pinus* y otras especies.

Especie	H_e	Marcador	Referencia
<i>Melanochromis auratus</i> (pez)	0.671	SSR's	Markert <i>et al.</i> (1999)
<i>Corvus corax</i> (cuervo)	0.679	SSR's	Tarr & Fleischer (1999)
<i>Merluccius merluccius</i> (pez)	0.75	SSR's	Lundy <i>et al.</i> (2000)
<i>Sorex areneus</i>	0.79	SSR's	Lugon-Moulin <i>et al.</i> (1999)
<i>Camellia japónica</i> L. (árbol perenne)	0.80	SSR's	Ueno <i>et al.</i> (2000)
<i>Hordeum</i> (cebada)	0.04-0.82	cpSSR's	Provan <i>et al.</i> (1999)
<i>Pinus pinceana</i>	0.8237	cpSSR's	Este estudio
<i>Pinus sylvestris</i> (pino)	0.95	cpSSR's	Provan <i>et al.</i> (1998)

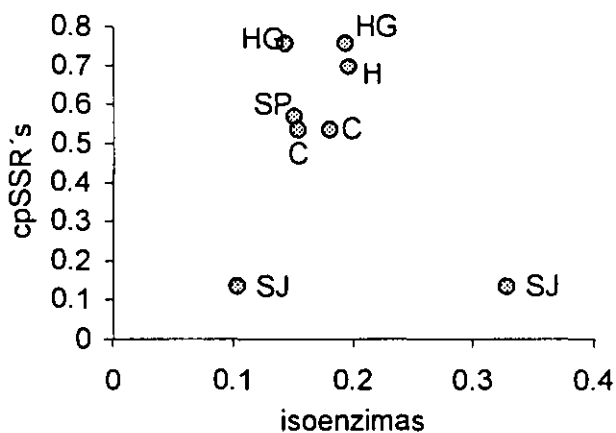


Fig. 18. Relación entre valores de heterocigosis obtenidos mediante análisis genéticos con isoenzimas (Molina-Freaner *et al.* 2001; Ledig *et al.* manuscrito en preparación) y con microsatélites de cloroplasto para algunas poblaciones mexicanas de *Pinus pinceana*.

Estructura genética, flujo genético y tiempos de coalescencia

Estructura genética

La estructura genética analizada con el AMOVA, para los modelos de mutación de alelos infinitos y de mutación paso a paso fue la de una estructura en 3 parches, cada uno con dos poblaciones y ubicados en una línea del norte al sur de la distribución de la especie y los estimados de F para ambos modelos de mutación son altos y sugieren la misma estructura. La combinación de valores altos de diversidad genética y altos niveles de diferenciación parece ser común en las coníferas mexicanas, por ejemplo en los casos de *Pinus lagunae* y *Pinus muricata* D. Don (Molina-Freaner *et al.* 2001).

El valor de F_{st} estimado a partir de datos obtenidos con isoenzimas es de 0.247 (Molina-Freaner *et al.* 2001; Tabla 24) y es mucho menor al obtenido aquí (0.78486 para alelos infinitos). El valor de F_{st} obtenido con isoenzimas, en comparación con otros estudios (Tabla 24), resulta bajo en general pero alto si se compara únicamente con coníferas. Es por esto que si sólo se compra con coníferas, el estudio de isoenzimas para *Pinus pinceana* resulta en una estructuración de las poblaciones, sin embargo los resultados no permiten ver claramente cuáles son los parches que generan la estructura. Este valor fue obtenido con datos de 4 de las 6 poblaciones estudiadas aquí (Cuauhtémoc, Huizache, Guadalcázar y San Joaquín), pero esto no es un argumento para explicar el que con los datos de isoenzimas no se logre visualizar la estructura en parches, pues se contaba con al menos una de las poblaciones de cada parche. Me parece que aquí vuelve a intervenir el marcador molecular utilizado, en el presente estudio el marcador (cpSSR's) tiene una mucho mayor resolución al momento de identificar la variación, lo que permite ver con claridad las diferencias entre poblaciones y establecer una estructura geográfica en parches con mayor confiabilidad. Tales diferencias en valores de diferenciación es probable que se deban a las tasas de mutación de cada marcador, por ejemplo, en un mismo caso de aislamiento de poblaciones de la misma especie la divergencia en los microsatélites se dará con mayor rapidez que la divergencia en isoenzimas simplemente porque la velocidad de mutación en los primeros es mucho mayor que en las isoenzimas.

En cuanto a los valores de F obtenidos bajo los supuestos del modelo de mutación paso a paso podemos decir que la estructura de parches planteada en los párrafos anteriores se mantiene (Tabla 12). Así, el valor para F_{st} , llamado en este modelo R_{st} para distinguir los supuestos a los que se ajusta, es de 0.9382, F_{ct} de 0.9382 y F_{sc} de -0.03186 . Es de notar que el valor de variación tanto entre todas las poblaciones en conjunto como entre parches es mayor que los mismos valores calculados bajo el modelo de alelos infinitos ($F_{st}=0.78486$, $F_{ct}=0.78399$, $F_{sc}=0.00401$, ver Tabla 11). Esto se explica simplemente si recordamos los supuestos bajo los que se mueve cada modelo. El modelo de alelos infinitos no considera las altas tasas de mutación de los microsatélites, solamente toma en

cuenta los niveles de heterocigosis en las poblaciones, por lo que si los niveles de heterocigosis son altos en diferentes parches a pesar de que la diversidad genética en cada parche se deba a alelos diferentes el valor de F_{st} será pequeño. En el caso de del modelo de mutación paso a paso se considera la "historia" de los alelos y la diferenciación entre parches está relacionada con esto, siendo los parches menos diferentes, aquellos en los que sus alelos tengan la menor varianza en su tamaño.

Los valores de diferenciación por pares de poblaciones tanto para el modelo de alelos infinitos (Tabla 13) como para el modelo de mutación paso a paso (Tabla 14), no hacen si no confirmar la estructura en parches analizada con el AMOVA. En el caso del modelo de alelos infinitos los valores de F_{st} menores se encuentran en todos los casos entre las poblaciones que pertenecen a un mismo parche: Cuauhtémoc y Sierra de Parras tienen un valor de 0.02750 (no significativamente diferente de cero); Huizache y Guadalcázar 0.00 y San Joaquín y Tolantongo 0.00 (Tabla 13). La misma situación se repite para el modelo de mutación paso a paso (Tabla 14). Volviendo a comparar los dos modelos de mutación, observamos que en la mayoría de los casos (10 de los 15 pares posibles de poblaciones), los valores de diferenciación son más grandes en el caso de los estimados obtenidos con el modelo de mutación paso a paso (ver Tablas 14 y 15), lo cual tiene nuevamente, la explicación anterior sobre los supuestos en los que se basa cada modelo.

Tabla 24. Valores de diversidad genética entre poblaciones en diferentes especies. Sombreadas se encuentran todas especies de coníferas.

Especie	Valores	Estimador	Marcador	Cita
<i>Globicephala melas</i> (ballena)	0.0108	F_{st}	SSR's	Fullard <i>et al.</i> (2000)
<i>Protium glabrum</i> (árbol)	0.012	θ	RAPD's	Schierenbeck, <i>et al.</i> (1997)
<i>Pinus edulis</i> (pino)	0.012	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Betancourt <i>et al.</i> (1991)
<i>Pinus washoensis</i> (pino)	0.016	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Niebling & Conkle (1990)
<i>Globicephala melas</i> (ballena)	0.0189	R_{st}	SSR's	Fullard <i>et al.</i> (2000)
<i>Pinus flexilis</i> (pino)	0.022	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Schuster, Alles & Mitton (1989)
<i>Pinus rigida</i> (pino)	0.023	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Guries & Ledig (1982)
<i>Centrocercus urophasianus</i> (perdiz de cuerpo grande)	0.0266	F_{st}	SSR's	Oyler-McCance <i>et al.</i> (1999)

Tabla 24. Valores de diversidad genética entre poblaciones en diferentes especies. Sombreadas se encuentran todas especies de coníferas.

Especie	Valores	Estimador	Marcador	Cita
<i>Quercus petraea</i> (encino)	0.027	F_{st}	RAPD's	LeCorre <i>et al.</i> (1997)
<i>Merluccius merluccius</i> (pez)	0.029	θ	SSR's	Lundy <i>et al.</i> (1999)
<i>Washingtonia filifera</i> (palma)	0.038	F_{st}	Isoenzimas	McClenaghan, <i>et al.</i> (1986)
<i>Astrocaryum mexicanum</i> (palma)	0.042	F_{st}	Isoenzimas	Eguiarte <i>et al.</i> (1993)
<i>Delphinapterus leucas</i> (ballena beluga)	0.047	ϕ_{st}	SSR's	Brown Gladden <i>et al.</i> (1999)
<i>Pinus banksiana</i> (pino)	0.052	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Brown & Moran (1981)
<i>Pinus resinosa</i> Ait. (pino)	0.068	R_{st}	cpSSR's	Echt <i>et al.</i> (1998)
<i>Sorex areneus</i>	0.076	F_{st}	SSR's	Lugon-Moulin <i>et al.</i> (1999)
<i>Erinaceus europeus</i> (puerco espin)	0.079	R_{host}	SSR's	Becher & Griffiths (1998)
<i>Macaca sylvanus</i> (macaco)	0.115	R_{st}	SSR's	Segesser <i>et al.</i> (1999)
<i>Macaca sylvanus</i> (macaco)	0.118 \pm 0.015	F_{st}	SSR's	Segesser <i>et al.</i> (1999)
<i>Pinus attenuata</i> (pino)	0.120	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Millar <i>et al.</i> (1988)
<i>Pinus radiata</i> (pino)	0.130	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Millar <i>et al.</i> (1988)
<i>Pinus engelmanni</i> (pino)	0.130	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Bermejo (1993)
<i>Pinus caribaea</i> (pino)	0.130	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Mathenson, Bell & Barnes (1989)
<i>Allium aaseae</i>	0.136	F_{st}	RAPD's	Smith & Pham (1996)
<i>Pinus jeffreyi</i> (pino)	0.138	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Furnier & Adams (1986)
<i>Melanochromis auratus</i> (pez)	0.151	F_{st}	SSR's	Markert <i>et al.</i> (1999)
<i>Pinus rzedowskii</i> (pino)	0.175	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Delgado <i>et al.</i> (1999)

Tabla 24. Valores de diversidad genética entre poblaciones en diferentes especies. Sombreadas se encuentran especies de coníferas.

Especie	Valores	Estimador	Marcador	Cita
<i>Pinus leucodermis</i> (pino)	0.179	F_{st}	RAPD's	Bucci <i>et al.</i> (1997)
Asteraceae	0.20	F_{st}	Isoenzimas	Hamrick <i>et al.</i> (1979)
<i>Centrocercus urophasianus</i> (perdiz de cuerpo pequeño)	0.2153	F_{st}	SSR's	Oyler-McCance <i>et al.</i> (1999)
<i>Pinus halepensis</i> (pino)	>0.2	R_{st}	CpSSR's	Bucci <i>et al.</i> (1998)
<i>Pinus muncata</i> (pino)	0.22	F_{st} o G_{st}	Isoenzimas	Millar <i>et al.</i> (1988)
<i>Pinus leucodermis</i> Ant. (pino)	0.22	G_{st}	CpSSR's	Powell <i>et al.</i> (1995)
<i>Abies religiosa</i> (abeto)	0.24	F_{st}	Isoenzimas	Aguirre-Planter <i>et al.</i> (2000)
<i>Pinus pinceana</i>	0.247	F_{st}	Isoenzimas	Molina-Freaner <i>et al.</i> (2001)
<i>Corvus kubaryi</i>	0.281	F_{st}	SSR's	Tarr & Fleischer (1999)
<i>Pinus brutia</i> (pino)	>0.3	R_{st}	CpSSR's	Bucci <i>et al.</i> (1998)
<i>Zostera marina</i> (planta marina con flores)	0.384	ρ (estimado estandarizado de R_{st})	SSR's	Reusch <i>et al.</i> (2000)
Solanaceae	0.43	F_{st}	Isoenzimas	Hamrick & Godt (1996)
<i>Aechmea tuitensis</i>	0.62	F_{st}	Isoenzimas	Izquierdo & Piñero (2000)
<i>Pseudosuga menziesii</i>	0.73	F_{st}	RAPD's	Agarrad <i>et al.</i> (1995)
<i>Pinus pinceana</i>	0.785	F_{st}	cpSSR's	Este estudio.

Flujo genético

El número de migrantes entre poblaciones se calcula a partir de los valores de F_{st} o R_{st} anteriores, por lo que el patrón en donde las poblaciones pertenecientes a un mismo parche son más similares y por lo tanto tienen un mayor número de migrantes entre sí, se mantiene (Tablas 15 y 16).

Las tasas de flujo genético entre poblaciones de diferentes parches (Tablas 15 y 16) son bajas (menores a 1), en comparación con otros pinos (de muchas especies) en donde las tasas van de 3.4 a 36.4 (revisado en Ledig 1998). Valores

menores de número de migrantes se han reportado también en otras especies endémicas mexicanas de pinos como *Picea chihuahuana* Martínez y *Pinus coulteri* D. Don, ambas especies con distribuciones muy fragmentadas y en donde la evidencia de deriva genética es obvia (Ledig *et al.* 1997; Ledig 2000). Con tasas de flujo tan bajas entre los parches, la fragmentación resultado de la deriva genética resulta una consecuencia lógica y obvia en los resultados de diferenciación. Aquí cabe puntualizar la gran resolución que tienen los marcadores cpSSR's pues, a pesar de que el cloroplasto viaja a través del polen y que este vuela por varios kilómetros entre poblaciones, se observa claramente la estructura en parches que presenta *Pinus pinceana*. Esta estructuración no es clara en el caso de estudios con isoenzimas (Molina-Freaner *et al.* 2001; Ledig manuscrito en preparación) a pesar de que sería lógico pensar que este marcador pudiera tener más resolución a nivel de detectar estructura genética pues se trata de un marcador nuclear que viaja sólo con las semillas, las cuales tienen un rango de dispersión pequeño en comparación con el polen.

Nuevamente los valores de M_F y M_R son diferentes aunque, como se ha dicho, generan el mismo patrón relacionado con la estructura geográfica en parches que se ha propuesto. En este caso los valores de M_F son en general mayores que los de M_R (en 10 de las 15 parejas de poblaciones posibles, ver Tablas 15 y 16). Esto es debido a que el modelo de alelos infinitos sobreestima el número de migrantes pues no considera la varianza en el tamaño de los alelos, esto es su historia, como lo hace el modelo de mutación paso a paso, en donde los alelos migrantes deben ser sólo aquellos en donde la varianza con el resto de los alelos de la población sea muy grande y sólo explicable por migración.

La dispersión de semillas por aves en el grupo de los piñoneros ha sido asociada a córvidos (Lanner 1998), las aves de este grupo que se han observado dispersando semillas de piñoneros alcanzan un rango máximo de dispersión de 15 km (Van del Wall 1990). Las poblaciones más cercanas de este estudio se encuentran a 25.76 km lineales una de la otra, por lo que la migración entre ellas por transporte de semillas queda descartada y sólo queda la opción de intercambio de información a través de polen dispersado por viento, lo que fortalece el uso de microsatélites de cloroplasto al menos para seguir el flujo génico entre poblaciones.

Tiempos de coalescencia

Nuevamente y al igual que en el caso del cálculo de número de migrantes, los tiempos de coalescencia entre poblaciones surgen de las matrices de F_{st} o R_{st} entre pares de poblaciones, por lo que se mantiene el patrón de los datos anteriores. Los tiempos de coalescencia menores para ambos modelos de mutación (0.00 para el modelo de alelos infinitos y 0.00 para el modelo de mutación paso a paso) se encuentran entre las poblaciones menos diferenciadas genéticamente, con mayor número de migrantes entre ellas y más cercanas geográficamente, esto es Huizache y Guadalcázar (Tablas 17 y 18).

En ambos modelos queda establecido que las poblaciones que han empezado a divergir más recientemente son Huizache y Guadalcázar, esto por haber quedado más cercanas geográficamente tras la fragmentación en la distribución de la especie, mientras que las que han quedado más alejadas geográficamente son las que tienen ya más tiempo de haber empezado a alejarse genéticamente (Sierra de Parras y Tolantongo; Tablas 17 y 18).

Finalmente y volviendo a la comparación de los resultados obtenidos según cada modelo de mutación, observamos que los tiempos de coalescencia menores son los que se encuentran bajo el modelo de alelos infinitos (Tabla 17) en comparación con los resultados del modelo de mutación paso a paso (Tabla 18). Lo anterior es debido a que la diferenciación entre las poblaciones bajo el primer modelo supone una estructura menos rígida y con mayor flujo de información entre poblaciones, lo que lógicamente haría más lenta la divergencia entre parches y poblaciones.

Distancias genéticas y geográficas, relación entre estructura genética y distancia geográfica

Las distancias genéticas normalizadas de Nei (D_A), incluyen como parámetro en su cálculo, la distancia entre haplotipos la cual es estimada de diferente manera para el modelo de alelos infinitos (en donde se toma estrictamente la diferencia de tamaño entre los mismos) y para el modelo de mutación paso a paso (en donde se pondera el tamaño de las diferencias como reflejo de la cercanía genética de los haplotipos). Debido a esto, los resultados para cada modelo son diferentes, las distancias en el modelo de alelos infinitos son, en la mayoría de los casos (12 de 15 pares de poblaciones), menores que los valores de distancia para el modelo de mutación paso a paso, pues como ya se ha explicado el modelo de alelos infinitos tiende a subestimar las diferencias entre poblaciones al no considerar la historia de los alelos.

Aunque los valores de distancia genética para cada modelo resultan diferentes, se sigue un patrón en donde la distancia geográfica explica la distancia genética. De este modo, las poblaciones más cercanas geográficamente (Huizache y Guadalcázar a 25.76 km; Tabla 21) son las más cercanas genéticamente (0 para ambos modelos, Tablas 19 y 20); mientras que las poblaciones más lejanas geográficamente (Sierra de Parras y Tolantongo a 613.33 km) son las más lejanas genéticamente (3.62 para el modelo de alelos infinitos, Tabla 19; 68.7979 para el modelo de mutación paso a paso, Tabla 20).

Por otro lado las distancias intrapoblacionales, para ambos modelos, son menores en las poblaciones con menor tamaño (San Joaquín, 0.1333 para ambos modelos y Tolantongo, 0.00 para ambos modelos) y que tienen menos flujo con el resto, esto resulta obvio pues la variación es limitada de origen y no existen muchas posibilidades de adquirir nuevos individuos por migración por lo que la

distancia entre los individuos de dichas poblaciones es mínima, en Tolantongo de hecho no hay diferencias entre individuos pues de los individuos muestreados sólo se encontró un haplotipo.

Los resultados sobre variación, estructura genética y distancias genéticas sugieren un modelo en donde la variación está distribuida entre los tres parches que conforman la mayor parte de la distribución de la especie, esto es una estructura geográfica de la variación genética que se evidencia gráficamente con los árboles de distancia genética entre poblaciones (Figs. 10 y 11) y entre haplotipos (Fig. 14). En el árbol de haplotipos se observa la misma estructura geográfica que en las poblaciones ya que, los haplotipos se agrupan de acuerdo a las poblaciones en donde se encuentran y en consecuencia, de acuerdo a su distribución geográfica.

La prueba de Mantel que se aplicó a cada matriz de distancia genética (Tablas 19 y 20) junto con la matriz de distancia geográfica (Tabla 21) arrojó coeficientes de correlación altos (0.810121 para el modelo de alelos infinitos; 0.638010 para el modelo de mutación paso a paso). Lo anterior sólo hace notar que es muy probable que la estructura genética de *Pinus pinceana* se explique por un modelo de aislamiento por distancia entre poblaciones. Estos resultados y la conclusión de un modelo de aislamiento por distancia son congruentes con todo lo que se ha venido diciendo sobre la estructuración en parches de las poblaciones, así como con los valores bajos de flujo genético entre las poblaciones más alejadas en contraste con la uniformidad genética de las poblaciones pertenecientes a un mismo parche.

Volviendo a la comparación de los resultados obtenidos previamente con isoenzimas, este apartado muestra también la mayor eficacia de los microsatélites para revelar la estructura genética de la especie. En el caso de la relación entre distancia genética y distancia geográfica, los microsatélites mantienen el patrón en donde una mayor distancia geográfica representa una mayor distancia genética, no así las isoenzimas, en donde el patrón geográfico de la variación no resulta claro (Fig. 19). Además, en el caso de los microsatélites el árbol construido a partir de las distancias genéticas nos muestra claramente (Figs. 10 y 11) a las poblaciones agrupadas por parches determinados por la distribución geográfica, no es así el caso de los árboles obtenidos en estudios previos con isoenzimas (Fig. 20 a y b). Sin embargo, en el caso del árbol de Ledig *et al.* sí se distinguen dos clados, uno de ellos agrupa a la mayor parte de las poblaciones que tomaron en cuenta y que en el presente caso corresponden todas al parche del norte que se separa claramente de los otros dos, el problema en el caso de este árbol construido con isoenzimas tal vez sea, más que el marcador molecular, el muestreo que no revela tan claramente el patrón geográfico como lo logran los microsatélites de cloroplasto estudiados en el presente trabajo.

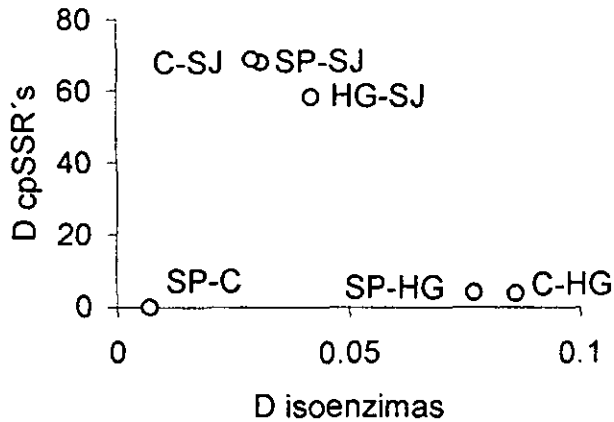
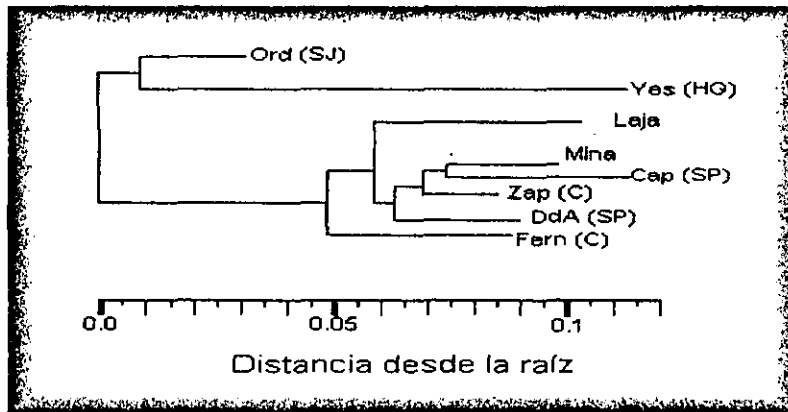


Fig. 19. Comparación entre los valores de distancia genética por pares de poblaciones obtenidos con isoenzimas (Ledig *et al.* manuscrito en preparación) y con microsatélites de cloroplasto para algunas poblaciones mexicanas de *Pinus pinceana*.

a)



b)

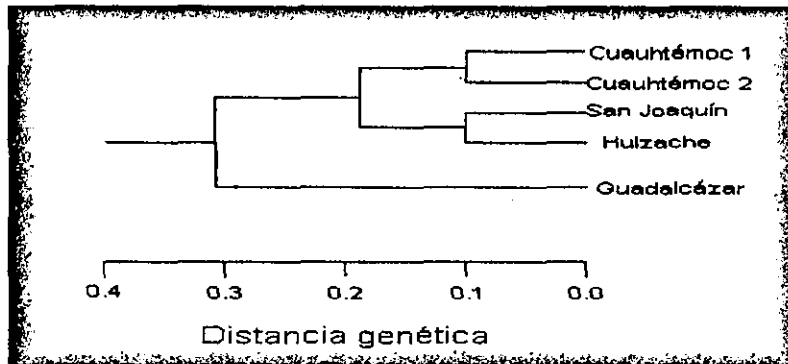


Fig. 20. Árboles de distancia genética entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México. a) Según Ledig *et al.* (2001 manuscrito en preparación). b) Según Molina-Freaner *et al.* (2001).

Modelos de mutación para genética de poblaciones usando microsatélites

De acuerdo con datos reales y de simulación, Valdes *et al.* (1993) concluyeron que el modo en el que los microsatélites mutan paso a paso, es decir añadiendo o removiendo una unidad de repetición por cada evento de replicación en el que pueden o no darse estas mutaciones debido al apareamiento erróneo de las cadenas de DNA (Fig. 2). Es por esto que los estimados de genética de poblaciones en donde se pondera el hecho de que los alelos con menor diferencia en longitud son los más parecidos son los más adecuados para un análisis genético que use datos de microsatélites, es decir el modelo de mutación paso a paso en donde se usa como estimador principal R_{st} (Slatkin 1995). Parece entonces que, muy probablemente los resultados que corresponden al modelo de mutación paso a paso sean los más cercanos a la realidad. Sin embargo, existe la posibilidad de convergencias entre poblaciones debido a la alta tasa de mutación de microsatélites, lo cual no es considerado por el modelo de mutación paso a paso y podría estar pasando por alto el que poblaciones con historias diferentes hayan convergido en un solo parche. Sin embargo, en el caso particular de estudio dada la clara estructuración de las poblaciones bajo ambos modelos de mutación parece poco probable que los resultados tengan un error importante debido a que el modelo de mutación paso a paso no considere convergencias.

A pesar de que los resultados con los diferentes modelos no son idénticos, sí mantienen en todos los casos el mismo patrón relacionado con la distribución geográfica de la especie y revelan la misma estructura fragmentada de las poblaciones. Además de la similitud en la interpretación de los resultados de ambos modelos, los coeficientes de correlación para todos los estimadores surgidos de F_{st} y R_{st} se encuentran por arriba de 0.873 (Tabla 22), valor notablemente alto.

Por lo anterior se puede decir que, en el caso particular de *Pinus pinceana* la estructura genética es explicable con cualquiera de los dos modelos de mutación para genética de poblaciones que se utilizaron, esto es el modelo de alelos infinitos y el modelo de mutación paso a paso.

Historia de la especie

Inferencia de la historia poblacional a partir de filogenias moleculares

Para ambos modelos los árboles de distancia genética construidos (Figs. 10 y 11), nos presentan claramente el agrupamiento por pares de las poblaciones en los tres parches en la distribución de la especie que hemos manejado hasta ahora. En ambos casos las poblaciones de Tolantongo y San Joaquín resultan ser las más lejanas, lo cual es lógico si pensamos en el poco número de migrantes que tienen con el resto de las poblaciones dando como resultado la lejanía genética de este par de poblaciones con el resto; mientras que las poblaciones centrales

(Huizache y Guadalcázar) en ambos modelos se mantienen mucho más cerca de las del norte (Sierra de Parras y Tolantongo). Esta muy clara fragmentación del grupo es confirmada con las figuras 12 y 13, en donde observamos una curva de tipo exponencial, lo cual según Nee *et al.* (1996), es reflejo de poblaciones que no están creciendo, que se están fragmentando. De este mismo modo la figura 15 construida a partir del árbol de distancias entre haplotipos presenta y confirma la misma tendencia de fragmentación que las figuras 12 y 13.

Esta fragmentación, sin embargo, parece ser muy lenta pues la pendiente de la curva es pequeña (0.272 para alelos infinitos y 0.0098 para mutación paso a paso; ver Figs.12 y 13). Tal vez la fragmentación sucedió hace ya mucho tiempo pero el intercambio de información, sobre todo entre las poblaciones del norte y del centro, ha logrado que ésta se esté dando tan lentamente.

En la red de haplotipos (Fig. 16) se observa que los haplotipos más compartidos se encuentran en las poblaciones del centro, y que a partir de ellos se notan divergencias hacia las poblaciones del norte y del sur, lo que sugiere que los haplotipos centrales son los ancestrales o que se encontraban en la población original.

Además, se observa un patrón de agrupamiento de haplotipos de acuerdo a regiones geográficas lo que confirma el aislamiento por distancia (Fig. 16). Se probó enraizar el árbol con los haplotipos ancestrales (6, 8, 9 o 4) en el caso del árbol de haplotipos y con cualquiera de las dos poblaciones centrales en el caso del árbol de poblaciones y en ningún caso la topología cambia, lo que sustenta la hipótesis de que la radiación se dio a partir de haplotipos que aún se conservan en las poblaciones centrales. La fragmentación de la población original inició la divergencia de los parches, estos parches se diferencian más y comparten menos haplotipos ancestrales en cuanto mayor es la distancia geográfica lo cual se refleja en el área de intersección entre los círculos correspondientes a cada parche, es por eso que las poblaciones del sur se notan tan lejanas en el esquema y las del centro y norte se encuentran con una mayor intersección entre ellas.

No podríamos asegurar la causa de la fragmentación, pero si consideramos los tiempos de divergencia de las poblaciones según el modelo de mutación paso a paso, tenemos que todas las poblaciones coalescen hace 128.052 generaciones, lo que significa 2561.04 años (si la generación es de 20 años) podríamos relacionar esto con un cambio climático en el Pleistoceno reciente en donde la situación se volvió más húmeda y fresca que en épocas previas de acuerdo con datos estratigráficos, de polen y fósiles encontrados en el lago de Chalco, México (Lozano-García *et al.* 1993). Tal vez este cambio originó la fragmentación de la especie, así como se supone que cambios previos, también en el Pleistoceno, originaron la especiación del grupo *Cembroides* (Millar 1998).

Distribución Mismatch

Los datos obtenidos de las poblaciones de *Pinus pincena* no se ajustan al modelo de expansión súbita de Rogers (1995), el cual, a partir de la distribución *mismatch* de las diferencias entre individuos puede determinar el momento de la expansión, expansión que sólo es confirmada si la distribución presenta un carácter unimodal. En el caso de *Pinus pinceana* la distribución es multimodal, lo que significa que se trata de una población en equilibrio demográfico, es decir que no ha pasado por momentos de expansión, incluso es posible que haya sucedido lo contrario, que se haya reducido su tamaño pues el valor obtenido por el modelo en cuanto al tamaño poblacional inicial es 2 veces el valor obtenido con los datos de individuos actuales.

La distribución *mismatch* de *Pinus pinceana* (Fig. 14), significa según el modelo de Rogers (1995) que no hay expansión. El que no haya expansión se confirma en el apartado anterior que nos habla de fragmentación. Si tomamos en cuenta el apartado anterior junto con el presente resultaría lógico pensar que *Pinus pinceana* en algún momento tuvo una distribución continua que se ha fragmentado y que lo sigue haciendo lentamente (según las Figs. 12, 13 y 15). Según Millar (1998) los cambios climáticos del Pleistoceno están relacionados con una parte de la especiación del grupo al que pertenece *Pinus pinceana* (Cembroides), es muy probable que los cambios climáticos del Pleistoceno hace más de 3000 años hayan tenido un efecto en la distribución de esta especie, que tal vez comenzó su fragmentación entonces, al romperse la continuidad climática en su distribución y originando parches de mayor o menor tamaño separados por barreras climáticas y/o geográficas que dificultaron el intercambio de migrantes entre ellos lo que en la actualidad se refleja en la estructura geográfica de la genética de las poblaciones.

Conservación

En el caso *Pinus pinceana* parece muy evidente la estrategia de conservación a seguir. Si bien es cierto que la variación conjunta de la especie es alta (0.8237), esta variación se encuentra en su mayoría entre parches de poblaciones. Debido a la estructura genética de la especie, resulta indispensable conservar la variación que existe en cada uno de los parches, los cuales son realmente diferentes entre sí aunque cada una de las dos que conforman cada parche son casi iguales debido al alto flujo genético entre ellas. Por lo anterior la estrategia que se sugiere es conservar al menos una de las dos poblaciones de cada parche, preferentemente aquélla que tenga la mayor variación genética entre individuos. Así pues, se sugiere conservar *in situ* las siguientes poblaciones: Sierra de Parras, Guadalcázar y San Joaquín.

Perspectivas

Existen dos desventajas (al menos) al usar microsatélites de cloroplasto. La primera es que al estudiar la parte de la historia de la especie correspondiente al cloroplasto sólo conocemos la mitad de la misma, es decir faltaría estudiar la variación y la estructura genética de microsatélites nucleares para conocer la parte correspondiente a la semilla, en donde se esperaría mayor variación (pues el cloroplasto no recombina como el núcleo) y una estructura genética aún más marcada (las semillas no viajan demasiado). Tal vez en el caso particular de las poblaciones del sur en donde la variación es tan pobre, un estudio con microsatélites nucleares aclararía un poco la historia particular de estas dos poblaciones. La segunda es la posibilidad de convergencias entre poblaciones debido a la alta tasa de mutación de los microsatélites y de subestimación de tiempos de coalescencia y distancias genéticas entre poblaciones debido a la gran capacidad de dispersión del polen.

Sin embargo debemos resaltar el valor de estudios con microsatélites para genética de poblaciones en comparación con el uso de isoenzimas pues demostraron ser, en este caso particular, más eficientes para revelar la estructura genética de la especie, además de tener la ventaja de ser marcadores codominantes, lo que permite hacer análisis más finos de genética de poblaciones que otros marcadores como RAPD's o RFLP's.

Por último queda por obtener la secuencia de cada alelo de los microsatélites estudiados para ver con más claridad la posible evolución de los alelos y haplotipos en las diferentes poblaciones y plantear una reconstrucción más fina de la historia biogeográfica de la especie.

CONCLUSIONES

- La variación genética de *Pinus pinceana* es alta en general, pero está distribuída de manera muy heterogénea, ya que existen poblaciones con variación relativamente alta mientras que existen otras en donde ésta es nula.
- La capacidad de los microsatélites de cloroplasto resultó mayor que la de las isoenzimas utilizadas anteriormente para revelar la variación genética de la especie y la estructura geográfica de esta variación.
- La estructura genética de *Pinus pincena* es una estructura fragmentada en 3 parches de dos poblaciones cada uno en donde cada parche es notablemente diferente al resto y en el cual las poblaciones que lo integran son prácticamente iguales
- La estructura genética descubierta para *Pinus pinceana* se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia, en donde el flujo genético y las distancias genéticas entre poblaciones están fuertemente ligadas a la separación espacial.
- Es posible que la estructura de la especie sea debida a una fragmentación pasada debida a cambios climáticos en el Pleistoceno. Esta fragmentación probablemente rompió con una distribución continua de la especie transformándola en la estructura en parches que observamos en la actualidad.
- En el caso particular de *Pinus pincena* tanto el modelo de alelos infinitos como el modelo de mutación paso a paso son capaces de revelar la estructura genética de la especie.
- La estrategia de conservación con *Pinus pinceana* debe contemplar el mantener la mayor parte de la variación de la especie conservando al menos una población de cada parche, sugerimos Sierra de Parras, Guadalcázar y San Joaquín.

Apéndice 1

Tabla de datos originales sobre la distribución *mismatch*.

Diferencias	Observado	Esperado
0	2077	362.796
1	1478	351.624
2	208	340.796
3	10	330.301
4	1164	320.129
5	1428	310.271
6	332	300.716
7	2	291.455
8	44	282.48
9	44	273.781
10	2	265.35
11	0	257.179
12	2	249.259
13	0	241.583
14	0	234.143
15	0	226.933
16	0	219.944
17	4	213.171
18	42	206.607
19	0	200.244
20	22	194.078
21	10	188.101
22	0	182.308
23	0	176.694
24	38	171.253
25	22	165.979
26	24	160.868
27	0	155.914
28	0	151.113
29	21	146.459
30	38	141.949
31	2	137.577
32	0	133.341
33	0	129.235
34	2	125.255
35	0	121.398
36	1	117.659
37	12	114.036
38	1	110.524
39	0	107.12
40	0	103.822

Diferencias	Observado	Esperado
41	21	100.625
42	10	97.526
43	1	94.522
44	0	91.612
45	0	88.79
46	0	86.056
47	0	83.406
48	0	80.838
49	0	78.348
50	41	75.935
51	22	73.597
52	10	71.331
53	411	69.134
54	2	67.005
55	40	64.942
56	0	62.942
57	1	61.003
58	0	59.125
59	0	57.304
60	0	55.539
61	23	53.829
62	914	52.171
63	0	50.565
64	0	49.008
65	121	47.498
66	1704	46.036
67	0	44.618
68	0	43.244
69	2	41.912
70	0	40.622
71	0	39.371
72	0	38.158
73	0	36.983
74	53	35.844
75	493	34.74
76	0	33.671
77	0	32.634
78	21	31.629
79	861	30.655

BIBLIOGRAFÍA

- Agarrad, J.E., S.S. Vollmer, F.C. Sorensen and S.H. Strauss. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas-fir. *Molecular Ecology*. **4**: 441-447.
- Aguirre-Planter, E., G. Furnier and L.E. Eguiarte. 2000. Low levels of genetic variation and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *Am. J. Bot.* **87**(3): 362-371.
- Allendorf, F.W., K.L. Knudsen and G.M. Blake. 1982. Frequencies of null alleles at enzyme loci in natural populations of ponderosa and red pine. *Genetics*. **100**: 497-504.
- Axelrod, D.I. 1986. Cenozoic history of some western American pines. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **73**: 565-641.
- Bannister, M.H. 1965. Variation in the breeding system of *Pinus radiata*. In: The genetics of colonizing species. Ed. H.G. Baker and G.L. Stebbins. New York. Academic Press. 353-372 pp.
- Becher, S.A. and R. Griffiths. 1998. Genetic differentiation among local populations of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in mosaic habitats. *Mol. Ecol.* **7**: 1599-1604.
- Bermejo, V.B. 1993. Genetic diversity and the mating system in *Pinus engelmannii* Carr. Ph.D. dissertation. University of Wisconsin, Madison, W.I.
- Betancourt, L.J., W.S. Schuster, J.B. Mitton and R.S. Anderson. 1991. Fossil and genetic history of an pinyon pine (*Pinus edulis*) isolate. *Ecology*. **72**: 1685-1696.
- Brown, A.H.D. and G.F. Moran. 1981. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: M.T. Conkle (ed.), Isozymes in North American forest trees and forest insects, Technical Report Number 48, 1-10. Pacific Southwestern Forest Range Experimental Station Berkeley, C.A.
- Brown Gladen, J., M. Ferguson, M.K. Friesen and J.W. Clayton. 1999. Population structure of North American beluga whales (*Delphinapterus leucas*) based on nuclear DNA microsatellite variation and contrasted with the population structure revealed by mitochondrial DNA variation. *Mol. Ecol.* **8**: 347-363.
- Bucci, G., G.G. Vendramin, L. Lelli and F. Vicario. 1997. Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. Endangered populations: use of

- molecular markers for conservation purposes. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 1138-1146.
- Bucci, G., M. Anzidei, A. Madaghiele and G.G. Vendramin. 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in *halepensis*-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Molecular Ecology*. **7**: 1633-1643.
- Burchardt, B. 1978. Oxygen isotope paleotemperatures from the Tertiary period in the North Sea area. *Nature*. **275**: 121-3
- Chakraborty, R. and S.P. Daiger. 1991. Polymorphisms at VNTR loci suggest homogeneity of the white population of Utah. *Hum. Biol.* **63**: 571-587.
- Chase, M., Kessel, R. and Bawa, K. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *Am. J. Bot.* **83**: 51-57.
- Cockerham, C.C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution*. **23**: 72-83.
- Cockerham, C.C. 1973. Analysis of gene frequencies. *Genetics*. **74**: 679-700.
- Coles, J.F. and Fowler, D.P. (1976). Inbreeding in neighboring trees in two white spruce populations. *Silvae Genetica*. **25**: 29-34.
- Cornelius, J. 1994. Heritabilities and additive genetic coefficients of variation in forest trees. *Canadian Journal of Forest Research*. **24**: 372-9.
- Dallas, J.F. 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*. **3**: 452-456.
- Darwin, C. 1859. On the origins of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, London.
- Dawson, I.K., Waugh, R., Simons, A.J. and Powell, W. 1997. Simple sequence repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliricidia sepium*. *Molec. Ecol.* **6**: 179-183.
- Delgado, P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Náser and E. Álvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered mexican pine *Pinus Rzedowskii* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* **86**(5): 669-676.
- DeVerno, L. and A. Mosseler. 1997. Genetic variation in red pine (*Pinus resinosa* Ait.) revealed by RAPD and RAPD/RFLP analysis. *Canadian Journal of Forest Research*. **27**: 1316-1320.
- Diario Oficial. 16 de octubre de 2000. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000, Protección ambiental –Especies de flora y fauna

silvestres en México-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. México.

- Di Rienzo, A. Peterson, A.C. Garza, J.C. Valdes, A.M. Slatkin, M. Freimer, N.B. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*. **91**: 3166-3170.
- Dow, B.D. and Ashley, M.V. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molec. Ecol.* **5**: 615-627.
- Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D. and Rieseberg, L.H. 1996. Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites en: Molecular Systematics. Hillis, D., Moritz, C. and Mable, B. (ed). Sinauer. USA. 249-320 pp.
- Echt, C.S., DeVerno, L.L., Anzidei, M. and Vendramin, G.G. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Mol. Ecol.* **7**: 307-316.
- Eguiarte, L.E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. En Los Tuxtlas, Ver. Tesis de Doctorado. Centro de Ecología/UACPyP de CCH. UNAM. México.
- Eguiarte, L., A. Búrquez, J. Rodríguez, M. Martínez-Ramos, J. Sarukhán, D. Piñero. 1993. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. *Evolution*. **47**: 75-87.
- Eguiluz Piedra, T. 1985. Origen y Evolución del género *Pinus*. *Dasonomía Mexicana*. **3** (6): 5-31.
- Ellegren, H. 1995. Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mammalian Genome*. **6**: 376-377.
- Excoffier, L., P. Smouse and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. **131**: 479-491.
- Excoffier, L. 2000. Manual Arlequin ver. 2.000.
- Farjon, A. and B.T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica monograph 75. New York Botanical Garden. New York.
- Feldman, M.W., Bergman, A., Pollock, D.D., Goldstein, D.B. 1997. Microsatellite genetic distances with range constraints: Analytic description and problems of estimation. *Genetics*, **145**: 207-216.

- Fowler, D.P. and R.W. Morris. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. *Canadian Journal of Forest Research*. **21**: 635-642.
- Franklin, E.C. (1970). Survey of mutant forms and inbreeding depression in species of the Family Pinaceae. USDA Forest Service Research Paper SE-61.
- Fullard, K., G. Early, M.P. Heide-Jørgensen, D. Bloch, A. Rosing-Asvid and W. Amos. 2000. Population structure of long-finned pilot whales in the North Atlantic: a correlation with sea surface temperature?. *Mol. Ecol.* **9**: 949-958.
- Furnier, G.R. and W.T. Adams. 1986. Geographic patterns of allozyme variation in Jeffrey pine. *American Journal of Botany* **73**: 1009-1015.
- Gebhard W. and Zachau, H.G. 1983. *J. Mol. Biol.* **170**: 567-573.
- Gillespie, J. 1998. Population Genetics A concise guide. The Johns Hopkins University Press. USA
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., Fledman, M.W. 1995 a. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*. **139**: 463-471.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., Fledman, M.W. 1995 b. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*. **92**: 6723-6727.
- Greaves, D.R. and Patient R.K. 1985. *EMBO J.* **4**: 2617-2626.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Susuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. 1996. An Introduction to Genetic Analysis. USA. W.H. Freeman and Company.
- Gross, D.S. and Garrad, W.T. 1986. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3010-3013.
- Guries, R.P. and F.T. Ledig. 1982. Genetic diversity and structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill). *Evolution*. **36**: 387-402.
- Hamada, H., Petrino, M.G. and Kakunaga, T. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6465-6469.
- Hamrick, J.L., Y.B. Linhart and J.B. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **10**: 173-200.

- Hamrick, J.L. and M.J. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Proc. Roy. Soc. London B* **351**: 1291-1298.
- Harding, R.M., A.J. Boyce, J.J. Martinson, J. Flint and J.B. Clegg. 1993. A simulation study of VNTR population genetics: Constrained recombination rules out the infinite alleles model. *Genetics*. **135**: 911-922.
- Harpending, H.C., S.T. Sherry, A.R. Rogers and M. Stoneking. 1993. The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology*. **34**:483-496.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of Ancient Population Growth in a Low-Resolution Mitochondrial DNA Mismatch Distribution. *Human Biology*. **66** (4): 591-600.
- Hartl, D.L. 1980. Principles of Population Genetics. Sinauer. USA. 488 p.
- Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1989. Principles of Population Genetics. Sinauer. USA. 682 p.
- Hedrick, P.W. 1983. Genetics of Populations. Science Books Int. USA.
- Hedrick, P.W. 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*. **53** (2) : 313-318.
- Hillis, D., Moritz, C. and Mable, B. (editores). Molecular Systematics. 1996. Sinauer. Canada. 249-252 pp.
- Hoelzel, A.R. and D.R. Bancroft. 1998. Statistical analysis of variation en: Molecular Genetic Analysis. Hoelzel, A.D. (ed). The Practical Approach Series. USA. 399-407pp.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* **7**: 1-44.
- Izquierdo and Piñero. 2000. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Aust. J. Bot.* **48**: 645-650.
- Jarne, P. and Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree*. **11** (10): 424-429.
- Jeffreys, A.J., N.J. Royle, V. Wilson and Z. Wong. 1988. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*. **332**: 278-281.
- Karamangala, R.R. and Nickrent, D.L. 1989. An electrophoretic study of representatives of subgenus *Diploxylon* if *Pinus*. *Canadian Journal of Botany*. **67**: 1750-9.

- Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. **49**: 725-738.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge.
- Lanner, R.M. 1998. Seed dispersal in pines en: Ecology and Biogeography of *Pinus*. Richardson, D.M. (ed). Cambridge University Press. UK. 281-295 pp.
- Lauria, F. 1991. Taxonomy, systematics and phylogeny of *Pinus* subsection *Ponderosae* London (Pinaceae). Alternative concepts. *Linzer Biologi. Beitr.* **23** (1): 129-202.
- Le Corre, V., S. Dumolin-Lapegue and A. Kremer. 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Molecular Ecology*. **6**: 519-529.
- Ledig, F.T. 1998. Genetic Variation in *Pinus* en: Ecology and Biogeography of *Pinus*. Richardson, D.M. (ed). Cambridge University Press. UK. 251-280 pp.
- Ledig, F.T. 2000. Founder effects and genetic structure of Coulter pine. *Journal of Heredity*. **91**: 307-315.
- Ledig, F.T., V. Jacob-Cervantes, P.D. Hodgskiss and T. Eguiluz-Piedra. 1997. Recent evolution and divergence among populations of a rare Mexican Endemic, Chihuahua spruce, following Holocene climatic warming. *Evolution*. **51**: 1815-1827.
- Li, W-H. 1997. Molecular Evolution. Sinauer. Canada. 388-395 pp.
- Long, J.C. 1986. The allelic correlation structure of Gainj and Kalam speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics*. **112**: 629-647.
- Lozano-García, M.S., B. Ortega-Guerrero, M. Caballero-Miranda & J. Urrutia-Fucugauchi. 1993. Late Pleistocene and Holocene Paleoenvironments of the Chalco Lake, Central México. *Quaternary Research*. **40**: 332-342.
- Lugon-Moulin, N., H. Brünner, A. Wytterbach, J. Hausser and J. Goudet. 1999. Hierarchical analyses of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora: Soricidae). *Mol. Ecol.* **8**: 419-431.
- Lundy, C.J., P. Moran, C. Rico, R.S. Milner and G.M. Hewitt. 1999. Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a

case study of European hake (*Merluccius meluuccius*), a commercially important fish. *Mol. Ecol.* **8**: 1889-1898.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**: 209-220.

Markert, J.A., M.E. Arnegard, P.D. Danley and T.D. Kocher. 1999. Biogeography and population genetics of the Lake Malawi cichlid *Melanochromis auratus*: habitat transience, philopatry and speciation. *Mol. Ecol.* **8**: 1013-1026.

Marzluff, J.N. and Balda, R.P. 1992. The pinyon Jay: Behavioral Ecology of a Colonial and Cooperative Corvid. Poyser. London.

Mathenson, A.C., J.C. Bell and R.D. Barnes. 1989. Breeding systems and genetic structure in some central American pine populations. *Silvae Genetica.* **38**: 107-113.

McClenaghan, L.R. Jr. and A. Beauchamp. 1986. Low genetic differentiation among isolated populations of the California fan palm (*Washingtonia filifera*). *Evolution.* **40**(2): 315-322.

McGrowran, B. 1990. Fifty million years ago. *American Scientist.* **78**: 30-39.

Michalakis, Y. and L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics.* **112**: 629-647.

Millar, C.I. 1998. Early evolution of pines en: Ecology and Biogeography of *pinus*. Richardson, D.M. (ed). Cambridge University Press. UK. 69-91 pp.

Millar, C.I. and Kinloch, B.K. 1991. Taxonomy, phylogeny, and coevolution of pines and their stem rusts. En: *Rusts of Pines. Proceedings IUFRO Rusts of Pine Working Party Conference, 1989*, ed. Y. Hiratsuka, J. Samoil, P. Blenis, P. Crane and B. Laishley, 1-38 pp. Banff, Alberta: Forestry Canada, Edmonton, Alberta.

Millar, C.I., S.H. Strauss, M.T. Conkle and R.D. Westfall. 1988. Allozyme differentiation and biosystematics of the Californian closed-cone pines (*Pinus* subsect. *Oocarpae*). *Systematic Botany.* **13**: 351-370.

Miller, K.G., Fairbanks, R.G. and Mountain, G.S. 1987. Tertiary oxygen isotope, sea level history and continental margin erosion. *Paleoceanography.* **2**: 1

Mitton, J.B. 1993. Molecular approaches to population biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **25**: 45-69.

- Molina-Freaner, F., P. Delgado, N. Pérez-Náser, D. Piñero and E.R. Álvarez-Buylla. 2001. Do rare pines need different conservation strategies?: evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany*. **79**: 223-230.
- Morgante, M., N. Felice, G.G. Vendramin. 1997. Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In: Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals. Karp, A., P.G. Isaac, D.S. Ingram (eds). Chapman and Hall. London.
- Mosseler, A., D.J. Innes and B.A. Roberts. 1991. Lack of allozymic variation in disjunct Newfoundland populations of red pine (*Pinus resinosa*). *Canadian Journal of Forest Research*. **21**: 525-528.
- Mosseler, A., K.N. Egger and G.A. Hughes. 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research*. **22**: 1332-1337.
- Neale, D.B. and Sederoff, R.R. (1989). Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*, **77**: 212-216.
- Nee, S., E.C. Holmes, A. Rambaut and P.H. Harvey. 1996. Inferring population history from molecular phylogenies. In: New uses for new Phylogenies. Harvey, P., A.I. Leigh-Brown and J. Maynar-Smith (eds). Oxford University Press. 66-79 pp.
- Nei, M. 1975. Molecular Population Genetics and Evolution. American Elsevier. USA.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. USA.
- Nei, M. and H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **76**: 5269-5273.
- Niebling, A.U. and M.T. Conkle. 1990. Diversity of washoe pine and comparisons with allozymes of ponderosa pine races. *Canadian Journal of Forest Research*. **20**: 298-308.
- Nesje, M., K.H. Roed, J.T. Lifjeld, P. Lindberg and O.F. Steen. 2000. Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.* **9**: 53-60.
- Ohta, T. and Kimura, M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* **22**: 201-204.

- Oyler-McCance, S.J., N.W. Kahn, K.P. Burnham, C.E. Brauns and T.W. Quinn. 1999. A population genetic comparison of large- and small-bodied sage grouse in Colorado using microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.* **8**: 1457-1465.
- Parrish, J.T. 1987. Global paleogeography and paleoclimate of the late Cretaceous and the early Tertiary. En: The Origins of Angiosperms and their biological consequences (ed) F.M. Friis, W.G. Chaloner and P.R. Crane. Cambridge University Press. Cambridge. 51-73 pp.
- Perry, J.P. 1991. The pines of Mexico and Central America. Timber Press. USA. 80-82 pp.
- Plessas, M.E. and Strauss, S.H. (1986). Allozyme differentiation among populations, stands and cohorts in Monterrey pine. *Canadian Journal of Forest Research*, **16**: 1155-64.
- Prothero, D.R. and Berggren, W.A. (eds) 1992. Eocene-Oligocene Climatic and Biotic Evolution. Princeton University Press. Princeton, N.J.
- Powell, W., Morgante, M., McDevitt, R., Vendramin, G.G. and Rafalski, J.A: 1995a. Polymorphic simple sequence repeat regions in the chloroplast genome: applications to the population genetics of pines. *Proc Natn. Acad. Sci. USA* **92**: 7759-7763.
- Powell, W. Machray, G.C. and Provan, J. 1996a. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Pl. Sci.* **1**: 215-222.
- Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N.J., McNicol, J.W., Forrest, G.I., Cottrell, J. and Powell, W. 1998. Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proc. R. Soc. Lond.* **265**: 1697-1705.
- Provan, J., J.R. Russell, A. Booth and W. Powell. 1999. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Mol. Ecol.* **8**: 505-511.
- Reusch, T.B.H., T. Stam and J.L. Olsen. 2000. A microsatellite-based estimation of clonal diversity and population subdivision in *Zostera marina*, a marine flowering plant. *Mol. Ecol.* **9**: 127-140.
- Rogers, A.R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution.* **49**(4):608-615.

- Rogers, A.R. and H.C. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**:552-569.
- Schèfer, R., Ali, S. and Epplen, J.T. 1986. *Chromosoma*. **93**: 502-510.
- Schemske, D.W. and Lande, R. (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution*, **39**: 41-52.
- Scheinder, S., D. Roessli and L. Excoffier (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
<http://anthro.unige.ch/arlequin>
- Schuster, W.S., L.D. Alles and J.B. Mitton. 1989. Gene flow in limber pine: evidence from pollination phenology and genetic differentiation along an elevational transect. *American Journal of Botany*. **76**: 1395-1403.
- Shierebeck, K.A., M. Shupski, D. Lieberman and M. Lieberman. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology*. **6**: 137-144.
- Shriver, M.D., L. Jin, R. Chakraborty and E. Boerwinkle. 1993. VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model: A computer simulation approach. *Genetics*. **134**: 983-993.
- Simon, J.P., Y. Bergeron and D. Gagnon. 1986. Isozyme uniformity in populations of red pine (*Pinus resinosa*) in the Abitibi region, Quebec. *Canadian Journal of Forest Research*. **16**: 1133-1135.
- Singh, G. 1988. History of aridland vegetation and climate: a global perspective. *Biological Review*. **63**: 159-95.
- Slatkin, M. 1987. Gene Flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **263**: 787-792.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics*, **139**: 457-462.
- Slatkin, M. and R.R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. **129**:555-562.
- Schlötterer, C. 1998. Microsatellites en: Molecular Genetic Analysis. Hoelzel, A.D. (ed). The Practical Approach Series. USA. 237-261pp.

- Smith, J.F. and T.V. Pham. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *American Journal of Botany*. **83**(6): 717-726.
- Smouse, P.E., J.C. Long and R. Sokal. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*. **35**: 627-632.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. **105**: 437-460.
- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. In: Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology. Takahata, N. and A.G. Clark (eds). Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Society Press, Sinauer Associates, Inc., p. 37-59.
- Tarr, C.L. and C. Fleischer. 1999. Population boundaries and genetic diversity in the endangered Mariana crow (*Corvus kubaryi*). *Mol. Ecol.* **8**: 941-949.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 6463-6471.
- Tautz, D. and Renz, M. 1984. *Nucl. Acids. Res.* **12**: 4127-4138.
- Tigerstedt, P.M.A., Rudin, D., Niemela, T. and Tammissola, J. (1982). Competition and neighboring effects in a naturally regenerating population of Scots pine. *Silvae Genetica*. **16**: 122-9.
- Ueno, S., N. Tomaru, H. Yoshimaru, T. Manabe and S. Yamamoto. 2000. Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth evergreen forest, Tsushima, Japan. *Mol. Ecol.* **9**: 647-656.
- Valdes, A.M., Slatkin, M. and Freimer, N.B. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: The stepwise mutation model revisited. *Genetics* **133**: 737-749.
- Vander Wall, S.B. 1990. Food Hoarding in Animals. University Chicago Press. Chicago.
- Vázquez-Lobo, A. 1996. Evolución de hongos endófitos del género *Pinus* L: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Vendramin, G.G. Lelli, L., Rossi, P. and Morgante, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molec. Ecol.* **5**: 595-598.

- Von Segesser, F. N. Menard, B. Gaci and R.D. Martin. 1999. Genetic differentiation within and between isolated Algerian subpopulations of Barbary macaques (*Macaca sylvanus*): evidence from microsatellites. *Mol. Ecol.* **8**: 433-442.
- Wakasugi, T., J. Tsudzuki, S. Ito, K. Nakashima, T. Tsudzuki and M. Sugiura. 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 of the USA.* **91**: 9794-9798.
- Weber, J.L. and Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics.* **2**: 524-530.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* **38**: 1358-1370.
- White, G. and Powell, W. 1997a. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Molec. Ecol.* **6**: 851-860.
- White, G. and Powell, W. 1997b. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Molec. Ecol.* **6**: 1185-1197.
- Wolfe, J.A. 1978. A paleobotanical interpretation of Tertiary climates in the Northern Hemisphere. *American Scientist.* **66**: 694-703.
- Widmer, A. and P. Schmid-Hempel. 1999. The population genetic structure of a large temperature pollinators species, *Bombus pascuarium* (Scopoli) (Hymenoptera: Apidae). *Mol. Ecol.* **8**: 387-398.
- Wright, S. 1949. Adaptation and selection. En: Genetics, Paleontology and Evolution. Jepson, G.L., G.G. Simpson and E. Mayr (eds). Princenton University Press. USA. 365-389 pp.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**:323-354.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evol.* **19**: 395-420.
- Zavarin, E. 1988. Taxonomy of pinyon pines. In *Proceedings of the III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros 6-8 August 1987* (ed) M.F. Passini, D.C. Tovar and T. Eguiluz Piedra, pp. 29-40. Chapingo, México: Centro de Genética Forestal.