

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Envío a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: PATRICIA DELGADO

VALERIO

FECHA: 22 NOVIEMBRE 2002

FIRMA: [Signature]

Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales de *Pinus montezumae* Lamb y *P. pseudostrobus* Lind (Pinaceae)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M en C. PATRICIA DELGADO VALERIO

DIRECTOR DE TESIS: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2002



COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de septiembre de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) Patricia Delgado Valerio, con número de cuenta 93810647 y número de expediente 3932015, con la tesis titulada: "Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales de *Pinus montezumae* Lamb y *P. pseudostrobus* Lind, (Pinaceae)", bajo la dirección del (la) Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau.

Presidente:	Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
Vocal:	Dra. María Elena Alvarez-Buylla Roces
Vocal:	Dr. Carlos Fabian Vargas Mendoza
Vocal:	Dra. Susana Aurora Magallón Puebla
Secretario:	Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns
Suplente:	Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella
Suplente:	Dr. Francisco Molina Freaner

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de noviembre de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTO

En estos párrafos se hace un reconocimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT- 138507 y a la Dirección General de Estudios de Posgrado DGEP-1045, por la Beca- crédito y complementaria recibida durante la realización del presente trabajo, y por el financiamiento al proyecto CONACYT-3777 a Piñero y Gernandt y CONABIO-R116 a P. Delgado y D. Piñero.

A los Drs. Daniel Piñero, Luis Eguiarte y Lorenzo Segovia, por formar parte del comité tutorial, y ser guía fundamental en la realización de esta tesis.

A la Dra. Elena Alvarez-Buylla Roces, Dra. Susana A. Magallón Puebla, Dr. Francisco Molina Freaner y Dr. Carlos Fabian Vargas Mendoza, por las sugerencias aportadas al trabajo y formar parte del jurado de examen de grado.

“Yo luchare siempre, hasta la muerte, para expresar mis ideas. Pero haré otro tanto para que mi adversario pueda libremente expresar las suyas”.

Dario Fo

RESUMEN

La hibridación introgresiva es el tema central del presente trabajo que se estudió en 13 poblaciones naturales de dos especies de pino de amplia distribución geográfica, muy relacionadas filogenéticamente (*Pinus pseudostrobus* y *P. montezumae*), y para las que se han sugerido eventos de introgresión. El trabajo contempla el análisis de datos de microsatélites nucleares (nSSR) y de cloroplasto (cpSSR) con base en la genética de poblaciones clásica, el análisis de haplotipos de cpSSR bajo la teoría de coalescencia, y el análisis de varianza (ANOVA) y de distancias euclidianas de datos morfológicos. A partir de esta información se desarrollaron tres estudios, el primero que trata sobre la estructura genética y variación en el tamaño de fragmentos obtenidos con cpSSR en diversas especies de pino, tanto del subgénero *Pinus* como *Strobus*, el segundo que hace inferencias de eventos de hibridación introgresiva con datos morfológicos y nSSR, y el tercero que hace un análisis sobre la estructura filogeográfica de las poblaciones y de la dinámica histórica de la introgresión. Los datos nos permitieron detectar eventos de hibridación introgresiva ancestral, unidireccional de cpSSR y morfología, de *P. montezumae* a *P. pseudostrobus*, y simétrica o bidireccional, con nSSR. En este sentido, es probable que *P. montezumae* este actuando como árbol padre y *P. pseudostrobus* como árbol madre receptora de polen. Los factores que probablemente han influido en la hibridación introgresiva observada pueden ser: i) la ruptura de barreras reproductivas entre estas especies, ii) mayor eficiencia y viabilidad del polen de *P. montezumae*, iii) mayor dispersión de semillas de *P. pseudostrobus*, y iv) mayor capacidad adaptativa en ambientes contrastantes de *P. montezumae*. En cuanto a la dinámica evolutiva de las especies, sugerimos eventos históricos de expansión, aislamiento por distancia y fragmentación de las poblaciones, y con base en el concepto cohesivo de especie, sugerimos la existencia de dos linajes independientes (*P. montezumae* y *P. pseudostrobus*) y de un linaje no independiente representado por el evento de introgresión. Este estudio sugiere que los estudios de hibridación introgresiva deben considerar diferentes tipos de datos, tanto morfológicos como moleculares (nucleares versus citoplasmáticos), ya que cada uno de ellos permite detectar diferentes escenarios evolutivos relacionados con la hibridación introgresiva los que complementan nuestro conocimiento acerca de la historia evolutiva de las especies.

ABSTRACT

The aim of this work is introgressive hybridization. We studied it in 13 natural populations of two phylogenetically close-related species of widely distributed pines, *Pinus montezumae* and *Pinus pseudostrobus*. The data were obtained from nuclear (nSSR) and chloroplast (cpSSR) microsatellite and analyzed using classical population genetics and coalescence theory; We also analyzed morphological data using ANOVA and euclidian distances. We developed three different studies: The first analyze the genetic structure using chloroplast microsatellite fragment size differences between several species of both subgenera of pines, *Strobus* and *Pinus*. The second study infers introgressive hybridization events using nSSRs and morphological data. Finally, the third is a phylogeographic analysis about the geographic structure of populations and their dynamics through the geological history. The results helps us to detect ancestral introgressive hybridization events in different manners. In one hand, this was unidirectional introgression using cpSSR and morphology data from *P. montezumae* to *P. pseudostrobus*. On the other hand, it was symmetric using nSSR. In this way, is possible that *P. montezumae* is being acting as the pollen donor and *P. pseudostrobus* as the pollen receptor. Some of the factors that may be influencing the introgressive hybridization observed are i) the rupture of genetic barriers between both species, ii) higher resistance and viability of *P. montezumae* pollen, iii) higher seed dispersion of *P. pseudostrobus*, and iv) higher adaptative capacity of *P. montezumae* to contrastant (often disturbed) environments. Our results concerning the historic dynamic of both species, we suggest range expansion events, isolation by distance and population fragmentation. Moreover, based on the Cohesive Species Concept, we suggest that both *P. montezumae* and *P. pseudostrobus* each belong to different independent lineages.

Finally, the analysis of morphological and molecular (cytoplasmatic and nuclear) data are widely recommended for this kind of studies. They allow us to detect different evolutive scenarios of introgressive hybridization, which certainly complemented our knowledge about the evolution of these species.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
ANTECEDENTES	5
PROCESOS DE HIBRIDACIÓN	5
HIBRIDACIÓN INTROGRESIVA	6
<i>Conceptos</i>	6
<i>Mecanismos</i>	7
ESPECIACIÓN POR HIBRIDACIÓN	9
<i>Dinámica de la especiación</i>	9
<i>Dinámica de la hibridación introgresiva</i>	10
<i>Hibridación introgresiva nuclear versus citoplasmática</i>	12
AVANCES TEÓRICOS Y METODOLÓGICOS	13
<i>Predicciones teóricas</i>	13
<i>Marcadores moleculares SSRs (microsatélites)</i>	13
<i>Métodos de análisis</i>	14
<i>Las especies de estudio</i>	17
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL	22
CAPÍTULO II	
Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation	
Consequences	1
ABSTRACT	27
INTRODUCTION	27
MATERIAL AND METHODS	28

<i>Molecular markers</i>	28
<i>Allozymes</i>	28
<i>Microsatellites</i>	29
RESULTS	29
<i>Expected heterozygosity and genetic differentiation</i>	29
<i>Population inbreeding and mating system</i>	31
DISCUSIÓN	32
<i>Constancy in heterozygosity among species</i>	32
<i>Heterogeneity in population differentiation among species</i>	33
<i>Microsatellites: comparative approaches</i>	33
<i>Mating system plasticity and morphological adaptation</i>	35
ACKNOWLEDGMENTS	35
LITERATURE CITED	35

CAPÍTULO III

Evidencias de hibridación introgresiva entre *Pinus montezumae* y

P. pseudostrobus, detectadas con el uso de microsatélites nucleares (nSSR)

y caracteres morfológicos	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	5
<i>Material De campo</i>	5
<i>Extracción de ADN y productos de PCR</i>	6
<i>Análisis de caracteres morfológicos</i>	7
<i>Parámetros de diversidad genética y estructura poblacional</i>	7
<i>Aislamiento por distancia y relaciones filogenéticas</i>	9
RESULTADOS	10
<i>Patrones de variación morfológica</i>	10
<i>Variación genética</i>	12
<i>Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento</i>	16
<i>Estructura genética</i>	16
<i>Patrones deflujo genético</i>	18

<i>Aislamiento por distancias y relaciones filogenéticas</i>	19
DISCUSIÓN	20
<i>Amplificación heteroespecífica</i>	20
<i>Variación y estructura genética</i>	21
<i>Flujo genético y relaciones filogenéticas</i>	23
<i>Especiación y conservación</i>	26
AGRADECIMIENTOS	27
LITERATURA CITADA	27
CAPÍTULO IV	
Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones	
De <i>Pinus montezumae</i> Lamb. y <i>P. pseudostrobus</i>, Lind, en México y	
Guatemala	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	5
<i>Material vegetativo, extracción y productos de PCR</i>	5
<i>Diversidad genética y subdivisión de las poblaciones</i>	8
<i>Reconstrucción filogenética y coalescencia</i>	8
RESULTADOS	9
<i>Diversidad genética y subdivisión de las poblaciones</i>	9
<i>Reconstrucción filogenética y coalescencia</i>	14
DISCUSIÓN	23
<i>Variación y estructura genética</i>	23
<i>Relaciones genealógicas</i>	24
<i>Análisis de clados anidados e inferencias históricas</i>	25
AGRADECIMIENTOS	29
LITERATURA CITADA	29
CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN GENERAL	
Introgresión diferencial: datos morfológicos y moleculares	
(citoplasmáticos y nucleares)	1

<i>Parámetros genéticos y diferenciación genética</i>	2
<i>Flujo genético y relaciones filogenéticas</i>	4
<i>Especiación y Coservación</i>	7
CONCLUSIONES	15
LITERATURA GENERAL	17

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Pinus es un género con una distribución amplia en el Hemisferio Norte, pero representado en México y Centro América por más de la mitad de las especies que lo conforman (110 especies, Farjon y Styles, 1997). De acuerdo con Perry (1991), en México se reconocen 72 especies, formas y variedades, de las cuales 34 especies son endémicas a México. Se ha hipotetizado que durante el Eoceno, México y Centro América constituyeron regiones de refugio importantes de especies del género *Pinus*, considerando a México como el centro de diversificación de muchas de las especies (Millar, 1993). Sin embargo, en México se tuvo escaso conocimiento de su evolución, ya que los mayores esfuerzos de investigación forestal fueron destinados a especies muy comunes y comerciales (Stead 1983a). No fue sino hasta la última década en que se iniciaron estudios que consideran aspectos evolutivos, ecológicos y taxonómicos (Bermejo 1993; Quijada *et al.*, 1998; Ledig 1998, 1999; Liston *et al.*, 1999; Matos y Schaal., 2000; Delgado *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2001; Gernandt *et al.*, 2001; Escalante, 2001; Cuenca, 2001; Moreno, 2002; Rentería, 2002).

A nivel global, la mayoría de las investigaciones sobre el género *Pinus* han sido dirigidas al área de la taxonomía y biogeografía (Little y Critchfield, 1969; Axelrod, 1980, Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997). En particular, diversos estudios taxonómicos han enriquecido el conocimiento de la diversidad de especies que conforman a este grupo, y por tanto han dado pautas a continuas reevaluaciones de su clasificación. Los estudios taxonómicos contemplan el análisis comparativo de caracteres de diverso origen, morfológicos, químicos, anatómicos y moleculares (Shaw, 1914; Critchfield, 1986; Szmidt *et al.*, 1988; Karalamangara y Nicker, 1989; Strauss y Doerksen, 1990; Govindaraju, 1992; Wang y Szmidt, 1993; Pérez de la Rosa *et al.*, 1995; Farjon y Styles, 1997; Liston *et al.*, 1999). Todos los resultados de estas investigaciones han llegado a la conclusión de que el género *Pinus* tiene un origen monofilético y que está conformado por dos grandes subgrupos: subgénero *Strobus* y subgénero *Pinus*. Sin embargo, las relaciones filogenéticas de muchas de las secciones y subsecciones dentro de los subgéneros no se han logrado establecer claramente (Critchfield, 1986; Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997; Pérez de la Rosa *et al.*, 1995; Liston *et al.*, 1999; Piñero, com pers). En particular, varias especies mexicanas han sido difíciles de ubicar taxonómicamente (Shaw, 1914; Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997; Pérez de la Rosa *et al.*, 1995; Liston *et al.*, 1999). Algunos de ellas tienen caracteres intermedios a los de los dos subgéneros o al de las subsecciones (Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997; Liston *et al.*, 1999). Otras especies presentan caracteres intermedios entre especies de la misma subdivisión. Por ejemplo, especies de la subdivisión *Ponderosae*, *Oocarpae*, *Cembra* y *Paracembra* (Lanner, 1974a; Millar, 1993; Perry, 1991). Este tipo de resultados han hecho que

las relaciones filogenéticas que se obtienen en *Pinus* sean polifiléticas o parafiléticas. Las relaciones filogenéticas pueden ser interpretadas bajo tres hipótesis generales: 1) la mayoría de estas especies tienen un origen muy reciente, por lo que la divergencia no ha sido grande o no ha concluido el proceso de especiación; 2) existe evolución gradual donde las formas o especies con caracteres intermedios guardan caracteres ancestrales junto con caracteres novedosos y 3) varias de las especies tienen un origen polifilético, donde probablemente los procesos de hibridación introgresiva han tenido una función importante durante su especiación (evolución reticulada). Una de las estrategias que permite discernir entre las hipótesis mencionadas es el estudio de los procesos de especiación a nivel de las poblaciones haciendo una reconstrucción genealógica de la historia evolutiva de especies particulares, para intentar inferir el proceso de especiación.

Con respecto a la hipótesis de hibridación introgresiva como un posible proceso de origen de especies del género *Pinus* se tienen antecedentes importantes. Desde hace más de dos décadas se ha trabajado con cruces controladas entre varios pares de especies de pinos de los Estados Unidos, México y Europa, y en la mayoría de los casos se han producido híbridos, los cuales pueden dejar descendencia fértil (Bighman *et al.*, 1972; Critchfield 1986; Quijada *et al.*, 1998). Estos estudios son artificiales y solo se han hecho con especies que son importantes económicamente. En la actualidad se ha documentado la hibridación e introgresión natural en algunas especies de México, como *P. montezumae* y *P. hartwegii* (Matos y Schaal, 2000), de Europa, como *P. brutia*, *P. halapensis* y *P. eldarica* (Bucci *et al.*, 1998) y se ha probado el origen de una especie (*P. densata*) por medio de la hibridación ancestral entre dos especies de pino de Asia (Wang y Szmidt, 1990; Wang *et al.*, 2001). Además, existen varios trabajos sobre la hibridación en otros géneros de coníferas, como *Picea* (Szmidt *et al.*, 1988; Stibe *et al.*, 1989; Sutton *et al.*, 1991) y *Larix* (Szmidt *et al.*, 1988), así como un gran número de casos de hibridación inter específica e intergenérica en diferentes grupos de plantas y animales (e. g., Anderson, 1949; Stebbins, 1959; Knobloch, 1972; Rieseberg *et al.*, 1988).

Si nosotros partimos de la hipótesis de hibridación como un proceso importante en el origen y evolución de algunas especies del género *Pinus*, tenemos claramente que desarrollar el trabajo con especies que sean muy relacionadas filogenéticamente y que presenten poblaciones distribuidas en simpatria, con lo que por un lado, se esperarían mayores probabilidades de intercambio genético entre las mismas y por otro lado, se lograría determinar los posibles eventos históricos que han ocurrido durante su evolución. En este sentido, varias especies de pinos nos brindan la oportunidad de probar hipótesis sobre los procesos de hibridación introgresiva, tema central del presente trabajo. Aquí se exploran eventos de hibridación

introgresiva entre dos especies de *Pinus* de amplia distribución geográfica: *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.

Las especies de pino que se seleccionaron como sistema de estudio cubren varios de los aspectos esenciales para la realización de estudios de introgresión: i) las especies están muy relacionadas filogenéticamente, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* pertenecen al subgénero *Pinus* (pinos duros), y se ubican en la sección *Ponderosae* (Little y Critchfield, 1969), sección que está representada por varias especies que probablemente hibridizan entre sí, ii) presentan poblaciones que se distribuyen en alopatria y simpatria, a través de una extensa zona geográfica tanto en México como Guatemala; en el Eje Neovolcánico Transversal, Sierra de Juárez, Mesa de Chiapas, y la Mesa Central de Guatemala (ver Fig. 2) por lo que se pueden estudiar tanto poblaciones puras como mezcladas, iii) para estas especies se han sugerido posibles eventos de hibridación natural entre *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, con base en características morfológicas, anatómicas y de la composición química de resinas (Martínez 1948; Mirov 1967; Perry 1991); y iv) las especies tienen un uso potencial como producto maderable. *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* son las especies más explotadas en México, para su comercialización dentro y fuera del país (Sausedo y Acosta, 1988), aspecto que puede influir en la extinción de poblaciones locales. Por todo lo anterior, es claro que estas especies, son ideales como sistema de estudio para analizar escenarios evolutivos de la dinámica de genes que han influido durante la especiación del género *Pinus*.

Este estudio se desarrolló dentro de un contexto microevolutivo (evolución de genes) y biogeográfico (distribución de genes) con base en el uso de herramientas moleculares y métodos analíticos intrapoblacionales. Con los resultados se pretende obtener bases teóricas y empíricas para entender las rutas de las interacciones genéticas de las poblaciones y especies de estudio y con ello probar hipótesis acerca de cómo, cuando y en qué magnitud se han presentado los procesos de hibridación introgresiva en estas especies, qué factores han permitido el mantenimiento de las mismas y qué tanto de esta información puede sustentar de una manera sólida la teoría o hipótesis de evolución reticulada.

ANTECEDENTES

PROCESOS DE HIBRIDACIÓN

Los procesos de hibridación introgresiva son muy comunes entre plantas y algunos grupos de animales. Sin embargo en las dos décadas pasadas su importancia fue vista con gran escepticismo y no fue sino hasta principios de los 90's en que se retomó a la hibridación como un proceso importante en la evolución y origen de especies (ver Rieseberg y Ellstrand 1993, Rieseberg y Wendel 1993; Arnold y Hodges, 1995). Comúnmente se ha caracterizado a los individuos de origen híbrido como estériles, semiestériles o inviábiles (e.g., Heiser *et al.*, 1949, Ayala y Dobzhansky, 1974), aspectos que han sido refutado, ya que en muchos casos los individuos pueden ser viables y dejar descendencia fértil (ver Lamb y Avise, 1986, Wang y Szmidt, 1990), ó como individuos morfológicamente intermedios entre sus progenitores, con coherencia entre las características de diferentes poblaciones híbridas (Anderson, 1949; Grant, 1979), por ejemplo, de caracteres morfológicos, químicos, moleculares o de hábitat. Sin embargo, se ha visto que en la naturaleza existe todo un gradiente de estos aspectos proyectados como un mosaico de características parentales, intermedias y extremas (propias de los híbridos), mismas que son controladas genéticamente en interacción con el ambiente (Mooren y Buchanan 1988, Rieseberg 1995).

Los avances recientes de las técnicas moleculares han permitido detectar diferentes mecanismos y dinámicas de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales tanto de plantas como animales (ver Rieseberg y Ellstrand 1993, Rieseberg y Wedel 1993, Arnold y Hodges 1995; Rieseberg 1995). Esto ha abierto un extenso campo de estudios alternativos sobre el origen y evolución de especies con base en el planteamiento de hipótesis micro y macroevolutivas, relacionadas por ejemplo, con diferentes modelos de especiación por hibridación introgresiva (parapátrica y simpátrica); con la extinción de poblaciones locales debido a dinámica diferencial de la introgresión, con la dispersión de polen y competencia reproductiva entre especies, con la distribución histórica de las especies originadas por introgresión, con la importancia de la hibridación como un mecanismo de adaptación y generador de nuevas especies, entre otras. La información que se ha generado durante los últimos años sobre estos procesos contempla múltiples aspectos, que van desde la historia de la conceptualización teórica de la hibridación hasta el desarrollo de modelos teóricos y metodológicos para el análisis y comprobación de hipótesis de dichos procesos.

HIBRIDACIÓN INTROGRESIVA

Conceptos

Un enfoque de la hibridación inter-específica requiere en primer lugar de reconsiderar el concepto de especie. Como sabemos, en la actualidad la definición del concepto de especie sigue siendo un tópico de gran debate dentro de la comunidad biológica. La amplitud de este debate incluye una variedad de diferentes conceptos de especie, como de especie biológica, morfológica, genética, paleontológica, evolutiva, filogenética, de cohesión, entre otras. En particular, el concepto cohesivo de especie propuesto por Templeton (1989), que define a una especie como un linaje evolutivo que tienen la potencialidad de la cohesión fenotípica a través de mecanismos de cohesión intrínsecos (genéticos y/o demográficos) que limitan la unión de poblaciones, y que son mantenidos por la acción de fuerzas microevolutivas como flujo genético, deriva génica y selección natural, me parece la definición más incluyente, ya que toma en cuenta procesos microevolutivos y macroevolutivos dentro de un marco de mecanismos cohesivos intrínsecos de las especies. No es de igual importancia el aislamiento reproductivo para especies de reproducción sexual, como lo es para especies de reproducción asexual, o híbridas, por lo que otro mecanismo o mezclas de mecanismos (cohesión) pueden influir más para su especiación. En este sentido, considero al concepto de especie cohesiva como el más robusto e importante que incluye a las especies originadas por hibridación.

Como menciona Anderson (1949), la hibridación es uno de los procesos más importantes dentro de todo el campo del estudio evolutivo, pero también es uno de los tópicos más controvertidos y menos entendidos. Inicialmente, la hibridación se definió como un proceso de formación de una nueva especie a través del entrecruzamiento de dos especies, y las gradaciones de estas (subespecies, razas o formas) fueron interpretadas como productos del entrecruzamiento de poblaciones o subespecies conespecíficas (Anderson, 1949, Stebbins, 1959, Grant, 1981). Pero esta distinción es arbitraria y en la literatura más reciente se ha propuesto a la hibridación como el intercambio genético entre formas de diferente estatus taxonómico (Rieseberg y Wendel, 1993). Aunado a la definición de la hibridación, la cual se presenta de manera puntual en las poblaciones de dos o más especies, esta también puede presentarse de manera gradual por medio de la incorporación de material genético por introgresión o hibridación introgresiva, concepto que es definido como la incorporación selectiva de material genético ajeno a la especie por hibridación y retrocruza repetida (Anderson, 1949; Rieseberg y Soltis, 1991). El estudio de la introgresión es central en especies que evolucionan bajo este proceso, ya que si existe introgresión en las poblaciones las variantes genéticas deben exceder a las que se producen por

mutación (Anderson, 1949, Rieseberg, 1995). Es decir, se esperaría mayor variación genética en poblaciones híbridas que en las parentales. Con base en esta visión, se puede ir reconstruyendo la dinámica histórica de su origen y especiación.

Mecanismos

La hibridación entre dos especies resulta en dos mecanismos de aislamiento que son genéticamente inestables: el mantenimiento del híbrido y la recombinación del híbrido (Templeton, 1981).

1) El mantenimiento del híbrido es donde la hibridación de dos especies parentales es seguida por selección para el mantenimiento del estado híbrido. Tales mecanismos incluyen ciertos tipos de partenogénesis en animales y la poliploidía en plantas que es muy común en ellas (Ridley, 1996).

La poliploidía se define como hibridación seguida de duplicación cromosómica en los híbridos (Ridley, 1996). Los poliploides han sido clasificados como alopoliploides y homopoliploides. Los primeros son poliploides que tienen duplicación de diferentes grupos de cromosomas, ya sea de dos o más parentales, mientras que los homopoliploides son poliploides que producen duplicaciones de un grupo básico de cromosomas (Avisé, 1994). Los poliploides se forman comúnmente por un gameto femenino diploide fertilizado por un gameto masculino haploide con la producción de un triploide (Dewet, 1979). El triploide tiende subsecuentemente a producir gametos femeninos triploides que son fertilizados por gametos masculinos haploides formando un tetraploide. Estos dos pasos pueden estar separados en el tiempo por reproducción asexual o vegetativa lo que origina grandes zonas formadas por clonas de tetraploides adaptados a condiciones ecológicas diferentes a las especies parentales (Harrison, 1990). Además, si la fertilización y reproducción sexual son completamente restauradas en el triploide, la especie puede ser estructuralmente diploidizada, ya que en alguna instancia la diploidización arraiga dentro de los genes preexistentes de las especies parentales diploides (Waines, 1976). También la diploidización puede ocurrir por la inactivación o divergencia del gen duplicado (Ferris *et al.*, 1979).

2) En la recombinación del híbrido, también llamada especiación por recombinación (Grant, 1981), el rearrreglo cromosómico al azar en generaciones posteriores a la hibridación puede formar poblaciones que son homocigas para una nueva combinación de cromosomas (sin duplicación de cromosomas). La nueva población híbrida pueden ser fértil y estable y tener la misma ploidía que los progenitores y puede ser parcial o totalmente aislada de los progenitores (Rieseberg y Noyes, 1998). Esto es establecido después de que varias generaciones de híbridos

se originan por autofecundación y por retrocruza (< 10 generaciones). Aunado a este modelo existen otros factores que juegan un papel importante en la especiación por recombinación y son selección para los híbridos más fértiles o viables, rápida evolución cromosomal y la disponibilidad de habitats para el establecimiento de las especies híbridas (Rieseberg y Noyes, 1998).

Actualmente se han documentado algunos casos que siguen este tipo de patrón de especiación por recombinación, donde la hibridación no tiene repercusiones en la ploidia de las especies (especiación por recombinación). Uno de estos trabajos es el reportado por Gallez y Gottlieb (1982), en *Stephanomeria diegenensis*, que es una planta anual diploide nativa del Sur de California originada por la hibridación natural entre dos especies diploides: *S. exigua* y *S. virgata*. Encuentran que *S. diegenensis* tiene caracteres morfológicos y cariotipos intermedios entre las dos especies. De manera similar, otro estudio que se realizó en el híbrido *Iris nelsonii* también se comprobó la hibridación por recombinación con base en el análisis de isoenzimas y otros marcadores del ADN nuclear. La especie tiene una morfología, incluyendo color y complementos de cromosomas que muestran similitud con *I. fulvia*, *I. hexagona* e *I. brevicaudis* (Arnold *et al.*, 1990b, 1991). Otro ejemplo muy interesante lo describen Wang y Szmidt, (1990) y Wang *et al.*, (2001). Ellos hacen estudios sobre el origen y evolución de *Pinus densata* por hibridación entre *P. tabulaeformis* y *P. yunnanensis*, con base en el uso de ADN de cloroplasto y de isoenzimas, encuentran que *P. densata* se originó en el terciario por una hibridación ancestral y que comparte fragmentos que son diagnósticos para cada una de las especies parentales. Un aspecto muy interesante que se menciona es que actualmente *P. densata* vive en elevaciones que son superiores a las que se distribuyen las especies parentales (2, 700 a 2, 900 msnm), que está aislada reproductivamente de las especies parentales y que es una especie completamente fértil.

Cabe mencionar que aunque la literatura reporta otros casos donde la ploidía no es alterada al originarse una especie por hibridación, en muchos de ellos la especiación por hibridación requiere de varias etapas de incorporación de material genético por hibridación introgresiva. Uno de los ejemplos que muestra complejas rutas de la dinámica de la introgresión vía flujo genético citoplasmático es el estudio del género *Salix*, sección *Longifolia* (Brunsfeld *et al.*, 1992). Brunsfeld y sus colegas documentan no menos de cuatro ejemplos de captura de cloroplasto en esta sección, utilizando sitios de restricción (RFLP's). Uno de los ejemplos más intrincados es el que se documenta en la especie *S. taxifolia*, que se asemeja mucho a *S. Interior* en varios caracteres. Resultados moleculares revelan que las poblaciones analizadas presentan un ADN de cloroplasto de *S. interior* y posee una mezcla de caracteres de otras especies de *S.*

exigua y *S. nielanopsis*, otros dos miembros de la sección. Por otra parte, la población que se ubica en David California de *S. taxifolia* hibridiza con *S. Goodigii*, un miembro de otra sección *Humboidilanae* la cual ha su vez, se distribuye en simpatria con *S. Laxifolia*. Una hipótesis que plantean es que se dió flujo genético dentro de una población relictual de *S. taxifolia* por dispersión de semillas por el viento de una población vecina de *S. interior* y posiblemente por el resultado de introgresión de más de cuatro especies de sauces.

ESPECIACIÓN POR HIBRIDACIÓN

Dinámica de la especiación

Ahora bien, cuando se están estableciendo recombinantes entre dos especies, la dinámica de la especiación por hibridación puede diferir dependiendo de la distribución geográfica de las especies, de las condiciones ecológicas y genéticas de las especies progenitoras como del híbrido. En esencia, se inicia una divergencia en dos vías, i) por el aislamiento genético causado por un efecto fundador del híbrido y ii) a través de la formación de zonas de hibridación por la incorporación de material genético ajeno a la especie, es decir por hibridación introgresiva (Reiseberg *et al.*, 1996).

i) La especiación por hibridación puede ser causada por un efecto fundador del híbrido, donde la dispersión juega el principal papel dentro del proceso de especiación (Birky, 1988). Un probable escenario sería la introducción de semillas híbridas dentro de una población pura de una especie parental. Estas semillas se pueden establecer por medio de selección y originar una nueva población de individuos híbridos (Hewitt, 1988; Rieseberg *et al.*, 1996).

ii) Las zonas de hibridación son áreas de contacto entre dos diferentes, formas, razas, o especies en las cuales la hibridación tiene lugar y donde las especies puras o parentales se distribuyen fuera de la zona de interacción (Ridley, 1996). Esta definición es intencionalmente amplia e incluye especies híbridas con distribución en simpatria (asociadas con diferentes habitats o recursos) como con especies híbridas con distribución parapátrica. Esto es, con distribución restringida a parches, habitats con condiciones microambientales específicos (Harrison, 1990). Algunos de los modelos que han sido aplicados comúnmente a especies de plantas son;

- Modelo de zonas de tensión, en el cual se implica que la selección endógena actúa en contra de los híbridos (Key, 1968; Barton, 1979; Barton y Hewitt, 1985). Las zonas de hibridación son mantenidas por un balance entre selección y dispersión de individuos de ancestría mezclada.

- Modelo de reforzamiento, Howard (1993), describe al concepto de reforzamiento como el proceso por el cual barreras de aislamiento reproductivo precigóticas en zonas de traslape o hibridación, accionan como una respuesta de selección contra la hibridación. Esto es, el modelo está basado, al igual que el anterior, en selección endógena contra el híbrido.

- Modelo de mosaico o de parches (Harrison, 1986), donde la estructura interna de la zona de hibridación es muy compleja, reflejando una distribución de hábitat y recursos en forma de parches (Harrison, 1986; 1990; Howard, 1986). En este caso, la variación que se observa depende de la habilidad de dispersión de los organismos relativo a la escala espacial de ambientes heterogéneos.

- Modelo de superioridad del híbrido (Moore, 1977), que es muy parecido al anterior a diferencia de que en este, la adecuación de los híbridos es superior a la de los parentales pero solo en zonas específicas (ecotonos, parches). Además este modelo está basado en selección exógena.

- Modelo de novedad evolutiva (Arnold, 1997). Propuesta que se ha hecho muy recientemente, que plantea que la dinámica de las zonas de hibridación toman igual importancia ambos componentes, selección y la adecuación de los híbridos. Este concepto puede explicar la frecuente pero inexplicable ocurrencia de hibridación en zonas amplias, como en rangos de mosaico o parche (ecotonos o habitats en disturbio), así como la hibridación ancestral. Es decir, conjunta todos los modelos anteriores, así como patrones de introgresión que no habían incluidos antes pero que están presentes en la naturaleza de manera heterogénea y que pueden ser ampliamente complejos. Por ejemplo, Martín y Cruzan (1999), sustentan la hipótesis de que una continua y extensa hibridación, es el resultado de una adecuación elevada de los híbridos, la cual produce una zona de hibridación que se expande donde los híbridos desplazan a los genotipos parentales. Tales estudios sobre poblaciones naturales fortalecen la idea de que la hibridación es fuente de riqueza de variabilidad genética, capaz de originar nuevas adaptaciones.

Dinámica de la hibridación introgresiva

La dinámica de la introgresión puede ser muy variable, ya que depende en gran medida del ambiente y de la arquitectura genética de las especies. La hibridación introgresiva puede ser asimétrica (unidireccional de una especie a otras especies) o simétrica (ambas direcciones entre especies) y resultar o concluir en un proceso de especiación que da origen a una nueva especie, a la extinción de alguna de las especies parentales o a la extinción de los híbridos (Rieseberg *et al.*, 1996):

1) La introgresión asimétrica es dependiente o independiente del ambiente, de la adecuación muy alta de algunas poblaciones, y de una constante adición de material genético a la especie con baja adecuación (Leheman *et al.*, 1991). Un ejemplo lo encontramos en el trabajo realizado por Bucci *et al.*, (1998) donde describen la variación genética y la hibridación natural entre tres especies de pino del complejo Halapensis (*P. halapensis*, *P. brutia* y *P. eldarica*) con base en nueve microsátélites de cloroplasto. Ellos analizan la frecuencia de la introgresión entre las especies de una zona de simpatria, y encuentran valores importantes de hibridación introgresiva entre *P. halapensis* y *P. brutia*. Detectaron 10 haplotipos específicos de *P. brutia* y 3 de *P. halapensis*. Ningún haplotipo de *P. brutia* fue detectado en individuos de *P. halapensis*, sin embargo si se detectaron haplotipos de *P. halapensis* en individuos de *P. brutia*, incluso, el análisis del gametofito y del embrión de semillas de *P. brutia* también presentó haplotipos de *P. halapensis*. Este tipo de resultado permitió el planteamiento de una hipótesis de introgresión asimétrica o unidireccional, donde se menciona que las semillas de *P. brutia* fueron polinizadas por polen de *P. halapensis*. Sin embargo, este estudio no hace un análisis de la dinámica de la introgresión o de la sobrevivencia de los embriones híbridos. En general, estos tópicos son analizados de manera muy escasa y en la mayoría de los casos reportan la existencia de la hibridación introgresiva sin profundizar en la dinámica histórica del proceso.

2) La introgresión simétrica comúnmente se inicia con poblaciones híbridas pequeñas que se distribuyen a cualquier lado de las especies parentales. Los híbridos con adecuación alta son seleccionados: se inicia un movimiento de los híbridos a sitios adyacentes disponibles, si continúan con una adecuación alta, se repite el proceso hasta originar un nuevo tipo o especie (García y Davis, 1994). Un ejemplo de introgresión simétrica se detectó en poblaciones naturales de *Typha* (plantas herbáceas clonales) (Kuehn *et al.*, 1999). *T. glauca* es una especie nueva que se originó por la introgresión de material genético entre *T. angustifolia* y *T. latyfolia*. *T. glauca* ha sido descrita como una especie híbrida y como un producto de la retrocruza de los híbridos de la F1 con los parentales. Kuehn y sus colegas, analizaron estas hipótesis con el uso de marcadores moleculares (RFLP's y AFLP's), detectando fragmentos específicos de las 7 especies parentales. Ellos concluyen que *T. glauca*, comenzó a formarse en la zona de contacto entre *T. angustifolia* y *T. latyfolia* por la introgresión de material genético bidireccional a principios de siglo XIX, y que la progenie revela una generación avanzada de hibridación (opuesto a la hipótesis de la primer generación de híbridos, F1). También revelan segregación en los patrones de los marcadores utilizados, lo que da solidez a la hipótesis de ser individuos de una nueva especie híbrida, es decir, se presentaron bandas propias de los híbridos y bandas compartidas entre las especies parentales. Estos individuos forman un enjambre de híbridos dentro de la zona de

contacto, y son capaces de ocupar el hábitat de cualquiera de las dos especies parentales (Waters y Shay, 1990).

Hibridación introgresiva nuclear versus citoplasmática

En este punto es de suma importancia considerar que los mecanismos de hibridación introgresiva pueden ser variables y depender en gran medida del material genético que ha sido hibridado. Esto es, si se ha presentado una recombinación de genes entre dos especies que tienen repercusiones a nivel del ADN nuclear, o bien, se ha incorporado a otra especie por vía citoplasmática (Rieseberg, 1995; Rieseberg *et al.*, 1996).

Estudios detallados de zonas de hibridación han demostrado incongruencias por evolución diferencial de hibridación introgresiva nuclear versus citoplasmática (Rieseberg *et al.*, 1996). No es sorprendente considerar que la selección, el ligamiento genético y la deriva genética estén probablemente afectando diferentes marcadores de diferentes maneras (Rieseberg y Ellstrand, 1993). Desde una perspectiva filogenética, las zonas de hibridación pueden ser descubiertas por incongruencias filogenéticas. En efecto, muchos de los estudios filogenéticos que se han reportado incluyen estudios detallados de zonas de hibridación responsables de las discordancias filogenéticas observadas, y las explicaciones de dichas incongruencias han sido planteadas de dos maneras, i) hipótesis que se aplican primeramente a introgresión diferencial entre el ADN citoplasmático y nuclear (del número efectivo de alelos, de dispersión, de asimetría, de esterilidad del híbrido masculino, de efecto fundador), e ii) hipótesis que explican la distribución de marcadores especie-específicos para ambos genomas citoplasmáticos y nucleares (selección, ligamiento, deriva genética, conversión de genes).

Aunque varias de estas hipótesis están interrelacionadas y no se excluyen mutuamente, algunas de ellas parecen ser más críticas para explicar la introgresión diferencial de genomas citoplasmáticos y nucleares. Por ejemplo, la hipótesis de selección actúa fuertemente en genes nucleares pero no en genes citoplasmáticos (Powell, 1983; Barton y Jones, 1983; Whittemore y Schaal, 1991). Esta hipótesis es más probable si la interacción epistática dentro de genomas nucleares es fuerte, y por tanto, la rápida eliminación del genoma nuclear donado en cruza interespecíficas es la regla (ver Rich, 1963). También si existe un fuerte ligamiento genético o una marcada desventaja del heterócigo, la introgresión de alelos neutrales o ventajosos es mínima o nula (Rieseberg *et al.*, 1996). Otra de las hipótesis crítica y generalizada, es la herencia asimétrica de genomas citoplasmáticos, que resultan de patrones de dispersión de polen y de semillas muy distintos, dando lugar a patrones de introgresión para marcadores nucleares y citoplasmáticos (e.g., Arnold *et al.*, 1991).

AVANCES TEÓRICOS Y METODOLÓGICOS

Predicciones teóricas

La actual búsqueda del papel que juega la hibridación en el origen y evolución de especies ha arrojado interesantes avances teóricos y metodológicos. Por ejemplo, dentro del campo de la sistemática molecular se han hecho estudios filogenéticos a través del análisis nuclear o citoplasmático entre poblaciones, especies y géneros (Rieseberg *et al.*, 1988, Wendel y Albert, 1992; Rieseberg, 1995) y se ha demostrado que la hibridación no sólo es un proceso ampliamente distribuido en la naturaleza, sino que también tiene importantes implicaciones en la interpretación de filogenias. Esto es, al incluir especies híbridas en los análisis filogenéticos en muchos casos se generan topologías ambiguas donde se considera que las especies son originadas por más de un ancestro.

Un ejemplo claro de lo anterior se encuentra en el estudio del género *Helianthus* (girasoles), donde las filogenias obtenidas con el uso de ADN de cloroplasto contrastan significativamente con las filogenias obtenidas con caracteres morfológicos y con genes nucleares del ADN ribosomal (Rieseberg y Soltis, 1991). Al corroborarse este tipo de fenómenos se ha requerido del análisis de más de un gen o de una sola región del ADN, ya que los procesos evolutivos a nivel de genes son en muchos casos diferentes a los procesos que se presentan a nivel de especies por lo que los análisis filogenéticos están siendo reevaluados, separando los conceptos teóricos y metodológicos para el análisis filogenético de árboles de especies y de genes (Hudson, 1990; Templeton, 1992; Templeton y Sing, 1993).

Además, la comprobación experimental de los procesos de hibridación e introgresión han sido de gran impacto sobre las teorías evolutivas, dando pauta al planteamiento de una nueva teoría acerca del origen y evolución de las especies, llamada evolución reticulada (Avice, 1994; Rieseberg, 1995). En este tipo de evolución las especies se originan de diferentes ancestros donde las topologías forman una red anastomosada de relaciones polifiléticas. Si esta teoría fuera probada en muchos grupos o taxa que contienen especies de origen híbrido podrían comprometer seriamente las reconstrucciones filogenéticas basadas en un número pequeño de caracteres o aquellas generadas sobre las hipótesis de cladogénesis en un sentido estricto (Rieseberg, 1995).

Marcadores moleculares SSRs (microsatélites)

Algunos de los marcadores genéticos que son recomendados ampliamente para hacer estudios de hibridación introgresiva son RFLP's, AFLP's, SRR's (microsatélites) de cloroplasto y nuclear (Schaal *et al.*, 1991; Rieseberg y Soltis *et al.*, 1991; Rieseberg, 1995). Sin embargo,

recientemente los microsatélites han tomado ventaja sobre los otros marcadores genéticos debido a que: i) tienen el más alto grado de polimorfismos, ii) estos loci segregan de manera Mendeliana y son codominantes, iii) tienen un solo locus genético por microsatélite, iv) se considera que los microsatélites mutan una base en cada cambio y siguen el modelo de mutación de un paso (SMM), v) son selectivamente neutros y por tanto, compatibles con los supuestos de la genética de poblaciones (Golstein y Pollock, 1994, Vendramin *et al.*, 1996). Por ello tienen una base teórica sólida que sustenta la posibilidad de realizar análisis finos de la historia de los genes. Para trabajar con SRR's se requiere de conocer la secuencia: que incluye una región repetitiva bien definida (el microsatélite) responsable de la variación observada y que además es homóloga para diferentes especies o incluso géneros (Golstein *et al.*, 1995a). Esto es, los microsatélites son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí (Vendramín *et al.*, 1996). Esta condición es necesaria para hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo.

Aunado a esto, al ser los microsatélites altamente polimórficos, pueden ser ventajosos con relación al uso de secuencias. Por un lado se debe de analizar con precaución la variación que se ha encontrado en secuencias de regiones del ADN nuclear, ya que esta se puede haber generado por duplicaciones, o por la presencia de familias multigénicas (Rieseberg, 1991). Esto último genera un alto grado de homogeneidad dentro y entre especies, proceso conocido como "evolución concertada". Estos fenómenos pueden distorsionar la historia evolutiva de los organismos bajo estudio y confundir sus relaciones filogenéticas (Rieseberg *et al.*, 1991b). Es decir, se pueden presentar aparentes reticulaciones, o escenarios de hibridación introgresiva en donde no la hay. Por otro lado, estudios que analizan secuencias para estudios intraespecíficos en el ADN citoplasmático (ADN de cloroplasto o mitocondrial) tienen niveles bajos de variabilidad y la información que se obtiene a nivel intraespecífica es muy limitada (Schaal *et al.*, 1991).

Por todo lo anterior, el presente estudio fue realizado con los marcadores moleculares microsatélites tanto de cloroplasto (N), como nucleares (2N). Estos marcadores fueron considerados como los óptimos para obtener información comparativa para ambas regiones del ADN, detectar la introgresión entre especies, conocer los mecanismos o dinámica del movimiento de genes entre las poblaciones de las especies y lograr reconstruir su historia evolutiva.

Métodos de análisis

Dentro de los métodos de análisis también se han desarrollado programas específicos que permiten hacer inferencias probabilísticas del flujo genético interespecífico, reconstruir la

historia de la introgresión en el pasado y hacer predicciones del proceso.

Uno de estos métodos es el desarrollado por Barton y Baird (1996), en el cual se analizan datos de alelos o de las frecuencias alélicas. Barton y Baird juntan los conceptos de modelo estadístico e hipótesis estadística para obtener una descripción en términos probabilísticos de los procesos por los cuales se suponen las observaciones generadas. Algunas de las estimaciones que genera son la estructura genética dentro y entre poblaciones, desequilibrio de ligamiento, diferentes modelos de clinas de hibridación con base en diferentes hipótesis (hipótesis de una dimensión, monotónica, barreras físicas, entre otras).

Otro programa que también se ha desarrollado es el RETICLAD de Morenfield (1996). A diferencia del método anterior este programa se basa en métodos cladísticos o de parsimonia. Este método ha sido más utilizado para hacer inferencias filogenéticas de taxa supraespecíficos, pero podría funcionar bien para hacer inferencias de reticulaciones de poblaciones híbridadas de diferentes especies.

Finalmente, se han utilizado secuencias de regiones específicas del genoma, como microsatélites y RFLPs para detectar la dinámica histórica de la hibridación introgresiva sobre una genealogía de genes. El análisis de dichas genealogías está basado en una teoría de la genética de poblaciones que se ha desarrollado recientemente, llamada teoría de la coalescencia (Tavaré, 1984; Watterson, 1984; Hudson, 1990). Esta teoría se basa en el análisis filogenético de eventos evolutivos que sucedieron en el pasado a nivel de poblaciones (Crandall y Templeton, 1993). Un árbol de genes muestra cuales genes son más relacionados con otros y el tiempo en el cual ocurrieron los ancestros más comunes de los genes actuales (Hudson, 1990). Cuando los linajes de una población se juntan o “coalescen” dentro en un ancestro común, se conoce como la coalescencia (Kingman, 1982 a; Hudson, 1990), y la edad de este ancestro común se conoce como el tiempo de coalescencia. Para un gen, todos los diferentes alelos de una población tienden a coalescer, ordenando o reconstruyendo así la historia de las poblaciones. Actualmente, existen varios programas que pueden ayudar a realizar estas reconstrucciones como el “TCS “ de Clement *et al.*, (2001), que proporciona información de las topologías generadas con base en parsimonia con confiabilidad igual o superior al 95% . Además, la genealogía generada puede ser correlacionada con la distribución geográfica de los diferentes genes o haplotipos, realizando un análisis de anidamiento sumamente fino de la relación genealógica y geográfica, así como de las inferencias de los posibles procesos evolutivos que dieron origen a esa dinámica, como, el flujo genético, barreras geográficas, aislamiento por distancia entre otras (Templeton y Sing, 1993; Templeton *et al.*, 1995; Posada *et al.*, 2000). A esto se le conoce como análisis filogeográfico.

Los procesos genealógicos dependen de factores demográficos que son los que nos van a hablar de las mutaciones que son fijadas o perdidas por selección a través de la historia de una población, y que por tanto, nos permiten proyectar un escenario histórico de las poblaciones. Sin embargo, para realizar una reconstrucción de la historia ancestral de haplotipos dentro de linajes particulares se requiere del uso de genes que tengan tasas de mutación constantes sobre modelos de mutación neutrales. Es decir, que para reconstruir la historia de las relaciones ancestrales el marcador genético no debe de estar influenciado por recombinación, selección o migración, de tal manera que nos hablen únicamente de la historia de los linajes, y que sin embargo nos permita hacer inferencias de la historia de los procesos genealógicos, que dependen fuertemente de factores como el tamaño de las poblaciones, de la estructura geográfica y de la selección.

Actualmente se han realizado varios estudios con base a los análisis de coalescencia utilizando secuencias y sitios de restricción (Templeton y Sing, 1995; Matos, 1992; Matos y Schaal, 2000), así como de datos de microsatélites (Cooper *et al.*, 1996; Malaspina *et al.*, 1998; Wilson y Balding, 1998). Uno de estos trabajos es el realizado por Matos y Schaal (2000), el cual trata de documentar eventos de hibridación introgresiva entre *Pinus montezurnae* y *P. hartwegii*. Para ello hacen un análisis de coalescencia con base a sitios de restricción del ADN de cloroplasto, y demuestra que la hibridación entre estas especies resulta por la captura de cloroplasto entre ambas especies. Este evento es proyectado en una reconstrucción genealógica de familias de haplotipos agrupados no dentro de las especies, si no entre regiones donde las poblaciones de las dos especies crecen asociadas. Sin embargo, la introgresión no fue reportada significativamente. No encontró muchos polimorfismos y las frecuencias de los polimorfismos más ancestrales fueron bajas. La reconstrucción de la genealogía no proporcionó resultados que nos hablen a cerca del proceso histórico de la introgresión, por lo que el aspecto central del trabajo fue la aplicación de los análisis de coalescencia y de métodos robustos para corregir árboles de genes sobre aspectos de hibridación.

Como sabemos, los microsatélites nucleares (nSSR), son regiones recombinantes para las que la teoría de coalescencia requiere de métodos indirectos y ser aplicada y los microsatélites de cloroplasto (cpSSR) no son recombinantes y cumplen con todos los supuestos de dicha teoría. Por tanto, el presente trabajo se realizó con dos aproximaciones generales, i) se usó la teoría clásica de la genética de poblaciones para el estudio de la hibridación introgresiva con ambos marcadores genéticos, y 2) las bases teóricas y metodológicas de la coalescencia fueron aplicadas en el estudio de la dinámica histórica de la hibridación introgresiva con base a cpSSR.

Las especies de estudio

Little y Crichfield (1969) clasifican a *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* dentro de la denominada Subsección Ponderosae, incluyendo en este grupo taxonómico a tres reconocidos "complejos de especies", Ponderosa (complejo que incluye a *P. arizonica*, *P. engelmannii*, *P. jeffreyi*, *P. durangensis* y *P. ponderosae*), Pseudostrobus (incluye a *P. pseudostrobus* la variedad *apulsensis*, las formas *protuberans* y *megacarpa*), y Montezumae (incluye a *P. douglasiana*, la variedad *lindleyi*, la forma *megacarpa*, *P. cooperi* y *P. martinezii*). Especies para las que Van der Burgh (1973), y posteriormente Farjon y Styles (1997) forman dos grupos dentro de la subsección Pseudostrobi, excluyendo al complejo Ponderosa. La delimitación de las especies en estos grupos sigue siendo compleja aun con los estudios cladísticos de caracteres morfológicos que realizaron. Algunas de las observaciones que se obtuvieron fueron que ambas especies forman un grupo monofilético, comúnmente relacionado con *P. devoniana*, *P. douglasiana*, *P. lumholtzii* y *P. maximinoi*.

P. pseudostrobus fue descrita por Martínez en 1948 como una árbol de 15 a 25 m de altura, con ramas extendidas y verticiladas. Acículas agrupadas en fascículos de 5, triangulares y flexibles. Los canales resiníferos son de 2 a 3. Las vainas persistentes, anilladas de 12 a 15 mm de longitud, las yemas son oblongas cónicas de color anaranjado. Los conos son ovoides o largamente ovoides, de 8 a 10 cm, a veces más, de color café claro, amarillentos o morenos, extendidos muy levemente encorvados, no pronto caedizos (fig. 1a). Las semillas son de forma vagamente triangular, oscuras de unos 6 mm y ala de 23 mm de largo por 6 a 9 mm de ancho.

Esta especie se encuentra distribuida a lo largo de la Sierra Madre Oriental, del Sur de Chiapas y parte de la Sierra Madre Occidental, introduciéndose a la mesa central de Guatemala (Perry 1991) (Fig. 2). No obstante, Eguiluz (1978), menciona que puede llegar su distribución hasta Nicaragua. En México su distribución queda ubicada entre los paralelos 17° 15' a 29° 25' de latitud Norte y meridianos de 92° 05' a 108° 35' de longitud Oeste. Se le ha encontrado en diferentes localidades de los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y el D.F. (Eguiluz 1978). La especie tiende a formar masas puras y asociadas a otras especies de pinos y latifoleadas como *P. chiapensis*, *P. ayacahuite*, *P. oocarpa*, *P. patula*, *P. montezumae*, *P. cembroides*, *P. rudis*, *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, además de *Abies religiosa*, *Quercus* sp, *Arbutus* sp, *Buddleia* sp, *Alnus* sp, y *Dasylyrion* sp, entre otras (Eguiluz, 1978). Prospera en un rango altitudinal muy amplio, desde los 1600 msnm en Nuevo León hasta los 3350 msnm, pero sus mejores calidades de estación se observan alrededor de los 2500 msnm, como son el Estado de México, Puebla, Morelos, e Hidalgo. Los suelos son profundos, de color café oscuro y generalmente con buenas condiciones de humedad.

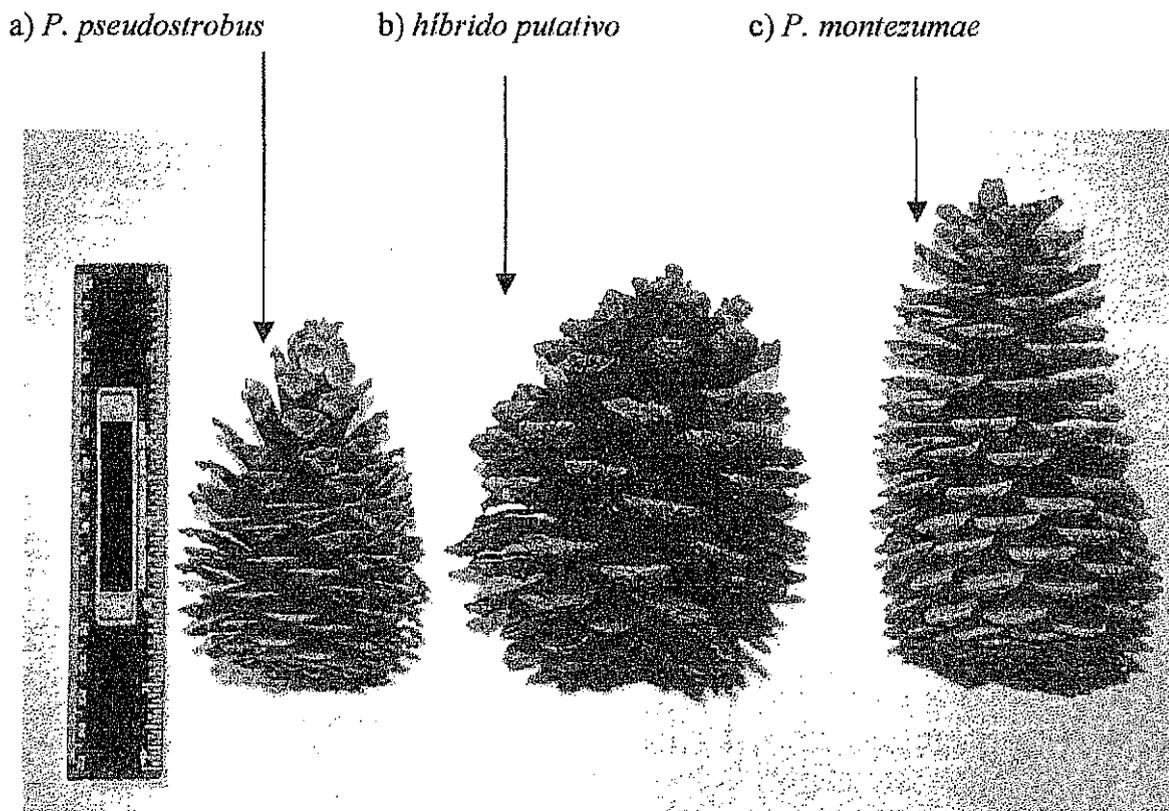


Figura 1. Morfología de conos de a) *P. pseudostrobus* de la población P51 en Oaxaca, b) individuo de una población de híbridos putativos en Michoacán, y c) *P. montezumae* en Tlaxcala.

P. montezumae es un árbol de 20 a 35 m de altura, con diámetros de 30 a 70 cm. La corteza es morena rojiza con ramas gruesas y extendidas. Hojas en grupos de 5 rara vez 4, anchamente triangulares. Los canales resiníferos varían de 3 a 6, a veces 8 o más. Los conos son largamente ovoides, ovoides cónicos u oblongos cónicos, de 8.5 cm a 15 cm de largo, caedizos (Fig. 1c).

La especie se distribuye en el Eje Neovolcánico, Sierra Madre Oriental, al Norte y en el Sur y Sureste de país; adentrándose a las montañas de Guatemala. Queda ubicada entre los paralelos 16° 50' a 25° 20' de latitud Norte y meridianos 92° 15' a 105° 10' de longitud Oeste (Fig. 2). Habita en varios sitios de los estados de Coahuila, Colima, Chiapas, Distrito Federal, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Tlaxcala (Eguiluz, 1978). Frecuenta un rango latitudinal muy variable de 1150 a 3500 msnm, y al igual que *P. pseudostrobus*, sus mejores calidades de estación se ubican alrededor de los 2500 msnm. La especie forma masas puras extensas, pero comúnmente se asocia con *P. ayacahuite* con su

variedad *veichii*, *P. douglasiana*, *P. leiphylla*, *P. lawsoni*, *P. mochoacana*, *P. rudis*, *P. hartwegii*, y *P. teocote*, con *Abies religiosa*, *Cupressus lindleyi*, *Alnus* y *Quercus sp.*

Esta especie presenta gran variabilidad, principalmente de los caracteres morfológicos de conos y acículas (Perry, 1991) este hecho, aunado a la presencia de formas intermedias entre esta especie y *P. pseudostrobus* hacen difícil su identificación. Los dos taxa crecen juntos en diferentes zonas y las poblaciones conformadas con individuos híbridos fértiles es común (Perry, 1991) (Fig. 1b). En México, estos sitios son generalmente localizados en el Eje Neovolcánico, en el estado de México, (INIFAP., com pers., Nepamuseno), Chiapas, Guerrero Colima y Michoacán (hacia Zitácuaro, Angangué, Pátzcuaro y Uruapan) (Perry, 1991) (ver Fig. 2). Aparentemente, *P. montezumae* puede hibridizar con otras especies como *P. rudis* y *P. hartwegii* (Perry, 1991: Matos y Schaal, 2000), en el estado de Nuevo León, y en Hidalgo, con *P. michoacana* (Perry, 1991). El diagnóstico de las formas híbridas entre las dos especies en estudio, no es intermedio, ya que se presentan individuos con conos de *P. montezumae* y acículas de *P. pseudostrobus* o viceversa, conos de *P. montezumae* pero pequeños y acículas de *P. pseudostrobus*, es decir se presenta un gradiente o mosaico de variación morfológica entre estas dos especies. En este sentido, estos sitios de hibridación natural son una oportunidad para desarrollar estudios básicos y aplicados para la implementación de estrategias de conservación de probables sitios de diversificación genética, esta información puede ser aplicada para el mejoramiento genético de las especies, el hecho de que las cruza artificiales que se han realizado entre estas dos especies por el Instituto de Genética Forestal en California, hayan sido exitosas, indica que la hibridación de las mismas en condiciones naturales es posible.

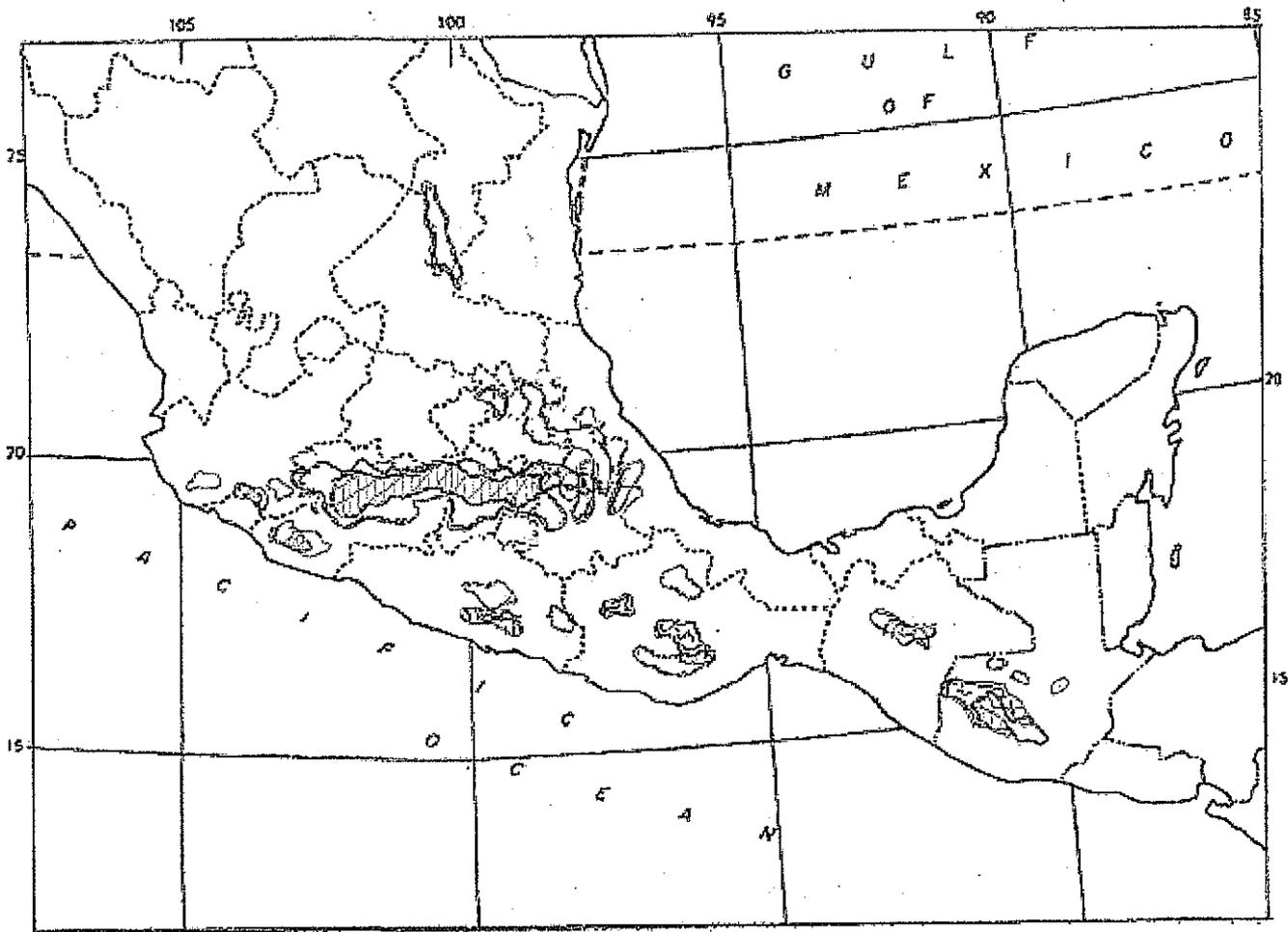


Fig. 2. Distribución geográfica de las poblaciones naturales de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* en México y Guatemala de acuerdo a Perry (1991). Las líneas en azul representan las áreas de distribución de *P. pseudostrobus*; las líneas en rojo representan las áreas de distribución de *P. montezumae*, y las líneas en gris y verde, representan las áreas de translapo de ambas especies.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Justificación:

Como se mencionó anteriormente, una de las hipótesis del origen de varias especies del género *Pinus* esta relacionada con la hibridación introgresiva, para la cual existen varios estudios tanto artificiales como de poblaciones naturales que han demostrado su importancia dentro de la evolución del género. Sorprendentemente, y a pesar de que para México se han propuesto a varias especies originadas por introgresión por ejemplo, *P. ayacahuite* y sus variedades (Critchfield, 1986; Perry, 1991), *P. quadrifolia* (Lanner, 1974), *P. pseudostrobus*, *P. montezumae*, *P. hartwegii*, *P. douglasiana*, *P. michoacana* (Critchfield, 1986; Perry, 1991; Matos y Schaal, 2000), *P. maximartinezii* (Ledig, 1998), no existen estudios a nivel molecular que lo demuestren, a excepción del trabajo de Matos y Schaal (2000), en el cual se detectó la introgresión entre *P. montezumae* y *P. hartwegii*, especies morfológicamente diferentes. Por tanto el presente estudio tiene gran relevancia, ya que por un lado, puede funcionar como un sistema base para el estudio de la hibridación introgresiva en especies de pinos mexicanos que están conformadas por varios linajes evolutivos, como podrían ser formas o variedades, así como de especies originadas por dicho proceso (como podría ser *P. quadrifolia*). Por otra parte, el sistema de estudio que se seleccionó puede permitir la reconstrucción fina de la dinámica de la introgresión ya que las especies están representadas tanto por poblaciones simpátricas como alopátricas, factor que es primordial para la implementación de métodos de análisis que permitan hacer una reconstrucción clara de la historia del proceso.

Hipótesis

- Existen diferentes grados de introgresión natural entre las poblaciones alopátricas y simpátricas de las especies de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*. Se esperaría que las poblaciones simpátricas presentaran los valores más altos de variación genética (mayor polimorfismo y heterocigosis), lo cual es evidencia de hibridación introgresiva.
- Existe una importante estructura genética entre las poblaciones de posibles híbridos y las parentales. Como la mayoría de las poblaciones posibles híbridas se encuentran distribuidas a través del eje Neovolcánico, se esperaría obtener valores importantes de estructura genética (> 0.15) entre estas poblaciones y las parentales que se encuentran distribuidas en otras zonas de alopatria.
- Si la mayoría de las poblaciones que representan a estas dos especies se distribuyen en simpatria se esperaría que la dinámica de la introgresión fuera bidireccional. En este caso se

obtendrían patrones de relaciones filogenéticas que no agrupen a las poblaciones puras de cada especie.

- Las poblaciones clasificadas morfológicamente como posibles híbridas tienen un origen filogenético de una u otra especie en estudio. Se esperaría obtener información que permita catalogar filogenéticamente a estas poblaciones como originales de alguna de las especies.
- Existe una relación significativa entre los datos morfológicos y moleculares los cuales reflejan patrones de introgresión. Se esperaría que los datos morfológicos representen las mismas agrupaciones de las diferentes poblaciones con respecto a las agrupaciones que se obtengan tanto con datos moleculares de cloroplasto como de ADN nuclear.

Objetivo general:

En este trabajo se pretendió estudiar los posibles mecanismos y dinámicas de evolución por hibridación introgresiva entre dos especies del género *Pinus* de amplia distribución geográfica en México y Guatemala (*P. montezumae* y *P. pseudostrobus*), con base en datos morfológicos y moleculares (microsatélites de cloroplasto y nucleares).

Objetivos específicos:

- Determinar la existencia de eventos de hibridación introgresiva entre las especies en estudio y estimar la contribución genética de las poblaciones parentales y posibles híbridas a la variación y estructura genética de las poblaciones.
- Obtener una genealogía de haplotipos de cloroplasto (cpSSR) para estimar las posibles rutas de divergencia y flujo genético de haplotipos de las poblaciones en estudio, y con ello inferir patrones filogeográficos.
- Conocer la dinámica de la hibridación introgresiva y con ello evaluar la importancia del proceso en la evolución del género *Pinus*.
- Diseñar estrategias de conservación que incorporen la información genealógica y biogeográfica de las poblaciones de mayor introgresión para establecer núcleos prioritarios de conservación.

CAPITULO II

Comparative genetic structure in pines: Evolutionary and conservation consequences

Estructura genética comparada en pinos: Consecuencias evolutivas y para la conservación

**PATRICIA DELGADO¹, ARGELIA CUENCA¹, ANA E. ESCALANTE¹,
FRANCISCO MOLINA-FREANER² & DANIEL PIÑERO¹**

Departamento de Ecología Evolutiva, ¹Instituto de Ecología, Apartado 70-275, México D.F. 04510, México and ²Unidad Regional Noroeste, Departamento de Ecología Funcional y Aplicada, Instituto de Ecología, Apartado Postal 1354, Hermosillo, Sonora 83000, México

Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences

Estructura genética comparada en pinos: consecuencias evolutivas y para la conservación.

PATRICIA DELGADO¹, ARGELIA CUENCA¹, ANA E. ESCALANTE¹, FRANCISCO MOLINA-FREANER²
& DANIEL PIÑERO¹

Departamento de Ecología Evolutiva, ¹Instituto de Ecología, Apartado 70-275, México Distrito Federal 04510, México & ²Estación Regional Noroeste, Departamento de Ecología Funcional y Aplicada, Instituto de Ecología, Apartado Postal 1354, Hermosillo, Sonora 83000, México;
e-mail: pinero@miranda.ecologia.unam.mx

ABSTRACT

Pines have been the focus of several studies that estimate population genetic parameters using both allozymes and chloroplast single sequence repeats (SSRs). Also, the genus has also been recently studied using molecular systematics so that we now have a more clear understanding of their evolutionary history. With this background we studied comparatively the genetic structure in pines. Expected heterozygosity is particularly constant with a 99 % confidence interval between 0.19 and 0.23 in species that have been studied until now using allozymes. There is a significant proportion of species (9/41) that show high population differentiation estimates (F_{ST} = or larger than 0.15) and five of these have large and wingless seeds probably associated with low densities, bird dispersal mechanisms and resistance to water stress. These species include the North American pinyon pines. Outcrossing rates are also constant among species from both subgenus *Pinus* and subgenus *Strobus*, which probably reflects a selective limit to the amount of deleterious alleles that can be maintained in pine species and this also affects inbreeding levels. We also explored the data published using microsatellites in pines and conclude that these markers uncover a higher proportion of variation and genetic differentiation as expected and that the evolutionary models that are used to derive the population genetic structure estimators should take into account other sources of mutation (point mutations, larger insertions and or deletions and duplications) to better understand the comparative applications of these molecular markers.

Key words: *Pinus*, genetic structure, outcrossing rates, microsatellites, allozymes.

RESUMEN

Los pinos han sido el objeto de varios estudios para estimar los parámetros genéticos de la población utilizando tanto aloenzimas como fragmentos repetidos de secuencia sencilla (RSSs) de cloroplasto. Este género también ha sido estudiado recientemente utilizando sistemática molecular de tal manera que ahora tenemos un entendimiento más claro de su historia evolutiva. Con estos antecedentes estudiamos comparativamente la estructura genética de pinos. La heterocigosis esperada es particularmente constante con límites de confianza al 99 % entre 0,19 y 0,23 en las especies que se han estudiado hasta ahora utilizando aloenzimas. Hay una proporción significativa de especies (9/41) que muestran estimados de diferenciación altos (F_{ST} = o mayor que 0,15). De ellos cinco especies tienen semillas grandes y sin alas asociadas probablemente con bajas densidades, dispersión de semillas por aves y resistencia a sequía. Estas especies incluyen a los pinos piñoneros de Norteamérica. Las tasas de entrecruzamiento también son constantes entre especies tanto del subgénero *Pinus* como del subgénero *Strobus* que refleja probablemente un límite selectivo a la cantidad de alelos deletéreos que pueden ser mantenidos en las poblaciones y que afecta también el nivel de consanguinidad. También exploramos los datos publicados usando microsatélites en pinos, concluyendo que estos marcadores muestran una mayor cantidad de variación y diferenciación genética como es esperado y que los modelos de evolución molecular utilizados para derivar los estimadores de la estructura genética de la población deben de tomar en consideración otras fuentes de mutación (mutaciones puntuales, inserciones y deleciones de mayor tamaño y la existencia de duplicaciones) para entender las aplicaciones que desde el punto de vista comparado se pueden hacer con este tipo de marcadores.

Palabras clave: *Pinus*, estructura genética, tasa de entrecruzamiento, microsatélites, aloenzimas.

INTRODUCTION

The development of studies on the genetic structure in plants has been associated with that of the

molecular markers. Studies using allozymes as markers started in the early 1970s and during the next three decades a great amount of data has accumulated (Hamrick & Godt 1990) that have

shown some generalizations. The first one refers to the inverse relationship between outcrossing rates and genetic differentiation (Govindaraju 1988), so that species of tropical trees or trees in general show an outcrossing rate close to one and genetic differentiation estimates (usually estimated through allelic frequencies variance or F_{ST}) very close to zero (e.g., Furnier & Adams 1986, Eguiarte et al. 1993, Ledig 1998).

Hamrick and coworkers (e.g., Hamrick & Godt 1990) have made several generalizations between genetic structure and life history characteristics. An extraordinary homogeneity in expected heterozygosity has been observed. This pattern has been explained in light of Ohta's nearly neutral theory of molecular evolution (Ohta 1995). Also, variation in outcrossing rates has shown a bimodal distribution. Schemske & Lande (1985) first described this bimodality. Other generalizations show that trees, perennial plants and widespread species have larger genetic variation. In particular, most pine species have been studied in terms of their genetic structure and the above results have been confirmed in this genus (Ledig 1998). Some exceptions to the above generalizations are represented by species that are rare or that have passed through a bottleneck like *Pinus torreyana* or *Pinus resinosa*. Contrary to expectations based on their rarity (but see Comps et al. 2001), studies on the genetic structure on Mexican and North American pinyon pines have shown high genetic variation (heterozygosities between 0.216 and 0.220) except for *P. edulis* (0.03, Premoli et al. 1994) and a high population differentiation (F_{ST} between 0.18 and 0.25). This genetic structure coincides with the one found in other rare conifer species like *Picea chihuahuana* (Ledig et al. 1997) and suggests that the outcrossing rate is less than one as found for the few species where it has been estimated (Ledig et al. 1999 for *P. maximartinezii*, Ledig et al. 2001 for *P. pinceana*). These data can now be studied under a phylogenetic approach. In particular, recent phylogenetic studies of pines using molecular markers (e.g., Liston et al. 1999) can be used as a historical framework to ask questions about the origin and adaptive value of the genetic structure.

Pines represent an interesting system to study the effect of different ecological characteristics on the genetic structure. This genus grows naturally in the northern hemisphere and species can be found as far north as in latitude 71° N (e.g., *Pinus sylvestris*), in ecosystems where annual rainfall is only 300-400 mm (e.g., *P. pinceana*), and longevities that reach 2,500 to 5,000 years (e.g., *P. aristata* and *P. longaeva*). The great diversity of environments colonized by this ge-

nus and its local abundance make pines a key ecological element in most temperate forests of the northern hemisphere. Until now 110 species have been described. Seventy one of those species grow in America and about 50 in Mexico.

This paper presents a comparative analysis of pine genetic structure using allozymes and chloroplast microsatellites. In particular, the analysis is presented using a phylogenetic approach incorporating recent molecular systematic data. Furthermore, we explore the relevance and evolutionary implications of the use of microsatellite as a comparative tool to further our understanding of the causes and patterns of the genetic structure of these trees.

MATERIAL AND METHODS

Molecular markers

Different markers have been used in plants and in particular in trees to understand their genetic structure. How well is the genome sampled and how sensitive are they to estimate the genetic variation are the main questions that are usually asked to evaluate their ability to estimate genetic variability. The first answer depends on the way the markers are distributed in the genome and the number of loci that is being used. The second one depends directly on the number of base pairs that are sampled. In pines allozymes have been usually the markers used in most studies. Approximately 50 species have been studied with these markers. In some cases all three basic estimates of population genetic structure have been obtained (expected heterozygosity, genetic differentiation or F_{ST} and outcrossing rates). In all studied species at least an estimate of expected heterozygosity was obtained. Recently, chloroplast microsatellites have been used to study these aspects of the genetic structure and data for at least 10 species have been published. However, no outcrossing rates estimates using nuclear microsatellites have been published. Because of the structure of the data, we restricted our analysis to data on allozymes and chloroplast microsatellites that now represent an important source of information for a comparative analysis.

Allozymes.

These markers have provided most of the data that we have now on the genetic structure of plants in general and particularly for trees. The polymorphisms are based on the differential mo-

bility on a particular electrophoretic support, usually starch. Allozymes sample more with respect to the number of loci used and their sensitivity is about one fourth of the number of bases sampled. That is, only a base change in four is detected in a gel. For example, a study with 20 allozyme loci samples about $(1000 \times 20) / 4$, or 5,000 nucleotides, assuming that an average gene has 333 amino acids. These are codominant markers.

Microsatellites

The single stranded repeats (SSRs) are DNA sequences that are repeated in tandem a number of times. The larger repeats (until 5 Mb) are called satellites. Intermediate repeats (the repeated unit is more than 10 bp and form blocks of 0.5 to 30 kb) are called minisatellites. Microsatellites have repeated units of 1-8 bp and form structures that have 20 to 100 bp. The number of bases sampled with microsatellites depends on the number of loci used but in general is very low because a region of high variation is sampled and to estimate the same amount of variation a much lower number of base pairs are needed.

Evolutionary models and their assumptions

The genetic estimates of heterozygosity and genetic differentiation depend on the genetic model that is assumed to have occurred during the evolution of the molecular markers. An infinite allele model is usually assumed if allozymes or RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) are used but in the case of microsatellite there are good reasons to use a stepwise mutation model based on the way microsatellites are thought to mutate. In particular the model that is thought to be important in these markers is a model based on the slipped-strand mispairing mutation model (Li 1997) that produces an increase or a decrease of a repeat unit (usually a base). Recently many groups have questioned the application of this model based on many factors (Hedrick 1999, Balloux et al. 2000). The first is the possibility of homoplasy or allele convergence. The second refers to the possibility that the mutation mechanism produces alleles that are more than one repeat unit from the original allele. This could happen through insertions or deletions of more than one repeat unit. This process violates the assumptions of the model and makes the estimates biased in the same proportion. As a consequence, both estimates are regularly used, those based on a stepwise mutation model (Ohta &

Kimura 1973, Valdés et al. 1993, Slatkin 1995) and on an infinite allele model (based on the estimation model originally developed by Wright [1949] and Kimura & Crow [1964] and further developed by Weir & Cockerham [1988]).

We used a comparative approach to analyze the genetic data on pines. First we used standard statistical tests to compare the estimates (Sokal & Rohlf 1994). Second we grouped the data with respect to their taxonomic status using the classification proposed by Price et al. (1998). Finally we used a published phylogenetic framework for pines (Liston et al. 1999) to further clarify historical patterns in genetic estimates.

RESULTS

Expected heterozygosity and genetic differentiation

Genetic variation estimated through the expected heterozygosity has been obtained for approximately 50 pine species. Ledig (1998) has published a recent review. For 38 species, both heterozygosity and genetic differentiation (using F_{ST} or G_{ST}) have been published. In all cases allozymes were used as genetic markers. To these data we added some that were not included in Ledig's review (Parker & Hamrick 1996, Delgado et al. 1999, Ledig 1999, Ledig et al. 1999, 2001, Molina-Freaner et al. 2001). These data show a distribution close to a Gaussian curve, but statistically, only the expected heterozygosity adjusts to a normal distribution (Fig. 1). Genetic differentiation does not adjust to such a distribution mainly because there is an excess of observed values close to zero. Averages for the genus are 0.198 for the expected heterozygosity and 0.129 for the genetic differentiation (Table 1). On the other hand genetic differentiation estimates are not significantly different ($t_{39} = 0.21$, $P > 0.5$) between hard (0.127) and soft pines (0.136). It is noteworthy the high variation among species in both the *Pinus* and the *Ponderosae* subsections for the expected estimates of heterozygosity. No significant correlation was detected ($r = 0.03$, d.f. = 72, $P > 0.05$) between the expected heterozygosity and genetic differentiation (Fig. 2). This correlation remains low when data are partitioned among soft ($r = 0.04$, d.f. = 16, $P > 0.05$) and hard pines ($r = 0.07$, d.f. = 72, $P > 0.05$).

When multiple estimates have been published for a particular species, probably a species is better characterized by the largest published estimate due to subsampling of variation. That is, if a study reports a larger F_{ST} estimate, this estimate

TABLE 1

Average heterozygosities and genetic differentiation estimates (F_{ST}) in pines. Averages are presented for different taxonomic subsections as defined by Price et al. (1998). Standard deviations are shown in parentheses

Heterocigosidades y diferenciación genética (F_{ST}) en pinos. Los promedios se presentan para diferentes subsecciones como fueron definidas por Price et al. (1998). Entre paréntesis se muestran las desviaciones estándar

Taxonomic group	Number of species	Heterozygosity	Genetic differentiation (F_{ST})
Subgenus <i>Pinus</i>	29	0.186 (0.085)	0.127 (0.182)
<i>Strobis</i>	12	0.227 (0.068)	0.136 (0.099)
Subsection <i>Attenuata</i>	3	0.150 (0.009)	0.167 (0.050)
<i>Pinus</i>	7	0.207 (0.132)	0.100 (0.044)
Oocarpae	1	0.213	0.100
Ponderosae	6	0.172 (0.102)	0.116 (0.057)
<i>Australes</i>	7	0.217 (0.053)	0.076 (0.042)
Contortae	4	0.157 (0.047)	0.058 (0.010)
<i>Halepenses</i>	1	0.181	0.010
<i>Strobi</i>	4	0.197 (0.056)	0.150 (0.070)
<i>Cembroides</i>	3	0.219 (0.002)	0.153 (0.112)
Cembrae	4	0.234 (0.091)	0.110 (0.140)
Balfourianae	1	0.340	0.150
Total	41	0.198 (0.082)	0.129 (0.161)

is probably closer to the species mean as some studies do not have a representative sample of both individuals and populations. The correlation between expected heterozygosity and F_{ST} slightly improves when using these data ($r = 0.24$, d.f. = 39, $P > 0.05$) but it is statistically nonsignificant.

When we compared the means of the estimates for the genetic structure for the subsections in Table 1 some generalizations can be made. First, the expected heterozygosities in all subsections of soft pines are larger than the ones obtained for hard pines. Second, genetic differentiation in hard pines is in all cases smaller than the ones estimated for soft pines. In particular *P. halepensis*, a hard pine, shows an extreme value of 1%. This species is in subsection *Halepenses*. The estimate was obtained for populations in Greece (Loukas et al. 1983) and either represents a biased sample for the species or this species deserves future attention being such an extreme example of low population differentiation.

Estimates of genetic variation using microsatellites in pines range between 0.411 for *P. heidreichii* var. *leucodermis* (Powell et al. 1995) to 0.978 for *P. sylvestris* (Provan et al. 1998) with an average of 0.582 (Table 2).

On the other hand, estimates of F_{ST} (using the infinite allele model) range between 0.023 for *P. pinaster* (Ribeiro et al. 2001) and 0.783 for *P. pinceana* (Escalante 2001), with an average of

0.245. If we do not consider the estimate for *P. pinceana* since probably represents a case of extreme differentiation through fragmentation, the average drops to 0.166. Estimates of R_{ST} based on the stepwise mutation model published until now are only 6. The comparison of these estimates (F_{ST} and R_{ST}) show that in half of the species R_{ST} estimates are smaller than F_{ST} (0.047 for *P. nelsonii*, Cuenca 2001; 0.068 for *P. resinosa*, Echt et al. 1998; and 0.212 for *P. halepensis*, Bucci et al. 1998) while in the rest R_{ST} estimates are larger than F_{ST} (0.068 for *P. brutia* subsp. *eldarica*, 0.289 for *P. brutia*, Bucci et al. 1998; and 0.783 for *P. pinceana*, Escalante 2001). In fact both estimates are statistically correlated ($r = 0.985$, d.f. = 4, $P < 0.01$) which suggests that the differences in both models are not important when comparisons are made in these pine species. Furthermore, except for the estimate for *P. pinceana*, a slightly negative correlation (statistically nonsignificant, $r = 0.688$, d.f. = 4, $P > 0.10$) is observed between genetic diversity and genetic differentiation as F_{ST} .

Microsatellites can be used to amplify the same locus in different species. Table 3 shows averages for six species from the subgenus *Pinus* and subgenus *Strobis* species (4) for 11 microsatellite loci (Cuenca 2001, Escalante 2001, Delgado, Vendramin & Piñero unpublished results). The average sizes of microsatellites are usually very

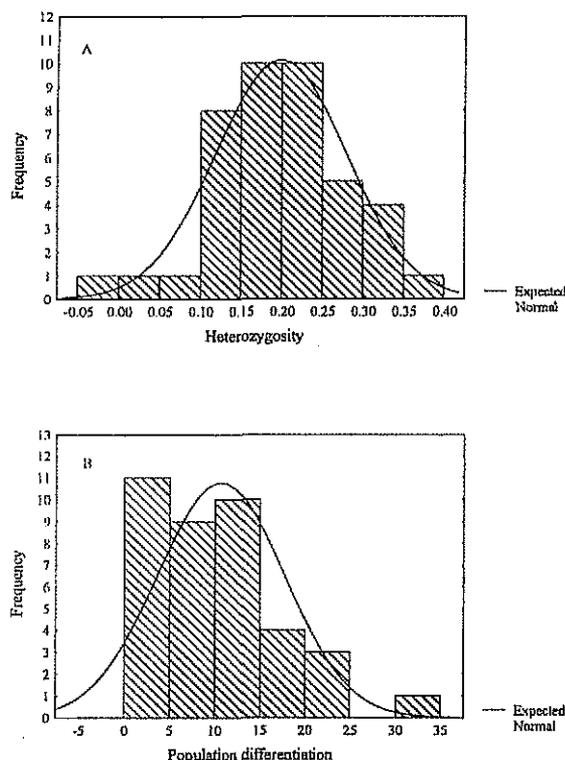


Fig. 1: Frequency distribution of expected heterozygosity (top) and genetic differentiation (bottom) in pine species from published data using allozymes. Differentiation estimates are expressed in percentage.

Distribución de frecuencias de la heterocigosidad esperada (arriba) y la diferenciación genética (abajo) en especies de pinos obtenida de datos publicados con marcadores isoenzimáticos. Los datos de diferenciación están multiplicados por 100.

similar in the two subgenera except in one locus (Pt26081). Also, the variances for the two subgenera are, in general, quite similar

Population inbreeding and mating system

Population inbreeding or in other words the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium could have three causes. First, inbreeding could develop through self-fertilization. Secondly, mating could occur among genetically related individuals and this would produce inbreeding. Thirdly, genetic drift could also increase the level of homozygosity. The published estimates of inbreeding (F_{IS}) in pines range from estimates close to zero to 0.14 for *P. pinceana* (Ledig et al. 2001). On the other hand, outcrossing rates estimates range from 0.65 for *P. maximinoi* (Matheson et al. 1989) to values statistically equal to 100 % out-

crossing. Average of direct estimations using allozymes for 17 species (six from the subgenus *Strobos* and 11 from the subgenus *Pinus*) is 0.88 (SD = 0.10) (Ledig 1998, Ledig et al. 1999, 2001). This distribution is shown in Fig. 3 and fits a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test, $d = 0.16$, $P > 0.20$). Confidence intervals (95 %) are rather narrow (0.82 and 0.93). Average estimates for hard and soft pines are not statistically different (0.89 and 0.86 respectively). For species in which a direct estimate of outcrossing rate has been obtained, we can calculate the expected inbreeding coefficient assuming that all inbreeding is due to the mating system ($f = [1-t] / [1+t]$) and compare both values (Table 4). All inbreeding estimates were obtained in seeds. In general, direct inbreeding estimates coincide with the expected ones based only on the mating system. In some cases like *P. sylvestris* (Muona & Szmidt 1991) and *P. pinceana* (Ledig et al. 2001) both estimates are clearly different. This is probably produced by natural selection in favor of heterozygotes or overdominance (see Ledig 1998 for a revision in pines). This effect probably has different intensity in different species and appears to act in earlier stages of the life cycle in some cases.

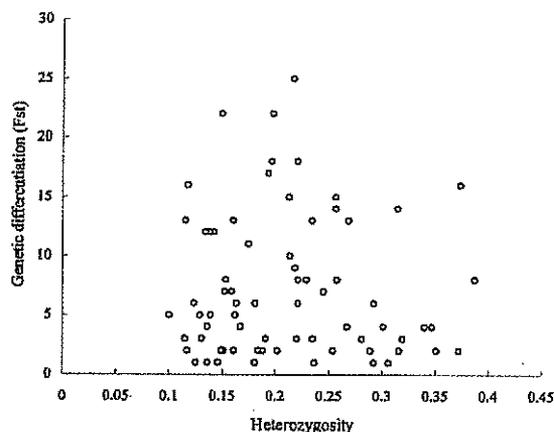


Fig. 2: Relation between expected heterozygosity and genetic differentiation in 71 studies in which both estimates were obtained for 38 pine species using allozyme markers. Circles are data for species in the subgenus *Pinus* (hard pines), squares are data for species in the subgenus *Strobos* (soft pines).

Relación entre la heterocigosidad esperada y la diferenciación genética en 71 estudios en los que ambos estimados se han obtenido para 38 especies de pinos usando marcadores isoenzimáticos. Los círculos muestran los datos para especies de pinos del subgénero *Pinus* (pinos duros), los cuadros muestran los datos para las especies del subgénero *Strobos* (pinos blandos).

TABLE 2

Average genetic diversity and genetic differentiation estimates for pine species using chloroplast microsatellite loci (standard deviations are shown in parentheses)

Estimados de la diversidad y la diferenciación genética usando loci de microsatélites de cloroplasto en especies de pinos (las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis)

Taxon	Subsection	Diversity	F _{st}	R _{st}	Number of loci	Reference
<i>P. sylvestris</i>	<i>Pinus</i>	0.978				Provan et al. (1998)
<i>P. pinaster</i>	<i>Pinus</i>	0.885	0.023		6	Ribeiro et al. (2001)
<i>P. resinosa</i>	<i>Pinus</i>	0.618	0.121	0.068		Echt et al. (1998)
<i>P. heidreichii</i> var. <i>leucodermis</i>	<i>Pinus</i>	0.411	0.22			Powell et al. (1995)
<i>P. halepensis</i>	<i>Halepenses</i>	0.222	0.308	0.212	8	Bucci et al. (1998)
<i>P. brutia</i>	<i>Halepenses</i>	0.297	0.289	0.323	8	Bucci et al. (1998)
<i>P. brutia</i> ssp. <i>Eldarica</i>	<i>Halepenses</i>	0.271	0.068	0.074	8	Bucci et al. (1998)
<i>P. nelsonii</i>	<i>Cembroides</i>	0.728	0.131	0.047	4	Cuenca (2001)
<i>P. pinceana</i>	<i>Cembroides</i>	0.824	0.783	0.930	4	Escalante (2001)
Total		0.582 (0.289)	0.245 (0.241)			

A historical framework can also be used to compare the mean outcrossing rates in different subsections. In all lineages, rates are in general high. Also, the lowest estimates correspond to *P. cembra* and *P. maximinoi*, (0.69 and 0.65, respectively), which belong to different subgenera (*Strobus* and *Pinus*, respectively).

DISCUSSION

Constancy in heterozygosity among species

There are several sources of evidence that suggest that effective population size determines mostly the level of allozyme variation in a species or in other words, that within a species there is a correlation between expected heterozygosity and population size (Avice 1994). In the case of *Pinus* very few species show estimates of expected heterozygosity different from 0.20. These results are predicted if mutation rates are assumed relatively constant (Hedrick 1999). In particular for *Pinus*, 99 % confidence limits for expected heterozygosity in 41 species are 0.189-0.227, which suggests that historically effective population sizes have been constant among species or that have been

TABLE 3

Mean size (in bp) for different chloroplast microsatellite loci in both subgenera of *Pinus*. The loci identification corresponds to the notation of the chloroplast sequence of *Pinus thunbergii* (Wakasugi et al. 1994). Standard deviations are shown in parentheses

Tamaño promedio para diferentes loci de microsatélite de cloroplasto en ambos subgéneros de *Pinus*. Los loci corresponden a la notación de la secuencia del cloroplasto de *Pinus thunbergii* (Wakasugi et al. 1994). Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis

Locus	Subgenus <i>Pinus</i>	Subgenus <i>Strobus</i>	All species
Pt1254	66.5 (1.22)	67.5 (1.73)	66.9 (1.45)
Pt1520	122.8 (2.48)	122 (3.65)	122.5 (2.84)
Pt9383	88 (3.35)	88.3 (3.59)	88.1 (3.25)
Pt26081	142.3 (1.75)	156.3 (1.26)	147.9 (7.34)
Pt36480	144.7 (2.88)	142.8 (2.06)	143.9 (2.64)
Pt41093	77.3 (0.82)	76.8 (2.63)	77.1 (1.66)
Pt4821	88.5 (0.55)	87.5 (0.58)	88.1 (0.74)
Pt5187	79.2 (5.42)	85.8 (2.06)	81.8 (5.41)
Pt63718	93.2 (0.41)	91 (0.82)	92.3 (1.25)
Pt71936	145.8 (1.60)	142.8 (2.06)	144.6 (2.31)
Pt87268	163.7 (2.73)	167.5 (1.00)	165.2 (2.90)

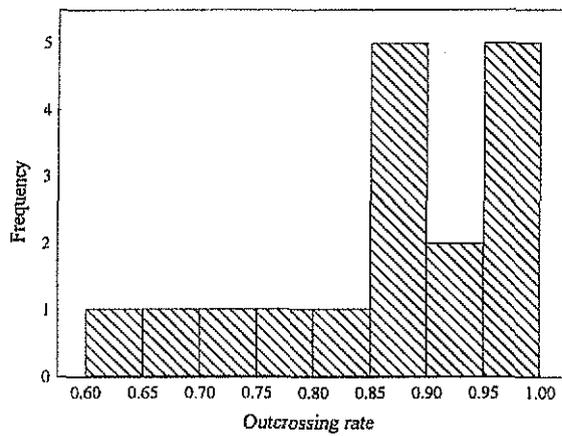


Fig. 3: Frequency distribution of outcrossing rates in pine species from published data using allozymes.

Distribución de frecuencias de las tasas de entrecruzamiento en especies de pinos de datos publicados usando aloenzimas.

maintained above levels at which increases in population sizes would marginally increase the level of genetic variation.

Other aspect of the life history that could affect the level of genetic variation is individual longevity. Although species have been described (particularly in subsection *Balfourianae*) in which individual longevity could reach thousands of years, it is more common within the range from tens of years to a few hundred years. Longevity could be one of the causes of the data observed, like the level of expected heterozygosity estimated for *P. longaeva* (0.340, Hiebert & Hamrick 1983).

In this context of relative constancy of estimates for expected heterozygosity, it is relevant to analyze in some detail those species that show a significant deviation from the mean. In general the distribution showed in Fig. 1 shows that those species that have expected heterozygosities be-

low 0.1 are very few and all of them (for example, *P. torreyana*, Ledig & Conkle 1983) are probably the consequence of a bottleneck. This phenomenon has also been described for coulter pine (*P. coulteri*, Ledig 2000) at the intraspecific level.

Heterogeneity in population differentiation among species

Genetic differentiation shows a contrasting pattern from that found for expected heterozygosity. The distribution does not fit a normal distribution and is probably due to different causes. Theoretically, both migration and genetic drift determine population differentiation. In some cases, attention has been given to the fact that the estimation of genetic differentiation could be biased if the molecular markers show a high mutation rate (Hedrick 1999). Other aspects like the ecological components of migration and genetic drift could also affect the level of population differentiation. These include, for example, population density and migration agents of both gametes and embryos (Alvarez-Buylla et al. 1996). These factors are quite variable in pines and would explain variation in estimates of genetic differentiation. For example pinyon pines in North America share a low population density, relatively isolated populations and seed dispersal by birds. All these factors cause a relatively high population differentiation.

Microsatellites: comparative approaches

Several studies have explored the patterns of microsatellite evolution. Although at the intraspecific level the interpretation of genetic variation is straightforward (slipped-strand mispairing producing one step mutations at high rates), at the interspecific level, particularly when more diver-

TABLE 4

Inbreeding coefficients (F_{IS}) and outcrossing rate (t_m) derived from inbreeding estimates (f) for pine species

Coefficientes de consanguinidad (F_{IS}) y estimados de consanguinidad (f) derivados de la tasa de entrecruzamiento (t_m) para diferentes especies de pinos

Taxon	Subsection	t_m	f	F_{IS}	Reference
<i>P. contorta</i>	<i>Contortae</i>	0.95	0.03	0	Wheeler & Guries (1982)
<i>P. ponderosa</i>	<i>Ponderosae</i>	0.96	0.02	0.02	Farris & Mitton (1984)
<i>P. sibirica</i>	<i>Cembrae</i>	0.89	0.06	-0.01	Goncharenko et al. (1992)
<i>P. sylvestris</i>	<i>Pinus</i>	0.94	0.03	-0.14	Muona & Szmidt (1991)
<i>P. maximartinezii</i>	<i>Cembroides</i>	0.82	0.10	0.08	Ledig et al. (1999)
<i>P. pincheana</i>	<i>Cembroides</i>	0.86	0.07	0.14	Ledig et al. (2001)

gent species are compared, other factors could be involved. This is because different studies have reported other mechanisms that should be taken into account (Kruglyak et al. 1998, Karhu et al. 2000). Although slipped-strand mispairing was first described as the main mechanism for microsatellite mutation, it has been demonstrated that base substitutions could account for a significant portion of observed substitutions when different species have been compared (Kruglyak et al. 1998). Mutation rates of these two kinds of events differ for various orders of magnitude. While point mutations occur at rates between 10^{-10} - 10^{-8} , mutations in microsatellites that either increase or decrease the number of repeats have been estimated between 10^{-5} - 10^{-2} . In particular, SSRs mutation rates of 10^{-3} have been found in pines (Provan et al. 1999). These results show that there must be a difference of about 4 orders of magnitude between the average allelic substitution times for mutations based on the number of repeat copies in a microsatellite and those based on point mutations. This will produce that the transient polymorphisms of both mutation mechanisms will be present in different populations but allele fixation originated from point mutations will occur with higher frequency among divergent species. The comparison of alleles among divergent species has shown this fact (Karhu et al. 2000) but also the existence of a third kind of substitutions (besides size mutations and point mutations), duplications that in highly divergent species will also be present. These mutation mechanisms should be better studied in order to interpret the observed polymorphisms.

The relative proportion of mutation rates with respect to migration rates has been used to explain the incongruence seen in F_{ST} estimates using uniparental and biparental markers, in particular to explain lower F_{ST} 's for uniparental markers (Balloux et al. 2000). In pines, differentiation would be expected to be highest in maternally inherited markers (mitochondria) than in paternally inherited markers (chloroplast) (Furnier & Stine 1995). The lowest differentiation would then be expected in nuclear markers. There are in the literature reports of genetic differentiation using nuclear allozymes and chloroplast microsatellites. These data show that there is a positive relation (but statistically non significant, $r = 0.86$, d.f. = 2, $P > 0.10$) between genetic differentiation using these markers when nuclear data is used as the independent variable for *P. pinaster*, *P. pinceana*, *P. halepensis* and *P. heidreichii* var. *leucodermis* (Table 2, Ledig 1998, Ledig et al. 2001). They also show that differentiation estimates using allozymes are always lower than those obtained from chloroplast

microsatellites as was also found for *Picea glauca* by Furnier & Stine (1995).

Results shown in Table 3 support a more complex microsatellite evolutionary model than expected. From a model with genetic drift and mutation, the expected size for microsatellites from different species would diverge at a rate proportional to both mutation rate and population size and as a consequence variance among species would be larger. Microsatellite average sizes for different hard and soft pine species are equal in six of the 11 loci. In the other 5 loci, there is a significant difference but in two of those loci (Pt26081 and Pt87268) is larger in pines from the subgenus *Strobus* while in the other three the average size is larger in pines from the subgenus *Pinus* (Pt4821, Pt63718 and Pt71936). The other prediction would be that the variance for both groups of pines taken together would be larger than the variances for each one of the subgenera. Variances are statistically larger at the 5 % limit (Bartlett's test) in these five loci when all species are taken together. This probably shows that size mutation appears to be controlling the evolutionary dynamics of microsatellites at these five loci but it also suggests that other factor should explain both the variance homogeneity and also the homogeneity of the sizes of microsatellites at the other six loci. Selection would explain both homogeneities and further studies should explore this possibility.

The most representative parameter of the genetic structure in plants is the rate of outcrossing, estimated as the proportion of seed produced through self-fertilization with respect to those produced through cross-fertilization (Govindaraju 1988). Mating system has consequences on inbreeding levels and through that on the different factors that produce inbreeding depression. For example, a species with a high outcrossing rate, usually has a high frequency of recessive deleterious and lethal alleles and inbreeding depression will be high if self-fertilization increases. These species will normally have decreasing inbreeding coefficients (an increase in heterozygote proportions) through life stages until adulthood.

Plasticity within some pine species or their ability to modify outcrossing rates (Ledig 1998) is probably due to adaptation to contrasting population densities that favour colonization to new environments in which trees self-fertilize more frequently, as has been described for *P. radiata* (Bannister 1965 cited in Ledig 1998). This flexibility, on the other hand, has not been strong enough as to modify the mating system in such a way that a species would be predominantly self-fertilized. In fact mating system in pines is so

open that interspecific hybridization is quite common in sympatric species so that hybridization has frequently been proposed as a speciation mechanism in this genus (e.g., Bucci et al. 1998).

Mating system plasticity and morphological adaptation

One of the main conclusions of this work is that pines show a striking homogeneity in their genetic system that includes homogeneity of expected heterozygosity but most of all nearly constant outcrossing rates for species that diverged 135 million years (see for example Hamrick & Godt 1990). Apparently there has been a strong limitation to the reduction of outcrossing rates in pines and probably those populations or species in which this has happened have probably gone extinct.

These conclusions about the genetic structure probably do not apply to morphological characters. For example, while there is low differentiation in molecular markers (allozymes, RAPDs or microsatellites in *P. sylvestris* in Finland, Kahru et al. 1996) there is a strong morphological differentiation probably as a result of strong natural selection on morphological characters.

In view of the knowledge on the genus *Pinus* with respect to their uses, ecological services, morphological adaptations and its conservation status, the group can be considered as model to establish conservation strategies in tree species. Until now, proposals to establish conservation strategies in this genus could be summarized as follows. First, species that show fragmented distributions have higher genetic differentiation and outcrossing rates different from 100 %. North American pinyon pines belong to this group of species and require both in situ and ex situ conservation strategies with emphasis in reforestation with young trees. The second strategy could be generated from a phylogenetic perspective, conservation of abundant tree species is as important as conservation of relictual lineages so that speciation and adaptation processes continue. These conclusions should be put in practice in countries like Mexico with high deforestation rates. Finally, it has become clear that knowledge of comparative genetic structure in this group of trees is an excellent tool to develop strategies for their conservation.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Rocío Esteban for her technical assistance and Tom Ledig for making available a copy of his paper on *P. pinceana* before publication. This work was supported by grant 31777-N from Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología to D.P. and IN205998 to D.P. and David Gernandt.

LITERATURE CITED

- AVISE JC (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York, New York. 511 pp.
- ÁLVAREZ-BUYLLA E, A CHAOS, D PIÑERO & A GARAY (1996) Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal and seed banks. *Evolution* 50: 1155-1166.
- BALLOUX F, H BRÜNNER, N LUGON-MOULIN, J HAUSSE & J GOUDET (2000) Microsatellites can be misleading: an empirical and simulation study. *Evolution* 54: 1414-1422.
- BERMEJO-VELÁZQUEZ B (1983) Genetic diversity and the mating system in *Pinus engelmannii* Carr. Ph.D. Thesis (Forestry), University of Wisconsin, Madison, Wisconsin. 91 pp.
- COMPS B, D GÖMÖRY, J LETOUZEY, B THIÉBAUT & RJ PETIT (2001) Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics* 157: 389-397.
- CUENCA A (2001) Variación y estructura genética de una especie de pino endémica de México (*Pinus nelsonii* Shaw.). Bachelor in Science Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. 99 pp.
- DELGADO P, D PIÑERO, A CHAOS, N PÉREZ-NASSER & E ÁLVAREZ-BUYLLA (1999) High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86: 669-676.
- ECHT CS, LL DEVERNO, M ANZIDEI & GG VENDRAMIN (1998) Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology* 7: 307-316.
- EGUIARTE LE, 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.
- ESCALANTE AE (2001) Estructura genética de poblaciones de *Pinus pinceana* G. Gordon & Glendinning usando como marcadores moleculares microsatélites de cloroplasto (cpSSR's). Bachelor in Sciences Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. 95 pp.
- FARJON A & BT STYLES (1997) *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica Monograph* 75. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. 291 pp.

- FARRIS MA & JB MITTON (1984) Population density, outcrossing rate, and heterozygote superiority in ponderosa pine. *Evolution* 38: 1154-1156.
- FURNIER GR & WT ADAMS (1986) Mating system in natural populations of Jeffrey pine. *American Journal of Botany* 73: 1009-1015.
- FURNIER GR & M STINE (1995) Interpopulation differentiation of nuclear and chloroplast loci in white spruce. *Canadian Journal of Forest Research* 25: 736-742.
- GONCHARENKO GG, VE PADUTOV & AE SILIN (1992) Population structure, gene diversity, and differentiation in natural populations of cedar pines (*Pinus subsect. Cembrae*, Pinaceae in the USSR. *Plant Systematics and Evolution* 182: 121-134.
- GOVINDARAJU DR (1988) A note on the relationship between outcrossing rate and gene flow in plants. *Heredity* 61: 401-404.
- HAMRICK JL & MJW GODT (1990) Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, MT Clegg, AL Kahler & BS Weir (eds) *Plant population genetics, Breeding and Genetic Resources*: 43-63. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- HEDRICK PW (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313-318.
- HIEBERT RD & JL HAMRICK (1983) Patterns and levels of genetic variation in the Great Basin bristlecone pine, *Pinus longaeva*. *Evolution* 37: 302-310.
- KARHU A, J-H DIETERICH & O SAVOLAINEN (2000) Rapid expansion of microsatellite sequences in pines. *Molecular Biology and Evolution* 17: 259-265.
- KARHU A, P HURME, M KARJALAINEN, P KARVONEN, KARKKAINEN, D NEALE & O SAVOLAINEN (1996) Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 215-221.
- KIMURA M & JF CROW (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- KRUGLYAK S, RT DURRETT, MD SCHUG & CF AQUADRO (1998) Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 10774-10778.
- LATTA RG & JB MITTON (1997) A comparison of population differentiation across four classes of gene markers in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* 146: 1153-1163.
- LEDIG FT (1998) Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson DM (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*: 251-280. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- LEDIG FT (1999) Founder effects and genetic structure in Coulter pine. *Journal of Heredity* 91: 307-315.
- LEDIG FT & MT CONKLE (1983) Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr). *Evolution* 37: 79-85.
- LEDIG FT, V JACOB-CERVANTES, PD HODGSKISS & 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.
- LEDIG FT, MT CONKLE, B BERMEJO, T EGUILUZ, P HODGSKISS, DR JOHNSON & WS DVORAK (1999) Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: Genetic diversity, disequilibrium and the mating system in *P. maximartinezii*. *Evolution* 53: 91-99.
- LEDIG FT, M CAPÓ-ARTEAGA, PD HODGSKISS, H SBAY, C FLORES-LÓPEZ, MT CONKLE & B BERMEJO-VELÁZQUEZ (2001) Genic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88: 1977-1987.
- LI W-H (1997) *Molecular evolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 487 pp.
- LISTON A, WA ROBINSON, D PIÑERO & ER ÁLVAREZ-BUYLLA (1999) Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 95-109.
- LOUKAS M, Y VERGINI & CB KRIMBAS (1983) Isozyme variation and heterozygosity in *Pinus halepensis*. *Biochemical Genetics* 21: 497-509.
- MATHESON AC, JC BELL & RD BARNES (1989) Breeding systems and genetic structure in some Central American pine populations. *Silvae Genetica* 38: 107-113.
- MOLINA-FREANER F, P DELGADO, D PIÑERO, N PÉREZ-NASSER & E ÁLVAREZ-BUYLLA (2001) Do rare pines need different conservation strategies? evidence from three Mexican rare species. *Canadian Journal of Botany* 79: 131-138.
- MUONA O & AE SZMIDT (1991) A multilocus study of natural populations in *Pinus sylvestris*. In: Gregorius HE (ed) *Population genetics in forestry, Lecture Notes in Biomathematics No. 60*: 226-240. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- OHTA T (1995) Synonymous and nonsynonymous substitutions in mammalian genes and the nearly neutral theory. *Journal of Molecular Evolution* 40: 56-63.
- OHTA T & M KIMURA (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Research* 22: 201-204.
- PARKER KC & JL HAMRICK (1996) Genetic variation in sand pine (*Pinus clausa*). *Canadian Journal of Forest Research* 26: 244-254.
- POWELL W, M MORGANTE, R MCDEVITT, GG VENDRAMIN & JA RAFALASKI (1995) Polymorphic simple sequence repeat regions in the chloroplast genome: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 7759-7763.
- PRICE RA, A LISTON & SH STRAUSS (1998) Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: Richardson DM (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*: 49-68. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- PROVAN J, N SORANZO, NJ WILSON, JW McNICOL, GI FORREST, J COTTRELL & W POWELL (1998) Gene pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple sequence repeats. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 265: 1697-1705.

COMPARATIVE GENETIC STRUCTURE IN PINES

- PROVAN J, N SORANZO, NJ WILSON, DB GOLDSTEIN & W POWELL (1999) A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153: 943-947.
- RIBEIRO MM, C PLOMION, R PETIT, GG VENDRAMIN & AE SZMIDT (2001) Variation in chloroplast single sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics* 102: 97-103.
- SCHEMSKE DW & R LANDE (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39: 41-52.
- SLATKIN M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics* 139: 457-462.
- SOKAL RR & FJ ROHLF (1994) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Third edition. W.H. Freeman & Company, San Francisco, California. 887 pp.
- VALDÉS AM, M SLATKIN & NB FREINER (1993) Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133: 737-749.
- WHEELER NC & RP GURIES (1982) Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Canadian Journal of Forest Research* 12: 595-606.
- WRIGHT S (1949) Adaptation and selection. In: Jepson GL, GG Simpson & E Mayr (eds) *Genetics, paleontology and evolution*: 365-389. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Associate Editor: R. Medel

Received April 30, 2001; accepted January 8, 2002

CAPITULO III

Evidencias de hibridación introgresiva entre *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus*, detectadas con el uso de caracteres morfológicos y microsatélites nucleares (nSSR)

DELGADO PATRICIA Y DANIEL PIÑERO

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-725, Ciudad Universitaria, México D. F. 04510, México.

RESUMEN

En este trabajo se analizaron posibles eventos de hibridación introgresiva entre dos especies de pino (*P. montezumae* y *P. pseudostrobus*) distribuidas en México y Guatemala con base a tres caracteres morfológicos (acículas, conos y canales resiníferos) y tres microsatélites nucleares (trinucleótidos). Las especies son muy cercanas filogenéticamente, pertenecen a la subsección, Ponderosae (subgénero *Pinus*), y presentan caracteres morfológicos y anatómicos compartidos. Se realizó un análisis de varianza para los tres caracteres morfológicos que indica diferencias significativas entre grupos de poblaciones, siendo los caracteres tipo de acícula y número de canales resiníferos los más variables. Los análisis de los datos moleculares fueron realizados con base en el modelo de mutación de un paso (SMM). Los valores más altos de la variación genética se presentaron en las poblaciones híbridas putativas, probablemente por efecto del flujo genético entre las poblaciones de ambas especies. El desequilibrio de ligamiento, el flujo genético, los valores de diferenciación y las distancias genéticas, indican que las poblaciones híbridas putativas están más asociadas con las poblaciones de *P. pseudostrobus*, por lo que podrían ser poblaciones originales de esta especie. El fenograma obtenido con los datos morfológicos indica eventos de hibridación introgresiva asimétrica de *P. montezumae* al resto de las poblaciones. En contraste, el fenograma realizado con datos moleculares demuestra que la introgresión se presenta entre todas las poblaciones y ocurre de manera bidireccional. Probablemente la asociación de las poblaciones de *P. montezumae* son más fuertes filogenéticamente que las de *P. pseudostrobus* y podrían sugerir adaptaciones morfológicas al ambiente. En este estudio no se encontraron patrones de asociación geográfica claros, por lo que la introgresión se presentó en forma de parches heterogéneos. Los resultados sugieren probables procesos históricos de hibridación introgresiva, causados probablemente por la ruptura de barreras reproductivas entre estas especies y por una mayor eficiencia y viabilidad del polen de *P. montezumae*, y mayor dispersión de semillas de *P. pseudostrobus*.

Palabras clave: diversidad genética, flujo genético, hibridación introgresiva, microsatélites nucleares, morfología, *Pinus*.

INTRODUCCIÓN

En plantas, la hibridación introgresiva es un proceso evolutivo extensamente documentado, definido como la incorporación selectiva de material genético ajeno a la especie por hibridación y retrocruza repetida (Anderson, 1949). Los recientes avances de las técnicas moleculares han permitido detectar diferentes mecanismos y dinámicas de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales de plantas y animales (ver Rieseber y Ellstrand, 1993; Arnold y Hodges, 1995; Rieseberg *et al.*, 1995). Estos avances han abierto un extenso campo de estudios acerca del origen y evolución de especies por hibridación introgresiva, con base en el planteamiento de hipótesis relacionadas con diferentes modelos de especiación (parapátrica y simpátrica). Por ejemplo, estudios relacionados con la extinción de poblaciones locales debido a la dinámica diferencial de la introgresión, con la dispersión de polen y competencia reproductiva entre especies, con la distribución histórica de las especies originadas por introgresión, y con la importancia de la hibridación como un mecanismo de adaptación y generador de nuevas especies, etc.

Un sistema interesante para este tipo de estudios lo proporciona el grupo de las coníferas, para el cual existen varios precedentes del origen y evolución de especies por hibridación introgresiva (Wagner *et al.*, 1987; Wheeler y Guries, 1987; Bucci *et al.*, 1998; Wang y Szmidt, 1990; Matos y Schaal, 2000; Wang *et al.*, 2001). Estos estudios se han desarrollado con diferentes tipos de datos, tanto morfológicos como moleculares. Actualmente, los microsatélites (SSR's), son los marcadores preferidos para la realización de este tipo de estudios, ya que son altamente polimórficos, son codominantes, selectivamente neutros y compatibles con los supuestos de la genética de poblaciones (Golstein y Pollock, 1994; Golstein 1995; Lu *et al.*, 2001; Roques *et al.*, 2001). En particular para el género *Pinus* se han desarrollado algunos microsatélites tanto de ADN nuclear (nSSR) (Smith y Devey, 1994; Fisher *et al.*, 1998; Elsik *et al.*, 2000; Lian *et al.*, 2001), como de organelos citoplasmáticos, como los de cloroplasto (cpSSR) (Powell *et al.*, 1995a, b; Vendramín *et al.*, 1996), o los de la mitocondria (mSSR) (Soranzo *et al.*, 1998). Los microsatélites de cloroplasto y de la mitocondria son mononucleótidos, y han sido homólogos y conservados para diferentes especies de pino, incluyendo otros géneros de coníferas como *Picea*, *Cupressus* y *Abies* (Vendramín *et al.*, 1996; Echt *et al.*, 1998, Soranzo *et al.*, 1998). En contraste, y a pesar de que se han desarrollado microsatélites nucleares en especies de

coníferas, hay muy poca información disponible (Karhu *et al.*, 1996; Morgante *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000; Lian *et al.*, 2001; Kutil y Williams, 2001). Esto se debe probablemente a la dificultad para amplificarlos en distintas especies. Kutil y Williams (2001), mencionan que los microsatélites nucleares amplificados en diferentes especies de pinos son de tres nucleótidos. Estos tienden a ser más conservados que los mono o dinucleótidos por que no se distribuyen al azar en el genoma, sino que tienen efectos funcionales en la replicación, transcripción, regulación en la expresión de genes y regulación (Sinden, 1999; Young *et al.*, 2000; Kutil y Williams, 2001). Es importante realizar más estudios de microsatélites en pinos, que por un lado permitan corroborar su homología entre especies de este género y por otro lado permitan examinar patrones de variación y estructura genética. Esta información es básica para explorar diferentes procesos evolutivos y adaptativos de las especies.

En el presente estudio analizamos caracteres morfológicos y variación en microsatélites nucleares (nSSR) para obtener evidencia de hibridación introgresiva y de los patrones de diversificación y diferenciación de 13 poblaciones de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*. Para estas especies se han sugerido eventos de hibridación introgresiva (Martínez, 1948; Mirov, 1967; Perry, 1991). Además, comparten algunos caracteres morfológicos, químicos y anatómicos (Martínez, 1948; Mirov, 1967; Perry, 1991) y están muy relacionadas filogenéticamente, pertenecen a la subsección Ponderosae (Little y Critchfield, 1969). Las poblaciones puras habitan en la parte Norte de México y Sur de Guatemala, y la mayoría de las poblaciones simpátricas se encuentran en el Eje Neovolcánico, región que ha sido mencionada como focal para el origen de especies de plantas por hibridación (Rzedowski, 1978). Con base en esta información se realizó un análisis de la variación de tres caracteres morfológicos para probar la hipótesis de la existencia de tres grupos diferentes de poblaciones que representan a las dos especies parentales y a las poblaciones híbridas putativas, y con ello sustentar la hipótesis de hibridación introgresiva a nivel molecular. Los objetivos planteados en este trabajo fueron: (i) obtener evidencias de la hibridación introgresiva entre las poblaciones de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, se esperaría una mayor contribución de la variación genética de las poblaciones híbridas putativas, (ii) obtener información de la dinámica de la introgresión, se esperaría que en las poblaciones híbridas putativas las frecuencia de alelos específicos de las

especies tipo fueran bajas, y (iii) realizar un análisis comparativo con los datos morfológicos y los datos de microsatélites nucleares para proponer posibles patrones biogeográficos de introgresión, se esperaría que ambos tipos de datos reflejen las mismas agrupaciones entre las poblaciones híbridas putativas y puras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de campo

Se colectó tejido vegetativo de 312 individuos de 13 poblaciones de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, para atestiguar polimorfismos intra e interespecíficos con base en 3 nSSR. Se colectaron 5 poblaciones puras de *P. montezumae*, 3 de *P. pseudostrobus* y 5 híbridas putativas, con base en información preexistente de su ubicación geográfica (ver Tabla 1, Fig. 1). Las poblaciones puras e híbridas se agruparon en cinco tipos: (i) poblaciones puras de *P. montezumae* (ii) puras de *P. pseudostrobus*, (iii) con morfología dominante de *P. montezumae*, (iv) con morfología dominante de *P. pseudostrobus*, y (v) con morfología intermedia de ambas especies. Para verificar la forma del cono de cada especie se colectaron de 3 a 5 conos por árbol (312 árboles). Adicionalmente se colectaron tres ramillas por árbol para verificar el tamaño color y grosor de las acículas. Finalmente se colectó una ramilla que fue almacenada a -72°C para la posterior cuantificación de canales resiníferos y uso para la extracción de ADN.

La matriz de datos morfológicos se hizo con tres caracteres cualitativos de acuerdo a los criterios de identificación de Madrigal (1986): forma del cono (*P. pseudostrobus*, cono ovoide o largamente ovoide de 8-10 cm de largo; *P. montezumae*, cono ovoide-cónico de 8.5-15.0 cm de largo), tipo de acículas (*P. pseudostrobus*, flexibles, triangulares y colgantes de 17-24 cm de longitud; *P. montezumae*, hojas anchamente triangulares, flexibles, extendidas de 14-21 cm de longitud), y número de canales resiníferos (*P. pseudostrobus* de 2 a 4 y en *P. montezumae* de 3 a 6 y 8). Los tres caracteres fueron clasificados como presencia / ausencia y cuantificados en cuatro repeticiones independientes.

Tabla 1. Ubicación geográfica y altitud de los sitios de colecta de las poblaciones tipo; puras e híbridas putativas de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, en México y Guatemala.

Pobl.	Especie	Tipo	Localidad	Ubicación Geográfica	Altitud (msnm)
P51	<i>P. pseudostrobus</i>	Pura	Tuxtepec Oaxaca	96°26'31" 17°19'59"	2144
P62	<i>P. pseudostrobus</i>	Pura	Aguililla Michoacán	102°55'36" 18°49'17"	2370
P123	<i>P. pseudostrobus</i>	Pura	Caoqué, Jalpa Guatemala	90° 41' 66" 14° 38' 23"	2043
H14	<i>P. pseudostrobus</i> <i>P. montezumae</i>	Híbrida putativa	Malacatepec Edo. México	100°09'43" 19°21'16"	3100
H25	<i>P. montezumae</i> / <i>P. pseudostrobus</i>	Híbrida putativa	Anganguero Michoacán	100°17'07" 19°37'01"	2850
H36	<i>P. montezumae</i> / <i>P. pseudostrobus</i>	Híbrida putativa	Temascaltepec Edo de México	100°02'28" 19° 02'35"	3100
H47	<i>P. pseudostrobus</i> / <i>P. montezumae</i>	Híbrida putativa	Zitácuaro Michoacán	100°21'31" 19°26' 15"	1700
H98	<i>P. montezumae</i> <i>P. pseudostrobus</i>	Híbrida putativa	San Cristobal Chiapas	92°25'60" 16°44'25"	2440
M79	<i>P. montezumae</i>	Pura	Puebla	98°02'30" 19°07'02"	2100
M10	<i>P. montezumae</i>	Pura	Tlaxcala	98°02'30" 19°13' 30"	3000
M11	<i>P. montezumae</i>	Pura	Ixmiquilpan Hidalgo	99° 30' 21" 20° 30' 18"	2100
M12	<i>P. montezumae</i>	Pura	Totonicapan Guatemala	91° 24' 08" 14° 55' 60"	2374
M13	<i>P. montezumae</i>	Pura	Cuernavaca Morelos	19° 03' 15" 99° 14' 30"	2010

Extracción de ADN y productos de PCR

Se extrajo ADN genómico con el método de extracción Miniprep CTAB (Vázquez-Lobo, 1996). Se ensayaron 14 pares de oligonucleótidos, 7 publicados por Elsik *et al.*, (2000), derivados del ADN secuenciado de *P. taeda* y 8 publicados por Echt *et al.*, (1996) aislados en *P. strobus*, tres microsatélites para pinos duros amplificaron de manera consistente en todas las poblaciones. Los 3 nSSR están conformados por tres pares de bases (trinucleótidos); PtTX3013 (GTT)_n: 130 Pb, PtTX3025 (CAA)_n: 250 Pb, y PtTX2123

(AGC)n: 200 Pb. Las reacciones de amplificación y condiciones de PCR fueron realizadas con el método de Elsik *et al.* (2000). Los números de acceso a GenBank de los tres nSSR secuenciados son del AY181422 al AY181425. Los productos de PCR fueron separados con una cámara de secuenciación en geles de poliacrilamida al 6% (7M Urea) y visualizados con nitrato de plata (Echt *et al.*, 1996). Los geles fueron corridos a 60 V, 50° C por 1.5-3.5 horas, dependiendo del tamaño de los fragmentos. El tamaño de los fragmentos fue calculado con el programa UVP (Ultra Violet Products), versión 3.0.2 (1999), y por comparación con marcadores control de 10 pb.

Análisis de caracteres morfológicos

Los patrones de similaridad y diferencia entre las 13 poblaciones se estimaron con base a un análisis univariado (ANOVA), el cual nos habla de la cantidad de variación morfológica debida a los caracteres: tipo de acícula, forma del cono y número de canales resiníferos. También se realizó un análisis de correlación múltiple entre los tres tipos de caracteres morfológicos para verificar si se relacionan significativamente o son independientes entre sí. La agrupación de las diferentes poblaciones fue explorada por medio de las distancias euclidianas, que son el promedio de distancias aritméticas no estandarizadas, y que permiten formar grupos jerárquicos de poblaciones representados en un fenograma (UPGMA; Sokal y Michener, 1958). Para los tres análisis morfológicos se utilizó el programa Statistica (Statsoft, 1995).

Parámetros de diversidad genética y estructura poblacional

Todas las estimaciones se obtuvieron con base en las frecuencias alélicas, y con el modelo de mutación de un paso (SMM). Se obtuvieron varios estimados de la diversidad genética: Número de alelos (A), diversidad genética dentro de las poblaciones (H , Slatkin, 1995), heterocigosis observada (H_O) y esperada (H_E). Por otra parte, realizamos un análisis de varianza molecular para los alelos con el parámetro θ_{HO} , que es un estimado de la homocigosis esperada en una población en equilibrio entre la deriva genética y la mutación (Zouros, 1997). Además, como $\theta = 2Nu$, se estimó el tamaño efectivo de las poblaciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

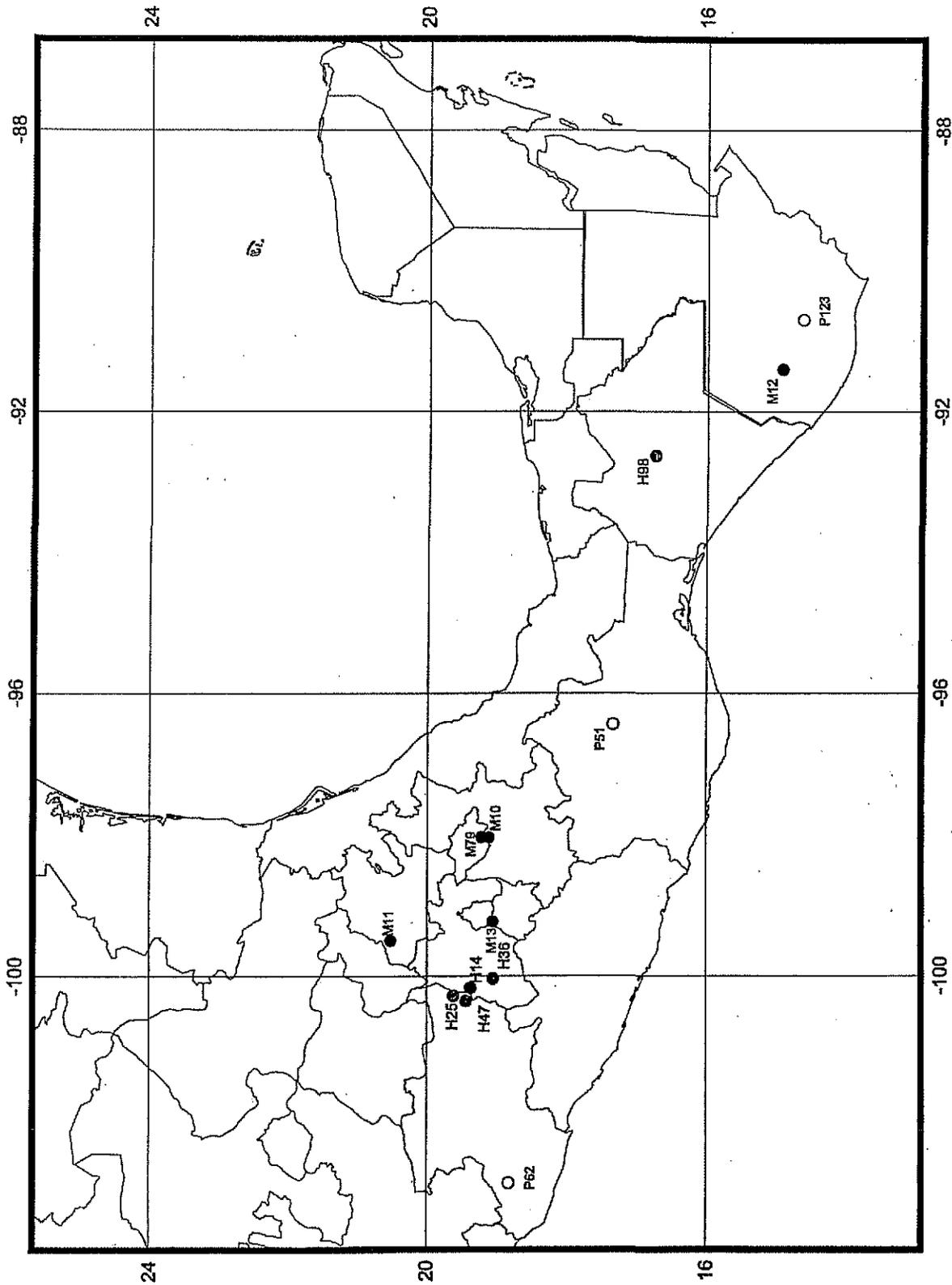


Figura 1. Distribución geográfica de las poblaciones de *P. pseudoatropis*, *P. montezumae* y posibles híbridadas, en México y Guatemala. Los círculos negros indican las poblaciones puras de *P. montezumae*; los círculos blancos las poblaciones puras de *P. pseudoatropis*, y los círculos grises indican a las poblaciones posibles híbridadas.

Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) fueron obtenidas por el déficit de heterocigos esperados. Su significancia se estimó con 1000 permutaciones (Slatkin y Excoffier, 1996). Para el desequilibrio de ligamiento las estimaciones fueron realizadas con el método de Markov con 1000 permutaciones (Excoffier *et al.*, 1992). También analizamos las posibilidades de determinar si la introgresión observada era ancestral o reciente, comparando el déficit tanto de heterocigos como de desequilibrio de ligamiento entre los mismos pares de loci. La hipótesis nula de no introgresión fue de asociación de alelos al azar entre los loci sin déficit de heterocigos y en equilibrio de ligamiento.

La estructura genética entre poblaciones se estimó con el modelo de mutación de un paso SMM (R_{ST}) para 5 poblaciones puras de *P. montezumae*, 3 de *P. pseudostrobus* y 5 híbridas putativas. Se aplicó un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) a una estructura de tres grupos de poblaciones: entre grupos (\emptyset_{CT}) poblaciones puras de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* e híbridas, entre poblaciones dentro de grupos (\emptyset_{SC}) y dentro de poblaciones (\emptyset_{ST}), su significancia fue obtenida por 1000 permutaciones no paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992). Para la estimación de los parámetros de la variación genética y de los estadísticos de la estructura genética se usó el programa Arlequin (Scheinder *et al.*, 2000).

Para detectar poblaciones mezcladas de las dos especies en estudio se realizó una aproximación con la estimación del flujo genético empleando el estadístico $M = 4Nm$, (Slatkin 1991), donde M es una estimación del número absoluto de migrantes que cambian entre dos poblaciones, $4N$ es el tamaño de la población y m es el estimado de la tasa de migración por generación. Este modelo supone que dos poblaciones de tamaño N obtenidas de un gran número de poblaciones intercambian una fracción m (migrantes) cada generación, y que la tasa de mutación u no es importante comparada con la tasa de migración.

Aislamiento por distancia y asociación filogenética

Para el análisis de aislamiento por distancias se utilizó el estadístico $M = (1/F_{ST} - 1/4)$ que analiza la migración de pares de poblaciones con relación a su distancia geográfica (Slatkin, 1993; Alvarez-Buylla y Garay, 1994). La significancia se obtuvo con el análisis de Mantel con 2000 permutaciones (Raymond y Rousset, 1995). Para determinar las relaciones filogenéticas se construyó un filograma de neighbor-joining, con las distancias estandarizadas

de Nei (1983), distancias que para microsatélites han presentado valores más altos de confiabilidad estadística que otras distancias (Takezakii y Nei, 1996). La significancia fue estimada con 1000 permutaciones (Takezaki y Nei, 1996). Para la reconstrucción del filograma y la obtención de su significancia estadística se utilizó el programa NJBAFG (Takezaki, 2000).

RESULTADOS

Patrones de variación morfológica

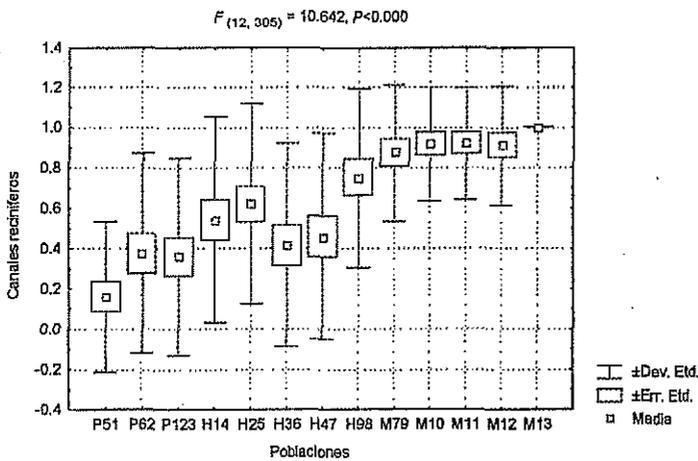
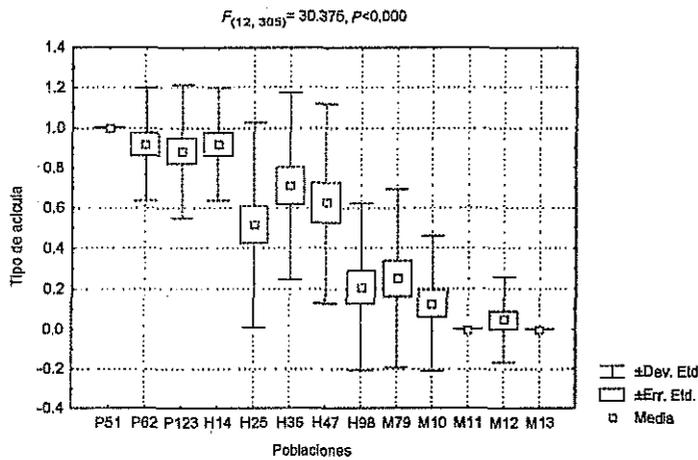
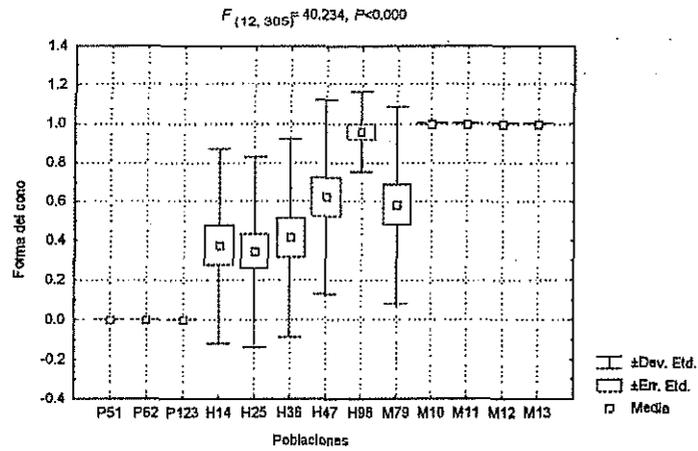
Para el análisis de los tres caracteres morfológicos en un total de 312 muestras se obtuvieron coeficientes de variación (D. E./M x 100) que fueron de 82.82 a 100.09 %. Los caracteres más variables fueron tipo de acícula y forma del cono (Tabla 2).

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de tres caracteres morfológicos en 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* e híbridas putativas.

Variable	N	Media	Desv. Est.	Coef. Var.
Conos (ovoide/conico)	312	0.553	0.498	90.05
Acículas (colgantes/extendidas)	312	0.509	0.500	100.09
C. resiníferos (2-4/3-8)	312	0.581	0.482	82.82

Con el análisis univariado (ANOVA) los tres caracteres presentaron diferencias altamente significativas en los valores medios entre los diferentes grupos de poblaciones (Fig. 2). Los valores del análisis de correlación entre las tres variables fueron altos con valores que van de 0.469 entre las variables forma del cono y tipo de acículas, de 0.400 entre las variables forma del cono y número de canales resiníferos, y de 0.407 entre tipo de acículas y canales resiníferos, todas las correlaciones fueron significativas ($P = < 0.0009$, significancia obtenida con una prueba de T de Student's).

Para ver si se presentaba algún efecto de selección de los caracteres morfológicos a nivel de las especies, se realizó un fenograma (UPGMA), el cual agrupa a las poblaciones en términos de similitud de sus conos, acículas y canales resiníferos (Fig. 3). Se detectaron dos grupos, el primero formado por las poblaciones de *P. montezumae* y una población híbrida (H98), y el segundo formado por poblaciones híbridas y las tres de *P. pseudostrobus*. Este análisis indica que las poblaciones de *P. montezumae* son mas fuertemente asociadas con relación al resto de las poblaciones de *P. pseudostrobus* e híbridas putativas, lo que sugiere la



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Valores promedio \pm , Dev. Etd. (Desviación Estandar), Err. Etd. (Error Estandar) y media, para tres caracteres morfológicos medidos en 312 árboles de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* e híbridas putativas. En la parte superior de las gráficas se muestran los resultados del análisis de varianza (F y P).

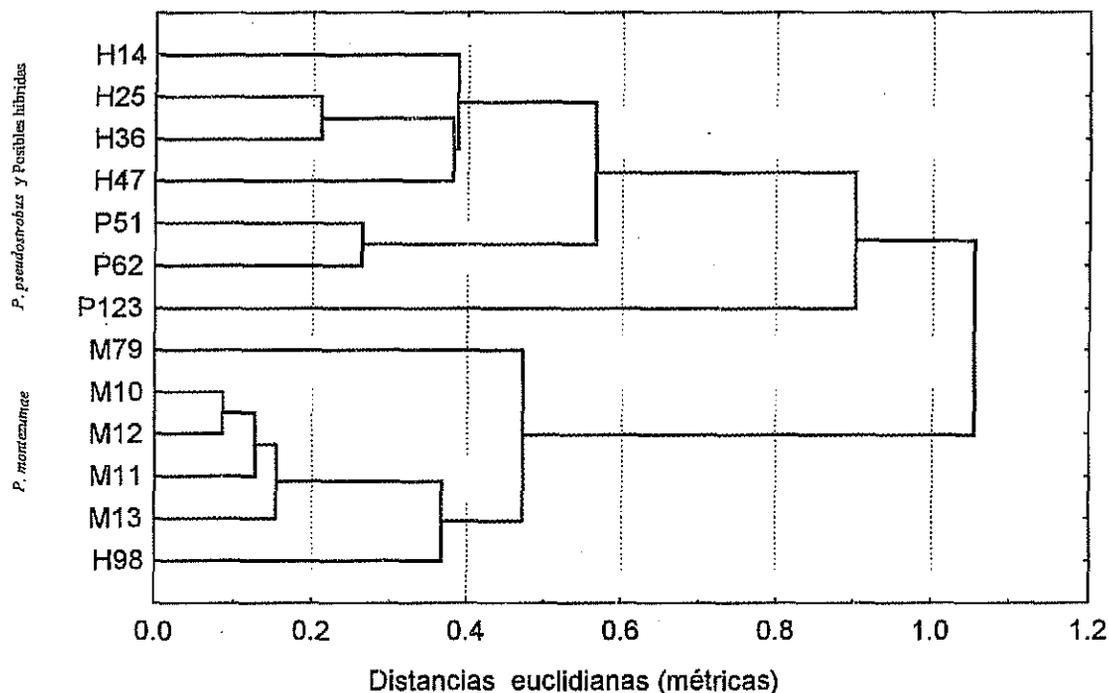


Figura 3. Fenograma (UPGMA) de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* e híbridas putativas en México y Guatemala, basado en las distancias euclidianas de tres caracteres morfológicos (tipo de acículas, forma del cono y número de canales resiníferos).

existencia de eventos de hibridación introgresiva de *P. montezumae* al resto de las poblaciones. Estos resultados son importantes porque reflejan la asociación de los individuos por su morfología entre especies y la adquisición de adaptaciones morfológicas al ambiente.

Variación genética

Se ensayaron doce microsatélites, de los cuales 5 fueron monomórficos y 4 no amplificaron en todos los individuos. Solo tres microsatélites polimórficos amplificaron para todas las poblaciones. El tamaño de los fragmentos varió de 2 a 10 pb. Se obtuvieron 25 alelos en total, de 4 a 8 por población. Las poblaciones híbridas putativas presentaron el mayor número de alelos (20), seguido de *P. pseudostrobus* (18), y *P. montezumae* (19). Se presentaron tres alelos privados en la población P51 de *P. pseudostrobus* para el locus PtTX3013 (125, 139, 140 pb) y uno para el locus PtTX3025 (274pb).

Tabla 3. Frecuencias alélicas de 3 microsátélites obtenidas para 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudoastrobus* e híbridas putativas en México y Guatemala.

Loci (No)	<i>P. pseudoastrobus</i> (No. Pob. = 3) N = 72			Híbridas putativas (No. Pob. = 5) N = 120					<i>P. montezumae</i> (No. Pob. = 5) N = 120				
	P51	P62	PI23	H14	H25	H36	H47	H98	M79	M10	M11	M12	M13
PtTX3025 (1)													
264	0.00	0.04	0.00	0.04	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
268	0.12	0.02	0.04	0.00	0.08	0.02	0.00	0.00	0.06	0.06	0.00	0.00	0.00
269	0.00	0.02	0.00	0.00	0.02	0.00	0.06	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00
270	0.84	0.92	0.94	0.96	0.88	0.96	0.94	0.88	0.86	0.78	0.86	0.75	0.80
272	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.06	0.00	0.04	0.10	0.14	0.20
274	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00
276	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00
278	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.06	0.04	0.00	0.02	0.00
PtTX3013 (2)													
125	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
127	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
130	0.13	0.02	0.00	0.00	0.04	0.02	0.00	0.04	0.00	0.00	0.25	0.05	0.00
135	0.54	0.94	1.00	1.00	0.94	0.98	0.83	0.88	0.94	1.00	0.65	0.88	0.98
137	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.15	0.00	0.06	0.00	0.06	0.05	0.02
139	0.10	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
141	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PtTX2123 (3)													
190	0.02	0.07	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.10
192	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
194	0.00	0.00	0.04	0.02	0.00	0.00	0.11	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.08
196	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02	0.04	0.00	0.02	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00
198	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.11	0.19	0.10	0.21	0.00	0.00	0.19
200	0.92	0.83	0.94	0.96	0.77	0.60	0.44	0.71	0.65	0.67	0.98	1.00	0.63
204	0.04	0.06	0.00	0.00	0.00	0.06	0.04	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
206	0.02	0.02	0.00	0.00	0.17	0.13	0.04	0.02	0.13	0.04	0.00	0.00	0.00
208	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.04	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Asimismo, se presentó un alelo privado en las poblaciones híbridas de H25, H36 y H98, para el locus PtTX2123 (208), así como en las poblaciones H98 y H36 para el locus PtTX3013 (126), y el locus PtTX2123(192) de manera respectiva. En *P. montezumae* no se encontraron alelos exclusivos o privados (Tabla 3). Los alelos más frecuentes fueron 270, 135, 200, tanto en poblaciones puras como híbridas. Los alelos más frecuentes para las poblaciones puras de *P. montezumae* fueron el 270, 135, y 198, para *P. pseudoastrobus* los alelos 270, 136 y 200, y para las poblaciones híbridas putativas los alelos 270, 135, y para el

tercer locus los alelos 206 y 208, lo que puede ser un indicador de altos niveles de flujo genético entre las poblaciones.

Tabla 4. Sumario de estimados de la variación y estructura genética en 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* e híbridas. Para cualquier población se muestra: el nombre de la población y tamaño (N); el número de alelos (A); la diversidad genética obtenida de los haplotipos (H); la heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_E); * = la probabilidad de déficit de heterócigos ($P = 0.05$); D. E. = Desviación Estandar; F_{IS} y R_{ST} = la divergencia genética dentro y entre poblaciones con el modelo de un paso (SMM); F_{IS}^* valores significativos que se desvían de H-W por exceso de homocigos ($P = 0.05$); R_{ST}^* valores significativos de diferenciación genética ($P = 0.05$).

Población	N	A	H (D.E)	H_o	H_E	P	$F_{IS}(SMM)$	$R_{ST}(SMM)$
<i>P. pseudostrobus</i>								
P51	24	13	0.349 (0.262)	0.354	0.399	0.771		
P62	23	13	0.176 (0.166)	0.178	0.223	0.687		
P123	23	9	0.084 (0.107)	0.086	0.147	1.000		
Media	23	11.6	0.203 (0.178)	0.206	0.256		0.038	0.022
Híbridas putativas								
H14	24	6	0.055 (0.084)	0.083	0.122	1.000		
H25	24	12	0.246 (0.206)	0.278	0.271	1.000		
H36	24	11	0.244 (0.205)	0.236	0.272	0.820		
H47	23	10	0.213 (0.218)	0.396	0.362	0.743		
H98	24	9	0.309 (0.241)	0.208	0.346	0.033*		
Media	24	9.6	0.213 (0.191)	0.241	0.275		0.049	0.082*
<i>P. montezumae</i>								
M79	24	10	0.289 (0.230)	0.342	0.328	0.934		
M10	24	11	0.280 (0.225)	0.212	0.302	0.013*		
M11	24	8	0.249 (0.208)	0.227	0.298	0.671		
M12	20	8	0.107 (0.146)	0.126	0.244	0.516		
C13	24	8	0.217 (0.190)	0.188	0.200	0.668*		
Media	23	9	0.228 (0.199)	0.219	0.273		0.138*	0.122*
Media general	23	10	0.214 (0.21)	0.221	0.274		0.075	0.075

Nota: H_o y H_E presentaron valores de D. E. iguales a cero, no significativos ($P = 0.05$)

Los niveles de diversidad genética fueron diferentes entre las poblaciones y especies (Tabla 4). Las poblaciones más diversas genéticamente (H) fueron dos puras de *P. montezumae* M79 ($H_E = 0.289$), M810 ($H_E = 0.280$) y una híbrida H98 ($H_E = 0.309$). Los valores más bajos se presentaron en las poblaciones distribuidas en Guatemala, la P123 ($H_E = 0.084$) y la M12 ($H_E = 0.107$). La heterocigosis observada y esperada fue muy semejante, pero variable entre las poblaciones, los valores por ejemplo de H_o más contrastantes se presentaron dentro de las poblaciones híbridas, de 0.083 (H14) a 0.396 (H47), en *P.*

montezumae el valor fue de 0.126 (TM12) a 0.342 (M810), y en *P. pseudostrobus* de 0.086 (P123) a 0.354 (P51). La contribución de la diversidad genética de las poblaciones parentales ($H = 0.2155$) fue igual al de las poblaciones híbridas ($H = 0.213$). Sin embargo la estimación de la heterocigosis observada fue más alta para las poblaciones híbridas ($H_o = 0.241$) que de *P. pseudostrobus* ($H_o = 0.206$) y *P. montezumae* ($H_o = 0.219$). Estos patrones proporcionan un primer indicador de la detección de introgresión con la mayor contribución de la variación genética de poblaciones híbridas putativas

Tabla 5. Análisis de Varianza Molecular para los alelos de tres nSSR de 13 poblaciones de *Pinus montezumae*, *P. pseudostrobus* e híbridas putativas. $\theta = 2Nu$. (D. E = desviación estandar)

	Modelos		
	Infinito (IAM)		Un paso (SSM)
	$\theta_{(HOM)}$	(D. E)	$\theta_{(HOM)}$
<i>P. pseudostrobus</i>			
P51	3.93	1.34	16.75
P62	0.63	0.24	1.200
P123	0.19	0.09	0.290
Promedio	1.56		4.320
<i>Híbridas putativas</i>			
H14	0.14	0.07	0.210
H25	1.07	0.34	2.430
H36	1.62	0.52	4.410
H47	3.82	1.06	16.03
H98	1.84	0.61	5.270
Promedio	1.608		5.724
<i>P. montezumae</i>			
M79	2.27	0.76	7.220
M10	1.73	0.60	4.850
M11	1.73	0.48	4.850
M12	0.83	0.29	1.720
M13	1.22	0.35	2.940
Promedio	1.56		4.320
Promedio general	1.58		6.08

El análisis de varianza molecular para las frecuencias alélicas indica que las poblaciones puras de *P. pseudostrobus*, e híbridas putativas tienen tres veces más varianza

que las poblaciones de *P. montezumae*. Esto es, el tamaño efectivo (N_e) de estas poblaciones es mayor que el de las poblaciones de *P. montezumae*. Sin embargo, en el análisis entre los tres grupos de poblaciones no se obtuvieron diferencias significativas. Esto indica que el flujo genético es parecido entre grupos (Tabla 5).

Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

El análisis de desequilibrio de Hardy-Weinberg reveló una disminución de heterócigos para los tres loci en seis poblaciones, los valores con mayor significancia estadística fueron la población H98 híbrida putativa ($P = 0.0012$), seguida de la población P62 ($P = 0.006170$) de *P. pseudostrobis*, M810 ($P = 0.00857$) y la M13 ($P = 0.00465$) de *P. montezumae*. Las dos poblaciones restantes muestran valores pequeños y cercanos a cero, que son la población M11 ($P = 0.0122$) y la M12 ($P = 0.0327$) (Tabla 4). Sin embargo, los valores promedio obtenidos para el estadístico F_{IS} (variación genética intrapoblacional) (ver Tabla 4) presentan un déficit de heterócigos con valores significativos solo para las poblaciones de *P. montezumae* ($F_{IS} = 0.1397$; $P = 0.000$), pero no en las poblaciones de *P. pseudostrobis* ($F_{IS} = 0.0386$; $P = 0.2600$) e híbridas putativas ($F_{IS} = 0.0494$; $P = 0.260$), y sugiere que el entrecruzamiento entre estas poblaciones se presenta al azar, y que en general se encuentran en equilibrio H-W.

Los resultados del análisis de desequilibrio de ligamiento entre las poblaciones y todos los pares posibles de loci se muestran en la Tabla 6. El número de asociaciones significativas entre todos los posibles pares de loci fue muy bajo. Solo tres poblaciones híbridas H25, (PtTX3025-PtX3013), H98 y H47 (ambas PtTX3013-PtX2123) y una población parental de *P. pseudostrobis* P62 (PtTX3025-PtX2123) se encontraron en desequilibrio de ligamiento ($P = 0.05$), en el resto de las poblaciones se encontró que los alelos de los diferentes loci están asociados a azar.

Estructura genética

El promedio de la estructura genética entre las poblaciones fue moderadamente alto ($R_{ST} = 0.075$), varió de -0.02 a 0.256. El valor más alto de la estructura genética se presentó entre las poblaciones de *P. montezumae* ($R_{ST} = 0.122$), seguido de las poblaciones híbridas ($R_{ST} = 0.082$), y de *P. pseudostrobis* ($R_{ST} = 0.022$) (ver Tabla 4). También se observaron

diferencias significativas de las frecuencias alélicas de las poblaciones de *P. montezumae* e híbridas ($R_{ST} = 0.102$; $P < 0.000$), el valor más altamente significativo se presentó entre las poblaciones M13 de *P. montezumae* y H25 híbrida ($R_{ST} = 0.256$), seguido de la población M11 de *P. montezumae* y H47 híbrida ($R_{ST} = 0.250$). En contraste, no se presentaron diferencias significativas entre las poblaciones híbridas putativas y de *P. pseudostrobus* (promedio $R_{ST} = 0.052$; $P < 0.300$). Las poblaciones más divergentes entre *P. pseudostrobus* e híbridas putativas fueron la P123 con H25 y H47 ($R_{ST} = 0.138, 0.082$ respectivamente).

Tabla 6. Prueba de desequilibrio de ligamiento para todos los pares de loci en 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* e híbridas putativas. Solo las probabilidades del desequilibrio de ligamiento son incluidas. Datos con un asterisco son significativos entre pares de loci ($P < 0.05$). Los números de cada loci representan los nSSR descritos en la Tabla 3.

Poblaciones	Pares de loci		
	1/2	1/3	2/3
<i>P. pseudostrobus</i>			
P51	0.57	0.93	0.82
P62	0.33	0.01*	0.63
P123	1.00	0.07	1.00
Híbridas putativas			
H14	1.00	1.00	1.00
H25	0.04*	0.37	0.67
H36	1.00	0.28	0.67
H47	0.77	0.15	0.01*
H98	0.99	0.96	0.04*
<i>P. montezumae</i>			
M79	0.95	0.37	0.73
M10	1.00	0.60	1.00
M11	0.60	0.85	0.83
M12	0.31	1.00	1.00
M13	1.00	0.58	1.00

El análisis de varianza molecular (AMOVA) presentó valores bajos pero significativos tanto entre grupos ($R_{ST} = 0.064$; $P < 0.000$) como dentro de cada grupo ($R_{SC} = 0.059$; $P < 0.000$) y en el total de las poblaciones ($R_{CT} = 0.005$ ($P < 0.05$)). El porcentaje de la variación entre grupos fue de 0.046%, entre poblaciones dentro de grupos (5.83%), y el mayor porcentaje de la variación se encontró dentro de las poblaciones (93.67%). Aunado a esto realizamos un análisis de varianza molecular agrupando de manera independiente a las poblaciones puras de cada especie, así como de las poblaciones híbridas. En este caso, *P.*

montezumae presentó el mayor porcentaje de variación entre las poblaciones (12.26 %), seguido de las poblaciones híbridas putativas (8.15 %) y de las poblaciones de *P. pseudoastrobus* (2.36 %) Estos resultados sugieren que las poblaciones de *P. pseudoastrobus* e híbridas putativas están genéticamente menos estructuradas que las poblaciones puras de *P. montezumae*.

Patrones de flujo genético

Los resultados del flujo genético estimados con el parámetro M (migración para pares de poblaciones) presentaron valores altos (Fig. 4). La población H36 híbrida putativa y 3 de *P. montezumae* presentaron valores infinitos. Los otros valores de M altos fueron obtenidos entre las poblaciones de *P. montezumae*, M11 y M12 ($M = 763$), así como entre poblaciones híbridas putativas y puras de alguna de las dos especies, H36 y M12 ($M = 306.4$), H14 y P123 ($M = 112.7$), H98 y P51 ($M = 112.0$), H47 y P62 ($M = 106.7$). Nuevamente, este resultado refleja más flujo genético entre las poblaciones de *P. pseudoastrobus* e híbridas putativas, y entre estas últimas con valores infinitos en algunos casos.

Figura 4. Matriz de M ($4Nm$) entre 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudoastrobus* y posibles híbridas en México y Guatemala. Inf = valor infinito.

Pobl.	<i>P. pseudoastrobus</i>													
P51	---													
P62	18.1	---												
P123	17.7	42.2	---											
H14	20	39.1	112.7	---										
H25	21.1	07.5	5.6	07.6	---								<i>Posibles híbridos</i>	
H36	Inf	Inf	Inf	Inf	Inf	---								
H47	05.1	106.7	03.2	02.3	10.1	Inf	---							
H98	112	07.9	09.9	6.9	13.0	29.7	05.1	---						
M79	11.6	06.7	06.7	05.4	Inf	Inf	07.2	17.6	---					
M10	15.2	103.8	Inf	13.5	06.5	Inf	08.9	15.5	10.8	---				<i>P. montezumae</i>
M11	45.2	03.8	03.3	02.5	04.3	11.0	01.5	Inf	03.8	04.7	---			
M12	17.7	06.9	19.5	05.6	07.3	306.4	01.9	89.9	37.8	763	04.22	---		
M13	02.9	06.9	03.3	02.3	01.4	03.8	08.8	2.7	01.8	06.7	01.8	01.9	---	
	P51	P62	P123	H14	H25	H36	H47	H98	M79	M10	M11	M12	M13	

Aislamiento por distancia y relaciones filogenéticas

Las poblaciones más alejadas genéticamente (D_A) fueron dos población de posibles híbrida H14 y H47 (0.250-0.168). Las poblaciones más cercanas genéticamente fueron las poblaciones puras de *P. montezumae* (0.005), y una mezcla entre las poblaciones híbridas y puras de las dos especies. Estos resultados sugieren que tanto poblaciones híbridas como puras presentan distancias genéticas muy similares, por lo que no se observan diferencias significativas. Además, no se presentó ningún patrón de aislamiento por distancia entre poblaciones puras de cada grupo y entre el total de las poblaciones analizadas ($r = 0.120$, $P = 0.333$).

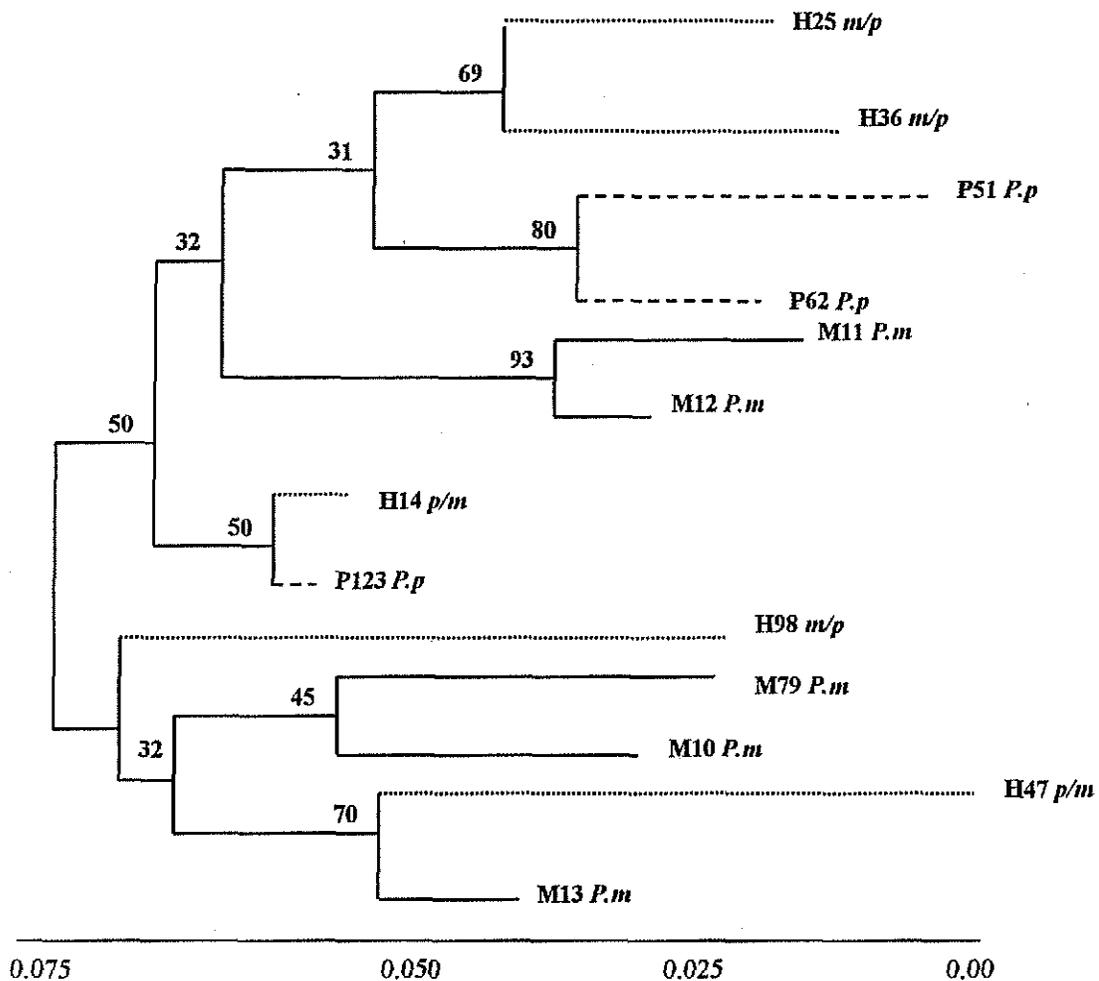


Figura 5. Filograma que muestra las relaciones genéticas entre poblaciones (D_A) con base a 3 SSR nucleares. Bootstrap basado en 1000 replicas (porcentajes). Las ramas con interlineado representan a las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* (*P. p*); las ramas con líneas continuas representan a las poblaciones puras de *P. montezumae* (*P. m*), y las líneas punteadas a las posibles poblaciones híbridas, dominadas por individuos de *P. montezumae* (*m/p*) o bien por *P. pseudostrobus* (*p/m*).

El filograma obtenido muestra dos grupos, el primero formado por las tres poblaciones puras de *P. pseudostrobis*, tres poblaciones híbridas (H25, H36, y H14) y dos de *P. montezumae* (M11 y M12). Mientras que el segundo grupo, esta representado por tres poblaciones puras de *P. montezumae* (M79, M10, y M13) y dos poblaciones híbridas (H98 y H47) (Fig. 5). Estos resultados sugieren que la mayoría de las poblaciones híbridas están mas ligeramente relacionadas a las poblaciones puras de *P. pseudostrobis* que con las poblaciones de *P. montezumae*, y por el otro lado, que la introgresión es simétrica, con intercambio de material genético entre las dos especies.

Si comparamos las agrupaciones obtenidas con ambos caracteres morfológicos y moleculares vemos que la población H98 se ubica en ambos casos dentro del grupo de *P. montezumae*. Las poblaciones puras de *P. montezumae* M11 y M12, se asocian fuertemente entre ellas (molecular = 93% morfológico = 97%), pero en el caso de los datos moleculares se observa la mezcla de alelos entre estas poblaciones y las poblaciones puras de *P. pseudostrobis* e híbridas putativas, lo cual indica que las agrupaciones formadas con ambos tipos de datos son diferentes.

DISCUSIÓN

Amplificación hetero-especifica

Se ha reportado que para detectar alelos heteroespecíficos en poblaciones de diferentes especies se requiere tener bien diferenciadas a las poblaciones alopátricas y del uso de marcadores altamente polimórficos (Williams *et al.*, 2000; Elsik *et al.*, 2001). Por lo que los microsatélites son ampliamente recomendables, sin embargo, se ha mencionado que los nSSR, son marcadores de muy poca información para hacer inferencias filogenéticas, ya que los polimorfismos tienden a ser ampliamente variables de taxon a taxon (Feldman *et al.*, 1997), o bien, se presenta muy poca diferenciación en el tamaño medio de los alelos en taxa muy relacionados filogenéticamente, por lo que no separan claramente a las especies (Garza *et al.* 1995). En este estudio, demostramos que nSSR trinucleótidos pueden ser de gran ayuda para diferenciar entre taxa muy relacionados filogenéticamente como fueron las poblaciones puras de cada especie, así como para detectar eventos de hibridación introgresiva entre las poblaciones de las especies. Los microsatélites usados en este estudio han sido caracterizados por ser muy similares entre las secuencias de los sitios de anclaje de los iniciadores, de la

región que amplifican los iniciadores y de la composición de los nucleótidos, soportando el supuesto de ortología (Kutil y Williams, 2001). Lo que puede ser sustentado con las secuencias obtenidas en este trabajo (ver número de acceso a GenBank en el apartado de materiales y métodos). En contraste, los nSSR dinucleótidos imperfectos ó compuestos, dejan duplicaciones de fragmentos o no amplifican entre especies (Karhu *et al.*, 2000; Kutil y Williams, 2001). Solo los microsatélites formados por trinucleótidos fueron polimórficos y conservados en las especies estudiadas y en varias especies ensayadas de ambos subgéneros (datos no mostrados), por lo que al igual que Kutil y Williams (2001) concluimos que nSSR trinucleótidos pueden ser muy buenos candidatos para atestiguar polimorfismos trans-específicos entre especies.

Variación y estructura genética

Las poblaciones analizadas presentaron valores relativamente altos e iguales para todos los estimadores de la variación genética. Los valores de H_E , se encuentran entre el promedio obtenido para otras especies de pino reportadas con isoenzimas de 0.200 a 0.250 (Ledig 1998; Delgado *et al.*, 2002) (revisar la Tabla 1 del capítulo II), así como para el promedio de nSSR en 5 especies que se han analizado de 0.26 a 0.30 (este estudio y el de Moreno 2002) (ver Tabla 7). Los valores de H fueron semejantes en las poblaciones híbridas y de *P. montezumae*, y la H_o fue mayor en las poblaciones híbridas putativas. Se ha demostrado que la contribución de los híbridos a la variación genética debe ser mayor a la de los parentales, por lo que la variabilidad genética se ve incrementada (Arnold, 1992; Roques *et al.*, 2001). En este caso, las poblaciones híbridas putativas presentaron los valores más altos de variación genética. Además, estas poblaciones presentaron el mayor número de alelos únicos o raros. Lo que puede deberse a nuevas mutaciones o por introgresión con otras especies (Williams *et al.*, 2000). En particular se han detectado eventos de introgresión de *P. montezumae* y *P. hartwegii* en México (Matos *et al.*, 2000), situación que puede ser una explicación para la presencia de alelos raros en estas poblaciones híbridas putativas como es el caso de la población H98 de Chiapas, donde la especie cohabita con *P. hartwegii* y podrían estar presentando eventos de flujo genético interespecífico entre sus poblaciones.

Tabla 7. Estimados de la heterocigosis esperada (H_E) obtenidos con microsatélites nucleares (nSSR) en especies de pinos (los nSSR fueron aislados de *P. taeda* y descritos por Elsik *et al.*, 2000).

Taxon	Tipo de distribución	H_E	Número de Loci	Referencia
<i>P. maximartinezii</i>	Restringida	0.300	3	Moreno (2001)
<i>P. nelsonii</i>	Restringida	0.071	3	Rentería (2001)
<i>P. taeda</i>	Amplia	0.513	18	Elsik <i>et al.</i> (2000)
<i>P. montezumae</i>	Amplia	0.274	3	Este estudio
<i>P. pseudostrobus</i>	Amplia	0.260	3	Este estudio
Promedio		0.283		

Como menciona Weir (1996), en ausencia de selección una simple generación de apareamiento al azar puede restaurar el equilibrio H-W en poblaciones híbridas, conclusión que podría ser aplicada al presente estudio, ya que solo una población híbrida (H98) presentó desviaciones de H-W y el valor promedio de la F_{IS} para las cinco poblaciones híbridas putativas no se desvían significativamente de H-W. Estos resultados son comparables a los obtenidos con otras especies de pino (Williams *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Por ejemplo, Wang *et al.*, (2001) encuentra que para un complejo de especies (*P. yunnanensis*, *P. tabuliformis* y *P. densata*), ninguna de las poblaciones se desvía significativamente de H-W. Ellos concluyen que el encontrarse las poblaciones en equilibrio H-W es un indicativo de un estado avanzado de estabilización de estas poblaciones híbridas. Aunado a lo anterior, las poblaciones híbridas putativas fueron las que se encontraron en más desequilibrio de ligamiento, lo cual puede estar directamente relacionado con el flujo genético entre las mismas. Weir y Cockerham (1979) mencionan que en poblaciones que se encuentran en desequilibrio de ligamiento el flujo genético es uno de los factores que las mantiene en tal condición, como es el caso de las poblaciones híbridas putativas donde se observan los valores más altos de flujo genético entre las mismas, incluso se presentan valores infinitos de Nm .

El valor promedio de diferenciación genética (R_{ST}) obtenido fue semejante a los reportados con isoenzimas para pinos de amplia distribución, de 0.13 (Ledig, 1998; Karhu *et al.*, 1996). Sin embargo, los valores de R_{ST} fueron contrastantes entre las poblaciones de *P. montezumae* (0.12) y *P. pseudostrobus*, (0.02), esto puede ser explicado parcialmente por su distribución geográfica, ambas especies se distribuyen en áreas similares y la mayoría de sus poblaciones cohabitan en simpatria. Sin embargo las poblaciones puras de *P. pseudostrobus*

comparten más alelos con las poblaciones híbridas, por lo que probablemente su distribución es más continua, y el tamaño de sus poblaciones es mayor. En contraste, las poblaciones de *P. montezumae* se distribuyen en forma discontinua, por lo que están fragmentadas y presentan valores altos de estructura genética. Lo cual puede ser sustentado con los valores de N_e , donde las poblaciones de *P. montezumae* presentaron algunos tamaños poblacionales menores a *P. pseudostrobus* (ver Tabla 4).

Flujo genético y relaciones filogenéticas

La estimación del flujo genético (con base a la M) fue alta entre y dentro de las poblaciones puras e híbridas putativas, superior a las reportadas en otras especies de pinos de amplia distribución (*P. flexilis*: Schuster *et al.*, 1989; *P. taeda*: Friedman *et al.*, 1985). Tanto las poblaciones híbridas putativas como puras tienen diferentes grados de hibridación introgresiva, por lo que el intercambio de material genético no muestra un patrón geográfico claro. Por ejemplo, la población mezclada H98 que se distribuye en Chiapas fue una población que presentó valores altos de diversidad genética y de desequilibrio de ligamiento, pero sus valores de flujo genético estuvieron en la media del resto de las poblaciones. En cambio, la población H36 tuvo valores altos de flujo genético tanto con poblaciones puras como híbridas. Esta población, junto con el resto de las poblaciones híbridas se distribuyen en el Eje Neovolcánico, por lo que es muy probable que esta zona sea un centro de hibridación entre estas especies, y probablemente con otras especies con las que se asocian, como *P. teocote*, *P. douglasiana*, *P. michoacana* y *P. hartwegii*.

Las relaciones genéticas de las poblaciones indican que existe una hibridación introgresiva bidireccional, por lo que los dos grupos que forma el filograma no presentaron distancias genéticas grandes, resultado que podría sugerir que la hibridación introgresiva se ha presentado a través de la historia evolutiva de estas especies, y podría ser ancestral. Aunado a esto los resultados de los datos morfológicos nos muestran que las poblaciones híbridas putativas están más asociadas a las poblaciones puras de *P. pseudostrobus*, donde se observa una agrupación más fuerte de las poblaciones puras de *P. montezumae*. Asociación que también se obtuvo con datos de microsatélites de cloroplasto (cpSSR) (Capítulo IV), lo cual indica que *P. montezumae* es una especie más cohesiva evolutivamente lo que se refleja en su morfología. Es probable que los caracteres utilizados sean filogenéticamente

diagnósticos de estas especies, ya que la topología del filograma obtenido con cpSSR concuerda con el obtenido con los caracteres morfológicos. Vemos entonces que la comparación de caracteres morfológicos y de cpSSR con relación a los nSSR es interesante, ya que se presentaron diferencias en las agrupaciones que no fueron detectadas con datos morfológicos ni con cpSSR y que sin embargo existen con el uso de ADN biparental (2N), demostrando el grado de la introgresión (ancestral) y las adaptaciones ecológicas diferentes de las poblaciones de las dos especies. Es decir, se observa una mayor capacidad adaptativa de *P. montezumae* a condiciones variables que *P. pseudostrobus*, ya que *P. montezumae*, tiene una mayor capacidad de invadir diferentes hábitat, mayor diseminación de polen y fertilidad.

La presencia de alelos iguales en todas las poblaciones puede deberse a tres aspectos: 1) las limitaciones de los marcadores usados, ya que los alelos más frecuentes fueron los mismos para todas las poblaciones y solo algunos fueron únicos para las poblaciones parentales pero con frecuencias bajas. Sin embargo, en el trabajo realizado con cpSSR (Capítulo IV), también se encontraron alelos compartidos entre las especies, aunque en frecuencias bajas, lo cual no influyó para el seguimiento de la dinámica de las rutas de la introgresión; 2) diferentes tasas de mutación en comparación a SSR de cloroplasto. Las tasas de mutación calculadas para cpSSR en pinos son de 10^{-5} (Provan *et al.*, 1999). Las tasas de mutación para nSSR en pinos no se conocen, pero podrían ser menores a los cpSSR, al ser formados en su región repetitiva por dinucleótidos o trinucleótidos, las probabilidades de mutación son menores que en microsatélites formados por mononucleótidos como son los cpSSR; y 3) la manera en que se heredan los nSSR, biparental (2N), por lo que el tamaño efectivo es por lo menos dos veces mayor que el de ADN citoplasmático en condiciones de equilibrio (Dong y Wagner, 1994). Por ende, tiene dos veces más probabilidades de generar un mayor grado de traslape de alelos. Dicho traslape sin embargo nos puede proporcionar mayor información de la cantidad de flujo genético y del grado de introgresión entre las poblaciones que el ADN uniparental (Lu, 2001). Esto es, los microsatélites nucleares son más precisos en detectar eventos de introgresión y los marcadores citoplasmáticos nos pueden hablar más de las relaciones genealógicas de las poblaciones y de linajes originados por la introgresión. Es importante subrayar que este tipo de resultados solo se pueden generar a través de la introgresión acumulada durante muchas generaciones, por lo que podemos

considerar que en esta primera aproximación de la detección de la hibridación introgresiva, las frecuencias tan homogeneizadas entre las diferentes poblaciones si están reflejando una alta incorporación de alelos interespecíficos por hibridación ancestral.

Varios factores pueden estar involucrados en la hibridación introgresiva simétrica observada, principalmente factores ecológicos, como son: selección del hábitat, abundancia y periodos reproductivos. Hasta ahora no existen antecedentes de la capacidad de dispersión de polen y/o fertilidad de semillas de estas especies, sin embargo Delgado (1994) reporta para una zona de Michoacán que *P. montezumae* produce 49% más semillas viables que *P. pseudostrabus*, por lo que algunas de las diferencias obtenidas (por ejemplo en la diversidad genética o heterocigosis) podrían deberse a una mayor viabilidad de semillas y fertilidad de polen de *P. montezumae* que de *P. pseudostrabus*. También se conoce que para algunas coníferas el polen puede dispersarse sobre grandes distancias, más de 1500 m (Adams, 1992), y algunas semillas alcanzan más de 300 m (Zasada, 1985). Estas estimaciones nos hablan de la factibilidad de intercambio de polen entre poblaciones de especies muy relacionadas, donde bajos niveles de flujo genético son suficientes para la homogenización. *P. montezumae* y *P. pseudostrabus* son especies que en su mayoría habitan en simpatria y que su ciclo fenológico esta sobrelapado (Patiño *et al.*, 1983). Esto promueve oportunidades de diseminación de polen de ambas especies en periodos de tiempo semejantes y consecuentemente la activación de la hibridación introgresiva.

La contribución de una u otra especie parental a la hibridación introgresiva es muy difícil de discernir con la información obtenida. Sin embargo, en el estudio de Delgado *et al.*, (Capítulo IV), realizado con cpSSR, y con las mismas especies, se encontró una introgresión asimétrica de *P. montezumae* a *P. pseudostrabus*, es decir incorporación de material genético de cloroplasto vía polen. Probablemente la alta homogenización que observamos en este estudio puede deberse a la contribución de la hibridación introgresiva de *P. pseudostrabus*, probablemente actúa como especie madre y receptora de polen, y la incorporación de sus variantes alélicas a *P. montezumae* puede estar dada por una eficiente diseminación de semillas. Esta hipótesis puede ser estudiada con un análisis de ADN de mitocondria, ya que esta se hereda vía materna. En conclusión, los factores que posiblemente están más relacionados con la hibridación introgresiva de estas especies, son, i) el rompimiento de las barreras reproductivas entre las dos especies (lo cual se facilita en pinos al no existir

mecanismos precigóticos que impidan la unión o fusión de los gametos) ii) los sistemas reproductivos de entrecruzamiento, iii) una eficiente diseminación de polen y semillas por el viento y iv) una mayor capacidad adaptativa de *P. montezumae*.

Especiación y conservación

El impacto que deja la hibridación introgresiva es de gran importancia tanto desde el punto de vista evolutivo como de la biología de la conservación. En el primer aspecto, un posible escenario de la historia evolutiva sería que entre estas especies podría haber introgresión ancestral, proceso que ha permanecido hasta ahora a través de la transmisión continua de material genético entre las poblaciones de ambas especies. En la actualidad esto podría haber originado la disminución del rango de distribución de las poblaciones puras, principalmente de *P. pseudostrobis*, donde varias de las poblaciones híbridas putativas fueron indígenas de *P. pseudostrobis* y que actualmente están conformadas por individuos posibles híbridos. Hipótesis que es de gran relevancia porque nos habla de la extinción de poblaciones locales y colonización de individuos originados por el proceso de hibridación introgresiva. Las implicaciones que tienen estos resultados en la biología de la conservación son claras: se requiere de la conservación "in situ" de por lo menos tres poblaciones híbridas putativas, en Chiapas (H98) y en el Estado de México (H36 y H47), siendo estas últimas las más diferenciadas genéticamente, por lo que posiblemente podrían representar dos centros de diversificación genética y el posible origen de un linaje independiente. Finalmente, para estas especies existe una gran deforestación, *P. pseudostrobis* ocupa el primer lugar de especies maderables para su explotación y comercialización dentro y fuera de México y Centroamérica (Saucedo y Acosta, 1988). Por tal motivo la deforestación ha contribuido a la modificación del hábitat con la consecuente colonización de otras especies por hibridación introgresiva.

Es difícil predecir cuales hibridación pueden dejar zonas estables y cuales pueden ocasionar la extinción de las poblaciones locales; mucho más estudios empíricos, particularmente los relacionados con el rompimiento de barreras reproductivas entre estas especies y con la adecuación de las poblaciones híbridas, podrían ayudar a clarificar el efecto que tienen los híbridos en la extinción de poblaciones parentales y en su exitosa colonización.

AGRADECIMIENTOS

Estamos muy agradecidos con Rodolfo Salas y Felipe Nepamuceno por su ayuda en la colecta de muchos ejemplares de este estudio. También agradecemos a la Dra. Williams por su motivación para trabajar nSSR. A Jordan Golubov su gran ayuda en el montaje de la técnica de tinción con plata. Alejandra Moreno y Miroslava Rentería por iniciar el montaje de los nSSR en el laboratorio de Genética y Evolución, y el apoyo logístico de Rosalinda Tapia y Caroline Burgeff. A los Drs. Elena Álvarez-Buylla y Luis Eguiarte, por sus comentarios y sugerencias de los análisis y del escrito. Este estudio fue financiado por la CONABIO- R116 de Delgado y Piñero y por CONACYT- 3777N de Piñero y Gernandt.

LITERATURA CITADA

- Adams, W. T. 1992. Gene dispersal within forest tree populations. *New For.* 6: 217-240.
- Alvarez-Buylla, R. E., and A. A. Garay. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia* a tropical pioneer species. *Evolution*, 48: 437-453.
- Arnold, M. L. 1992. Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual review of Ecology y Systematics*, 23: 237-261.
- Arnold, M. L, and S. A. Hodges. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents. *Trends in Ecology an Evolution*, 10: 67-71.
- Bucci, G., M. Anzide., A. Madaghiele, and G. G. Vendramín. 1998b. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in Halapensis-complex pine species using chloroplast SSR markers. *Molecular Ecology*, 7: 1633-1643.
- Cavalli-Sforza, L. L., P. Menozzi, and A. Piazza. 1994. The story and geography of human genes. Princeton University Press. Princeton N. J.
- Delgado, V. P. 1994. Evaluación de la capacidad productiva y eficiencia de semillas de tres especies del género *Pinus* (*P. montezumae* Lamb, *P. pseudostrobus* Lindl. y *P. leiophylla* Cham.), en la zona boscosa de Nvo Sn. Juan Parangaricutiro. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 54:267-274.

- Delgado P., A. Cuenca., A. E. Escalante., F. Molina and D. Piñero. 2002. Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 27-37.
- Dong, J, and B. Wagner. 1994. Paternally inherited chloroplast polymorphism in *Pinus*. Estimation of diversity y population subdivision, y test of disequilibrium with a maternally inherited mitochondrial polymorphism. *Genetics*, 136: 1187-1194.
- Echt, C. S., P. May Marquardt., M. Hsieh, and R. Zahorchak. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 39: 1102-1108.
- Echt, C. S., L. DeVerno., M. Anzide, and G. G. Vendramín. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology*, 7: 307-309.
- Elsik, C. G. V. T. Minihan., S. E. Hall., A. M. Scarpa, and C. G. Williams. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*, 43: 550-555.
- 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.
- Farjon, A, and B. T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). New York Botanical Garden. New York
- Feldman, M. W., A. Bergman., D. D. Pollok, and D. B. Golstein. 1997. Microsatellite genetic distances with range constraints: Analytic description y problems of estimation. *Genetics*, 145: 207-216.
- Fisher, P. J., . E. Richardson, and R. C. Gardner. 1998. Characteristics of single- y multi-copy microsatellites from *Pinus radiata*. *Theoretical y Applied Genetics* 96: 969-979.
- Friedman, S. T, and W. T. Adams. 1985. Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L). *Theoretical y Applied Genetics*, 69: 609-615.
- Garza, J.C., M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1995. Microsatellite allele frequencies in human y chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 594-603.
- Golstein, D. B, and D. D. Pollok. 1994. Least-squares estimation of molecular distance-noise abatement in phylogenetic reconstruction. *Theoretical and Applied Genetics* 12: 432-440.
- Golstein, D. B., L. A. Ruiz., L. L. Cavalli-Sforza, and M. W. Feldman. 1995a. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463-471.

- Kutil, B. L. and C. G. Williams. 2001. Triplet-repeat microsatellites shared among hard y soft pines. *The Journal of Heredity*, 92: 327-332.
- Karhu, A., P. Hurme., M. Karjalainen., P. Karvonen., K. Karkkainen., D. Neale, and O. Savolainen. 1996. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers?. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 215-221.
- Ledig, F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In *Ecology y Biogeography of Pinus*. Richarsonn , D. M. (ed). Cambridge University Press. UK. pp 251-280.
- Lian, C., M. Miwa, and T. Hogetsu. 2001. Outcrossing and paternity of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphisms. *Heredity*, 87: 88-98.
- Little, E. L. and W. B. Critchfield. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (Pines). United Stated Department of Agriculture Misc. Publ. No 1144.
- Lu, G., D. J. Basley. and L. Bernatchez. 2001. Contrasting patterns of mitochondrial DNA y microsatellite introgressive hybridization between lineages of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*); relevance for speciation. *Molecular Ecology*, 10: 965-985.
- Madrigal X. 1986. Claves de identificación de especies de Coníferas del Estado de Michoacán. Facultad de Biología.
- Matos, J. A. and B. A. Schaal. 2000. Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A Coalescent approach to hybridization. *Evolution*, 54: 1218-1233.
- Martínez, M. 1948. Los pinos Mexicanos. Segunda edición. Ediciones Bota. Méxic, D. F. 361 pp.
- Mirov, N. T. The genus *Pinus*. Ronald Press Co., New York.
- Moreno, L. A. 2002. Sistema de apareamiento y variación genética en *Pinus Maximartinezii*. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Morgante, M., Pfeiffer., A. Costacurta, and A. M. Oliver. 1996. Molecular Tools for population y ecological genetics in Coniferous trees. *Pyiton* (Hom, Austria) Special issue: "Bioindications..." Vol 6. Fasc.3: 129-138.
- Nei, M., F. Tajima, and Y. Taneto. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153-170.
- Patíño, V. F., P. Garza., A. Y. Villagómes., A. L. Talavera, y M. F. Camacho. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. INIF. SF-SARCH. pp 81.

- Perron, M. and J. Bousquet. 1997. Natural hybridization between black spruce y red spruce. *Molecular Ecology*, 6: 725-734.
- Perry, J. L. 1991. The Pines of Mexico and central America. Timber Press. Ptly, Oregon.
- Powell, W., M. Morgante, and C. Yre. 1995a. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 5: 1023-1029.
- Powell, W. M., M. Morgante., R. McDevitt., G. G. Vendramín, and J. A. Rafalski. 1995b. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Application to the populations genetics of pine. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences*, 92: 7759-7763.
- Provan, J., N. Soranzo., N. J. Wilson., D. B. Golstein, and W. Powell. 1999. A low Mutation Rate For Chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153: 943-947.
- Raymond M, and F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283.
- Renteria, A. M. 2002. Variación y estructura genética de una especie rara de México (*Pinus nelsonii* Shaw). Tesis de Biología. Facultad de Ciencias. UAM.
- Rieseberg, L. H. and N. C. Ellstrand. 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization. *Critical Reviews in the Plant Sciences*, 12: 213-241.
- Rieseberg, L. H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany*, 82: 944-953.
- Rieseberg, L. H. y Noyes R. D. 1998. Genetic map-based studies of reticulate evolution in plants. *Trends in Plant Science*, 3: 254-260.
- Roques, S., J-M Sévigny, and L. Bernatchez. 2001. Evidence for broadscale introgressive hibridization between two redfish (genus *Sebastes*) in the North-west Atlantic: a rare marine example. *Molecular Ecology*, 10: 149-165.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México, Liusa, México.
- Saucedo, S. A. y Acosta V. B. 1988. Modelo de organización para la producción forestal en la Comunidad Indígena de Nvo San Juan Parangaricutiro Michoacán. México. Tesis de Licenciatura. Escuela de Agrobiología, UMSNH.

- Schuster, W. S., L. D. Alles, and G. B. Mitton. 1989. Gene flow in limber pine: evidence from pollination phenology and genetic differentiation along an elevation transect. *American Journal of Botany*, 76: 1395-1403.
- Sinden, R. R. 1999. Biological implications of the DNA structures associated with disease causing triplet repeats. *American Journal of Human Genetic*, 64: 346-353.
- Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47: 264-279.
- Slatkin, M. 1995a. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Slatkin, M and Excoffier, I. 1996. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity*, 76: 377-383.
- Slatkin, M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res. Camb.* 58:167-175.
- Soranzo N., J. Provan, and V. Powell. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome*, 42: 158-161.
- Statsoft, Inc. 1995. STATISTICA for Windows. Tulsa, OK.
- Scheinder, S., D. Roessli, and L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics y Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerly.
- Smith, D. N. and Devey M. E. 1994. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome*, 37: 977-983.
- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. *In: Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to molecular paleopopulation biology.* Takahata, N. y A. G. Clark (eds). Tokio, Sunderly, MA: Japan Scientific Society Press, Sinaurer Assicuates, Inc., pp. 37-59.
- Takesaki, N. and M. Nei. 1996. Genetic distances y reconstruction of phylogenetics tree from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.
- Takezaki, N. 2000. NJBAFD: a program for neighbor-joining tree construction from allele frequency data. National Institute of Genetics, Japan.
- 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.

- Vendramín, G. G., L. Lelli., P. Rocci, and M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5: 595-598.
- Weir, B. S. and Cockerham. C. C. 1979. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity*, 42: 105-111.
- Weir, B. S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Wagner, D. B., G. R. Furnier., M. A. Saghai-Marroof., S. M. Williams., B. P. Dancik, and R. W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphism in lodgepole y jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84: 2097-2100.
- Williams, C. G., CH. G. Elsil, and R. D. Barnes. 2000. Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. in Zimbabwe. *Heredity*, 89: 261-268.
- Wang, X-R. and Szmidt A. E. 1990. Evolutionary analysis of *Pinus densata* (Masters), a putative Tertiary hybrid. 2. A study using species-specific chloroplast DNA markers. *Theoretical and Applied Genetic*, 8: 641-647.
- Wang, X-R., A. E. Szmidt, and O. Savolainen. 2001. Genetic composition and diploid hybrid speciation of high montain *Pinus densata*, Native to the Tibetan Plateau. *Genetics*, 159: 337-246.
- Wheeler, N. C. and Guries R. P. 1987. A quantitative measure of introgression between lodgepole y Jack pines. *Canadia Journal of Botanic*, 65:1876-1885.
- Young, E. T., J. S. Sloan, and K. V. Riper. 2000. Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 154: 1053-1068.
- Zasada, J. L. 1985. Production, dispersal and germination of white spruce and paper birch and first-year seedling establishment after the Rosie Creek fire. *In: Early results of the Rosie Creek fire research project 1984. Edited by G. P. Juday and C. T. Dyrness. Alaska Agric. For. Exp. Snt. Misc. Publ. 85-2- pp. 34-37.*
- Zouros, E. 1997. Mutation rates, population sizes and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural populations. *Genetics*, 54: 623-646.

CAPÍTULO IV

Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones de *Pinus montezumae* Lamb y *Pinus pseudostrobus* Lind, en México y Guatemala

¹DELGADO PATRICIA, ²G. G. VENDRAMIN., ²M. ANZIDEI & ¹PIÑERO DANIEL

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-725, Ciudad Universitaria, México D. F. 04510, México.

²Istituto per il Meiglioramento Genetico delle Plante Forestali. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Firenze, Italy.

RESUMEN

Pinus pseudostrobus y *P. montezumae* son dos especies de pinos muy relacionadas filogenéticamente. Pertencen a la subsección Ponderosae, con una amplia distribución geográfica en México y Centroamérica. Históricamente estas especies han tenido una distribución geográfica similar, donde la mayoría de sus poblaciones cohabitan en simpatria. Información sobre su morfología, anatomía y de datos moleculares, sugiere que estas especies presentan eventos de hibridación introgresiva, que pueden estar implicados en la especiación u origen de nuevos linajes. En este estudio utilizamos datos de microsatélites de cloroplasto (cpSSR) para hacer un análisis filogeográfico sobre la estructura genética de las poblaciones y la dinámica de la introgresión. Para ello usamos haplotipos de 6 cpSSR (mononucleótidos) en 13 poblaciones de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*. Los análisis fueron basados en métodos analíticos de la genética de poblaciones clásica, así como de la teoría de coalescencia. Los datos nos permitieron detectar eventos de hibridación introgresiva, resultado de la incorporación de material citoplasmático de manera unidireccional de *P. montezumae* a las poblaciones de *P. pseudostrobus*. La estructura genética de las poblaciones, así como la dinámica de la hibridación introgresiva resultan de relaciones genealógicas y geográficas de eventos históricos de expansión, aislamiento por distancia y fragmentación de las poblaciones. Con base al concepto cohesivo de especie, sugerimos la existencia de dos linajes independientes (*P. montezumae* y *P. pseudostrobus*) y de un linaje no independiente representado por el evento de introgresión de haplotipos de las poblaciones híbridas putativas y de *P. pseudostrobus*.

Palabras clave: Microsatélites de cloroplasto, filogeografía, coalescencia, hibridación introgresiva, *Pinus*.

INTRODUCCIÓN

La hibridación introgresiva es un proceso importante dentro del campo de la evolución (Anderson, 1949; Stebbins, 1959; Grant, 1981; Riesenber, 1995), es definida como la incorporación selectiva de material genético ajeno a la especie por hibridación y retrocruza repetida (Anderson, 1949). En particular, la detección de este proceso en especies del género *Pinus*, y las relaciones parafiléticas obtenidas en algunas secciones y subsecciones (Strauss y Doerkes, 1990; Liston *et al.*, 1999; Gernandt *et al.*, 2001) sugieren que varias especies se han originado y evolucionado a través de la hibridación introgresiva. Por ejemplo, algunas especies de Asia son capaces de hibridar y se ha postulado que *P. densata*, se originó por medio de la hibridación ancestral entre *P. tabulaeformis* y *P. yunnanensis* (Wang y Szmidt, 1990; Wang *et al.*, 2001). También se ha detectado este proceso en el complejo de pinos Halapensis en Europa (Bucci *et al.*, 1998) y entre otras especies de EUA (como *P. ponderosa*, Critchfield, 1986; *P. taeda* y *P. echinata*, Edwards-Burke *et al.*, 1997). Además existen casos de hibridación introgresiva en otros géneros de coníferas como *Picea* (Stibe *et al.*, 1989; Sutton *et al.*, 1991), *Larix* (Szmidt *et al.*, 1988), y *Abies* (Isoda *et al.*, 2000). Estos estudios han sido realizados con base en análisis filogenéticos y de la genética de poblaciones clásica. Sin embargo, recientemente se han generado estudios que analizan la introgresión de una manera más fina y robusta, basados en la teoría de coalescencia (Templeton *et al.*, 2001). En México, usando esta metodología se han detectado eventos de introgresión ancestral entre *P. montezumae* y *P. hartwegii* (Matos y Schaal, 2000). La teoría de coalescencia trata de conocer eventos evolutivos que sucedieron en el pasado bajo el análisis de una genealogía de genes (Kingman, 1982a, b; Tavaré, 1984; Avise, 1989; Ewens, 1990; Hudson, 1990; 1992). La información contenida en las genealogías no solo nos hablan de la variación genética de las poblaciones, sino de la manera en que se distribuye espacial y temporalmente, así como de la interpretación de posibles eventos de la demografía histórica de las poblaciones (expansión del rango, colonización o fragmentación; Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998). Estos análisis están basados en métodos de parsimonia y son sujetos de análisis estadístico (Templeton, 1992). Básicamente se forman grupos de haplotipos subdivididos jerárquicamente en clados anidados, que son utilizados para atestiguar la asociación de los haplotipos con diferentes variables (por ejemplo, distribución geográfica y altitudinal) con base en una χ^2 (Templeton

et al., 1987; Templeton y Sing, 1993). Un aspecto de gran relevancia que se ha planteado a la luz de la teoría de coalescencia ha sido la integración de este marco teórico para el análisis de procesos de especiación, los cuales pueden ser potencialmente inferidos al detectar fases evolutivas clave de la especiación dentro de las diferentes partes de la red de haplotipos (Templeton, 2001). La hipótesis que prueba es si las especies en estudio son linajes evolutivos independientes (especiación culminada) o bien, forman parte de un mismo linaje (especiación en proceso). Si el resultado es que dos o más especies forman parte de un mismo linaje evolutivo, pueden ser detectadas las causas de dicho patrón evolutivo como puede ser la presencia de polimorfismos transespecíficos, selección de linajes al azar, e hibridación (Avice, 1994; Templeton, 2001). En el presente estudio se hizo un análisis de los patrones de diferenciación genética y de la dinámica de la hibridación introgresiva de poblaciones naturales de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, utilizando microsatélites polimórficos de cloroplasto.

P. montezumae y *P. pseudostrobus* son dos especies nativas de México y Centro América. En estas especies se han sugerido eventos de hibridación introgresiva con base en datos morfológicos, bioquímicos, anatómicos y moleculares (Martínez, 1948; Mirov, 1967; Perry, 1991; Delgado y Piñero, en elaboración). Además, para *P. montezumae* se han detectado eventos de introgresión con otras especies de pino como *P. hartwegii* (Mirov, 1967; Matos y Schaal, 2000), *P. michoacana*, *P. douglasiana* (Perry, 1991) y *P. ponderosa* (Liddecoet y Ridher, 1961). *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* están muy relacionados filogenéticamente y pertenecen a la subsección Ponderosae (Little y Critchfield, 1969; Farjon y Styles, 1997). Su distribución geográfica es extensa y dentro de un rango altitudinal amplio (1600 a 3300 msnm). Las poblaciones puras de las especies ocupan zonas aisladas de la parte Norte y sur de México, al igual que las poblaciones de Guatemala que ocupan parte de la Sierra de Juárez. Las poblaciones simpátricas se encuentran fundamentalmente en el Eje Neovolcánico, región que ha sido mencionada como focal para el origen de especies de plantas por hibridación (Rzedowskii, 1978). Recientemente realizamos un estudio sobre la estructura genética e introgresión de estas especies con base al uso de microsatélites nucleares (Capítulo III), a partir de los cuales se logró detectar eventos de introgresión simétrica, donde la baja estructuración genética obtenida entre las poblaciones refleja una alta hibridación introgresiva entre los individuos de las dos especies.

Los objetivos específicos del presente estudio fueron: i) obtener evidencias de introgresión de material citoplasmático entre las poblaciones naturales de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, ii) conocer cual ha sido la dinámica histórica de la introgresión en las poblaciones, y iii) determinar como a influido la hibridación introgresiva en la extinción o generación de linajes evolutivos. Los resultados muestran eventos de hibridación introgresiva y resultan de la incorporación de material citoplasmático de manera unidireccional de *P. montezumae* a *P. pseudostrobus* y a las poblaciones híbridas. La dinámica de la hibridación introgresiva es probablemente, el resultado de relaciones genealógicas y geográficas de eventos históricos de expansión, aislamiento por distancia y fragmentación de las poblaciones estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetativo, extracción de ADN y productos de PCR

Se colectó tejido vegetativo de 312 individuos de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* para atestiguar polimorfismos intra-e interespecíficos con base en 6 cpSSR en un total de 13 poblaciones y se colectaron 5 poblaciones puras de *P. montezumae*, 3 puras de *P. pseudostrobus* y 5 putativas híbridas; estas se definieron de la información preexistente de su ubicación geográfica y con base a diferencias morfológicas de acículas, conos y corteza (Tabla 1, Fig. 1). Se extrajo ADN genómico utilizando el método de extracción Miniprep CTAB, modificado por Vázquez-Lobo (1996). Los 6 cpSSR (T)_n pares de iniciadores que se usaron fueron derivados del cloroplasto secuenciado de *Pinus thumbergii*; Pt1254, Pt9400, Pt1520, Pt3025, Pt7195, Pt8730 (Vendramín *et al.*, 1996). Las amplificaciones fueron realizadas con base al método propuesto por Vendramín *et al.*, (1996). Los números de acceso a GenBank de los cpSSR secuenciados son del AY164477 al AY164480. Los fragmentos fueron obtenidos con un secuenciador automático (ALF; Pharmacia). Se utilizaron marcadores de tres cpSSR pares de iniciadores que producen tres diferentes fragmentos (50, 100 and 150 bp). La separación de los fragmentos se realizó sobre geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% (7M Urea) de 0.35 mm de espesor y se corrieron a 1350 V, durante 80 min. El tamaño de los fragmentos fue calculado con el programa FRAGMENT MANAGER versión 1.1 (Pharmacia) y por comparación con los marcadores internos y externos de 50 y 150 pb.

Tabla 1. Ubicación geográfica y altitud de los sitios de colecta de las poblaciones tipo; puras e híbrida putativa de *P. montezumae* y *P. pseudostrobis*, en México y Guatemala.

Pobl.	Especie	Tipo	Localidad	Ubicación Geográfica	Altitud (msnm)
P51	<i>P. pseudostrobis</i>	Pura	Tuxtepec Oaxaca	96°26'31" 17°19'59"	2144
P62	<i>P. pseudostrobis</i>	Pura	Aguililla Michoacán	102°55'36" 18°49'17"	2370
P123	<i>P. pseudostrobis</i>	Pura	Caoqué, Jalpa Guatemala	90° 41' 66" 14° 38' 23"	2043
H14	<i>P. pseudostrobis</i> <i>P. montezumae</i>	Híbrida putativa	Malacatepec Edo. México	100°09'43" 19°21'16"	3100
H25	<i>P. montezumae</i> / <i>P. pseudostrobis</i>	Híbrida putativa	Anganguero Michoacán	100°17'07" 19°37'01"	2850
H36	<i>P. montezumae</i> / <i>P. pseudostrobis</i>	Híbrida putativa	Temascaltepec Edo de México	100°02'28" 19° 02'35"	3100
H47	<i>P. pseudostrobis</i> / <i>P. montezumae</i>	Híbrida putativa	Zitácuaro Michoacán	100°21'31" 19°26' 15"	1700
H98	<i>P. montezumae</i> <i>P. pseudostrobis</i>	Híbrida putativa	San Cristobal Chiapas	92°25'60" 16°44'25"	2440
M79	<i>P. montezumae</i>	Pura	Puebla	98°02'30" 19°07'02"	2100
M10	<i>P. montezumae</i>	Pura	Tlaxcala	98°02'30" 19°13' 30"	3000
M11	<i>P. montezumae</i>	Pura	Ixmiquilpan Hidalgo	99° 30' 21" 20° 30' 18"	2100
M12	<i>P. montezumae</i>	Pura	Totonicapan Guatemala	91° 24' 08" 14° 55' 60"	2374
M13	<i>P. montezumae</i>	Pura	Cuernavaca Morelos	19° 03'15" 99° 14'30"	2010

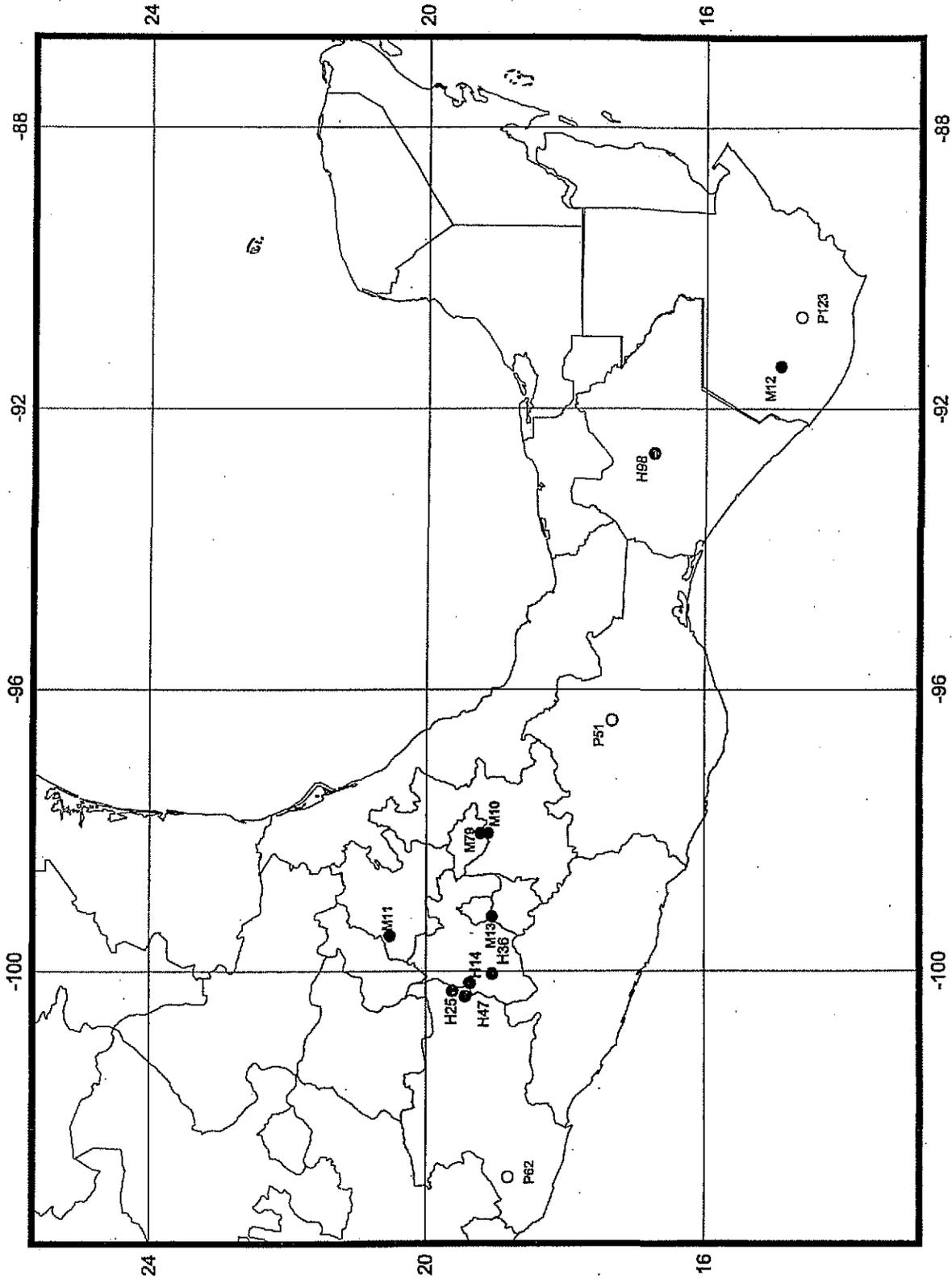


Figura 1. Distribución geográfica de las poblaciones de *P. pseudostrabus*, *P. montezumae* y posibles híbridas, en México y Guatemala. Los círculos negros indican las poblaciones puras de *P. montezumae*; los círculos blancos las poblaciones puras de *P. pseudostrabus*, y los círculos grises indican a las poblaciones posibles híbridas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diversidad genética y subdivisión de las poblaciones

Todas las estimaciones se obtuvieron con base en las frecuencias de los haplotipos, que resultan de la combinación de alelos (que son los tamaños diferentes de los fragmentos obtenidos para cada loci) de los seis cpSSR utilizados. Para la variación genética se obtuvieron estimaciones de la diversidad genética dentro de las poblaciones (H_E , Slatkin, 1995) y la media del número de diferencias para pares de haplotipos (π , Tajima, 1993). La divergencia entre poblaciones fue calculada con el modelo IAM (F_{ST}) y SMM (R_{ST}). Un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), se utilizó para analizar la estructura genética de tres grupos de poblaciones, el primero formado por cinco poblaciones de *P. montezumae*, el segundo por 5 híbridas y el tercero por tres de *P. pseudoastrobus*: Los componentes de variación se dividieron en tres grupos: entre grupos \mathcal{O}_{CT} , entre poblaciones dentro de grupos \mathcal{O}_{SC} y dentro de poblaciones \mathcal{O}_{ST} . La significancia de los valores fue obtenida por 1000 permutaciones no paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992). El flujo genético (Nm) se estimó indirectamente a partir de la R_{ST} siguiendo la fórmula propuesta por Slatkin (1991). Para la obtención de los parámetros y estadísticos estimados se usó el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000).

Reconstrucción filogenética y coalescencia

El conjunto de haplotipos obtenidos fue utilizado para la elaboración de una matriz de distancias genéticas (D_A) de acuerdo a Nei *et al.*, (1983). A partir de las distancias genéticas (D_A) se realizó un análisis de neighbour-joining con base al modelo SMM (Slatkin, 1995) tanto para las poblaciones puras de *P. montezumae* (3) y de *P. pseudoastrobus* (5), así como para el total de las poblaciones (13). Su significancia se estimó a través de una prueba de 1000 permutaciones (Takezaki y Nei, 1996). Para la reconstrucción del filograma (neighbour-joining) se usó el programa NJBAFD (Takezaki, 1998).

Posteriormente se realizó una selección de los haplotipos que presentaron frecuencias absolutas superiores a 2, que fue el valor de la frecuencia mínima de haplotipos compartidos entre poblaciones, y de haplotipos diagnóstico compartidos entre especies y poblaciones putativas híbridas para la elaboración de una matriz y reconstruir un árbol genealógico de mínima extensión (MST) entre haplotipos (Excoffier y Smouse, 1994). El árbol de genes reconstruido se considera como una variable para estimar estadísticos poblacionales, mismos que están relacionados con los componentes de variación y que están en función explícita de

la información filogenética. El árbol de mínima extensión fue construido con el programa Arlequin (Schneider *et al.*, 2000). Por otra parte, la misma matriz de distancias genéticas absolutas se usó para reconstruir una red de haplotipos con base a la estimación de los límites de parsimonia de acuerdo a Templeton (1992). Este procedimiento comienza calculando el número de pasos mutacionales entre haplotipos siguiendo las conexiones más parsimoniosas con una probabilidad igual o mayor que 0.95 (Templeton, 1992). La red de haplotipos fue obtenida con el programa TCS (Clement *et al.*, 2001). La corrección de ambigüedades para la red de haplotipos fue realizado con base en la metodología propuesta por Crandall *et al.*, (1994) y Cooper *et al.*, (1996). Las asociaciones que generaron muchas ambigüedades fueron corregidas de acuerdo a uno de los supuestos de la coalescencia, donde los haplotipos más frecuentes son los más ancestrales e internos (Crandall *et al.*, 1994). Posteriormente cuando las probabilidades de unión de dos o más haplotipos eran las mismas (de acuerdo a las frecuencias), se corrigió utilizando las diferencias de una base entre pares de haplotipos como la conexión más parsimoniosa (Cooper *et al.*, 1996). Finalmente el análisis de clados anidados de los haplotipos con relación a su distribución geográfica (Nested Cladistic Analysis: NCA), así como las inferencias de la demografía histórica fueron determinados con la metodología de Templeton *et al.*, (1995), y con el uso del programa GeoDis, de Posada *et al.* (2000).

RESULTADOS

Diversidad genética y subdivisión de las poblaciones

Las amplificaciones de PCR de 18 microsatélites de cloroplasto confirman la presencia de los fragmentos en las especies de estudio. De 18 cpSSR ensayados, 6 fueron polimórficos. El tamaño de los fragmentos varió de 2 a 8 pb. Se obtuvo un total de 29 alelos (de 4 a 6 alelos por locus) y 146 haplotipos. Se presentó un alelo único en la población P62 (Pt7195:143 pb) y en las poblaciones P51 y P123 de *P. pseudostrobilus*. (Pt8730:159 pb). En *P. montezumae* se encontró solo un alelo único en las poblaciones M79 y M810 (Pt1254: 64 pb). En algunas de las poblaciones mezcladas se encontraron alelos raros compartidos como en las poblaciones H36, H47 y H98 (Pt7195: 144 pb) y en las poblaciones H25 y H36 (Pt1520:124). Los alelos únicos que se presentaron en haplotipos diagnóstico para cada especie fueron: para *P. pseudostrobilus* el 66 (Pt1250), 146 (Pt7195), 163 (Pt8730), 125 (Pt1250), 141 (Pt3025) y 90 (Pt9400), para *P. montezumae* el 145 (Pt7195), 127 (Pt1520), y

140 (Pt3025). El 69% de los 146 haplotipos presentaron frecuencias menores a 0.05 entre los 312 individuos analizados. Para *P. montezumae* 48 de 53 (90.6%), en *P. pseudostrobis* 39 de 42 (93%) y para las poblaciones mezcladas 70 de 72 (97%).

Los haplotipos con frecuencias absolutas superiores a 2, así como los haplotipos diagnóstico (compartidos entre las dos especies e híbridos) se presentan en la Tabla 2, el resto de los haplotipos pueden ser revisados en la dirección electrónica (<http://www.ecología.unam.mx/laboratorios.html>). Los haplotipos más frecuentes fueron: H1 (67,147,160,126,141,89) y el H6 (67,146,160,124,141,89) tanto en poblaciones puras como mezcladas. Los haplotipos más frecuentes para las poblaciones puras de *P. montezumae* fueron: H34 (67, 147, 161, 126, 141, 89), H36 (67, 147, 161, 126, 140, 89), y H45 (67, 146, 161, 127, 141, 89). Para *P. pseudostrobis* los haplotipo: H43 (67, 147, 159, 126, 141, 89) y H20 (67, 146, 160, 126, 141, 190) y para las poblaciones híbridas putativas el haplotipo H19 (67 146 163 126 141 89) (ver Tabla 2).

Considerando las frecuencias de los 146 haplotipos para el análisis, se encontró que en todos los parámetros estimados las poblaciones más diversas genéticamente fueron H36 ($H_E = 0.5404$, $\pi = 3.243$) y H47 ($H_E = 0.5115$, $\pi = 3.068$). Dichas poblaciones han sido identificadas como híbridas putativas por lo que están representadas por individuos de las dos especies en estudio (Tabla 3). Para *P. montezumae* se obtuvieron valores altos en dos poblaciones M79 ($H_E = 0.4752$; $\pi = 2.851$) y M810 ($H_E = 0.448$; $\pi = 2.692$) seguido de dos poblaciones de *P. pseudostrobis* la población P51 ($H_E = 0.4571$; $\pi = 2.742$) y la P62 ($H_E = 0.4130$; $\pi = 2.478$). Los valores más bajos se presentaron en las poblaciones distribuidas en Guatemala, en particular la población P123 ($H_E = 0.0779$, $\pi = 1.438$) y la población M12 ($H_E = 0.0616$; $\pi = 0.308$) para *P. pseudostrobis* y *P. montezumae* respectivamente (Tabla 3).

Tabla 2. Frecuencias absolutas de los haplotipos diagnóstico obtenidas en 13 poblaciones de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* e híbridas. En la primer columna se indica el número de los haplotipos diagnóstico y el número de los haplotipos de las frecuencias totales. En la segunda columna se indican los haplotipos obtenidos con seis cpSSR (Pt1250, Pt7195, Pt8730, Pt1520, Pt3025, Pt9400, respectivamente). En las siguientes columnas se indican las frecuencias absolutas obtenidas para cada población.

Haplotipo	H14	H25	H36	H47	P51	P62	M79	M810	H98	M11	M12	P123	M13	Total
1-1	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	4.0	22
2-2	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4
3-3	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2
4-4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2
5-6	2.0	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5
6-7	3.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	9
7-9	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4
8-10	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4
9-11	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	3
10-12	0.0	8.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9
11-18	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2
12-19	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2
13-21	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2
14-22	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2
15-24	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2
16-27	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2
17-30	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3
18-43	0.0	0.0	0.0	3.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6
19-44	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	1.0	7
20-52	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7
21-58	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3
22-59	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6
23-62	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2
24-65	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2

Tabla 3. Estimados de la variación y estructura genética de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobis* e híbridas, en México y Guatemala (la estimación de la estructura genética fue obtenida con los modelos IAM y SMM). N= Tamaño de muestra; A= número de alelos; H= número de haplotipos; H_E = Diversidad genética; π = Media de diferencias entre pares de haplotipos; F_{ST} = diferenciación genética entre poblaciones de acuerdo al modelo de mutación de alelos infinitos (IAM); R_{ST} = diferenciación genética de acuerdo al modelo de mutación de un paso (SMM). D. E = Desviación Estandar; * valores significativos ($P = 0.05$).

Especie							IAM	SMM
Población	N	A	H	H_E (D.E)	π (D.E)	F_{ST}	R_{ST}	
<i>P. pseudostrobis</i>								
P51	24	15	17	0.457 (0.279)	2.743 (1.506)			
P62	24	15	19	0.413 (0.257)	2.478 (1.386)			
P123	24	13	14	0.078 (0.092)	1.438 (0.907)			
Media		14	16	0.3160 (0.209)	2.200 (1.267)	0.146*	0.166*	
<i>Híbridas putativas</i>								
H14	24	10	11	0.272 (0.185)	1.630 (1.000)			
H25	24	14	15	0.298 (0.199)	0.736 (1.000)			
H36	24	21	19	0.540 (0.322)	3.243 (1.732)			
H47	24	20	20	0.511 (0.307)	3.068 (0.511)			
H98	24	15	15	0.345 (0.223)	2.069 (1.199)			
Media		16	16	0.393 (0.248)	2.366 (1.088)	0.273*	0.449*	
<i>P. montezumae</i>								
M79	24	16	18	0.475 (0.289)	2.851 (1.555)			
M810	24	17	17	0.449 (0.276)	2.692 (1.483)			
M11	24	18	12	0.239 (0.169)	1.438 (0.907)			
M12	24	13	9	0.061 (0.073)	0.308 (0.329)			
M13	24	8	11	0.178 (0.136)	1.072 (0.733)			
Media		14	13	0.281 (0.209)	1.678 (1.001)	0.270*	0.258*	
Media general		15	15	0.330 (0.2100)	1.970 (1.000)	0.230	0.291	

Similarmente, para la divergencia genética entre poblaciones los valores más altos se presentaron en las poblaciones híbridas usando los modelos SMM e IAM en la estimación ($R_{ST} = 0.449$; $F_{ST} = 0.273$) seguido de las poblaciones puras de *P. montezumae* ($R_{ST} = 0.258$; $F_{ST} = 0.270$). La menor diferenciación entre poblaciones se presentó en *P. pseudostrobus* ($R_{ST} = 0.166$; $F_{ST} = 0.146$ (Tabla 3). El análisis jerárquico de la varianza molecular fue relativamente alto entre poblaciones ($R_{ST} = 0.4037$; $P < 0.000$) y entre poblaciones dentro de grupos (conformados cada uno por las dos especies y las poblaciones híbridas putativas) ($R_{SC} = 0.3483$; $P < 0.000$). Mientras que la diversidad media entre grupos (R_{CT}) fue de 0.0844 ($P < 0.050$). El porcentaje de la variación total que corresponde a la diversidad entre grupos fue de 8.44 %, entre poblaciones dentro de grupos de 31.93%, dejando el mayor porcentaje de haplotipos dentro de las poblaciones con 59.63%. Las estimaciones del flujo genético (Nm) oscilaron entre 1.272 y 3.52 con una media de 1.45, lo cual sugiere que existe un intercambio genético moderado entre las poblaciones de ambas especies analizadas.

Reconstrucción filogenética y coalescencia

Primeramente realizamos la reconstrucción de un árbol de neighbour-joining basado sobre las distancias genéticas de Nei (D_A) que incluye las poblaciones puras de cada especie para utilizarlo como control de clasificación de las especies para los análisis posteriores. El resultado reveló dos grupos definidos (figura no mostrada), cada uno conformados por las poblaciones de cada especie. El filograma obtenido para las 13 poblaciones muestra dos grupos; el primer grupo está formado tanto por las poblaciones putativas híbridas como las poblaciones puras de *P. pseudostrobus*, mientras que el segundo está representado por las poblaciones puras de *P. montezumae* (Fig. 2). Estos resultados sugieren por un lado que las poblaciones híbridas son filogenéticamente más relacionadas a las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* que a las poblaciones de *P. montezumae*, y por el otro lado, que la introgresión es unidireccional, con introgresión de material citoplasmático de *P. montezumae* hacia las poblaciones híbridas y de *P. pseudostrobus*.

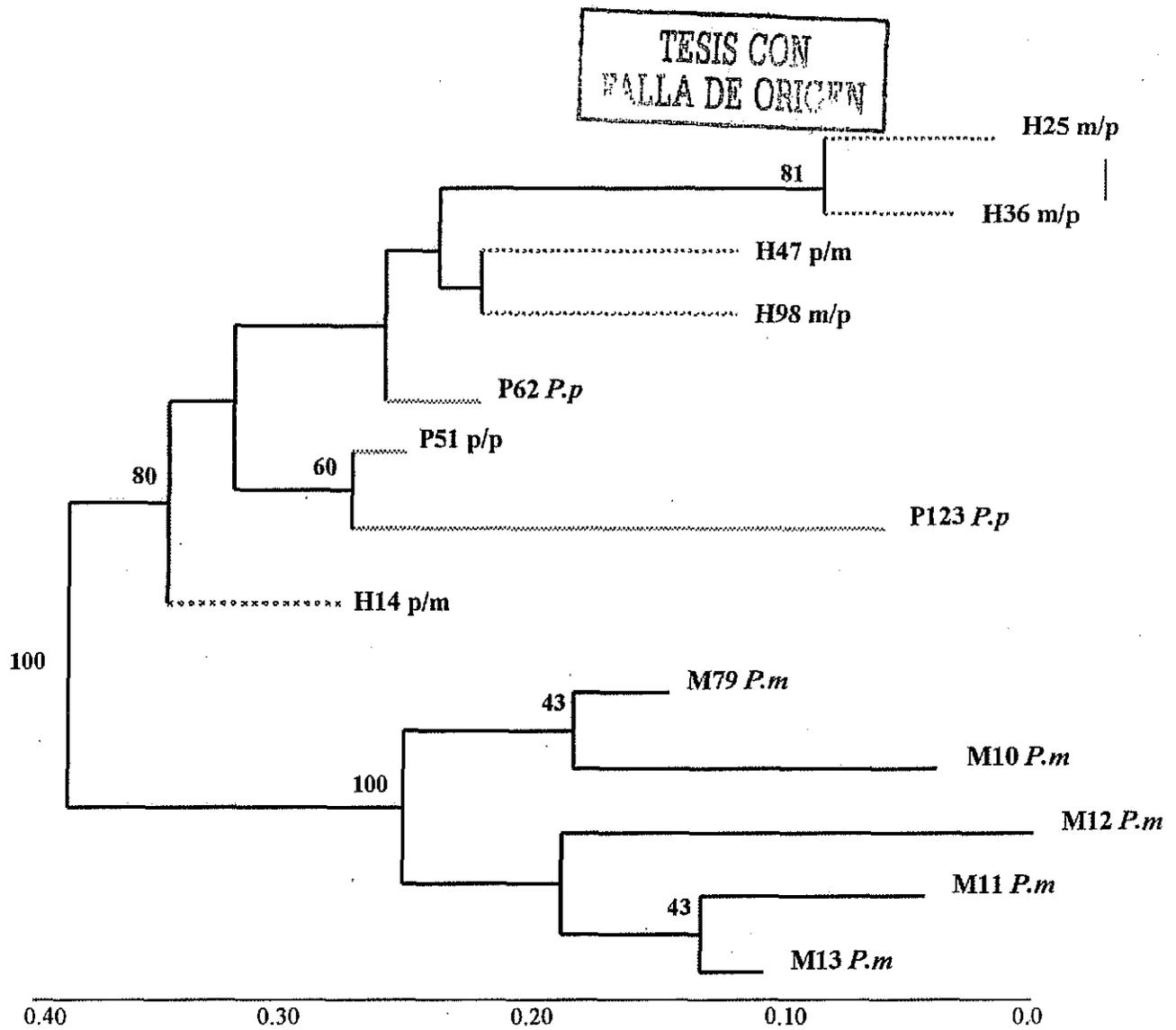


Figura 2. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre las 13 poblaciones (D_A) estudiadas. Bootstrap basado en 1000 replicas (se muestran los porcentajes superiores a 40%). La línea negra representa a las poblaciones puras de *P. montezumae*, la línea gris a las poblaciones puras de *P. pseudoatrobis*, y la línea punteada a las poblaciones putativas híbridas; m/p = población con caracteres morfológicos en su mayoría de *P. montezumae* y p/m = caracteres morfológicos en su mayoría de *P. pseudoatrobis*.

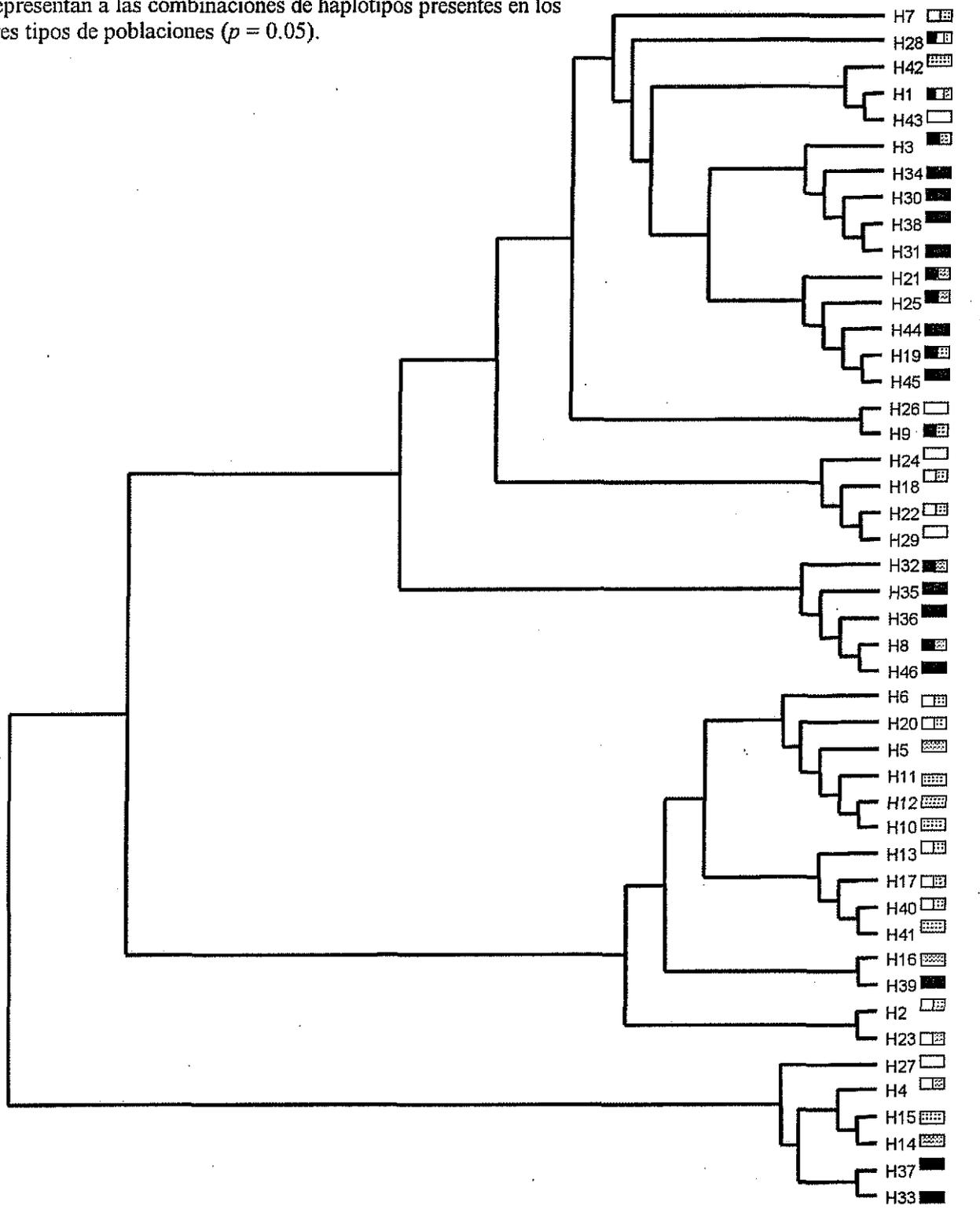
Las relaciones genealógicas de los 46 haplotipos, con base en el árbol de mínima extensión (MST), forman tres grupos de haplotipos; el primero que está conformado por la mayoría de haplotipos de *P. montezumae*, especie a la cual pertenecen los dos haplotipos con mayores frecuencias (H1 y H34), mezclados con haplotipos también presentes en individuos híbridos y de *P. pseudoatrobis* (Fig. 3). El segundo grupo está conformado por la mayoría de los haplotipos presentes en *P. pseudoatrobis* y los híbridos. Un tercer clado está

conformado tanto por un haplotipo de *P. pseudostrobus* e híbridos y por dos haplotipos de *P. montezumae*. Los resultados sugieren que las poblaciones presentan una introgresión ancestral, ya que uno de los haplotipos de mayor frecuencia y por tanto más ancestral (H1), esta representado en las dos especies y en una población híbrida (H14). Nuevamente, se observa una introgresión asimétricamente mayor de *P. montezumae* hacia las poblaciones de *P. pseudostrobus*.

Los valores obtenidos de las relaciones más parsimoniosas entre los haplotipos de la red o genealogía fueron altos en todos los pasos de la red ($P = 0.95$). Sin embargo, se generaron varias ambigüedades fundamentalmente de homoplasias entre los haplotipos H1-H34, H36-H35-H10, H1-H28-H42, y H16-H39-H17, las cuales fueron corregidas como se describe en el apartado de materiales y métodos. La red de haplotipos muestra a dos de los haplotipos más frecuentes como centros de diferenciación (H34 y H1) cada uno forma parte de un subgrupo (4-1 y 4-2 respectivamente) (Fig. 4). El subgrupo 4-1 incluye a 23 haplotipos (la mayoría representados por *P. montezumae*) los cuales integran a las 13 poblaciones estudiadas. El subgrupo 4-2 esta formado por 22 haplotipos, de los cuales la mayoría pertenecen a la especie *P. pseudostrobus*, conformado por haplotipos de 8 de los sitios de estudio. Estos dos subgrupos concuerdan con el filograma obtenido, excepto que en el filograma se muestra un tercer grupo formado por 6 haplotipos, los que están representados en el grupo 4-2 de la red de haplotipos. H4 y H27 pertenecen a *P. pseudostrobus* y son haplotipos internos, dos haplotipos de híbridos H15 y H14 que son externos, y los haplotipos H33 y H37 que fueron corregidos por las diferencias en sus tamaños con relación a los haplotipos que los conectan, quedando dentro del subgrupo-1 como haplotipos terminales, pero muy cercano al haplotipo H34 interno y ancestral.

Figura 3. Relaciones genealógicas de los haplotipos (cpSSR) con base al método de mínima extensión (MST), de Excoffier y Smouse (1994). Los rectángulos negros representan a los haplotipos obtenidos en las poblaciones puras de *P. montezumae*, los rectángulos blancos representan a los haplotipos de las poblaciones puras de *P. pseudostrabus*, los rectángulos rayados representan a los haplotipos diagnóstico de las poblaciones híbridas putativas, los rectángulos con dos o tres colores representan a las combinaciones de haplotipos presentes en los tres tipos de poblaciones ($p = 0.05$).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



P. montezumae

P. pseudostrabus

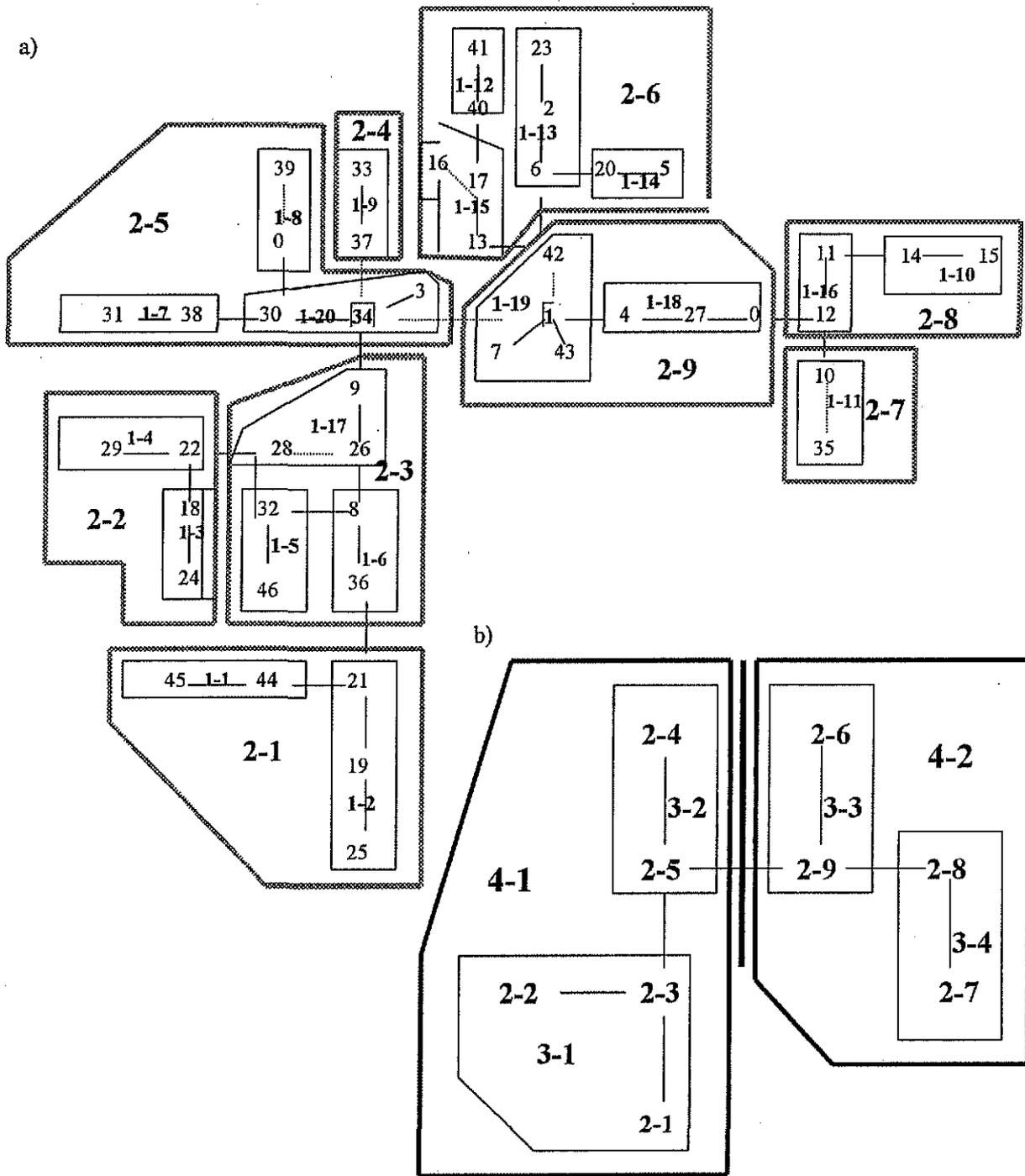


Figura 4. Red de haplotipos de cpSSR de las poblaciones de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, e híbridas putativas y grupos de anidamiento asociados. La red de haplotipos fue estimada al 95% de confiabilidad, con el uso de los algoritmos de Templeton (1992). Los ceros indican haplotipos intermedios entre los haplotipos observados pero que no se obtuvieron en las muestras. Las líneas solidas entre los haplotipos indican un cambio mutacional que interconecta dos haplotipos. Las líneas punteadas entre haplotipos indican ambigüedades (conexiones multiples) que fueron corregidas con la metodología de Crandall *et al.*, (1994) y Cooper *et al.*, (1996). a) incluye a los grupos de anidamiento de los cladros 1 y 2 y b) incluye a los niveles mas altos, clado 3 y 4. Los recuadros de líneas delgadas indican el nivel 1 del clado o al primer grupo de haplotipos anidados designados como '1-n', donde n corresponde al número específico del clado. Los recuadros con líneas gruesas representan el nivel 2, agrupando el clado-1. El clado-3 se indica en recuadros con líneas delgadas. El clado-4 se indican con recuadros con líneas gruesas y el ultimo anidamiento (clado-5), donde se agrupa a toda la red de haplotipos se indica con una línea vertical gruesa.

Tabla 4. Análisis de contingencia de asociación geográfica de 46 haplotipos de cpSSR en 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobis* e híbridas putativas en México y Guatemala.

Clado	chi-cuadrada	Probabilidad	Clado	chi-cuadrada	Probabilidad
1-2	11.86	0.121	2-2	11.27	0.001*
1-3	2.660	0.588	2-3	22.63	0.021*
1-4	2.920	0.337	2-5	14.53	0.115
1-5	3.000	1.000	2-6	52.05	0.000*
1-6	8.860	0.013*	2-8	0.000	1.000
1-7	4.000	0.314	2-9	4.183	0.538
1-9	6.000	0.193	3-1	82.75	0.000*
1-10	1.300	1.000	3-2	3.658	0.439
1-11	12.00	0.027*	3-3	24.88	0.002*
1-13	6.766	0.639	3-4	2.936	0.842
1-14	8.914	0.043*	4-1	56.46	0.000*
1-15	7.194	0.500	4-2	76.36	0.000*
1-16	1.333	1.000	Total	102.8	0.000*
1-17	16.09	0.049*			
1-18	4.000	0.346			
1-19	59.39	0.000*			
1-20	40.32	0.000*			
2-1	7.440	0.012*			

La Tabla 4 muestra el análisis de contingencia para los 46 haplotipos de las 13 localidades estudiadas, realizado por categorías anidadas de variación genética y geográfica (Fig. 4). Seis de los clados del nivel 1 muestra claras asociaciones geográficas con los haplotipos (1-6, 1-11, 1-14, 1-17, 1-19, 1-20), cuatro para el nivel 2 (2-1, 2-2, 2-3, 2-6), y dos para el nivel 3 (3-1 y 3-3). La hipótesis de que no hay asociación geográfica es rechazada con un valor altamente significativo en el resto de los niveles más altos.

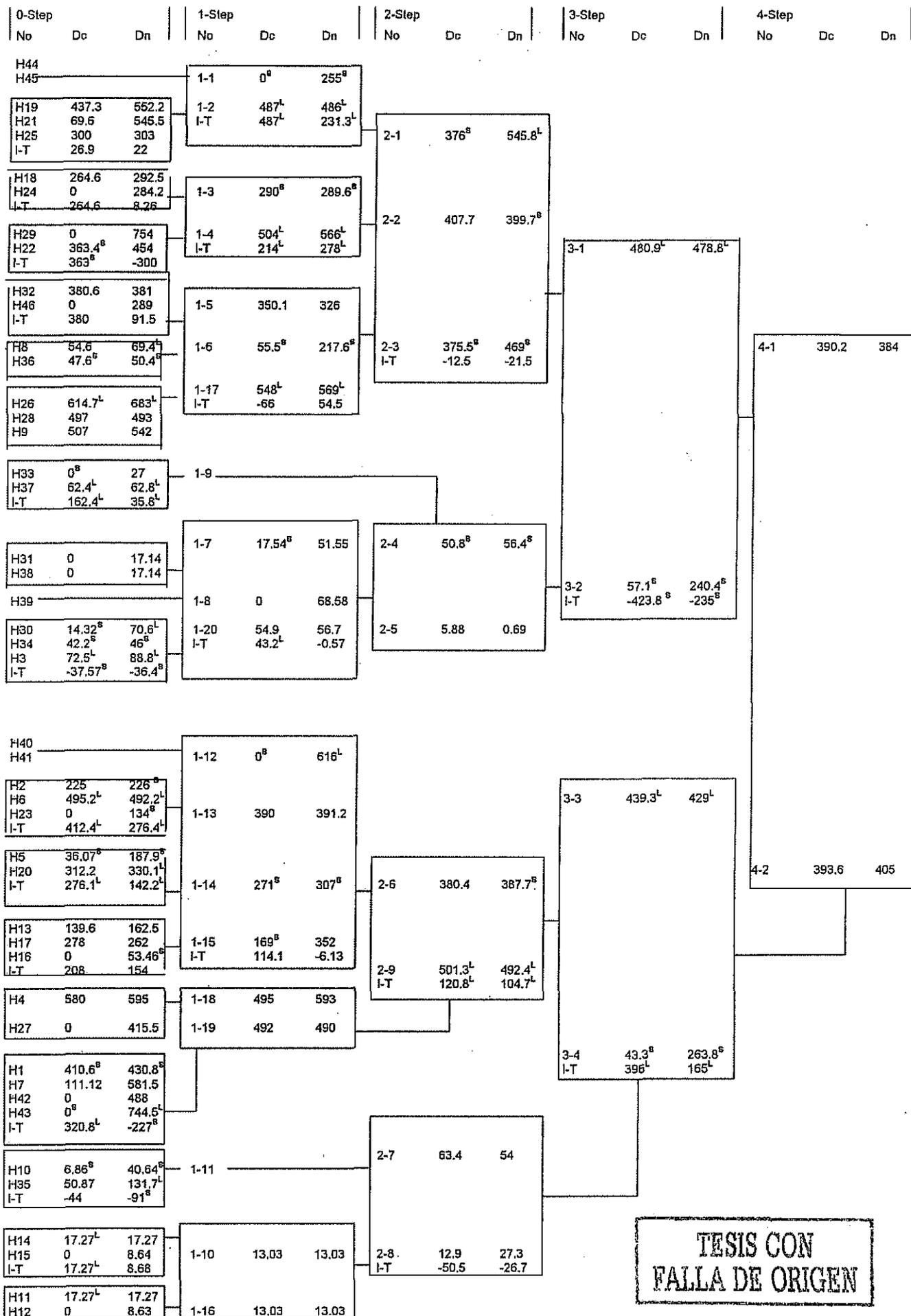
Tabla 5. Inferencias de procesos históricos con base a los resultados del análisis de clados anidados entre la distribución geográfica de los haplotipos de cpSSR en 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudoastrobus* e híbridas putativas en México y Guatemala.

Clado	Pasos de inferencia	Inferencia
<i>P. montezumae</i>		
1-6	1-2NO-11NO-17SI-4SI-9SI-10SI	Fragmentación alopátrica
1-17	1-2NO-11No-17SI-4NO	Flujo genético restringido/aislamiento vs distancia
1-20	1-2NO-11SI-Expansión del área-12NO	Contigua expansión del área
2-1	1-2SI-3NO-4NO	Flujo genético restringido/aislamiento vs distancia
2-2	1-2SI-3NO-4NO	Flujo genético restringido/aislamiento vs distancia
2-3	1-2SI-3NO- 4SI-9SI-10NO	Esquema de muestreo inadecuado para discriminar entre fragmentación y aislamiento por distancia
3-1	1-2NO-11SI-Expansión del área-12NO	Contigua expansión del área
4-1	1-2NO-11SI-Expansión del área-12NO	Contigua expansión del área
<i>P. pseudoastrobus</i>		
1-11	1-2NO-11SI-Expansión del área-12NO	Contigua expansión del área
1-14	1-2SI-3NO-4NO	Flujo genético restringido/aislamiento vs distancia
1-15	1-2SI-3NO-4NO	Flujo genético restringido/aislamiento vs distancia
1-16	1-2NO-11No-17	Inconcluso
1-19	1-2SI-3SI-5NO-6NO-7SI	Flujo genético restringido con dispersión pero a gran distancia
2-6	1-2SI-3SI-5NO-6SI-13SI	Colonización a gran distancia
3-3	1-2NO-3NO-4NO	Flujo genético restringido/aislamiento vs distancia
4-2	1-2SI-3NO-4NO	Flujo genético restringido/aislamiento vs distancia

Los resultados del análisis de clados anidados y las distancias geográficas se muestran en la Fig. 5, mientras que las inferencias acerca de la estructura de las poblaciones y sus interpretaciones de la demográfica histórica se muestran en la Tabla 5. Los patrones predominantes indican un evento inicial de contigua expansión del área del clado 4-1, representado fundamentalmente de haplotipos de *P. montezumae*, seguido de flujo genético con aislamiento por distancia y eventos actuales de fragmentación y flujo genético. Mientras que en el clado 4-2 se presentó un patrón inicial de flujo genético restringido, resultado del aislamiento por distancia, seguido de un proceso de colonización, y en los clados más

externos o terminales asilamiento por distancia y colonización a gran distancia. Este clado está representado fundamentalmente por haplotipos de *P. pseudostrobus* e híbridos. Nuevamente se observa un patrón claro de introgresión de haplotipos de *P. montezumae* hacia las poblaciones de *P. pseudostrobus*, donde la introgresión se representa en el clado 2-3, muy cerca del centro del clado 4-1, por lo que es un clado interno, y el clado 2-2 que es terminal o reciente. Este resultado sugiere un patrón de introgresión ancestral.

Figura 5. Análisis de clados anidados de las distancias geográficas con relación a 46 haplotipos obtenidos con cpSSR, de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*, e híbridas. La estructura jerárquica representada en esta figura es la misma que en la figura 4. Las diferentes columnas de izquierda a derecha muestran el incremento de los niveles de anidamiento, hasta el clado 5-1. Los recuadros reflejan la estructura de los clados anidados del nivel inferior inmediato. Los haplotipos se representan al principio del esquema (izquierda). Los niveles de los clados (No), las distancias de los clados (Dc) y de los clados anidados (Dn), se presentan en la parte superior del esquema. Una "S" subíndice indica que la distancia es significativamente pequeña al 95% de confiabilidad, y una "L" subíndice indica que la distancia es significativamente grande. Así como para los clados o haplotipos terminales "T" o internos "I". Estas distancias también son agrupadas en la parte inferior de los recuadros, indicados por el símbolos "I-T".



DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que los marcadores cpSSR pueden ser de gran ayuda para discriminar especies o taxa que estén muy relacionadas filogenéticamente, como es el caso de *P. montezuma* y *P. pseudostrobus*. En estudios similares que utilizan otros marcadores, el número de haplotipos específicos por especie es menor (Matos y Schaal, 2000; Wagner *et al.*, 1987; Kutil y Williams, 2001), o bien, no se obtienen fragmentos específicos para cada especie. Tal es el caso del trabajo realizado en el Capítulo III, estudio que trata sobre la estructura genética e introgresión de las mismas especies pero con base a microsatélites nucleares, donde la recombinación genética no permitió detectar con claridad la dinámica de la introgresión. Al detectar un mayor número de polimorfismos, así como polimorfismos específicos de las especies y de poblaciones híbridas putativas, los cpSSR pueden ser considerados potencialmente útiles para realizar estudios finos de la dinámica histórica de las especies y de la introgresión en el género *Pinus*.

Variación y estructura genética

La hibridación introgresiva es central en estudios evolutivos y de especiación. Este proceso ha sido ampliamente documentado en varias especies de pinos (Liddecoet and Righter, 1961; Lanner, 1974a; Bucci *et al.*, 1998; Matos y Schaal, 2000), y que por lo menos hasta ahora se conoce que ha dado origen a una especie, *P. densata*, por introgresión ancestral (Wang y Szmidt, 1990; Wang *et al.*, 2001). En particular para las dos especies en estudio, se tiene conocimiento de que *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* son capaces de intercambiar material genético, evidenciado por características morfológicas en las poblaciones naturales (Mirvo 1967; Perry, 1991) y en plantaciones artificiales (De la Garza y Nepamuceno; INIFAP com. pers.). En este estudio nosotros obtuvimos valores de diversidad genética, tanto de H_E como de π relativamente altos, comparables a los obtenidos con clSSR para otras especies de pino de amplia distribución geográfica, como *P. leucodermis* ($H_E = 0.316$; Powell *et al.*, 1995), y *P. halepensis* ($H_E = 0.222$; Bucci *et al.*, 1998). Además, los valores obtenidos para ambos estimadores en las poblaciones putativas híbridas fueron superiores a las poblaciones puras de cada especie. Este resultado es un indicador de que existe introgresión en las poblaciones mezcladas, en este caso las poblaciones que presentaron mayores valores de diversidad genética fueron dos de las

poblaciones ubicadas en el Estado de México dentro del Eje Neovolcánico. Esta región que ha sido denominada como centro de origen de nuevas especies de plantas por la hibridación introgresiva (Rzedowski, 1978).

Es interesante observar que la diferenciación genética en promedio para todas las poblaciones fue marcada ($R_{ST} = 0.302$), promedio que cae en el rango obtenido con cpSSR para otras especies de pinos, como del complejo *Halapensis* (0.074- 0.32; Bucci *et al.*, 1998), o del complejo *Montezumae*, con RFLP's de cloroplasto (0.014-0.475; Matos y Schaal, 2000), así como con el promedio general que se ha obtenido para todas las especies del género estudiadas ($F_{ST} = 0.240$, Delgado *et al.*, 2002). El mayor valor de estructura genética se encontró entre las poblaciones híbridas ($R_{ST} = 0.450$), resultado que, aunado a la presencia de haplotipos únicos en varias de estas poblaciones, pueden sugerir que la hibridación introgresiva ha ocurrido de manera continua a través de muchas generaciones, y que en la actualidad se ve reflejada en la existencia de variantes novedosas o propias de los individuos híbridos que habitan en estos sitios.

Relaciones genealógicas

También encontramos fuerte evidencia de incorporación de material citoplasmático de manera unidireccional en las relaciones filogenéticas de las poblaciones estudiadas así como de los haplotipos. Como se observa en la Fig. 2, las poblaciones de *P. montezumae* se agrupan en un grupo claramente definido, mientras que las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* y las poblaciones putativas híbridas se agrupan en un segundo clado. Topología que se observa más claramente en las relaciones genéticas de los haplotipos donde varios haplotipos obtenidos en individuos de las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* e híbridas son más relacionados genealógicamente con los haplotipos de *P. montezumae*, que con *P. pseudostrobus*, por lo que se agrupan dentro del clado que representa a *P. montezumae* (Fig. 3). Estos resultados indican dos aspectos relevantes, el primero que las poblaciones híbridas son originales o indígenas de *P. pseudostrobus*, y que presentan haplotipos recientes o novedosos. Segundo, que la introgresión ocurre a través del polen de las poblaciones de *P. montezumae* hacia las poblaciones de *P. pseudostrobus*, donde estas poblaciones actúan en su mayoría como árboles madre o receptoras de polen. Esto puede ser sustentado parcialmente con los resultados obtenidos en el estudio de Delgado y Piñero, (Capítulo III), donde con nSSR se detectó una introgresión bidireccional

pero mayormente en el mismo sentido de este trabajo, donde tres de cinco poblaciones putativas híbridas fueron agrupadas en el clado de *P. pseudostrobus*, además la topología obtenida con los datos morfológicos fue igual a la obtenida en este estudio, excepto que la población H98, se agrupo con el clado de *P. montezumae*. Esto indica que a nivel molecular como morfológico las poblaciones de *P. montezumae* son más cohesivas o más fuertemente relacionadas.

Análisis de clados anidados e inferencias históricas

Recientemente se ha demostrado que el análisis de la estructura genética es más robusto utilizando los métodos de coalescencia para analizar la estructura genealógica de los genes o haplotipos con relación a su distribución geográfica (Templeton, 1998). Estos métodos se están aplicando actualmente a nivel supraespecífico, pero con taxa que son poco divergentes como es el caso de las especies en estudio (Crandall, 1994). Los datos obtenidos para las especies estudiadas sugieren un alto nivel de estructura geográfica de las poblaciones (ver Tabla 4). Esto indica que los grupos de anidamiento están formados por linajes independientes, en este caso, de dos linajes evolutivos representados en los niveles más altos en el análisis. Esto es, por el clado-4-1, conformado en su mayoría de haplotipos de *P. montezumae* y el clado 4-2 representado en su mayoría por haplotipos de *P. pseudostrobus*. Así como un tercer linaje no independiente representado por la introgresión citoplasmática de *P. pseudostrobus* dentro del clado 4-1 de *P. montezumae*, linaje que al ser dependiente del linaje de *P. montezumae* (clado 4-1), podría encontrarse en procesos de especiación.

Las asociaciones de los diferentes haplotipos y clados de anidamiento nos indican dos procesos importantes de la historia demográfica de las poblaciones de acuerdo a la clave sugerida por Templeton (1995). El primero es un modelo de expansión contigua del área (clado 4-1). Este modelo fue descrito por Cann *et al.*, (1987), y supone que la expansión de las poblaciones se debe a la dispersión de los individuos en áreas contiguas, como un movimiento gradual a través del tiempo marcado por eventos de coalescencia en el cloroplasto. Ejemplos de expansión se observan en todos los niveles de anidamiento: clados 1-4, 1-20, 3-1, y 4-1, así como eventos de flujo genético por aislamiento por distancia en varios de los grupos de anidamiento de nivel más bajo como el clado 1-2, 2-1 y 2-2. La mayoría de los episodios de flujo genético incluyen a los clados representados por

haplotipos de *P. montezumae* e híbridos; estos últimos conforman un linaje evolutivo, que incluye introgresión ancestral dentro de los clados 2-1, 2-2 y 2-3, probablemente iniciada durante el evento más fuerte de expansión, representado dentro del clado 4-1. Otro proceso demográfico interesante es el de fragmentación que se detectó en los clados 1-6, 1-9 y 2-5. Los haplotipos que conforman estos clados están representados por poblaciones puras de *P. montezumae* distribuidas en Puebla, Hidalgo Tlaxcala y Morelos. Tenemos entonces, dos rutas de los procesos: la primera una expansión contigua del rango a la parte NE seguido de fragmentación, y la segunda, una expansión de la parte NW seguida de flujo genético y episodios recientes de fragmentación en poblaciones de *P. motezumae*, flujo genético en poblaciones híbridas y de *P. pseudostrobis*, y de expansión contigua en poblaciones de *P. montezumae* y poblaciones híbridas. En contraste, la otra parte de la historia (clado 4-2) esta representada por eventos de flujo genético debido al aislamiento por distancia en todos los niveles de anidamiento, clado representado por haplotipos de *P. pseudostrobis* e híbridos. En algunos clados más terminales del clado 3-3 y 3-4, se observaron procesos de colonización (clado 2-6) y flujo genético con dispersión a gran distancia (1-19). Es de gran interés el clado 2-6, donde se presentó el evento de colonización, que es definido como el establecimiento abrupto o rápido de una población en una nueva área geográfica (Templeton, 1998). Este clado esta conformado por haplotipos de las poblaciones puras de *P. pseudostrobis* y las poblaciones híbridas distribuidas en el Estado de México y Michoacán, y que forman parte del Eje Volcánico Transversal, además de Chiapas, Oaxaca y Guatemala, este clado incluye a los haplotipos más recientes. Por otra parte es importante mencionar que el único evento de expansión contigua registrado en este clado (4-2), fue para un haplotipo (H35) de *P. montezumae* y un híbrido (H10) en el clado 1-11; estos haplotipos generaron homoplasias dentro de la red, las cuales no se lograron corregir claramente, por lo que su interpretación demográfica debe de verse con cuidado. Resumiendo, los eventos evolutivos determinados en el clado 4-2 indican que históricamente se han presentado eventos de aislamiento por distancias seguidos por un evento de colonización, nuevamente flujo genético con aislamiento por distancia y con dispersión a gran distancia. Este patrón es interesante, ya que muestra que por un lado varios de los haplotipos se presentan tanto en poblaciones híbridas como puras de *P. pseudostrobis* los que probablemente se dispersaron por la parte NW de México, actualmente Sierra Madre

Occidental, y por otro lado que algunos de los haplotipos catalogados como híbridos representan haplotipos externos, por lo que podrían ser de origen reciente por hibridación.

En general se puede decir que *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* son dos especies distintas aunque cercanas, con gran capacidad de intercambiar material genético y donde las restricciones reproductivas no son muy fuertes. También que la información de caracteres morfológicos como evidencia de hibridación introgresiva sigue siendo diagnóstica de hibridación, ya que especies con poblaciones que muestran morfologías mezcladas, puede ser corroborado con datos moleculares (como en el presente estudio), donde la hibridación introgresiva es más factible de detectar en comparación a especies con caracteres morfológicos disímiles, donde la detección de eventos de introgresión es esporádica. Tal es el caso del estudio de Matos y Schaal (2000), donde se detectaron eventos de introgresión entre las especies estudiadas, las que tienen caracteres morfológicos completamente distintos, e incluso presentan diferencias de distribución altitudinal entre las áreas donde habitan. En el presente estudio la introgresión observada fue independiente de la distribución geográfica o altitudinal de las especies, y se presenta a través de toda el área de distribución de las poblaciones de *P. pseudostrobus* e híbridas.

Algunas de las explicaciones posibles acerca de la introgresión unidireccional observada pueden ser: i) diferente tiempo del desarrollo del polen entre las especies, ii) mayor producción de polen de *P. montezumae*, ii) mayor pérdida de óvulos de *P. pseudostrobus*, y iv) menor tamaño de algunas poblaciones de *P. pseudostrobus*. Todas estas explicaciones pueden estar dadas por cambios ambientales contrastantes entre las poblaciones, ya sea por eventos climáticos o geológicos pasados (fragmentación del ambiente) o por una perturbación humana reciente. El primer argumento se sustenta en los resultados obtenidos de la distribución de los haplotipos de las poblaciones representadas en el clado 4-1, donde observamos que en el pasado, las poblaciones tendieron a tener la mayor expansión pero que a través del tiempo estas no han presentado otro evento igual de manera significativa. Esto se ve reflejado en los eventos de aislamiento por distancia que se observan como más comunes actualmente. El segundo argumento se explica fundamentalmente para el clado 4-2, donde se agrupa la mayoría de haplotipos de *P. pseudostrobus*. Esta especie de pino ha sido la de mayor importancia económica como producto maderable, lo que ha contribuido a la disminución del tamaño de sus poblaciones. Por ello el patrón de aislamiento por distancia se ve incrementado a medida que aumentan

los niveles de anidamiento, presentando así haplotipos que al pasar de las generaciones pueden persistir como un linaje independiente con las oportunidades de dispersarse a otras localidades por flujo genético restringido. Históricamente se sugiere que el género *Pinus* tuvo su mayor diversificación hace 20 Myr (Millar, 1993). Los cambios climáticos asociados a las glaciaciones cíclicas que se presentaron durante este periodo fragmentaron o aislaron las poblaciones de muchas especies en refugios separados geográficamente. Al final de la última glaciación (hace 18 000 años), el clima fue más cálido, con la retracción de los glaciares propiciando una rápida migración de especies fuera de las áreas de refugio, muchas de las cuales se expandieron dentro de áreas que previamente no fueron habitadas (Webb y Bartlein, 1992). Probablemente, *P. montezumae* presentó una expansión anterior a las glaciaciones, por lo que pudo abarcar un área geográfica mayor y que actualmente está representada por poblaciones fragmentadas. En contraste, *P. pseudostrobus* podría tener capacidades adaptativas más restringidas que *P. montezumae*, por lo que su historia evolutiva ha sido probablemente determinada a través de eventos de flujo genético restringido por aislamiento por distancia. En efecto, y de acuerdo a Farjon y Styles (1997), existe registro fósil de conos del Terciario que podrían ser los ancestros de ambas especies y sustentar la hipótesis antes mencionada. Para *P. montezumae* existe registro fósil de conos que son muy parecidos a los de la especie, encontrados en Colorado, que datan del Oligoceno tardío (hace 26.5 Ma), y otros fósiles de conos que se asemejan a *P. pseudostrobus*, en Nevada, que datan del Mioceno (12.5 Ma) (Axelrod, 1986). Esta información demuestra que ambas especies están muy relacionadas históricamente, y que ambas tuvieron una distribución más al Norte en el pasado. Por ello es probable que se haya presentado primero el proceso de expansión contigua de *P. montezumae*, antes de las últimas glaciaciones, por lo que puede considerarse un origen más antiguo que *P. pseudostrobus*, especie para la cual su proceso histórico de aislamiento y flujo genético detectado es posterior a las glaciaciones. Tenemos entonces un escenario histórico del origen de dos linajes divergentes, los dos primeros que representan la especiación culminada de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, hace más de 15 a 20 mil años, y un tercer linaje no independiente que forma parte del linaje de *P. montezumae*, originado por la hibridación introgresiva ancestral, ya que forma un linaje interno y basal dentro del clado 4-1 de *P. montezumae*. Probablemente, este linaje no independiente en la actualidad se encuentra en procesos de especiación, hipótesis que es sustentada por los haplotipos únicos y de origen

recientes obtenidos en estas poblaciones híbridas putativas. Por otro lado, aparte de haber obtenido patrones interesantes de la dinámica histórica de las especies estudiadas, se generó información que apoya a la conservación "*in situ*" de las poblaciones que podrían ser centros de diversificación y de origen de nuevos linajes evolutivos, como son las poblaciones H14, H25, H35, H46, y H97 putativas híbridas.

A pesar de que se obtuvieron resultados importantes y se lograron establecer patrones evolutivos de la dinámica de la hibridación introgresiva entre estas especies, así como detectar las posibles rutas de la migración de polen, es importante seguir con la elaboración de estudios con estas especies que incluyan un mayor tamaño de muestra, colectando ejemplares de sitios que no fueron analizados (e.g., Veracruz, Guerrero, Colima y Chiapas), así como de estudios con ADN de mitocondria, ya que al ser heredada vía materna permitiría conocer las rutas de la migración del flujo genético por la disseminación de semillas, y así obtener un escenario evolutivo que permita complementar la historia evolutiva de estas especies.

AGRADECIMIENTOS

Estamos muy agradecidos con el Instituto de Mejoramiento Genético de Plantas Forestales de Florencia Italia, por su ayuda en la obtención de los datos de cpSSR. También, con Rodolfo Salas por su ayuda en el uso de los programas de análisis, y colecta de ejemplares, así como Alejandra Vazquez-Lobo, Omar Chassin, Fabiola Ramírez, Oscar Rodríguez y Rocío Esteban. Agradecemos a Felipe Nepamuceno y Pilar de la Garza, por su ayuda en la selección de las poblaciones híbridas putativas y comentarios importantes de campo. A los Drs. Elena Álvarez-Buylla y Luis Eguiarte, por sus comentarios y sugerencias de los análisis y del escrito. Este trabajo fue financiado por CONACYT-31777N a D. Piñero y D. Gernandt, y CONABIO, R116, a P. Delgado y D. Piñero.

LITERATURA CITADA

- Anderson, E. 1949. *Introgressive hybridization*. John Wiley and Sons. New York.
- Awise, J. C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43: 1192-1208.
- Axelrod, D. I. 1986. Cenozoic history of some western American pines. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 73:565-641.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Bucci, G., M. Anzide., A. Madaghiele, and G. G. Vendramin. 1998b. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halapensis-complex pine species using chloroplast SSR markers. *Molecular Ecology*, 7: 1633-1643.
- Cann, R. L., M. Stoneking, and A. C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325: 31-36.
- Clemen M., D. Posada, and K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 10:1657-1660.
- Crandall, K. A., A. R. Templeton, and CH. F. Sing. 1994. Intraspecific phylogenetics; problems and solutions, In: *Models Phylogeny Reconstruction* (ed. R. W. Scotland, D. J. Siebert, and D. M. Williams), Systematics Association Special Volume No. 52, pp. 273-97, Clarendon Press, Oxford.
- Cooper, G., W. Amos., D. Hoffman, and D. C. Rubinsztein. 1996. Network analysis of human Y microsatellite haplotypes. *Human Molecular Genetics*, 5:1759-1766.
- Critchfield, W. B. 1986. Hybridization and clasification of the White Pines (*Pinus* section *strobis*). *Taxon*, 35: 647-656.
- Delgado P., A. Cuenca., A. E. Escalante., F. Molina, and D. Piñero. 2002. Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 27-37.
- Delgado, V. P, and Piñero, D. 2002. Evidence of interspecific genetic flow between *Pinus montezumae* and *P. pseudostrobus*, as revealed by microsatellites nuclear and morphological data. (En elaboración)
- Edwards, M. A., J. L. Burke., J. L. Hamrick and R. A. Price. 1997. Frequency and direction of hybridization in sympatric populations of *Pinus taeda* and *P. echinata* (Pinaceae). *American Journal of Botanic*, 84: 879-883.
- Ewens, W. J. 1990. Population genetics theory- The past and the future. In: *Mathematical and Statiatical developments of evolutionary theory* (ed. S. Lessard), pp. 177-227. Kluwer Academics Publishers, New York.
- 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. y P. L. Smause. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics*, 136: 343-347
- Farjon, A. y B. T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). New York Botanical Garden. New York
- Gernandt, S. D., A. Liston, and D. Piñero. Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* Subsection *Cembroides*: Implications of molecular systematic studies of pine species complexes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21:449-467.
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press, New York.
- Hudson R. R. 1990. Gene genealogies and coalescent process. Pp, 1-42, In: Oxford Surveys in Evolutionary Biology, (ed) D. Futuyma and J. Antonovics. Oxford University Press, Oxford.
- Hudson, R. R., M. Slatkin, and N. L. Kaplan. 1992. A statistical test for detecting geographical subdivision. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 138-151.
- Isoda, K., S. Shiraishi., S. watanabe, and K. Kitamura. 2000. Molecular evidence of natural hibridization between *Abies veitchii* and *A. homolepis* (Pinaceae) revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology*, 12: 1965-1974.
- Kingman, J. F. C. 1982. The coalescent. *Stochast. Procceding. Applied.*, 13: 235-248
- Kutil B. L. and C. G. Williams. 2001. Triplet-repeat microsatellites shared among hard and soft pines. *The Journal of Heredity*, 92: 327-332.
- Lanner, R. M. 1974a. A new pine from Baja California and the hybrid origin of *Pinus quadrifolia*, *Southwestern Naturalist*, 19: 75-95.
- Ledig, F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: Ecology and Biogeography of *Pinus*. Richarsonn , D. M. (ed). Cambridge University Press. UK. pp 251-280.
- Liddecoet, A. R. and F. I. Righter. 1961. Trees of the Eddy Arboretum, Institute of Forest genetics, Placerville, CA. U. S. Forest Service and Range Experiment Station, misc. publ. No. 43. Berkeley, CA.
- Little, E. L, and Critchfield W. B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (Pines). United Stated Department of Agriculture Misc. Publ. No 1144.
- Liston A., W. A. Robinson., D. Piñero and E. Alvarez-Buylla. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1: 95-109.

- Matos J. A. and Schaal B. A. 2000. Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A coalescent approach to hybridization. *Evolution*, 54:1218-1233.
- Martínez M. 1948. Los pinos Mexicanos. Segunda edición, Ediciones botas. México, DF. 361 pp.
- Mirov N. T. 1967. The genus *Pinus*. Ronald Press Co., New York.
- Millar C. I. 1993. Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus*. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 80: 471-498.
- Nei, M., F. Tajima, and Y. Taneto. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153-170.
- Perry J. L. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon.
- Posada D., K. A. Crandall, and A. R. Templeton. 2000. GeoDis: a program for the cladistic analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9: 487-488.
- Powell, W. M., R. Morgante., G. G. McDevitt., G. G. Vendramin, and J. A. Rafalski. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes; applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 7759-7763.
- Rieseberg, L. H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany*, 82: 944-953.
- Rieseberg, L. H, and Soltis, D. E. 1991. Phylogenetic consequences of Cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*. 5: 65-84. Rieseberg, L. H. and J. F. Wendel 1993. Introgression and its consequences in plants. In: *Hybrid zones and the Evolutionary Process*, R. G. Harrison (ed), Oxford Univ. Press, Oxford, England, pp. 70-109.
- Rieseberg, L. H, and Wendel, J. F. 1993. Introgression and its consequences in plants. In: *Hybrid zones and the Evolutionary Process*, R. G. Harrison (ed), Oxford Univ. Press, Oxford, England, pp. 70-109.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México, Limusa, México.

- 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.
- Slatkin, M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetic Research Cambridge* 58:167-175.
- Slatkin, M. 1995a. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Strauss, S. H. and A. H. Doerksen. 1990. Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution*, 44: 1081-1096.
- Stebbins, G. L. 1959. The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 103: 231-251.
- Sutton B. C. S., D. J. Flanagan., J. R. Gawley., C. H. Newton., D. T. Leser, and Y. A. El-Kassaby. 1991. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in *Picea* and composition of hybrids from introgression zones. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 242-248.
- Szmidt, A. E., A. Sigurgeirsson, X. R. Wang., J. E. Hilgren, and D. Lindgren. 1988. Genetic relationships among *Pinus* species based on chloroplast DNA polymorphism. Proc. Frans Kempe Symp. Mol. Genetic.
- 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.
- Takezaki, N. and M. Nei. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic tree from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.
- Takezaki N. 1998. NJBAFD: a program for neighbor-joining tree construction from allele frequency data. National Institute of Genetics, Japan.
- Tavaré, S. 1984. Line of descent and genealogical processes, and their applications in populations genetic models. *Theoretical Population Biology*, 26:119-164.
- Templeton, A. R., E. Boerwinkle, and C. F. Sing. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117: 33-351.

- Templeton A. R. 1992. Human origins and analysis of mitochondrial DNA sequences. *Science*, 255: 737.
- Templeton A. R. and C. F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analysis under cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659-669.
- Templeton, A. R., E. Routman, and A.C. Phillips. 1995. Separating Population Structure from Population History: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 761-782.
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7:381-397.
- Templeton, A. R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status processes. *Molecular Ecology*, 10: 779-791.
- 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.
- Vendramín, G. G., L. Lelli., P. Rocci., and M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5: 595-598.
- Wagner, D. B., G. R. Furnier., M. A. Saghai-Marroof ., S. M. Williams., B. P. Dancik, and R. W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphism in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84: 2097-2100.
- Wang X. R. Y A. E. Szmidt. 1990. Evolutionary analysis of *Pinus densata* (Master) a putative Tertiary hybrid. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 641-647.
- Wang X-R., A. E. Szmidt, y O. Savolainen. 2001. Genetic composition and diploid hybrid speciation of high mountain pine *Pinus densata*, Native to the Tibetan Plateau. *Genetics*, 159: 337-246.
- Webb, T. y P. J. Bartlein. 1992. Global changes during the last 3 billion years: climatic controls and biotic responses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23: 141-143.

CAPITULO V

DISCUSIÓN GENERAL

**Introgresión diferencial: datos morfológicos y moleculares
(citoplasmáticos y nucleares)**

Utilizando caracteres morfológicos y marcadores moleculares microsatélites de ADN nuclear (nSSR) y de cloroplasto (cpSSR) se infirieron patrones históricos de la dinámica de la hibridación introgresiva entre *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*. Estos estudios, demostraron que los microsatélites son de gran ayuda para diferenciar entre taxa muy relacionados filogenéticamente. Además, los nSSR tienen gran utilidad para detectar eventos de hibridización introgresiva, pero que son más limitados que los cpSSR, ya que están sujetos a recombinación y por tanto tienen dos veces más probabilidades de generar un mayor grado de traslape de alelos, por lo que el seguimiento de la dinámica del flujo genético es más difícil de detectar (Lu, 2001; Rieseberg, 1995). Sin embargo, mientras que los nSSR, nos proporcionaron una mayor información de la cantidad del flujo genético y del grado de introgresión entre las poblaciones que los cpSSR, estos últimos nos proporcionaron información de las relaciones genealógicas de las poblaciones utilizadas para inferir la dinámica histórica de la introgresión. Por otra parte, los datos morfológicos aportan información relacionada con su plasticidad genética asociada a la variación ambiental o ecológica de los sitios donde habitan las especies. Así, la información obtenida fue comparativa y complementaria, de tal manera que permitió reconstruir la probable historia evolutiva de las especies a nivel de las poblaciones.

Parámetros genéticos y diferenciación genética

Las estimaciones de la diversidad genética, de la heterocigosis y de la estructura genética obtenidas con nSSR y cpSSR son comparables con otras especies de pino estudiadas con diferentes marcadores moleculares (Ledig, 1998; Delgado *et al.*, 2002). Sin embargo, las estimaciones con nSSR son relativamente menores al compararlas con las obtenidas con cpSSR. En principio, para los microsatélites nucleares se presenta una alta similitud de las frecuencias alélicas entre las poblaciones de ambas especies, valores medios de heterocigosis y de diversidad genética, siendo más altos en las poblaciones posibles híbridas. La presencia de algunos loci desviados de H-W y en desequilibrio de ligamiento también fueron detectados en varias de estas poblaciones. Los valores de flujo genético fueron altos tanto en poblaciones puras como entre las poblaciones posibles híbridas y por tanto se obtuvieron valores de estructura genética bajos entre todas las poblaciones, siendo mucho menores entre las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* e híbridas. En contraste, la información obtenida con cpSSR revela valores más altos de diversidad genética que los nSSR, y también las poblaciones posibles híbridas fueron las más variables. Los

valores de estructura genética fueron más altos con cpSSR que con nSSR, siendo las poblaciones de *P. montezumae* e híbridas las de mayor diferenciación.

Generalmente, cuando las poblaciones presentan eventos de introgresión se espera una gran cantidad de polimorfismos, debido a que puede incrementarse la variación genética (Roques *et al.*, 2001; Rieseberg, 1995), y la contribución de los híbridos a la variación genética debe ser mayor a la de los parentales (Arnold 1992; Perron y Bousquet, 1997; Roques *et al.*, 2001). En este caso, las poblaciones posibles híbridas presentaron los valores más altos de variación genética estimados para ambos marcadores genéticos, lo cual sugiere que las poblaciones seleccionadas como híbridas podrían estar representadas de *P. pseudostrobus*, cuyo valor de diversidad se vería aumentado como una consecuencia directa de la introgresión de *P. montezumae*. Además, las poblaciones posibles híbridas presentaron el mayor número de alelos únicos o raros. Este último aspecto de alelos únicos podría presentarse a través de nuevas mutaciones o por introgresión con otras especies (Williams *et al.*, 2000). El hecho de que los híbridos presenten caracteres morfológicos como moleculares diferentes a los parentales, es un indicador del grado de evolución y diferenciación de estos individuos con relación a sus progenitores. Rieseberg y Ellstrand (1993) demuestran como aumenta el porcentaje de caracteres extremos o propios de los híbridos en generaciones posteriores a la F1, de 10% a 30 % después de 10 generaciones. Por tanto, la presencia de caracteres únicos tanto morfológicos como moleculares obtenidos en las poblaciones híbridas son importantes indicadores de introgresión ancestral.

Los valores de variación genética obtenidos con nSSR fueron menores que con cpSSR. Esto puede deberse a: 1) tasas de mutación más altas en cpSSR que en nSSR, debido al tamaño diferente de la repetición. Como sabemos, los microsatélites generan sus polimorfismos debido al apareamiento erróneo entre las repeticiones cercanas, y resultan en una delección o duplicación de un segmento del ADN (Golstein, 1995a). Los cpSSR analizados están formados por zonas repetidas de mononucleótidos por lo que la generación de cambios por pérdida o adición de una base es más fácil de que ocurra que en los nSSR que estudiamos, que están formados por trinucleótidos, por lo que el error a la hora de replicar el ADN es menos probable que ocurra, ya que tendría que excluir o aumentar segmentos más grandes que los cpSSR; y 2) es posible que los nSSR tengan que ver con aspectos funcionales en la replicación, transcripción, regulación y expresión de genes (Sinden, 199; Young *et al.*, 2000; Williams, 2001). Por tanto son más

conservados que los cpSSR, ya que estos se distribuyen al azar en el genoma, son neutros y no están sujetos a selección (Vendramín *et al.*, 1996). Por tanto, son menos conservados que los nSSR.

Flujo genético y relaciones filogenéticas

Las estimaciones del flujo genético entre pares de poblaciones (M) para cpSSR están dentro del rango reportado para varias especies de coníferas (*P. flexilis*: Schuster *et al.*, 1989; *Picea* spp: Boyle y Morganster, 1986; *P. taeda*: Friedman *et al.*, 1985). En cambio con nSSR fueron muy altas, tanto en poblaciones puras como entre las poblaciones híbridas. Las poblaciones que presentaron valores de mayor flujo genético estimados con nSSR fueron las posibles híbridas con las poblaciones de ambas especies, y menor flujo genético entre especies. Tanto las poblaciones posibles híbridas como puras tienen diferentes grados de introgresión, por lo que el intercambio de material genético no muestra un patrón geográfico claro. En cambio, con cpSSR el flujo genético fue mayor entre las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* y posibles híbridas. Sin embargo, con los dos marcadores se observó que el mayor flujo genético se presentó entre algunas de las poblaciones posibles híbridas. Estas poblaciones se distribuyen en el Eje Neovolcánico, zona que ha sido mencionada como de origen de plantas por éste proceso (Rzedowski, 1978), por lo que es muy probable que esta zona sea un centro de hibridación entre las dos especies, y probablemente con otras especies con las que se asocian como *P. teocote*, *P. michoacana* y *P. hartweggi*.

Todas las estimaciones de la diversidad y estructura genética se ven reflejadas en las relaciones filogenéticas de las poblaciones, donde con nSSR no se observa una agrupación clara, resultado que indica una introgresión bidireccional. En cambio, las relaciones filogenéticas obtenidas con cpSSR formaron dos grupos definidos. En este caso, la introgresión fue asimétricamente más importante de *P. montezumae* a *P. pseudostrobus*. Aunado a esto los resultados de los datos morfológicos también nos muestran que las poblaciones posibles híbridas están más asociadas a las poblaciones puras de *P. pseudostrobus*, donde se observa un primer grupo formado de las poblaciones puras de *P. montezumae* y una posible híbrida (H98), y un segundo grupo conformado por la mayoría de las poblaciones híbridas (4 de 5) y las poblaciones de *P. pseudostrobus*. Si comparamos los resultados obtenidos con los tres tipos de datos, tenemos dos conclusiones generales: 1) los tres marcadores reflejan introgresión entre estas especies, en

menor grado con los datos morfológicos, seguido de los SSR de cloroplasto y una mayor introgresión con nSSR, 2) los tres tipos de datos forman dos grupos de poblaciones, el primero formado por las poblaciones puras de *P. montezumae* y el segundo por las poblaciones puras e híbridas de *P. pseudostrobus*, resultado que es menos claro con nSSR, seguido de los datos morfológicos y finalmente los cpSSR, lo que podría indicar que los datos que están probablemente más sujetos a selección por el ambiente son los datos morfológicos y los nSSR. Rieseberg (1995) menciona que la relación entre caracteres morfológicos entre las poblaciones puras e híbridas, no siempre es la norma, ni estos caracteres con datos moleculares. Por ejemplo, el estudio que realizaron Hanson y Rieseberg, (citado por Rieseberg 1995), en una zona de hibridación entre dos especies de *Yucca*, revelan poca o ninguna correlación entre la distribución de caracteres morfológicos, DNA de cloroplasto y RAPD's, lo que demuestra que la diferente manera de generar cada tipo de datos resulta en diferencias estructurales y moleculares de los individuos.

Dos aspectos que probablemente no permitieron detectar diferencias finas en la dinámica de la introgresión con base a los nSSR utilizados en este estudio podrían ser: 1) que en los marcadores que se utilizaron no se encontraron alelos con frecuencias específicas para cada especie parental y que probablemente se requiere del uso de más loci que muestren esas tendencias. Sin embargo, con cpSSR también se encontraron alelos compartidos, aunque en frecuencias bajas, lo cual permitió disectar las rutas de la introgresión, y 2) procesos específicos que están implicados en la manera que se comportan los SSRs, en el caso de los nSSR está la mutación y la recombinación. Las tasas de mutación calculadas para cpSSR, en pinos son de 10^{-5} (Proban *et al.*, 1999). Las tasas de mutación para nSSR en pinos no se conocen, pero se esperaría que fueran menores por el tipo de región repetitiva que los conforma (di-trinucleótidos). Aunado a esto la manera en que se heredan los nSSR, también es diferente a los cpSSR, ya que se heredan de manera biparental (2N), por lo que el tamaño efectivo es dos veces mayor que el de ADN citoplasmático en condiciones de equilibrio (Dong y Wagner 1994). Sin embargo, fue importante utilizar ambos tipos de datos moleculares, ya que la información que se obtuvo fue complementaria, y se logró discernir cuales poblaciones tienen mayor introgresión (que serían las posibles híbridas), cual es la dirección de la introgresión en el caso de cpSSR (de *P. montezumae* a *P. pseudostrobus*), y cual es la contribución complementaria de la introgresión de *P. pseudostrobus*, no detectada con cpSSR. Además, como se presentaron frecuencias alélicas muy

similares con nSSR, se demostró que la introgresión detectada solo se pudo generar a través de la introgresión acumulada durante muchas generaciones, resultado que es comparable al obtenido con cpSSR, ya que también se detectó un linaje que esta en proceso de especiación por eventos de introgresión acumulada durante varias generaciones. Vemos entonces que ambos marcadores si están reflejando una incorporación de alelos interespecíficos por hibridación introgresiva ancestral.

Varios factores pueden estar involucrados en los patrones de hibridación introgresiva obtenidos con ambos marcadores genéticos, principalmente factores ecológicos como son de selección de habitat, abundancia y periodos reproductivos. Por un lado, hasta ahora no hay datos sobre la capacidad de dispersión de polen y/o fertilidad de semillas entre estas dos especies, sin embargo Delgado (1994) reporta para una zona de Michoacán que *P. montezumae* produce 49% más semillas viables que *P. pseudostrobus*, por lo que esta diferencia en la H_E podría deberse a una mayor viabilidad de semillas y fertilidad de polen de *P. montezumae*, en comparación con *P. pseudostrobus*. Al dispersarse en un rango amplio de la distribución de la especie, produce la diversificación de alelos entre y dentro de las poblaciones con lo cual se lograron generar y por selección fijar alelos únicos o diagnósticos en las poblaciones híbridas. También se conoce que para algunas coníferas el polen puede dispersarse sobre grandes distancias mas de 500 m (Adams, 1992), y que las distancias que pueden dispersarse algunas semillas alcanzan hasta 300 m (Zasada, 1985). Estas estimaciones nos hablan de la factibilidad de intercambio de polen entre poblaciones de especies muy relacionadas, donde bajos niveles de flujo genético son suficientes para la homogenización. *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* son especies que en su mayoría habitan en simpatria y que su ciclo fenológico esta sobrelapado, la época de floración se presenta de febrero a abril en ambas especies (Patiño *et al.*, 1983), lo cual aporta espacios o transectos de hábitats de condiciones que favorecen a ambos taxa. Esto se ha observado en estudios de zonas de hibridación, donde la estructura interna de la zona de hibridación es muy compleja, reflejando una distribución de hábitats y recursos en forma de parches (modelo de parches o mosaico, Harrison 1986; 1990). En este caso, la variación que se observa depende de la habilidad de dispersión de los individuos relativo a la escala espacial de ambientes heterogéneos.

La distribución geográfica y altitudinal de las poblaciones híbridas también fue un factor que contribuyo a la introgresión, ya que la mayoría de las poblaciones híbridas se distribuyen en una misma zona (el Eje Neovolcánico), y su rango de distribución altitudinal es

muy parecido. Matos y Schaal (2000) encontraron introgresión entre *P. montezumae* y *P. hartweggi* activada por factores de asociación altitudinal, donde poblaciones de ambas especies se asociaban en sitios específicos, por ejemplo encontraron valores altos de relación filogenética en el Nevado de Toluca. Sin embargo consideramos que para las especies estudiadas los factores que están activando la introgresión fueron factores ecológicos y de estacionalidad, lo cual también se sustenta con los resultados de cpSSR, donde se observa que la diferencia en la capacidad de producción de polen entre estas dos especies puede ser uno de los mecanismos principales en activar la introgresión. El caso de los nSSR puede ser revisado a través de una más eficiente diseminación de semillas de *P. pseudostrobus*, aportando así la otra parte de la introgresión observada con nSSR. Para probar dicha hipótesis se requiere del estudio de estas poblaciones con ADN de mitocondria, ya que este se hereda vía materna. Se esperaría una mayor contribución de la introgresión de *P. pseudostrobus*, especie que puede estar actuando principalmente como árbol madre. En conclusión ambos tipos de datos muestran que la introgresión se ha dado de manera continua a través de varias generaciones por incorporación de material citoplasmático vía polen de *P. montezumae* y probablemente por una mayor diseminación de semillas de *P. pseudostrobus*.

Especiación y Conservación

La hibridación introgresiva es de gran importancia desde el punto de vista evolutivo como de la biología de la conservación. En el primer aspecto vemos que estos sitios podrían llegar a generar nuevas variedades o especies a través de dicho proceso, lo cual es muy probable por la presencia de alelos únicos o diagnósticos en poblaciones posibles híbridas, obtenidos tanto con cpSSR como nSSR, así como por la detección de un linaje no independiente dentro del grupo de haplotipos obtenidos para *P. montezumae*.

De acuerdo a los resultados del análisis de clados anidados de los haplotipos de cpSSR se planteo un probable escenario evolutivo de las especies estudiadas. Posiblemente, *P. montezumae* presentó un evento de expansión anterior a las glaciaciones, por lo que pudo abarcar una gran área geográfica que actualmente está representada por poblaciones fragmentadas. En contraste, *P. pseudostrobus* podría tener un origen posterior o bien, tener capacidades adaptativas más restringidas que *P. montezumae*, por lo que su escenario evolutivo ha sido determinado a través de eventos de flujo genético restringido por aislamiento por distancia. De acuerdo al registro de

conos fosilizados, el linaje que dio origen a *P. montezumae* pudo originarse en el Oligoceno tardío hace 26.5 Ma, y el linaje de *P. pseudostrobus*, en el Mioceno hace 12.5 Ma (Axelrod, 1986). Esta información demuestra que ambas especies están muy relacionadas históricamente y que ambas tuvieron una distribución más al Norte en el pasado. Tenemos entonces un escenario histórico del origen de dos linajes divergentes, los dos primeros que representan la especiación culminada de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, hace más de 15 a 20 mil años, y un tercer linaje no independiente que forma parte del linaje de *P. montezumae*, originado por la hibridación introgresiva ancestral.

La comprobación de la hibridación introgresiva entre estas especies aporta información crítica en cuanto a la realización de análisis filogenéticos con un sentido estrictamente cladogenético en el género *Pinus*, ya que como estas especies existen por lo menos 5 grupos de especies de varias secciones y subsecciones del género, que como se mencionó anteriormente muestran evidencias de que la introgresión puede estar influyendo en su evolución o pudo haber originado a varias de ellas. Por ejemplo, especies, formas o variedades del complejo de *P. ayacahuite*, el complejo *Pseudostrobus* (formado por lo menos con 5 variedades; Perry, 1991), el complejo *Montezumae* (con 5 especies; Farjon y Styles 1997; Matos y Schaal, 2000), así como el posible origen por hibridación de *P. maximartinezii* (Ledig, 1998) y *P. quadrifolia* (Lanner, 1974), especies que cuando han sido analizadas en una filogenia cladista, han presentado relaciones parafiléticas y polifiléticas (Liston *et al.*, 1999; Pérez de la Rosa *et al.*, 1995), por lo que se sugiere que para éste grupos de especies se realicen análisis genealógicos a nivel infraespecífico (poblaciones), que permitan detectar la existencia o no de la hibridación introgresiva, y posteriormente hacer inferencias más robustas de sus relaciones filogenéticas.

Por otra parte, aunque el proceso de hibridación introgresiva puede ser generador de especies, también puede ocasionar la extinción de las poblaciones o especies parentales (Rieseberg *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 1997), por tal motivo, realizamos un análisis específico de conservación que nos permitió proponer poblaciones prioritarias de conservación con base a la metodología propuesta por Vane-Wright *et al.*, (1991), llamada de “diversidad filogenética”. Esta metodología analiza las topologías obtenidas en una filogenia, se cuantifica el número de linajes que surgen de cada nudo o puntos de ramificación para cada taxa y los valores más altos se dan a las poblaciones que se encuentran más separadas del resto y cerca de la raíz del dendrograma. Aunque esta metodología fue inicialmente propuesta para taxa supraespecífico (especies,

géneros, familias), también ha sido aplicada a nivel infraespecífico, particularmente en poblaciones que presentan valores altos de diferenciación genética (F_{ST}), lo que permite analizar topologías más claras de las relaciones o agrupaciones filogenéticas (Fait 1992; Arita y Santos del Prado, 1999; Delgado *et al.*, sin publicar). En este trabajo, se utilizaron los filogramas obtenidos tanto con nSSR como cpSSR.

Para obtener el índice de diversidad filogenética se estimaron dos parámetros:

- 1) *Agrupación de poblaciones (AP)*; es el número de poblaciones presentes en el dendrograma.
- 2) *Pesos poblacionales básicos (PPB)*: se refiere a la división del total de la agrupación de poblaciones entre el valor de cada una.

Para facilitar los cálculos se estandarizaron los valores de *PPB* dividiéndolos entre el valor más bajo (E), lo que le dio a la población de menor categoría el valor de uno, donde encontramos que las poblaciones más diferentes son las más ancestrales en el dendrograma, mientras que las más parecidas evolutivamente a otras son las que se encuentran después de muchas bifurcaciones. Posteriormente, se usó el método de Vane-Wright *et al.*, (1991) adecuándolo a datos demográficos (número y tamaño de las poblaciones) y genéticos como la diversidad genética (H) obtenida con cpSSR y la heterocigosis esperada (H_E) obtenida con nSSR), con ello se obtuvieron índices de conservación, donde, en lugar de usar el número de ramificaciones entre nodos se usó: 1) el número de individuos por población y 2) los valores promedio de la diversidad genética (H) por población y los valores promedio de las heterocigosis (H_E). Para darle un valor mayor al tamaño más pequeño de población (que son los tamaños de las poblaciones que nos interesa conservar) se usó su inverso y se estandarizó entre el más pequeño, así la población más chica dio de 1. En el caso de los estimados de la variación genética (H_E), (H), estandarizamos con el valor más alto ya que queremos dar prioridades de conservación a las poblaciones de mayor número de heterocigos y de mayor diversidad genética, nuevamente se obtuvieron valores de 1 (la más variable) y 0. Una vez obtenidos los valores de los tres criterios de conservación (demográfico, genético y filogenético) se integraron realizando una sumatoria de promedios por población, donde las poblaciones que presentaron los valores más altos se consideraron las poblaciones con prioridades de conservar.

En el filograma obtenido con nSSR se observan 2 agrupaciones poblacionales (*AP*) para la población H98 de Chiapas (la más basal en la topología), 3 *AP* para la población P123 de Guatemala, 4 *AP* para las poblaciones H14, H47, posibles híbridas y el resto de las poblaciones

con *AP* de 4. Las *AP* obtenidas con cpSSR fueron 2 para la población H14, 3 *AP* para la M79, M810 y M12, 4 *AP* para las tres poblaciones de *P. pseudostrobus* P51, P62 y P123, dos de *P. montezumae* (M12 y M13), y 6 *AP* para el resto de las poblaciones posibles híbridas. Para que no se presentaran diferencias muy grandes entre los valores que se obtuvieron para poblaciones basales y terminales, se dividió el total de la agrupación poblacional (*AP*) entre el valor de cada población, por ejemplo para el primer valor con nSSR sería 53/5 y nos da un cociente de 10.6. Los cocientes que se obtienen son los pesos poblacionales básicos (*PPB*). Para facilitar los cálculos los valores fueron estandarizados, dividiéndolos entre el valor más bajo (*E*). Así, encontramos que los valores más diferentes son los que quedan en la parte más basal del fenograma. Las más parecidas evolutivamente a otras son las que se encuentran después de muchas bifurcaciones. Entonces, con base a la topología obtenida con nSSR la poblaciones H98 posible híbrida se encuentra a solo dos nodos de la raíz y la P123 tipo de *P. pseudostrobus*, a tres nodos de la raíz, las que serían las más diferentes evolutivamente al resto y por tanto las más valiosas para conservar (ver Tabla 1, Fig. 1). En el análisis de diversidad filogenética con cpSSR las poblaciones que presentaron menor número de *AP* fueron la H14 (2*AP*), seguido de tres poblaciones de *P. montezumae* (M79, M10 y M12), con 3 *AP*. Lo que indica que estas cuatro poblaciones serían evolutivamente las más importantes de conservar (Fig 2, Tabla 2).

El análisis con los otros índices de conservación (*N*, *H*, *H_E*), se presentan en la Tabla 3, así como la integración de los diferentes índices con base a una sumatoria. Los resultados indican que las poblaciones prioritarias de conservar de acuerdo al valor más alto para cada grupo de poblaciones fueron la población M79 de *P. montezumae* ubicada en Puebla, esto por el efecto de la mayor contribución de la variación genética con ambos marcadores moleculares. Seguido de la población M12 de Guatemala, en la cual se presenta el tamaño de la población que es pequeño. En general, todas las poblaciones de esta especie tienen variación genética alta, tamaños poblacionales grandes y de importancia filogenética semejante. Situación que se repite con las poblaciones de *P. pseudostrobus*, siendo la población de Oaxaca (P51) la prioritaria para conservar.

Aunque *P. pseudostrobus* presentan aparentemente valores parecidos en los 5 índices de conservación analizados, y por tanto nos indiquen que sus poblaciones no requieren de la implementación de estrategias de conservación, la existencia de eventos de introgresión en sus poblaciones implica que este proceso puede tener efecto en la extinción de poblaciones locales,

Tabla 1. Análisis de diversidad filogenética de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobis* y posibles híbridas con nSSR y de acuerdo a Vane-Wright *et al.*, (1991) modificado por Delgado *et al.*, (sin publicar). *AP* = Agrupación Poblacional; *PPB* = Pesos Poblacionales Básicos; *E* = Estandarización; % = Porcentaje de prioridad de conservar.

Población (No)	AP	PPB	E	%
P51	5	10.6	1	5.9
P62	5	10.6	1	5.9
P123	3	17.6	1.6	9.5
H14	3	17.6	1.6	9.5
H25	5	10.6	1	5.9
H36	5	10.6	1	5.9
H47	4	13.25	1.2	7.1
H98	2	26.5	2.5	14.8
M79	4	13.25	1.2	7.1
M10	4	13.25	1.2	7.1
M11	4	13.25	1.2	7.1
M12	4	13.25	1.2	7.1
M13	4	13.25	1.2	7.1
Promedio	53		16.9	100

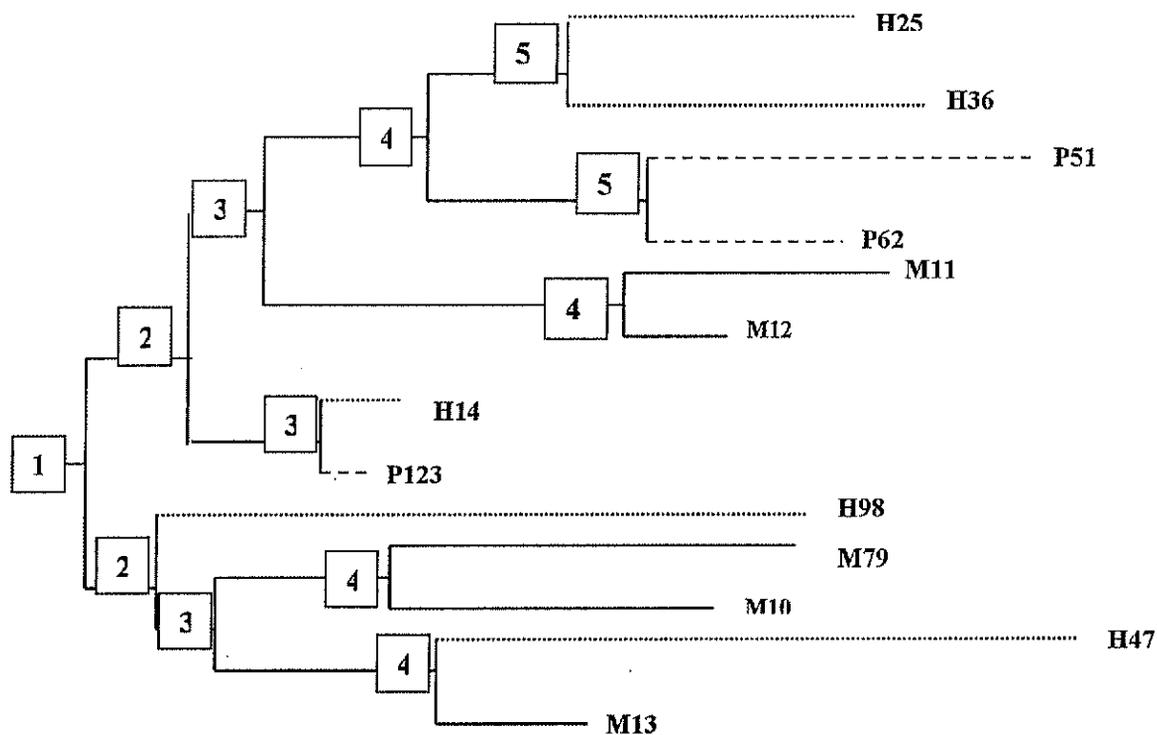


Figura 1. Filograma de diversidad filogenética (nSSR) de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobis* e híbridas putativas. Los números en los recuadros representan las Agrupaciones Poblacionales (*AP*).

Tabla 2. Análisis de diversidad filogenética de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* y posibles híbridas con cpSSR y de acuerdo a Vane-Wright *et al.*, (1991). modificado por Delgado *et al.*, (sin publicar). *AP* = Agrupación Poblacional; *PPB* = Pesos Poblacionales Básicos; *E* = Estandarización; % = Porcentaje de prioridad de conservar.

Población (No)	AP	PPB	E	%
P51	4	13.7	1.5	7.3
P62	4	13.7	1.5	7.3
P123	4	13.7	1.5	7.3
H14	2	27.5	3	14.5
H25	6	9.2	1	4.9
H36	6	9.2	1	4.9
H47	6	9.2	1	4.9
H98	6	9.2	1	4.9
M79	3	18.3	2	9.8
M10	3	18.3	2	9.8
M11	4	13.7	1.5	7.3
M12	3	18.3	2	9.8
M13	4	13.7	1.5	7.3
Promedio	55		20.47	100

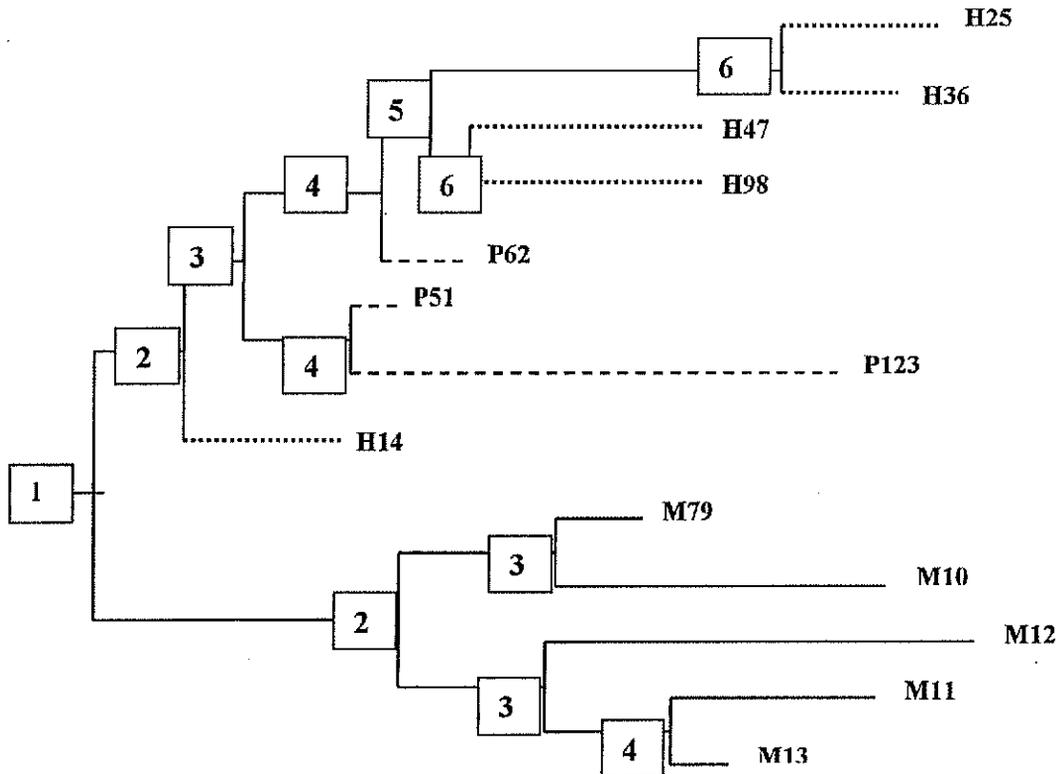


Figura 2. Filograma de diversidad filogenética (cpSSR) de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* e híbridas putativas. Los números en los recuadros representan las Agrupaciones Poblacionales (*AP*).

particularmente en poblaciones puras de la especie. Las poblaciones de *P. pseudostrobus* se traslapan con la mayoría de las poblaciones híbridas putativas, y en dos de las poblaciones puras de esta especie se presentaron eventos de introgresión de *P. montezumae* (población P51 de Oaxaca, y la P62 de Michoacán).

El linaje no independiente que se detectó dentro del linaje de *P. montezumae* originado por la introgresión también puede contribuir a la disminución del área de distribución de esta especie, esto, aunado al proceso acelerado de deforestación de estos bosques podría finalmente extinguir las poblaciones puras de esta especie y con ello perder parte de la riqueza biológica de los bosques templados de nuestro país. *P. pseudostrobus* es un de las especies más explotadas en México y Centroamérica (Saucedo y Acosta, 1988) por tal motivo es la especie que requiere de mayor atención para su conservación “*in situ*”, principalmente de las poblaciones de Oaxaca (P51), Michoacán (P62) y Guatemala (P123), esto en un sentido estricto de la conservación de variantes alélicas de poblaciones puras o típicas de la especie.

Por otro lado, la hibridación introgresiva puede tener efecto en la creación de centros de diversificación genética, siendo varias de las poblaciones posibles híbridas las más susceptibles de generar un nuevo linaje. Por tanto, es de gran importancia la conservación de poblaciones híbridas, que son centros de diversificación, como podrían ser las poblaciones H14 y H36 (distribuidas en el Estado de México), que fueron catalogadas como prioritarias de conservar. Estas poblaciones pueden ser los principales centros de origen de una nueva variedad o subespecie.

Es difícil predecir cuales hibridaciones pueden dejar zonas estables y cuales pueden ocasionar la extinción de las poblaciones locales; mucho más estudios empíricos, particularmente los relacionados con el rompimiento de barreras reproductivas entre estas especies y con la adecuación de las poblaciones híbridas, podrían ayudar a clarificar el efecto que tienen los híbridos en la extinción de poblaciones parentales y en su exitosa colonización. Además, se debe continuar con la elaboración de estudios con estas especies que incluyan un mayor tamaño de muestra, colectando ejemplares de sitios que no fueron analizados (en Veracruz, Colima, Jalisco y Chiapas), así como de estudios con ADN de mitocondria para obtener algún escenario evolutivo adicional que permita complementar la historia evolutiva de estas especies, y con ello proponer estrategias más claras de conservación.

Tabla 3. Índices de conservación obtenidos con datos demográficos, genéticos y filogenéticos para las poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobilus* y posibles híbridas. N = Tamaño de la población; H_{cp} = diversidad genética obtenida con cpSSR; H_{En} = heterocigosis esperada obtenida con nSSR; AP_n = Agrupación Poblacional obtenida con nSSR; AP_{cp} = Agrupación Poblacional obtenida con cpSSR. *Etds* = valores estandarizados a 1.

Población (No)	<i>N</i>	<i>N</i> <i>Etds</i>	H_{cp}	H_{cp} <i>Etds</i>	H_{En}	H_{En} <i>Etds</i>	AP_{cp}	AP_{cp} <i>Etds</i>	AP_n	AP_n <i>Etds</i>	Prioridad
<i>P. pseudostrobilus</i>											
P51	1000	1.000	0.354	1.000	0.399	1.000	4	0.500	5	0.400	3.100
P62	2000	0.500	0.178	0.904	0.223	0.500	4	0.500	5	0.400	2.404
P123	2000	0.500	0.086	0.174	0.147	0.367	4	0.500	3	0.600	2.141
<i>Híbridas putativas</i>											
H14	400	1.000	0.055	0.504	0.122	0.139	2	1.000	3	0.600	3.243
H25	400	1.000	0.246	0.550	0.271	0.785	6	0.250	5	0.400	2.985
H36	400	1.000	0.244	1.000	0.272	0.595	6	0.250	5	0.400	3.250
H47	400	1.000	0.213	0.728	0.362	1.000	6	0.250	4	0.500	3.478
H98	600	0.666	0.309	0.720	0.346	0.526	6	0.250	2	1.000	3.242
<i>P. montezumae</i>											
M79	3000	0.066	0.289	1.000	0.328	1.000	3	0.600	4	0.500	3.166
M10	4000	0.055	0.280	0.944	0.302	0.517	3	0.600	4	0.500	2.616
M11	1000	0.200	0.249	0.504	0.298	0.554	4	0.400	4	0.500	2.158
M12	200	1.000	0.107	0.131	0.244	0.458	3	0.600	4	0.500	2.687
M13	2000	0.100	0.217	0.376	0.200	0.407	4	0.400	4	0.500	1.783

CONCLUSIONES

- Los microsatélites cpSSR, muestran valores más altos de variación genética que las isoenzimas y que los nSSR, resultado que puede deberse a la diferente manera en que se dan los procesos de mutación en cada región del ADN.
- Los modelos de evolución molecular utilizados para derivar los estimadores de la estructura genética de la población deben de tomar en consideración otras fuentes de mutación (mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, y la existencia de duplicaciones) para entender las aplicaciones que desde el punto de vista comparado se pueden hacer con este tipo de marcadores.
- Se detectaron eventos de hibridación introgresiva con los tres tipos de datos (morfológicos, nSSR, y cpSSR), siendo los cpSSR más informativos sobre la dinámica histórica de la introgresión.
- Las poblaciones putativas híbridas presentaron en general los valores más altos de la variación genética, así como el mayor número de variantes alélicas únicas, por lo que su contribución a la variación genética de todas las poblaciones fue superior a la de las poblaciones puras o parentales.
- La estructura genética obtenida con cpSSR fue mayor a la obtenida con nSSR, resultado que concuerda con lo esperado, y refleja una mayor homogenización de las poblaciones con nSSR debido a la manera en que se heredan (2N).
- Las relaciones filogenéticas de las poblaciones obtenidas con nSSR indican que existe una hibridación introgresiva bidireccional. En contraste, con cpSSR, indican una hibridación introgresiva asimétrica, de *P. montezumae* a *P. pseudostrobis*, y los datos morfológicos muestran que las poblaciones posibles híbridas están más asociadas a las poblaciones puras de *P. pseudostrobis*.
- Los tres tipos de datos (morfológicos y moleculares), indican una mayor asociación de las poblaciones puras de *P. pseudostrobis* con las poblaciones posibles híbridas, sugiriendo que estas últimas fueron originalmente típicas o nativas de *P. pseudostrobis*.
- Ambos marcadores moleculares (nucleares y citoplasmáticos), indican que la hibridación introgresiva observada podría ser ancestral, por la alta homogenización de las frecuencias alélicas de todas poblaciones obtenida con nSSR, y por la presencia de un linaje introgresante basal obtenido con haplotipos de cpSSR.

CONCLUSIONES

- Los microsatélites cpSSR, muestran valores más altos de variación genética que las isoenzimas y que los nSSR, resultado que puede deberse a la diferente manera en que se dan los procesos de mutación en cada región del ADN.
- Los modelos de evolución molecular utilizados para derivar los estimadores de la estructura genética de la población deben de tomar en consideración otras fuentes de mutación (mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, y la existencia de duplicaciones) para entender las aplicaciones que desde el punto de vista comparado se pueden hacer con este tipo de marcadores.
- Se detectaron eventos de hibridación introgresiva con los tres tipos de datos (morfológicos, nSSR, y cpSSR), siendo los cpSSR más informativos sobre la dinámica histórica de la introgresión.
- Las poblaciones putativas híbridas presentaron en general los valores más altos de la variación genética, así como el mayor número de variantes alélicas únicas, por lo que su contribución a la variación genética de todas las poblaciones fue superior a la de las poblaciones puras o parentales.
- La estructura genética obtenida con cpSSR fue mayor a la obtenida con nSSR, resultado que concuerda con lo esperado, y refleja una mayor homogenización de las poblaciones con nSSR debido a la manera en que se heredan (2N).
- Las relaciones filogenéticas de las poblaciones obtenidas con nSSR indican que existe una hibridación introgresiva bidireccional. En contraste, con cpSSR, indican una hibridación introgresiva asimétrica, de *P. montezumae* a *P. pseudostrobis*, y los datos morfológicos muestran que las poblaciones posibles híbridas están más asociadas a las poblaciones puras de *P. pseudostrobis*.
- Los tres tipos de datos (morfológicos y moleculares), indican una mayor asociación de las poblaciones puras de *P. pseudostrobis* con las poblaciones posibles híbridas, sugiriendo que estas últimas fueron originalmente típicas o nativas de *P. pseudostrobis*.
- Ambos marcadores moleculares (nucleares y citoplasmáticos), indican que la hibridación introgresiva observada podría ser ancestral, por la alta homogenización de las frecuencias alélicas de todas poblaciones obtenida con nSSR, y por la presencia de un linaje introgresante basal obtenido con haplotipos de cpSSR.

- De acuerdo con los datos de cpSSR se sugieren posibles eventos históricos de expansión contigua de las poblaciones de *P. montezumae* y aislamiento por distancia de las poblaciones de *P. pseudostrobus*.
- También con cpSSR se propone un posible escenario evolutivo, donde se presentan dos linajes evolutivos independientes (*P. montezumae* y *P. pseudostrobus*), y un linaje no independiente originado por la hibridación introgresiva ancestral.
- Los tres tipos de datos sugieren la acción de varios factores tanto ecológicos, de selección del hábitat, abundancia y periodos reproductivos, así como genéticos, de selección de algunos nSSR, y de variantes alélicas novedosas, han influido en la dinámica histórica de la hibridación introgresiva observada entre las especies.

LITERATURA GENERAL

- Arita H, and Santos del Prado K. 1999. Conservation biology of néctar-feeding bats in México. *Journal of Mammalogy*, 80: 31-41.
- Arnold, M. A., B. D. Bennett. and E. A. Zimmer. 1990a. Natural hibridization between *I. fulvia* and *I. hexagona*: patterns of ribosomal DNA variation. *Evolution*, 44: 1512-1521.
- Arnold, M. A., C. M. Buckner. and J. J. Robinson. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in *Louisiana iris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 1398-1402.
- Arnold, M. L. 1997. Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Arnold, M. L, and S. A. Hodges. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents. *Trends in Ecology and Evolution*, 10: 67-71.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. New York.
- Axelrod, D. I. 1980. History of the maritime closed-cone pines, Alta and Baja California. *Geology Sciences Publied*, 127: 1-108.
- Ayala, F. J. and Dobzhansky, T. 1974. A new subspecies of *Drosophila pseudoobscura*. *Pan Pacific Entomology*, 50: 211-220.
- Barton, N. 1979. The dynamics of hybrid zones. *Heredity*, 43: 341-359.
- Barton, N. H. and J. S. Jones. 1983. Mitochondrial DNA: new clues about evolution. *Nature*, 306: 317-318.
- Barton, N. and M. Hewitt. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 113-148.
- Barton, N. H. and Stuart J. E. 1996. Analyse. A software for introgression zone and population genetics data analysis.
- Bermejo, V. B. 1993. Genetic diversity and the mating system in *Pinus engelmannii* Carr. PH Tesis. Wisconsin University.
- Bingham, R. T., R. J. Hoff, and R. J. Steinhoff. 1972. Genetics of western white pine, U. S. Dept. Agric. Forest. Serv. Ress. Paper WO-12. 18 pp.



- Birky, C. W. 1988. Evolution and variation in plant chloroplast and mitochondrial genomes. In: Gottlieb, L. D. and Jain, S. K. (Eds): *Plant evolutionary Biology*, pp. 23-53, Chapman and Hall London.
- Brunsfeld, S. J., D. E. Soltis, and P. S. Soltis. 1992. Evolutionary patterns and processes in *Salix* Sec. *Longifoliae*: evidence from chloroplast DNA. *Systematic Botany*, 17:239-256.
- Cuenca A. 2001. Estructura y variación genética de *P. nelsonii*, una especie endémica de México. Tesis de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Delgado P., D. Piñero., A. Chaos., N. Perez and E. Alvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 86: 669-676.
- Delgado P., L. Eguiarte., F. Molina., D. Piñero and E. Buylla. A infraespecific model as conservation alternative: the populations of four species from genus *Pinus* in endangered of extinction, México (sin publicar).
- DeWet, J. M. 1979. Origins of polyploids. In *Polyploidy Biological Relevance*, ed. W. Lewis, pp.3, 16. NY: *Plenum*, 583 pp.
- Eguiluz P. 1978. Ensayo de integración sobre conocimientos del género *Pinus*. Tesis Ing. Forestal. ENACH. Chapingo, México.
- Escalante, H. A. E. 2001. Estructura genética de poblaciones de *Pinus pinceana*, usando como marcadores moleculares microsatélites de cloroplasto (cpSSRs). Tesis de Biología. UNAM. México.
- Faith, D. P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61:1-10.
- Ferris, S. D., S. L. Portnoy. and G. S. Whitt. 1979. The roles of speciation and divergence time in the loss of duplicate gene expression. *Theoretical Population Biology*, 15: 114-139.
- Gallez, G. P. and L. D. Gottlieb. 1982. Genetic evidence for the hybrid origin of the diploid plant *Stephanomeria diegenensis*. *Evolution*, 36: 1158-1167.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Garcia, D. K. and S. K. Davis. 1994. Evidence for a mosaic hybrid zone in the grass shrimp *Palaemonetes kadiadensis* (Palaemonidae) as revealed by multiple genetic markers. *Evolution*, 48: 376-391.
- Govindaraju, D., P. Lewis and C. Collis. 1992. Phylogenetic analysis using ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms. *Plant. Systematics and Evolution*, 179: 141-153.
- Golstein, D. B., L. A. Zhivotovsky., L. A. Ruíz., L. L. Cavalli-Sforza, and M. W. Feltman. 1995a. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463-471.
- Grant V. 1979. Character coherence in natural hybrid populations in plants. *Botanical Gazette*. 140: 443-448.
- Harrison, R. 1986. Pattern and process in the narrow hybrid zone. *Heredity*, 56: 337-349.
- Harrison. R. G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Survey of Evolutionary Biology*. 7: 69-128.
- Heiser, C. B. 1949. Study in the evolution of the sunflower species *Helianthus annuus* and *H. bolanderi*. University of California Publications in Botany. 23: 157-196.
- Hewitt, M. G. 1988. Natural laboratories for evolutionary studies. *Tree* 37: 158-166.
- Howard, D. 1986. A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution*, 40: 34-43.
- Howard, D. 1993. Reinforcement: Origin, dynamics, and fate of an evolutionary hypothesis. *In: Hybrid Zones and the Evolutionary Process* (ed. Harrison RG), pp. 46-69. Oxford University Press, New York.
- Karalamangara, R. P., and D. L. Nickrent. 1989. An electrophoretic study of representatives of subgenus *Diploxylon Pinus*. *Canadian Journal of Botany*, 67: 1750-1759.
- Key, K. H. L. 1968. The concept of stasipatric speciation. *Systematics Zoology*, 17: 14-22.
- Knobloch, I. W. 1972. Heterogeneric Hybridization in flowering plants. *Taxon*, 21: 97-103.
- Kuehn, M. M., J. E. Minor, and B. N. While. 1999. An examination of hybridization between the cattail species *Typha latifolia* and *T. angustifolia* using RAPD-DNA and chloroplast DNA markers. *Molecular Ecology*, 12: 1981-1990.

- Lamb, T. and Avise, C. J. 1986. Directional introgression of mitochondrial DNA in a hybrid population of tree frogs: the influence of mating behavior. *Proceedings of the National Academic of Science, USA*, 83: 2526-2530.
- Little, E. L., and Critchfield W. B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (Pines). United States Department of Agriculture Misc. Publ. No 1144.
- Lehman, N., A. Eisenhauer., K. Hansen., L. D. Mech., R. O. Peterson and R. K. Wayne. 1991. Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric north American gray wolf populations. *Evolution*, 45: 104-119.
- Malaspina P., F. Cruciani., B. M. Ciminelli., L. Terrato., P. Santolamazza., A. Also., R. Brdika., A. Garcia., C. Gaudino., G. Guanti., J. Lavinha., M. Avila., M. Caraghin., R. Scozzari. and A. Novelletto. 1998. Network analyses of Y-Chromosomal type in Europe, Northern Africa, and Western Asian reveal specific patterns of geographic distribution. *American Journal of Human Genetics* 63: 847-860.
- Martín, L. and Cruzan. M. 1999. Patterns of hybridization in the *Piriqueta caroliniana* complex in central Florida: evidence for an expanding hybrid zone. *Evolution*, 53: 1037-1049.
- Matos, J. A. 1992. Evolution within *Pinus montezumae* complex of México: population subdivision, hybridization and taxonomy. Ph. D. Thesis, Washington University. Sn. Louis Missouri.
- Molina, F., P. Delgado., D. Piñero., N. N. Pérez, and E. Alvarez-Buylla. 2001. Do rare pine need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botanic*, 79: 131-138.
- Moore W. S. and Buchanan. D. B. 1988. Stability of the northern flicker hybrid zone in historical times: implications for adaptive speciation theory. *Evolution*, 39: 135-151.
- Morefield, J. D. 1992. Evolution and systematics of Stylocline and related Filagininae (Asteraceae: Inulea). Ph. D. dissertation, Claremont Graduate School. Claremont, CA.
- Pérez de la Rosa., S. A. Harris, and A. Farjon. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican Pines. *Theoretical and Applied Genetics*. 91:1101-1106.
- Pollock, D. D., A. Berman., M. W. Feldman, and D. B. Golstein. 1998. Microsatellite behavior with range constraints: Parameter estimation and improved distance

- estimation for use in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Populations Biology*, 53: 256-271.
- Powell, J. R. 1983. Interspecific cytoplasmic gene flow: evidence from *Drosophila*. *Proceeding of the National Academi of Science of the USA*, 80: 492-495.
- Quijada, A., A. liston., P. Delgado., A. Vázquez-Lobo, and E. Alvarez-Buylla. 1998. Varlation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of *Pinus rzedowskii* revealed by PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 539-544.
- Rieseberg, L. H, Soltis, D. E, and J. D. Palmer. 1988. A molecular reexamination of introgression between *Helianthus annuus* and *H. bolanderi* (Compositae). *Evolution*, 42: 227-238.
- Rieseberg, L. H. and D. E. Soltis. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolution Trends Plants*, 5: 65-84.
- Riesebeg, L. H. 1991. Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany*, 78: 1218-1237.
- Rieseberg, L. H., S. Beckstrom., A. Liston, and D. Arias. 1991b. Phylogenetic and systematic inferences from chloroplast DNA and isozyme variation in *Helianthus* sect. *Helianthus*. *Systematic Botany*, 16: 50-76.
- Rieseberg, L. H. and Ellstrand. N. C. 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization. *Critical Reviews in the Plant Sciences*. 12: 213-241.
- Rieseberg, L. H. and J. F. Wendel 1993. Introgression and its consequences in plants. *In: Hybrid zones and the Evolutionary Process*, R. G. Harrison (ed), Oxford Univ. Press, Oxford, England, pp. 70-109.
- Rich, C. M. 1963. Differential zygotic lethality in a tomato species hybrid. *Genetics* 48: 1497-1507.
- Ridley M. 1996. *Evolution*. (2nd Ed). Cambridge, Massachusetts USA. pp 425-459.
- Rieseberg, L. H., B. Sinervo., C. R. Linder., M. C. Ungerm, and D. M. Aruas. 1996. Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient experimental hybrid. *Science*, 272: 741-745.
- Routman, E. and Cheverud, J. M. 1994. Individual genes underlying quantitative traits: molecular and analysis methods. *In: Molecular ecology and evolution: approaches*

- and applications. (ed. B. Schierwater, B. Strait, G. P. Wagner. And R. DeSalle), pp. 593-606. Birkhauser, Basel.
- Shaw, G. R. 1914. The genus *Pinus*. Publ. Arnold Arb. 5. Harvard University, Cambridge.
- Schaal, B. A., K. Stephen. and S. H. Rogstad. 1991. DNA variation in plant populations. *Tree*, 10: 329-332.
- Stead, S. W. 1983a. Studies of variation in Central America pines, V: a numerical study of variation in the Pseudostrobus group. *Silvae Genetica*, 32: 1101-1115.
- Stibe M., B. B. Sears and D. E. Keathley. 1989. Inheritance of plastids in interspecific hybrids of blue spruce and white spruce. *Theoretical and Applied Genetics*, 78: 768-774.
- Templeton, A. R. 1980. Modes of speciation and inferences based on genetic distances. *Evolution*, 34:719-729.
- Templeton, A. R. 1981. Mechanisms of speciation - a population genetics approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 23-48.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In: Otte, D and J. A. Endler (Eds): *Speciation and its consequences*, pp 3-27. Sunderland. Mass. Sinauer Assoc. pp 676.
- Waines, J. G. 1976. A model for the origin of diploidizing mechanisms in polyploid species. *American Naturalist*, 110: 415-430.
- Wang X. R. and Szmidt. A. E. 1993. Chloroplast DNA, based phylogeny of Asia *Pinus* species (Pinaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 188: 197-211.
- Waters, I. and Shay, M. 1990. A field study of the morphometric response of *Thypha glauca* shoots to a water depth gradient. *Canadian Journal of Botany*, 68: 2339-2343.
- Whittemore, A. T. and B. A. Schaal. 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 2540-2544.
- Wilson, I. J. and D. J. Balding. 1998. Genealogical inference from microsatellite data. *Genetics* 150: 499-510.
- Wendel, J. F. and Albert. V. A. 1992. Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium L*): Character-state weighted parsimony analysis of chloroplast-DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany*, 17: 115-143.

- Van der Burgh. , J. 1973. Hölzer der niederrheinischen Braunkohlenformation, 2. Hölzer der Braunkohlengruben "Maria Theresia" zu Herzogenrath, "Zukunft West" zu Eschweiler und "Victor" (Zülpich Mitte) zu Zulpich. Nebst einer systematisch-anatomischen
- Vane-Wright, R. I., C. J. Humpries, and P. H. Williams. 1991. What to protect?- Systematics and the agony of choice. *Biological Conservation*, 55: 235-254.