

3 79212



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD ACADÉMICA

I. ECOLOGÍA



EVIDENCIA DE DOS LINAJES GENÉTICOS EN *Pinus cembroides* REVELADA POR MICROSATELITES DE CLOROPLASTO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A :

ARGELIA CUENCA NAVARRO

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO PIÑERO DALMAU

MEXICO, D. F.



JUNIO 2003

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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 19 de mayo de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Sistemática) del alumno(a) **Cuenca Navarro Argelia**, con número de cuenta 91770422, con la tesis titulada: "**Evidencia de dos linajes genéticos en *Pinus cembroides* revelada por microsatélites de cloroplasto.**", bajo la dirección de la Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau.

Presidente: Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
Vocal: Dr. David Sebastián Germandt
Secretario: Dr. Luis Enrique Eguarte Fruns
Suplente: Dr. Juan José Morrone Lupi
Suplente: Dr. Francisco Molina Freaner

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de mayo de 2003.


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Agradecimientos

Esta tesis fue financiada por el Instituto de Ecología de la UNAM, por CONACYT (proyecto 31777-N del Dr. Daniel Piñero) y por la CONABIO (proyecto R116 de la Dr. Patricia Delgado y el Dr. Daniel Piñero).

El presente trabajo no hubiera sido llevado a cabo sin la beca de maestría otorgada por el CONACYT y el complemento de la DGEP. También mi agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por apoyarme económicamente durante los meses que pase en el Istituto di Genetica Vegetale en Florencia, Italia.

Quisiera agradecer a David Gernandt, Mario Izaguirre, Rodolfo Salas y Daniel Piñero por permitirme abusar de su tiempo y su paciencia durante las salidas al campo. También a Alejandra Moreno por la colecta de la Amapola y al Dr. Francisco Molina por facilitarme sus muestras de Sierra de la Laguna.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Giovanni G. Vendramin por involucrarse en mi proyecto y por brindarme su ayuda y amistad. Muchísimas gracias a todo su equipo del Istituto di Genetica Vegetale, sezione Firenze: a Roberta Pastorelli y Maria Anzidei por tomarse el tiempo de enseñarme las técnicas de laboratorio. A Silvia Carnevale por toda su ayuda y amistad. También a Gabriele Bucci y a Daniella. A Ole K. Hansen por compartir el trabajo, las dudas y todo lo demás. A Anna, Laura, Alessandro y Clau. Gracias a todos porque hicieron de mi estancia en Florencia un tiempo maravilloso.

Gracias también a toda la gente del laboratorio de Genética y Evolución: Rodolfo, Alejandra M., Lev, Ana, Valentina, Alejandra A., Miroslava, Erika y todos los demás. A Rocío Esteban y a Oscar por su ayuda en el laboratorio.

Un especial agradecimiento a Daniel Piñero por apoyarme para llevar a cabo este proyecto, también por escuchar muchas de mis dudas y ayudarme a resolver algunas. A Francisco Molina, Luis Eguiarte, Juan José Morrone y David Gernandt por leer y revisar esta tesis, así como por todos sus comentarios y sugerencias a lo largo de todo el tiempo que trabajé en ella.

Finalmente quiero agradecer a toda la gente que, aunque no se encuentra involucrada directamente en este proyecto, fueron imprescindibles para la terminación de esta tesis: a Mario, Bárbara, Valentina, Nico y todos mis amigos, aunque ya nunca los vea. A mi familia desperdigada por el mundo y a toda la gente que me dio un empujón para seguir adelante. A Ole, Sebastián, Trudy y Ricardo.

A todas las preguntas que me quedan por responder

RESUMEN

Dentro del grupo formado por los pinos piñoneros, *Pinus cembroides* es la especie de mayor distribución e importancia económica en México, distribuyéndose en todo el norte del país y sur de Estados Unidos. En la actualidad existen discrepancias entre las distintas revisiones taxonómicas sobre la delimitación específica de este pino, así como entre los taxa similares a *P. cembroides*. Estas discrepancias se ven reflejadas tanto en lo que los diferentes autores reconocen como *P. cembroides*, así como en la relación de *P. cembroides* con otros taxa similares morfológicamente. En este trabajo se utilizaron tres loci polimórficos de microsátelites de cloroplasto para estudiar tanto la variación, estructura genética y algunos procesos históricos relacionados con la reciente divergencia de los taxa que según Farjon y Styles (1994) constituyen a *P. cembroides*, y que posteriormente se consideraron como tres especies distintas (Price *et al.* 1999). Se analizaron 385 individuos pertenecientes a 19 poblaciones de tres subespecies de *P. cembroides* (*cembroides*, *orizabensis* y *lagunae*), *P. discolor* y *P. johannis*, encontrándose 31 haplotipos distintos y dos linajes claramente diferenciados por los análisis de varianza molecular, uno de ellos formado por *P. cembroides*, donde se observa una variación genética moderada ($He = 0.59$) y una total falta de diferenciación genética entre las tres subespecies que lo componen. El otro grupo se encuentra formado por *P. discolor* y *P. johannis*, donde la variación genética es más elevada ($He = 0.78$) y existe cierta división entre los dos taxa que lo componen, la cual es evidente en las distancias genéticas pero no significativa en el análisis de varianza molecular. El análisis de clados anidados muestra una fragmentación alopatrica muy antigua y distintos eventos de flujo genético restringido y aislamiento por distancia. En el caso de *P. discolor* y *P. johannis* también se encuentra evidencia de ampliación continua del área de distribución. Se observan además tres fragmentaciones importantes: 1) entre las poblaciones de *P. discolor* ubicadas en Sonora y San Luis Potosí, 2) entre las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis* ubicadas en Zacatecas y el norte de San Luis Potosí con las poblaciones del Sur de San Luis Potosí, y 3) entre las poblaciones de *P. cembroides* ubicadas en el sur de Coahuila y las de Querétaro y Veracruz. Por otro lado, los análisis de demografía histórica demuestran que no ha habido expansión poblacional reciente. Se llevaron a cabo simulaciones para estimar algunos parámetros poblacionales históricos, obteniéndose una tasa de mutación de aproximadamente 1.5×10^{-3} (0.35 a 3.8×10^{-3}) por locus por generación, y una theta de 5.28 para el total de la muestra. Por otro lado, se encontró que el modelo de mutación por alelos infinitos se ajusta mejor a los datos obtenidos con este tipo de marcadores, por lo que se presume los niveles de homoplasia serán pequeños a pesar de las elevadas tasas de mutación. En cuanto a la divergencia del grupo, el haplotipo más ancestral se encuentra en el grupo formado por *P.*

discolor y *P. johannis*, por lo que se presume este será más antiguo, mientras *P. cembroides* es relativamente reciente, lo cual se ve sustentado por la falta de equilibrio entre migración y deriva encontrada en las poblaciones de este grupo.

ABSTRACT

Pinus cembroides is the pinyon pine with the greatest economical importance in Mexico and it is distributed in the North part of Mexico and South of United States. There is not a consensus about the classification of *P. cembroides* and morphologically similar taxa. Different authors disagree in the specific limits of this taxon. In this work three chloroplast microsatellites were used to study variation and genetical structure, as well as some historical processes related with the divergence of *Pinus cembroides* (sensu Farjon and Styles 1994). There were founded 31 haplotypes in 385 individuals belonging to 19 populations of *P. cembroides* subsp. *cembroides*, *P. cembroides* subsp. *orizabensis*, *P. cembroides* subsp. *lagunae*, *P. johannis* and *P. discolor*. Two different genetic lineages were clearly established by analysis of molecular variance. The first one is composed by the three subspecies of *P. cembroides*, where it is possible to found a moderate genetical variance ($H_e = 0.59$) and no genetical differentiation between subspecies. The second lineage is composed by *P. discolor* and *P. johannis*. It shows a higher genetical variation ($H_e = 0.78$) and a slight genetical differentiation between both taxa, evident in the genetical distances but not significative in the molecular variance analysis. The nested clade analysis shows a ancient allopatric fragmentation and some restricted gene flow with isolation by distance. It is also possible to detect three relative recent fragmentations: 1) among the *P. discolor* populations in Sonora and San Luis Potosi, 2) among the populations of Zacatecas-Northern part of San Luis Potosi and the Southern part of San Luis Potosi, and 3) among *P. cembroides* populations in Coahuila and Queretaro-Veracruz. On the other hand, historical demography analysis shown that there is not recent demographic expansion in any of both genetical lineages. Some simulations were carried out to estimate the mutation rate of this kind of markers, obtaining $\mu = 1.5 \times 10^{-3}$ (0.35 a 3.8×10^{-3}) per locus per generation and $\theta = 5.28$ for all the sample. Although the higher mutation rate, the dynamic of chloroplast microsatellites in this group follows an infinite alleles mutation model. Thus, in this case it is assumed homoplasy is not a problem in the phylogeographical reconstruction.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Características y evolución del género <i>Pinus</i>	1
1.1.1 Orígenes del género <i>Pinus</i>	1
1.1.2 El género <i>Pinus</i> en México	2
1.1.3 Los pinos piñoneros	3
1.1.4 El complejo de <i>Pinus cembroides</i>	5
1.2 El problema de estudio	6
1.2.1 Descripción de los taxa de estudio	8
1.3 Consideraciones metodológicas	12
1.3.1 Filogeografía y teoría de coalescencia	12
1.3.2 Marcadores moleculares: microsatélites de cloroplasto (cpSSRs)	14
2. ANTECEDENTES	16
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Colecta de material biológico	19
4.2 Obtención de datos genéticos	20
4.3 Análisis de variación genética	22
4.4 Análisis de Estructura Genética	23
4.4.1 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)	23
4.4.2 Comparaciones entre pares de poblaciones	25
4.4.3 Relaciones entre las distintas poblaciones	25
4.5 Red de haplotipos y análisis de clados anidados y asociación geográfica de los distintos grupos de haplotipos	26
4.6 Procesos históricos	27
4.6.1. Distribución mismatch	27
4.6.2. Simulaciones de parámetros históricos	28
4.7 Dinámica evolutiva de los microsatélites de cloroplasto en pinos	29
5. RESULTADOS	
5.1 Variación genética	31
5.2 Estructura genética	33
5.2.1 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)	34
5.2.2 Comparaciones entre pares de poblaciones	37
5.2.3 Relaciones entre las distintas poblaciones	44
5.3 Red de haplotipos, análisis de clados anidados y asociación geográfica de los distintos grupos de haplotipos	46
5.4 Distribución mismatch	49
5.5 Simulaciones de parámetros históricos	50
5.6 Dinámica evolutiva de los microsatélites de cloroplasto en pinos	56
6. DISCUSIÓN	57
6.1 Variación y estructura genética	61
6.2 Redes de haplotipos y análisis de clados anidados	61

6.2.1 Relaciones genealógicas	61
6.2.2 Fragmentaciones antiguas	65
6.2.3 Flujo genético restringido y aislamiento por distancia	66
6.3 Parámetros históricos de las poblaciones y análisis de coalescencia	67
6.4 Homoplasia en microsatélites de cloroplasto	69
6.5 Evolución de microsatélites de cloroplasto de pinos	70
7. CONCLUSIONES	73
8. REFERENCIAS	76
9. APÉNDICES	84

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características y evolución del género *Pinus*

El género *Pinus* es el mayor de la familia Pinaceae, constituido por aproximadamente 111 especies distribuidas a todo lo largo del hemisferio Norte (Farjon 1996, Farjon y Styles 1997). Este género se distingue de las otras coníferas por sus hojas aciculares, solas o en fascículos de una a seis, en ejes cortos. El cono femenino consiste en un grupo de escamas ovulíferas leñosas, cada una con una pequeña bráctea subyacente, la cual cuando el cono está maduro, se fusiona con la escama ovulífera y desaparece parcial o totalmente (Styles 1993). A excepción de *P. merkusii*, los pinos son exclusivos del hemisferio norte; encontrándose en muy diversos hábitats y en un gradiente altitudinal que abarca desde el nivel del mar hasta los 4,000 metros de altura. En las latitudes más cercanas al Ecuador ocupan principalmente las zonas altas, así como los semidesiertos (Millar 1993).

1.1.1 Orígenes del género *Pinus*

Según Florín (1963), tanto la familia Pinaceae como el género *Pinus* se originaron en el período Jurásico de la era Mesozoica, probablemente en Laurasia; donde poco después se diversificaron los dos subgéneros existentes (*Pinus* y *Strobus*, Richardson y Rundel 1998). Los antepasados de los pinos mexicanos han existido en América del Norte desde el Cretácico Inferior y posteriormente migraron al sur debido a los cambios climáticos causados por las glaciaciones y a las fluctuaciones en las barreras físicas (Styles 1993, Farjon y Styles 1997). Aparentemente estos pinos llegaron a México durante el Cretácico Tardío o principios del Terciario, a lo largo de la Sierra Madre Occidental desde las montañas de América del Norte (Farjon 1996), existiendo una segunda invasión durante el Terciario Medio. En esta segunda invasión, los pinos provenían del este de los Estados Unidos, en particular de los Apalaches, entrando a México por la Sierra Madre Oriental y rodeando el Golfo de México (Styles 1993). Posteriormente, los pinos radiaron hacia las mesetas centrales y el Istmo de Tehuantepec. Millar (1993) asume que América Central fungió como uno de los

refugios para los pinos durante el enfriamiento climático ocurrido durante el Eoceno Tardío. Debido a la gran cantidad de cambios climáticos y geológicos ocurridos recientemente en México, se ha sugerido que mucha de su diversidad refleja la evolución reciente del género (Farjon 1996).

Algunas de las características que han favorecido la rápida expansión de este grupo son: su abundante producción de semillas a edad temprana, su capacidad de colonizar sitios perturbados, el contar con mecanismos de dispersión a grandes distancias, un sistema de apareamientos que permite la endogamia y la autofecundación en individuos aislados, su habilidad para vivir en suelos pobres en nutrientes y su resistencia a las perturbaciones ambientales (Richardson y Rundel 1998). Los mayores centros de diversidad del género *Pinus* se encuentran en el sureste asiático, especialmente en el sur de China (Styles 1993) y en la parte sur de México y Centroamérica. Esta última región posee con 47 de las 111 especies descritas (Farjon 1996, Farjon y Styles 1997).

1.1.2 El género *Pinus* en México

Farjon (1996) menciona que en América del Norte existen tres regiones con gran diversidad de pinos: 1) México, 2) California y 3) el sureste de Estados Unidos. En México se encuentran 43 especies y 28 taxa infraespecíficos de este género (Farjon 1996), lo cual lo constituye en el país con mayor diversidad de pinos, con cerca del 47.5 % de las especies conocidas (Styles 1993, Farjon 1996, Farjon y Styles 1997).

Se han reconocido seis áreas principales de distribución de los pinos mexicanos: 1) la Sierra Madre Occidental, 2) la Sierra Madre Oriental, 3) el Eje Volcánico Transversal y la Mesa Central, 4) la Sierra de Juárez y la Sierra de San Pedro Mártir en Baja California, 5) la Sierra Madre del Sur y el Macizo de Oaxaca, y 6) los altos de Chiapas y Guatemala (Styles 1993, Farjon 1996). Sin embargo, Farjon (1996) sólo considera la existencia de dos centros de diversificación y evolución del género en México. El primero de estos centros de diversificación está constituido por el Eje Volcánico Transversal, con extensiones hacia el noroeste y el sureste, a lo largo de la Sierra Madre Occidental y de la

Sierra Madre del Sur. Tanto la Sierra Madre Occidental como el Eje Volcánico Transversal son complejos volcánicos, la primera con una historia de vulcanismo que comenzó en el Cretácico Superior y el segundo con un origen más reciente (Ferrusquía-Villafranca 1993). En el caso de la Sierra Madre del Sur, a pesar de poseer una geología más compleja, han existido ahí altas montañas al menos desde comienzos del Terciario (Ferrusquía-Villafranca 1993). Este es el centro de radiación de *P. devoniana*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* (Styles 1993, Farjon 1996). El segundo de estos centros de evolución y diversidad es el noreste de México, el cual se caracteriza por una disyunción de altas montañas rodeadas por desierto o semidesierto, una serie de adaptaciones a la aridez y una gran cantidad de endemismos locales. Esta zona emergió en el Cretácico Tardío o principios del Terciario, formando cadenas montañosas separadas por zonas bajas, existiendo una posterior diversificación en el Mioceno (Ferrusquía-Villafranca 1993, Millar 1993). Se cree que la diversidad encontrada en esta zona se debe tanto a la especiación como a la migración de especies desde las montañas Rocallosas (Farjon 1996).

1.1.3 Los pinos piñoneros

Los típicos pinos piñoneros se caracterizan por poseer conos femeninos subglobosos con una base plana (Malusa 1992), con pocas (no más de 60) escamas ovulíferas por cono (Farjon y Styles 1997, Gernandt *et al.* En prensa). Todas las especies de piñoneros se encuentran comprendidas en la subsección *Cembroides* (Little y Critchfield 1969), exceptuando a *P. nelsonii*, el cual recientemente se colocó como único integrante de la subsección *Nelsoniae* (Price *et al.* 1998, Gernandt *et al.* 2001). Los pinos de la subsección *Cembroides* tienen acículas solitarias o en fascículos de dos a cinco, con vainas caedizas y con la base de las brácteas foliares no decurrentes (Styles 1993). Las especies que constituyen esta subsección son árboles de ambientes áridos del norte y centro de México y algunas también se encuentran en el sur de Estados Unidos (Styles 1993).

La distribución geográfica de los pinos piñoneros en México incluye la Sierra Madre Oriental y Occidental, algunas montañas aisladas de Coahuila, la parte este del Eje Volcánico Transversal, la Sierra de Juárez y la de San Pedro Mártir en Baja California Norte y la Sierra de la Laguna en Baja California Sur. De todas las especies que conforman la subsección *Cembroides*, sólo *P. cembroides* se puede considerar de amplia distribución en el territorio mexicano (Perry 1991, Farjon y Styles 1997). Las poblaciones de pinos piñoneros encontradas en la Sierra Madre Oriental se encuentran asociadas al chaparral de montaña, donde tanto las sequías como las heladas son frecuentes. Se cree que estos dos factores, así como la intensa radiación solar, han seleccionado las acículas cortas y rígidas de algunos de los pinos que habitan esta zona (Farjon 1996). El otro ambiente en el cual se encuentran los pinos piñoneros, en particular los pinos que conforman el grupo de *P. cembroides*, es el bosque de juníperos. Este tipo de vegetación cubre una buena parte del norte de México, especialmente en las laderas semiáridas y en las mesetas de las Sierras Madres (Farjon 1996).

Se ha sugerido que la subsección *Cembroides* se extendió en México durante los inicios del Terciario, siendo la Sierra Madre Oriental el origen de los taxa más recientes, jugando un papel preponderante en la sobrevivencia y diversidad de esta subsección (Millar 1993 y 1998). Durante la radiación de los pinos piñoneros, se generaron cambios en el tamaño, el número de acículas por fascículo y la localización de los estomas (Malusa 1992). También se ha mencionado que durante la radiación se ha dado una cierta tendencia hacia el dioicismo (Passini 1994). A pesar que el área de distribución de los pinos piñoneros era mayor en el Eoceno que en la actualidad, no existe registro fósil suficiente que sustente la idea de vicarianza en este grupo de pinos (Malusa 1992). Se cree que hace 37 millones de años, *P. monophylla*, *P. edulis* y *P. cembroides* eran las especies dominantes en los bosques piñoneros de América del Norte (Romero *et al.* 2000). Por otro lado, se ha propuesto que las distintas variedades de *P. cembroides* son razas geográficas recientes, probablemente con origen en el Cuaternario (aproximadamente 2 millones de años, Romero *et al.* 2000).

Los bosques de pinos piñoneros constituyen un recurso muy importante en las zonas semiáridas de la Sierra Madre Oriental y Occidental. Debido a que estos crecen en zonas donde no suelen existir otras especies de pinos, estos son el único recurso maderero que se cuenta en ciertas zonas del país y, aunque no es de buena calidad, su madera se utiliza para la construcción a escala local, como leña, etc. Por otro lado, sus semillas alcanzan elevados precios en el mercado y son una importante fuente alimenticia en México (Styles 1993, Perry 1991, Farjon y Styles 1997). De todos los pinos piñoneros, *P. cembroides* es el de mayor importancia económica, y su distribución natural abarca 16 estados de la República, desde la frontera con Estados Unidos hasta Puebla y Veracruz en el sur del país (Styles 1993).

Estos pinos han sido objeto de considerables estudios taxonómicos y la clasificación de su variación ha llevado a resultados contradictorios acerca de la validez de varios de los taxa (Styles 1993). El número de especies reconocidas en la subsección *Cembroides* varía considerablemente, Little y Critchfield (1969) reconocieron ocho especies; sin embargo, al menos ocho especies nuevas han sido descritas posteriormente (Perry 1991, Farjon y Styles 1997, Gernandt *et al.* 2001). Muchas de estas nuevas especies se han descrito basándose en diferencias relativamente menores, como el número y tamaño de las acículas, el arreglo de los estomas, el número de canales resiníferos, las formas de crecimiento, la concentración de algunos monoterpenos y el grosor de la testa en la semilla (Gernandt *et al.* 2001). Existen algunos análisis cladísticos publicados sobre esta subsección, dos de ellos realizados con caracteres morfológicos (Malusa 1992, Farjon y Styles 1997), uno basado en fragmentos de restricción del cloroplasto (Pérez de la Rosa *et al.* 1995), uno con la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ribosomal nuclear (Gernandt *et al.* 2001) y otro con las secuencias de los genes *matK*, *rpl16* y *rbcL* (Gernardt *et al.* En prensa). Las relaciones filogenéticas todavía no se esclarecen de forma robusta, sin embargo, las especies consideradas relictuales dentro de esta subsección (*P. pinceana*, *P. maximartinezii* y *P. rzedowskii*) permanecen parafiléticas con respecto al resto de las especies, las cuales conforman el complejo de *P. cembroides* (Gernandt *et al.* 2001).

1.1.4 El complejo de *Pinus cembroides*

Malusa (1992) llama al complejo *cembroides* como los “piñoneros verdaderos”, caracterizado por la liberación tardía de polen y por la presencia de conos pequeños y resinosos. Este es un grupo monofilético (Malusa 1992, Pérez de la Rosa et al. 1995, Gernandt et al. En prensa) compuesto por *P. culminicola*, *P. johannis*, *P. catarinae*, *P. monophylla*, *P. edulis*, *P. quadrifolia*, *P. discolor*, *P. lagunae* y *P. cembroides*. De los cuales este último es el más variable, tanto morfológica como palinológicamente (Romero et al. 2000). Las especies de este grupo son ecológicamente similares (McCunne 1998) siendo identificadas como “tolerantes a restricciones”. En general son pinos de porte bajo, perennidad extrema, semilla grande, corteza delgada y rugosa y lento crecimiento (Romero et al. 1996).

Por otro lado, las relaciones filogenética al interior de la subsección *Cembroides* todavía sin conflictivas. Parte del problema es que los límites específicos dentro del complejo *Cembroides* no se encuentran claramente definidos, por lo que se ha argumentado que tanto la hibridación como la introgresión pueden ser fuerzas importantes en la evolución de este grupo. Muchas de las especies de este complejo son simpátricas en alguna parte de su distribución y dicha cercanía, aunada a la polinización por viento, podría estar permitiendo el flujo genético interespecífico (Gernandt et al. 2001), siendo esta una de las principales razones para la falta de consenso tanto para establecer el número de especies que conforman el grupo, como las relaciones de parentesco entre los taxa.

1.2 El problema de estudio

Dentro de la subsección *Cembroides*, uno de los grupos controversiales taxonómicamente es el de *Pinus cembroides sensu lato*, donde las últimas revisiones difieren considerablemente (Tabla 1). Por un lado, Perry (1991) considera la existencia de cuatro especies y dos variedades (*P. cembroides* var. *cembroides* y var. *orizabensis*, *P. lagunae*, *P. discolor* y *P. johannis*); mientras que Farjon y Styles (1997) lo consideran

como una sola especie con tres subespecies distintas (*P. cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *lagunae* y *P. cembroides* subesp. *orizabensis*) y dos variedades dentro de una de las subespecies (*P. cembroides* subesp. *cembroides* var. *cembroides* y *P. cembroides* subesp. *cembroides* var. *bicolor*). En el caso de Price et al. (1998), ellos consideran tres especies (*P. cembroides*, *P. discolor* y *P. johannis*) y tres subespecies para *P. cembroides* (subesp. *cembroides*, *lagunae* y *orizabensis*).

Tabla 1. Clasificación de los taxa similares a *Pinus cembroides* s.l. según tres diferentes autores: Perry (1991), Farjon y Styles (1997) y Price et al. (1998).

Perry (1991)	Farjon y Styles (1997)	Price et al. (1998)
<i>P. cembroides</i> Zuccarini	<i>P. cembroides</i> Zuccarini	<i>P. cembroides</i> Zuccarini
subesp. <i>cembroides</i>	subesp. <i>cembroides</i>	subesp. <i>cembroides</i>
subesp. <i>orizabensis</i> Balley	var. <i>cembroides</i>	subesp. <i>lagunae</i> Robert-Passini
<i>P. discolor</i> Balley y Hawskworth	var. <i>bicolor</i> Little	subesp. <i>orizabensis</i> Balley
<i>P. lagunae</i> Passini	subesp. <i>orizabensis</i> Balley	<i>P. discolor</i> Balley y Hawskworth
<i>P. johannis</i> Robert	subesp. <i>lagunae</i> Robert-Passini	<i>P. johannis</i> Robert

Por otro lado, los análisis filogenéticos no han sido concluyentes, de estos, el estudio más reciente fue realizado por Gernandt *et al.* (En prensa) utilizando la secuencia de tres genes de cloroplasto. En el caso de la topología obtenida con el gen *matK* (Figura 1A), se observa la imposibilidad de resolver las relaciones entre las subespecies de *P. cembroides* (según la clasificación de Price *et al.* 1998), debido a la falta de variación de *matK* entre estas subespecies. De esta manera, *P. cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *orizabensis* y *P. cembroides* subesp. *lagunae* forman un clado que tiene como grupo hermano a la secuencia de un individuo de *P. discolor* perteneciente a una población de San Luis Potosí. Por otro lado, la secuencia del individuo de *P. johannis* colectado en Zacateca se agrupa con *P. culminicola* y *P. discolor* (de origen desconocido), teniendo como grupo hermano la segunda secuencia de *P. johannis* proveniente de San Luis Potosí. Al combinar los resultados obtenidos con *matK*, *rpl16* y *rbcL* (Figura 1B, Gernandt *et al.* En presa) se observa una politomía entre *P. cembroides*, *P. cembroides orizabensis* y *P. lagunae*, la cual tiene un valor de bootstrap de 100 %, mientras que *P. discolor* y *P. johannis* se asocian en otro clado con 70 % de bootstrap.

Esta falta de resolución entre los taxa se encuentra influenciada por varios factores, entre ellos que el tiempo de coalescencia de estos marcadores es más lejano que el tiempo de diversificación del grupo, así como el posible origen polifilético de algunas especies, es decir, el origen por hibridación introgresiva o evolución reticulada. En ambos casos surge la necesidad de buscar nuevos marcadores con mayores tasas de mutación, los cuales nos puedan dar más información sobre las relaciones entre los distintos taxa involucrados y los procesos evolutivos dentro de este grupo; así como, la utilización de nuevas metodologías que nos ayuden a contestar preguntas sobre las relaciones entre taxa producto de una diversificación reciente en los cuales el aislamiento entre especies puede no encontrarse claramente establecido.

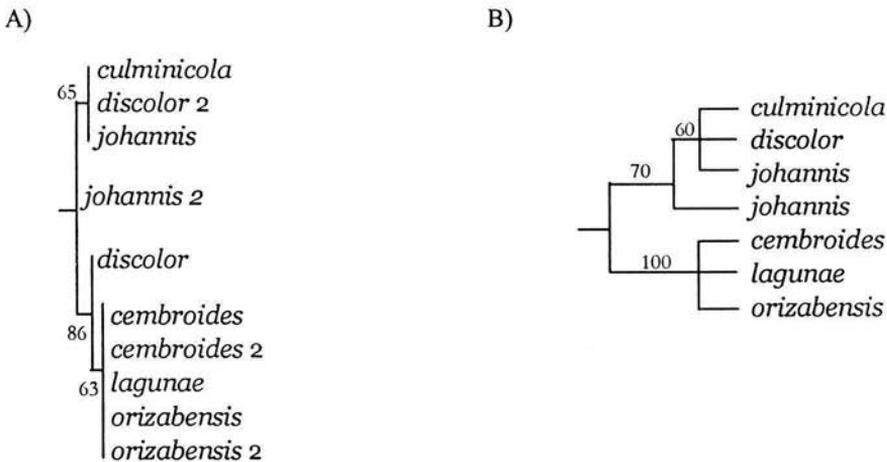


Figura 1. A) Fragmento de uno de los árboles más parsimoniosos obtenidos por Gernandt *et al.* (En prensa) utilizando *matK* (38 caracteres informativos). B) Fragmento del árbol de consenso estricto de 936 árboles obtenidos al combinar *rpl16*, *rbcL* y *matK* (169 caracteres informativos, CI = 0.82). Los números corresponden a los valores de bootstrap.

1.2.1 Descripción de los taxa de estudio

A) *Pinus cembroides* Zucc.

Pinus cembroides fue descrito por Zuccarinni en 1832. Posteriormente, Passini (1982) describió *P. cembroides* var. *cembroides* como un árbol de 5-15 m, con 2, 3 ó 4 acículas

por fascículo, estomas tanto en la parte dorsal como en la parte ventral de las hojas, dos canales resiníferos, conos femeninos 2-5 por 3-6 cm cuando están abiertos (Farjon y Styles, 1997) y semillas con endospermo color rosado (Romero et al. 2000). El polen se dispersa de mayo a junio, dependiendo de la altura de la población (Farjon y Styles 1997).

En México se encuentra en Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Perry 1991; Farjon y Styles 1997; Styles 1998; Romero 2000). Esta especie generalmente ocupa la zona de transición entre los valles semidesérticos y los bosques templados de mayor altitud, viviendo entre los 800 a 2800 m de altura, en zonas donde la precipitación anual varía entre los 300 y 700 mm.

Las poblaciones ubicadas en la Sierra Madre Oriental se encuentran expuestas a mayor calor y sequía que las poblaciones encontradas en la Sierra Madre Occidental (Romero 1996). En las zonas áridas se puede encontrar asociado con *Juniperus*, *P. nelsonii*, *P. pinceana*, *Quercus*, *Yucca*, *Agave*, y algunas cactáceas; mientras que en zonas más templadas se encuentra en bosques de pino encino, asociado con *P. arizonica*, *P. engelmanni*, *P. leyophylla*, y *P. pseudostrobus* (Perry 1991; Farjon y Styles 1997). Se ha mencionado un mutualismo importante entre *P. cembroides* y ciertas especies de aves como *Aphelocoma coerulescens* y *Gymnorhinus cyanocephalus* (Tomback y Linhart 1990), siendo estos los dos principales dispersores de semillas. Aunque Romero (1996) menciona otros posibles dispersores como otros cuervos y colúmbidos, además de algunos mamíferos pequeños.

Esta especie generalmente se encuentra donde el suelo es pobre y escaso, sin embargo, puede crecer en una gran variedad de sustratos, teniendo preferencia por los suelos de origen ígneo (Romero 1996). Las poblaciones ubicadas en Sierra Madre Oriental se encuentran sobre suelo predominantemente calizo y de mayor antigüedad (aproximadamente 65 MA) que el suelo de las poblaciones ubicadas en la Sierra Madre Occidental (al rededor de 26 MA), donde el suelo es ígneo (Malusa 1992).

B) *Pinus cembroides* subesp. *orizabensis*

Es un árbol pequeño de 8 a 10 m, con tronco monopodial y ramas bajas; tronco grueso, rugoso, con escamas y fisuras irregulares. Hojas en fascículos de 3 ó 4 persistentes por 3 a 5 años, más o menos rígidas; de 3 a 5 cm de largo. No se sabe en que época se dispersa el polen, pero se presume que es en los meses de mayo a junio.

Es el pino piñonero que se encuentra más al sur, en el límite de Puebla, Tlaxcala y Veracruz; principalmente en la parte oeste del pico de Orizaba y del Cofre de Perote. Una población aislada se encuentra a 15 km al este de Tehuacán; esta es una región semiárida con pequeños volcanes extintos entre 2,100 a 2,300 m de altitud, con suelos de origen volcánico. El clima donde se encuentra este pino se caracteriza por una larga estación seca que va desde noviembre hasta mayo, abundantes lluvias de verano y heladas en diciembre y enero (Perry 1991; Farjon y Styles 1997). Existe en bosques puros o mezclados con *Juniperus deppeana*, y *J. flaccida*. Ocasionalmente se encuentra con *P. pseudostrobus* o *Quercus*. (Perry 1991; Farjon y Styles 1997).

C) *Pinus cembroides* subesp. *lagunae*

Descrito por Passini en 1981 como *P. cembroides* var. *lagunae*, en 1983 Bailey lo asigna a la categoría de subespecie *lagunae*, debido a las hojas mucho más largas, con menos estomas, al pedúnculo más largo y ancho, y, sobre todo, a las diferencias en concentración de monoterpenos entre *P. lagunae*, *P. cembroides* y *P. cembroides* var. *orizabensis* ya que químicamente *P. lagunae* es mucho más parecido a *P. discolor* que a *P. cembroides* (Bailey 1983). Finalmente, Passini en 1987 eleva a este pino a la categoría de especie (Perry 1991).

Pinus lagunae es un árbol de 20 a 25 m con tronco monopodial, de 2 a 3 hojas por fascículo, las cuales persisten por dos a cuatro años; las acículas son laxas, de 4 a 8 cm de largo. El polen se dispersa en los meses de mayo a junio (Farjon y Styles 1997). Éste es el único pino que se encuentra en Baja California Sur, siendo una especie endémica de la Sierra de la Laguna, ocupando un área de 20,000 ha. El clima es subtropical, con precipitación anual de 750 mm, la mayoría durante las tormentas de verano (Farjon y

Styles 1997). Dicha Sierra es de roca granítica, flanqueada por rocas sedimentarias muy antiguas. Esta especie se encuentra en las mayores elevaciones de la zona norte, de 1600 a 2050 m de altura y generalmente se encuentra asociado con *Quercus devia*.

D) *Pinus discolor*

Originalmente fue descrito por Little (1968) como *P. cembroides* var. *bicolor*, pero Bailey y Hawksworth (1979) lo ascendieron a la categoría de especie debido a las diferencias en el tronco, el color distintivo de sus hojas, el tiempo de liberación del polen y la concentración de ciertos terpenos (Perry 1992).

Pinus discolor es un árbol o arbusto de 3 a 12 m con tronco monopodial muy corto y ramas surgiendo casi inmediatamente del suelo, de forma ascendente. Tres hojas rígidas por fascículo, raramente 2, 4 ó 5; persistentes por 4 a 7 años; de 2.5 a 6 cm de largo. Las acículas tienen dos colores: verde grisáceo en la superficie abaxial, y blanco en la adaxial; divididas por una línea verde. Conos de 2.5 a 4.5 cm cuando están abiertos (Farjon y Styles 1997). El polen es liberado en junio y julio (Malusa, 1992).

Se encuentra en Arizona, Nuevo México, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí, ocupando hábitats similares a *P. cembroides*, pero habita en zonas más áridas con rocas desnudas y se mezcla menos con otras especies de pino. Su rango altitudinal va de los 1700 a 3000 m. Con precipitación menor a los 500 mm anuales y con una estación seca de 7 a 8 meses de duración (Farjon y Styles 1997). Se le puede encontrar asociado con *Quercus*, *Juniperus*, *Agave*, *Yucca*, *Opuntia*, y ocasionalmente con *P. cembroides*.

E) *Pinus johannis*

Pinus johannis fue descrito originalmente por Robert (1978), a partir de ejemplares colectados en Concepción del Oro, en Zacatecas. Según Farjon y Styles (1997), *P. johannis* y lo que ellos llaman *P. cembroides* subesp. *cembroides* var. *bicolor* son sinónimos, y las diferencias fenotípicas no son más que variación intraespecífica dentro de un mismo taxa. Esto se encuentra corroborado por un estudio fenetista hecho con

características morfológicas por Romero et al. (2000) donde comparan la variación fenotípica entre *P. cembroides*, *P. discolor* y *P. johannis*, encontrando que estos dos últimos son un mismo taxa claramente diferenciado de *P. cembroides*.

Éste es un árbol pequeño o arbusto, de 2 a 4 m de altura, generalmente con múltiples troncos. Tres hojas por fascículo, ocasionalmente se pueden encontrar dos acículas por fascículo. Hojas flexibles y con márgenes enteros, estomas sólo en la superficie ventral. Conos oblongos, de 3-4 cm de largo por 2-3 cm de ancho. Originalmente, este pino sólo se había encontrado en una zona cerca de Concepción del Oro, en Zacatecas. Recientemente se han reportado pequeñas poblaciones en el oeste de Coahuila y en Miquihuana en el estado de Tamaulipas, así como en San Luis Potosí. El clima de la zona que habita esta especie es extremadamente árido, con precipitaciones de 300 mm anuales, con una temperatura media de 16° y heladas en diciembre y enero. Dicha zona carece prácticamente de suelo, encontrándose sólo rocas desnudas y su altura es de unos 2,700 m (Perry 1991). Sin embargo, existe cierta confusión entre las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis*, por lo que la descripción de su distribución geográfica puede variar dependiendo del autor.

1.3 Consideraciones metodológicas

1.3.1 Filogeografía y teoría de coalescencia

La filogeografía es el campo de estudio de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, especialmente aquellos que se encuentran dentro de la especie o entre especies cercanamente relacionadas (Avice 2000). En su forma más pura, la filogeografía se encarga de estudiar la distribución espacial de los alelos cuando se conocen, o pueden ser estimadas, sus relaciones genealógicas (Avice 2000). Esta disciplina busca interpretar la forma en la cual los procesos históricos sufridos por las poblaciones dejan marcas particulares en la distribución geográfica contemporánea de las características genéticas de los individuos

(Avice 2000). En este sentido, sirve de puente entre los enfoques propios del estudio microevolutivo y la macroevolución.

Según Hewitt (2001), la filogeografía consta de dos componentes principales: el espacial, el cual tiene que ver con la descripción de la forma en la cual se encuentran distribuidos los genes en el espacio, y el temporal o la acumulación de cambios en los linajes. En los últimos años se han generado una serie de metodologías que permiten el estudio de ambos componentes, entre las cuales algunas de las más poderosas son el análisis de clados anidados de árboles filogenéticos intraespecíficos (Templeton 1998), lo cual nos habla de la forma en la cual se encuentran asociados los haplotipos entre sí y si existe cierta asociación geográfica; y los análisis de distribución mismatch (Rogers and Harpending 1992), los cuales brindan información sobre algunos cambios demográficos ocurridos históricamente en las poblaciones.

Tradicionalmente, la genética de poblaciones ha partido de ciertos estadísticos como la diversidad genética, los índices de identidad, etc. para llevar a cabo inferencias sobre la historia de las poblaciones. Sin embargo, con esta aproximación se pierde mucha de la información contenida en los datos, debido principalmente a que no toma en cuenta, de manera explícita, las relaciones ancestrales o genealógicas entre los componentes de la muestra genética (Wilson y Balding 1998). Así pues, la interpretación de datos genéticos requiere una comprensión de los patrones de ancestría entre los genes de estudio.

Algunas de las aproximaciones más poderosas para el estudio filogeográfico son las basadas en la teoría de la coalescencia, siendo en el marco de dicha teoría donde se han generado las herramientas matemáticas y estadísticas para el estudio de las genealogías de genes dentro de una especie o entre especies cercanas (Harding et al. 1997). La teoría de coalescencia es básicamente un modelo de pérdida de linajes ("lineage sorting") y deriva genética corriendo hacia atrás en el tiempo hasta encontrar el ancestro común de estos linajes (Avice 2000). La forma en que coalescen los distintos segmentos de DNA nos brinda información de los procesos genealógicos que dan como resultado los estados actuales de los distintos genes dentro de las poblaciones, y pueden ser utilizados

para inferir flujo genético, aislamiento reproductivo, hibridación y divergencia entre linajes (Matos 1998, Matos y Schaal 2000). En su forma más simple, la coalescencia supone neutralidad, apareamiento al azar, tamaño efectivo constante a través del tiempo y un modelo de mutación con un número infinito de sitios donde se desprecia la tasa de ocurrencia de mutaciones reversibles o back-mutations (Wilson y Balding 1998, Avise 2000).

La gran mayoría de los estudios realizados en el campo de la filogeografía se han llevado a cabo en animales utilizando DNA mitocondrial, siendo muy poco aún lo que se ha hecho en plantas (una revisión en Schaal et al. 1998 y Schaal y Olsen, 2000). La utilización de DNA haploide presenta claras ventajas respecto a utilizar un marcador diploide; ya que la falta de recombinación permite identificar haplotipos, o linajes, que conservan la historia de las mutaciones ocurridas, y donde se puede eliminar la transmisión horizontal. Sin embargo, en el caso de las plantas el DNA mitocondrial presenta una lenta tasa de sustitución y frecuentes rearrreglos en su estructura, lo que lo hace menos apropiado para llevar a cabo estudios filogeográficos (Schaal et al. 1998), por lo que en tiempos recientes se ha recurrido al DNA de cloroplasto para este propósito. Los microsatélites de cloroplasto han sido utilizado con éxito en el estudio filogeográfico de varias especies de pinos como el *P. albicaulis* (Richardson et al. 2002) y *P. contorta* (Marshall et al. 2002).

1.3.2 Marcadores moleculares: microsatélites de cloroplasto (cpSSRs).

Los microsatélites (SSRs) son secuencias altamente repetidas que fueron descubiertas en los genomas eucariontes alrededor de 1980; están constituidos por unidades de repetición o motivos en tándem formados por de 1 a 5 pb, los cuales se repiten de cinco a cien veces en el mismo sitio (Jarne y Lagoda 1996). Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el genoma eucarionte, así como en la mitocondria y el cloroplasto (Powell 1995). En general presentan altos niveles de polimorfismo en poblaciones naturales (Jarne y Lagoda, 1996), el cual esta dado por diferentes números de repetición

del motivo en la región del microsatélite. Esto es fácilmente detectable por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Principalmente dos modelos de mutación han sido utilizados en los microsatélites: el modelo de alelos infinitos (IAM; Kimura y Crow 1964), el cual supone que cada mutación crea un nuevo alelo; y el modelo de mutación por *stepwise* (SMM; Kimura y Ohta 1978), donde las nuevas mutaciones retienen la memoria de los estados alélicos ancestrales (Goldsstein *et al.* 1995; Slatkin 1995); bajo este modelo las diferencias en tamaño entre los alelos es una relación lineal del tiempo en el cual divergieron. Recientemente, se han generado nuevos modelos para explicar la dinámica mutacional de este tipo de secuencias, entre ellos el modelo de dos fases (TPM, Di Rienzo *et al.* 1994; Estoup y Cornuet 1999), el cual es una variación del modelo de *stepwise* estricto, donde se permite que una proporción de las mutaciones involucre la ganancia o pérdida de más de una unidad de repetición. La controversia sobre el modelo de mutación adecuado es de suma importancia, ya que la estimación de muchos de los parámetros poblacionales, como estructura, número de migrantes y tamaño efectivo de las poblaciones, dependen del modelo de mutación que se suponga. Debido a sus altas tasas de mutación, en microsatélites esta dependencia es particularmente importante (Estoup y Angers 1998, Van Oppen 2000).

La caracterización de la secuencia completa del cloroplasto de *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et al.* 1994) ha permitido la identificación de este tipo de secuencias dentro de dicho organelo (cpSSRs), así como de sus regiones flanqueantes, con lo cual se han generado primers específicos para la amplificación de microsatélites particulares de pinos y otras coníferas (Vendramin, *et al.*, 1996). La herencia de los microsatélites de cloroplasto se ha estudiado en varias especies de coníferas, entre ellas *Picea abies* Karst. (Sperisen *et al.*, 1998), *Abies alba* (Vendramin y Ziegenhagen, 1997), *Pinus radiata* (Cato y Richardson, 1996), y en cruza de *P. halepensis* y *P. brutia* (Anzidei, *et al.* 1999), encontrándose en todos los casos herencia por vía paterna.

2. Antecedentes

En tiempos recientes han surgido una gran cantidad de trabajos donde se analizan las características genéticas de las poblaciones de varias especies de pinos. Algunos de los ejemplos clásicos han utilizado isoenzimas, donde en general se ha encontrado una gran cantidad de variación dentro de las poblaciones y sólo una pequeña parte entre las poblaciones (Conkle 1992, Hamrick *et al.* 1992, Ge *et al.* 1998). Esto es consistente con las características propias del género: polinización por viento, dispersión de semillas a grandes distancias, altas tasas de entrecruzamiento, largo tiempo generacional, etc. (Hamrick *et al.* 1992, Ledig 1998).

En los últimos años, con la implementación de nuevas técnicas moleculares se generaron una gran cantidad de nuevos estudios, desde aquellos enfocados a la mera descripción de las formas en las cuales se encuentra distribuida la variación genética (Petit *et al.* 1993, Caron *et al.* 2000, Mariette *et al.* 2001), hasta aquellos en los cuales se analizan los factores y procesos históricos responsables de los patrones de variación observados. Un ejemplo de éste lo constituyen una gran cantidad de trabajos enfocados a dilucidar la historia de algunas especies europeas, como las rutas migratorias y los posibles refugios existentes en la última glaciación, así como la dinámica de colonización seguida por estas especies y la delimitación de zonas genéticas y de conservación a nivel continental (Dumolin-Lapegue *et al.* 1997, Bucci y Vendramin 2000, Soranzo *et al.* 2000, Gugerli *et al.* 2001). Esto mismo se ha empezado a llevar a cabo en América del Norte y un ejemplo lo constituyen los trabajos de Marshall *et al.* (2002) y Richardson *et al.* (2002), ambos enfocados al estudio de la colonización postglaciar llevada a cabo por *P. contorta* y *P. albicaulis* respectivamente, y la forma en la cual los cambios climáticos ocurridos en el Pleistoceno afectaron la variación presente en estas especies.

Recientemente en México se ha generado una gran cantidad de información sobre la genética de poblaciones de algunas especies de pinos raras o amenazadas, como *P. rzedowskii* (Delgado *et al.* 1999), *P. nelsonii* (Cuenca *et al.* (En prensa), Rentería 2001),

P. pinceana (Molina-Freaner *et al.* 2000, Escalante 2001) y *P. maximartinezii* (Moreno 2002). Sin embargo, existen pocos casos donde se utilice una perspectiva filogeográfica para el estudio de la historia de las poblaciones; entre ellos se encuentran los trabajos realizados con *P. nelsonii* por Cuenca *et al.* (En prensa) y con *P. pinceana* por Escalante (2001). Adicionalmente, existen un par de trabajos donde se han utilizado este tipo de herramientas para el estudio de la hibridación e introgresión de algunos grupos de pinos mexicanos, tal es el caso de Matos y Schaal (2000) con el complejo de *P. montezumae*, y Delgado (2002) con *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.

Por otro lado, en el caso particular del complejo *cebroides* existen algunos trabajos demográficos como el llevado a cabo en *P. cebroides* subesp. *lagunae* por Díaz *et al.* (1999) y en *P. nelsonii* y *P. cebroides* por Suzán-Aspiri *et al.* (2002). A la par de los estudios filogenéticos llevados a cabo con estos taxa (Malusa 1992, Gernandt *et al.* 2001, Gernandt *et al.* En prensa), se han generado una serie de estudios enfocados a la delimitación de los grupos de *P. cebroides* y *P. johannis*, ya sea desde sus diferencias ecológicas (Romero *et al.* 1996), como utilizando un enfoque feneticista sobre algunas de sus características morfológicas (Romero *et al.* 2000). Por otro lado, existen un par de trabajos donde se utiliza un enfoque basado en la composición química de algunos compuestos secundarios para la identificación de los grupos de *P. cebroides* subesp. *cebroides*, *P. cebroides* subesp. *orizabensis*, *P. cebroides* subesp. *lagunae* y *P. johannis* (Zavarin y Snajberk 1985 y 1986). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se analiza de manera directa la variación y estructura genética de estos taxa, ni se busca un mayor conocimiento de la historia evolutiva de las poblaciones al interior de estos grupos.

3. OBJETIVOS

A) Estudiar la forma en la cual se encuentra distribuida la variación genética tanto al interior de cada uno de los taxa de estudio, como entre los distintos grupos, así como determinar algunos procesos históricos sufridos por las distintas poblaciones de estas especies.

B) Utilizar un enfoque filogeográfico para el estudio de la diversificación de los distintos grupos, así como poner a prueba las hipótesis taxonómicas existentes sobre las relaciones entre los taxa.

Objetivos particulares

- Estimar la variación y estructura genética dentro y entre las poblaciones de los distintos taxa.

- Llevar a cabo un análisis de clados anidados y asociación geográfica, con el fin de encontrar algunos procesos históricos determinantes de la forma en la cual se encuentran distribuidos los distintos linajes.

- Estimar la distribución de las diferencias entre haplotipos, con la finalidad de estudiar la demografía histórica de cada uno de los taxa. En particular, se analizará si algún taxa se ajusta a un modelo de expansión súbita y se llevarán a cabo simulaciones para estimar algunos de los parámetros poblacionales a largo plazo, en particular el tamaño efectivo y la tasa de mutación de los marcadores utilizados.

- Analizar cuál modelo de mutación se ajusta mejor a los datos obtenidos con estos loci de microsatélites de cloroplasto en estos taxa en particular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colecta de material biológico

Se colectaron acículas de 20 individuos elegidos al azar en 19 poblaciones (Tabla 2) de los estados de Nuevo León, Coahuila, Zacatecas, San Luis Potosí, Durango, Chihuahua, Sonora, Querétaro, Veracruz y Puebla, y 25 individuos de la única población existente de *P. cembroides* subesp. *lagunae* en Baja California Sur (Figura 2). Se trató de trabajar con poblaciones que cubrieran toda el área de distribución de los taxa en México, sin embargo, no fue posible colectar poblaciones en el Estado de Sonora, donde se encuentra tanto *P. cembroides* como *P. discolor*. Los ejemplares de *P. cembroides* subesp. *lagunae* fueron colectados por el Dr. Francisco Molina, y los ejemplares de *P. johannis* en la población de la Amapola por el Dr. Daniel Piñero y los biólogos Alejandra Moreno y Rodolfo Salas.

Tabla 2. 19 poblaciones colectadas de los taxa de estudio: *Pinus cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *orizabensis*, *P. cembroides* subesp. *lagunae*, *P. discolor* y *P. johannis*.

Taxon	Estado	Población	Coordenadas
<i>P. cembroides</i> subesp. <i>cembroides</i>	Chihuahua	Babícora	29° 17.243 N 107° 90.602 W 2301 m
		Panalachic	27° 68.708 N 107° 38.679 W 2302 m
		San Buenaventura	29° 75.700 N 107° 64.149 W 1368 m
		Yugarí	26° 95.073 N 106° 50.962 W 2195 m
	Coahuila	Saltillo	25° 10.394 N 100° 43.806 W 1988 m
	Durango	El Chicharo	25° 05.560 N 105° 33.768 W 2161 m
		Tepehuanes	25° 31.776 N 105° 75.92 W 2059 m
Nuevo León	Galeana	24° 51.906 N 100° 05.773 W 1713 m	

	Querétaro	El Madroño	21° 06.424 N 99° 40.983 W 2477 m
	Zacatecas	Mazapil	24° 39.920 N 101° 27.821 W 2823 m
<i>P. cembroides</i> subesp. <i>orizabensis</i>	Puebla	El Seco (Candelaria)	19° 05.049 N 97° 69.079 W 2348 m
		Ajalpan	18° 45.098 N 97° 23.335 W 2387 m
	Veracruz	Frijol Colorado	19° 61.672 N 97° 38.333 W 2790 m
<i>P. cembroides</i> subesp. <i>lagunae</i>	Baja California Sur	Sierra de la Laguna*	23° 33.21 N 109° 58.80 W
<i>P. discolor</i>	Chihuahua	Colonia Juárez	30° 16.878 N 108° 13.425 W 1975 m
	San Luis Potosí	Sierra de San Miguelito	22° 01.668 N 100° 56.387 W 2145 m
<i>P. johannis</i>	San Luis Potosí	La Amapola*	22° 04 N 101° 08 W
		Las Lajas	23° 18.045 N 101° 09.797 W 2368 m
	Zacatecas	Mazapil	24° 36.920 N 101° 27.281 W 2823 m

* en estas poblaciones no se cuenta con la altitud.

4.2 Obtención de datos genéticos

Se extrajo el DNA total utilizando un protocolo basado en CTAB 2% con la modificación de Vázquez-Lobo (1994). El DNA se cuantificó y diluyó hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 10 ng/μl.

Los datos genéticos se obtuvieron tanto en el laboratorio de Genética y Evolución del Instituto de Ecología, como en el laboratorio del Dr. Giovanni G. Vendramin, en el Instituto de Genética Vegetal del Consejo Nacional de la Investigación (CNR), en Florencia, Italia.

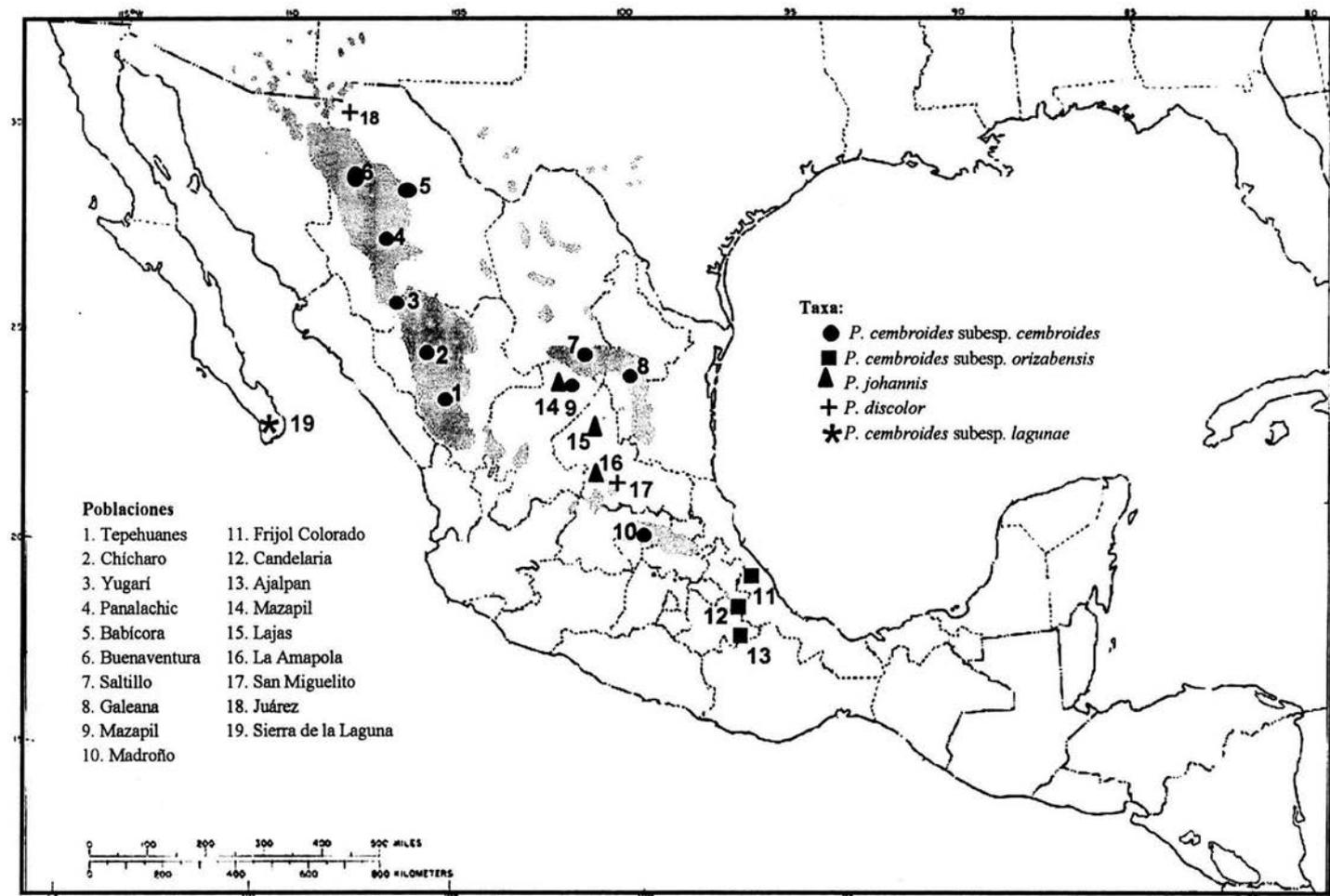


Figura 2. Mapa de distribución de *Pinus cembroides* segun Little y Critchfiel (1967). En este mapa se indican las poblaciones colectadas, así como los taxa a los cuales pertenecen las distintas poblaciones. En total se colectaron 19 poblaciones, de las cuales 10 son de *P. cembroides* subesp. *cembroides*, 3 de *P. cembroides* subesp. *orizabensis*, 3 de *P. johannis*, 2 de *P. discolor* y una de *P. cembroides* subesp. *lagunae*.

Se probaron 12 loci de microsatélites de cloroplasto utilizando los primers diseñados por Vendramin et al. (1996) con base en la secuencia de *P. thunbergii* (Tabla 3). Las amplificaciones se hicieron siguiendo el método de Vendramin et al. (1996, Apéndice I). Se utilizó un primer marcado con Cys-5 para posteriormente poder detectar productos de PCR en un secuenciador automático (ALF, Amersham Pharmacia).

Tabla 3. Secuencia de los primers utilizados para la amplificación de microsatélites de cloroplasto, generados por Vendramin et al. (1996) con base en la secuencia del cloroplasto de *P. thunbergii*. Los números de identificación corresponden con la posición en el genoma de *P. thunbergii*.

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
Pt1254	CAATTGGAATGAGAACAGATAGG TGCGTTGCACTTCGTTATAG	Pt11004 8	TAAGGGGACTAGAGCAGGCTA TTGCTATTGAACCTTGGACA
Pt9383	AGAATAAACTGACGTAGATGCCA AATTTTCAATTAAGGTCATTA	Pt6718	CACAAAAGGATTTTTTTTCAGTG CGACGTGAGTAAGAATGGTTG
Pt30204	TCATAGCGGAAGATCCTCTTT CGGATTGATCCTAACCATACC	Pt41093	TCCCAAAATACTAAAAAGCA CTCATTGTTGAACTCATCGAGA
Pt71936	TTCATTGGAAATACACTAGCCC AAAACCGTACATGAGATTCCC	Pt66480	TTTTGGCTTACAAAATAAAAGAGG AAATTCCTAAAGAAGGAAGAGCA
Pt87268	GCCAGGGAAAATCGTAGG AGACGATTAGACATCCAACCC	Pt26081	CCCGTATCCAGATATACTTCCA TGGTTTGATTTCATTTCGTTTCAT
Pt15169	CTTGGATGGAATACGAGCC GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA	Pt51873	AATCTTTCTACGGAACGGAAA ATCATTTTTGTGCTATGCAATGA
Pt79951	CTTTTGTTTTTCAACAATTGCA ACATCTATCTCCCATATCGGC		

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.2 % y posteriormente en geles de acrilamida 6% en un secuenciador automático ALF (Automater Laser Fluorescence, Pharmacia), dejándolos correr por 80 minutos. Los resultados se analizaron con el programa FRAGMENT MANAGER ver. 1.1 (Pharmacia) el cual asigna un cierto tamaño a cada banda. Para estimar los tamaños de los microsatélites se utilizaron tres líneas con marcadores externos de 50, 100, 150 y 200 pb (Pharmacia) y en cada carril junto con el producto de PCR se corrieron dos marcadores internos, cuyo tamaño es cercano al del microsatélite.

4.3 Análisis de variación genética

Los estimadores de variación genética se calcularon con el programa Arlequin vers. 2.00

(Schneider et al. 2000). Se estimó la frecuencia relativa de cada alelo y de cada haplotipo, tanto dentro de las poblaciones como en el total de la muestra. La diversidad genética fue estimada como la heterocigosis esperada para datos diploides (H_e ; Nei 1987), lo cual se estimó tanto para el conjunto de las poblaciones (H_T) como para cada población por separado.

Se utilizó el índice theta [$\theta = 2M\mu$ donde, en el caso de utilizar un marcador haploide, M es igual al tamaño poblacional (N) y μ es la tasa de mutación (Schneider et al. 2000)] como un estimador indirecto del tamaño efectivo de las poblaciones. Theta se estimó con base en la diversidad genética, suponiendo tanto un modelo de mutación por alelos infinitos como un modelo de mutación por *stepwise* (Schneider et al. 2000).

4.4. Análisis de estructura genética

4.4.1 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Para analizar en que forma se encuentra distribuida la variación genética entre las diferentes poblaciones o grupos de estas, se utilizó una análisis jerárquico (análisis de varianza molecular, AMOVA, Weir y Cockerham 1984, Excoffier et al. 1992), el cual se basa en el número de diferencias encontradas entre haplotipos.

Este análisis permite poner a prueba diferentes hipótesis de estructura genética, ya que compara las diferencias entre grupos previamente establecidos. La forma en la cual trabaja este tipo de análisis jerárquicos es dividiendo la varianza total en diferentes componentes: 1) el componente intrapoblacional, 2) el componente interpoblacional y 3) el componente intergrupacional. Los índices de fijación son calculados en tres niveles: Φ_{sc} , entre poblaciones dentro de un grupo; Φ_{st} , entre todas las poblaciones; y Φ_{ct} , entre grupos de poblaciones (Weir and Cockerham 1984, Excoffier et al. 1992).

La forma de estimar la variación entre los distintos grupos se encuentra directamente relacionada con los estimadores de distancia genética entre haplotipos. Estos

estimadores pueden basarse en el número de alelos diferentes entre pares de haplotipos, en cuyo caso nos referimos a un modelo de mutación de alelos infinitos; o bien, basarse en las diferencias en tamaño entre pares de haplotipos (Slatkin 1995), en cuyo caso se refiere a un modelo de mutación por *stepwise* (o mutación paso a paso). En el caso particular de utilizar al modelo de mutación por alelos infinitos es común referirse a la Φ_{st} como F_{st} , mientras que en el caso de utilizar *stepwise*, se le llama R_{st} .

Se pusieron a prueba distintas hipótesis de asociación entre poblaciones (Figura 3): 1) se formaron cinco grupos distintos, cada uno correspondiente a un distinto taxa (*P. cembroides*, *P. cembroides* var. *orizabensis*, *P. johannis*, *P. discolor* y *P. lagunae*) 2) se comparó el grupo formado por *P. cembroides* var. *orizabensis* y *P. lagunae*, con el formado por *P. johannis* y *P. discolor*. Posteriormente se analizó la variación entre las poblaciones al interior de estos dos grupos.

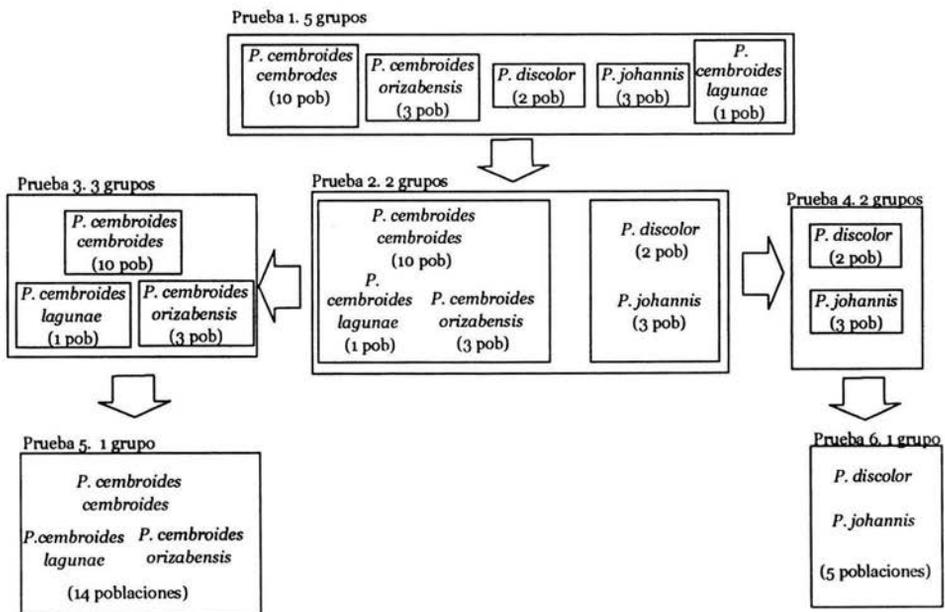


Figura 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para 19 poblaciones pertenecientes a cinco taxa: *P. Cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *orizabensis*, *P. cembroides* subesp. *lagunae*, *P. discolor* y *P. johannis*. En cada uno de los diferentes análisis se pone a prueba una hipótesis de estructura genética entre las poblaciones de los distintos taxa, observando como se distribuye la variación entre los grupos establecidos.

Todos los análisis de varianza molecular y estimación de los índices de fijación, se llevaron a cabo en ARLEQUIN ver. 2.0 (Schneider et al. 2000), utilizando ambos estimadores de distancia entre haplotipos (alelos infinitos y *stepwise*). La significancia de los distintos índices de fijación fue calculada con un enfoque no paramétrico (bootstrap) con 1030 permutaciones.

4.4.2. Comparaciones entre pares de poblaciones

Las comparaciones entre pares de poblaciones se llevaron a cabo utilizando la distancia genética basada en la varianza de la frecuencia de los distintos haplotipos bajo un modelo de alelos infinitos (IAM). La segunda aproximación fue utilizando un modelo de *stepwise* (SMM), que compara las diferencias en los tamaños de los alelos que constituyen los distintos haplotipos (Slatkin 1995). La significancia de la distancia genética entre pares de poblaciones fue calculada por bootstrap con 1023 permutaciones.

A partir de los índices de fijación se estimó el flujo genético entre pares de poblaciones, basándose en las ecuaciones de Slatkin (1995, Apéndice II). Los valores de flujo genético se encuentran expresados como el tamaño efectivo por el número de migrantes por generación ($M = Nm$ para datos haploides). Estos análisis fueron llevados a cabo con ARLEQUIN ver. 2.0 (Schneider et al. 2000).

Con la finalidad de poner a prueba un modelo de aislamiento por distancia, se llevó a cabo una prueba de Mantel entre la matriz de distancias genéticas, estimadas como los índices de fijación entre pares de poblaciones (F_{st} o R_{st}) y la matriz de distancias geográficas entre las poblaciones, para lo cual se utilizó el programa Mantel: nonparametric test calculator ver. 2.0.

2.4.3. Relaciones entre las poblaciones

Utilizando el programa NJBAFD (Naoko Tekezaki, Instituto Nacional de Genética, Jap.)

se construyeron dos árboles de neighbor-joining entre las poblaciones; el soporte de las ramas se estimó haciendo 1000 replicaciones de bootstrap. El primero de estos árboles se construyó utilizando la distancia genética de Nei (d , Nei 1972), la cual funciona bien cuando se utiliza un modelo de mutación por alelos infinitos y entre poblaciones con tiempos cortos de divergencia, esto último debido a que cuando se incrementa el tiempo de divergencia y/o la tasa de mutación es muy alta, esta medida de distancia se comporta de manera no lineal con respecto al tiempo (Li 1997). La segunda aproximación fue utilizando la distancia de Shiver (D_{sw} , Shiver et al. 1995), la cual es específica para loci altamente polimórficos, con tasas de mutación elevadas y que evolucionan según un modelo de mutación por stepwise.

4.5 Red de haplotipos, análisis de clados anidados y asociación geográfica entre haplotipos

La red de haplotipos fue inferida utilizando el método de la parsimonia estadística (Templeton *et al.* 1995, Templeton 1998, Carbone y Kohn 2001), el cual interconecta todos los haplotipos por una serie de eventos mutacionales, derivados de una matriz del número de diferencias en tamaño entre los distintos haplotipos. El resultado es una red de conexiones igualmente parsimoniosas, donde los haplotipos se encuentran ubicados ya sea como nodos o como puntas de una rama. Este análisis se llevó a cabo con el programa TCS: estimating gene genealogies (Clements *et al.* 2000). Con este mismo programa se colapsaron los distintos haplotipos en los distintos clados anidados, siguiendo las reglas de anidamiento de Templeton (1995, 1998).

Para probar la existencia de asociaciones geográficas entre grupos de haplotipos se utilizó programa GeoDis 2.0 (Posada *et al.* 2000) y los resultados obtenidos se interpretaron con la clave de inferencia biológica de Templeton (1995). En términos generales, la forma en la cual este análisis funciona es cuantificando los datos geográficos en dos tipos de distancias: 1) D_c (clade distance), la cual mide la distribución geográfica de un clado específico; esto se hace estimando la distancia promedio de dispersión de cada haplotipo x con respecto al centro geográfico de todos

los haplotipos x . 2) D_n (nested clade distance), la cual mide como se distribuye geográficamente un clado con respecto a sus clados hermanos; este estadístico estima la distancia en que un haplotipo perteneciente a un grupo de anidamiento (p.ej 1-1) se encuentra con respecto al centro geográfico de todos los haplotipos pertenecientes a los grupos del mismo nivel (p.ej 1-1, 1-2, 1-3...1-n). Adicionalmente se hace una prueba para detectar si existen diferencias significativas en la distribución geográfica de las puntas y los nodos de la red, presumiendo que los haplotipos internos, por ser más antiguos, se encontrarán más ampliamente distribuidos que los externos.

4.6. Análisis de parámetros históricos

4.6.1 Distribución mismatch

La distribución *mismatch*, o distribución de las diferencias entre pares de haplotipos, se estimó utilizando el programa Arlequin ver. 2.0 (Schneider et al. 2000). Este tipo de distribución se utiliza para medir la distancia genealógica entre individuos, partiendo del supuesto que la distancia genealógica es directamente proporcional a las diferencias entre los haplotipos.

La forma de esta distribución brinda información sobre algunos parámetros demográficos ocurridos históricamente en las poblaciones. El programa lleva a cabo simulaciones estimando la distribución de los datos según un modelo de expansión súbita de la población (dicho modelo se encuentra descrito en Rogers, 1995) realizando una prueba estadística para estimar si los datos se ajustan a dicho modelo.

Independientemente de si los datos se ajustan o no a un modelo de expansión súbita, la forma de la distribución de las diferencias entre pares de haplotipos está dada por tres parámetros: el tamaño ancestral de la población (N_0), el tamaño actual de la población (N_t) y el tiempo ocurrido entre ambos momentos. Sin embargo, estos tres indicadores dependen directamente de la tasa de mutación, por lo que los parámetros calculados

directamente a partir de las simulaciones son: $\theta_0 = 2N_0\mu$, $\theta_1 = 2N_1\mu$ y $\tau = 2t\mu$, donde μ es la tasa de mutación.

En este caso particular, los datos se dividieron en *P. cembroides* y el grupo *discolor/johannis*. En ambos casos se estimó la distribución mismatch utilizando un modelo de mutación por alelos infinitos, debido a que este modelo funciona mejor que un modelo de stepwise en grupos de reciente divergencia. Las simulaciones se llevaron a cabo con 1000 réplicas y la significancia se estimó con una prueba de chi cuadrada.

4.6.2. Simulaciones de parámetros poblacionales históricos

Se utilizó el programa MICSAT (Wilson y Balding 1998) para llevar a cabo simulaciones de algunos parámetros históricos. Este programa parte de un modelo clásico de coalescencia, el cual asume a) equilibrio entre mutación y deriva génica o neutralidad en los marcadores, b) apareamiento al azar, c) tamaño efectivo constante a través del tiempo y d) una tasa de mutación constante e igual entre todos los loci. El programa MICSAT (Wilson y Balding 1998) fue diseñado específicamente para datos obtenidos con microsatélites, por lo que se asume también que la mutación ocurre siguiendo un modelo de stepwise, en el cual se toma en cuenta la homoplasia producida por regresiones en el tamaño de los alelos (o back-mutations).

Para llevar a cabo las distintas simulaciones se parte de un cierto tamaño efectivo y una cierta tasa de mutación, los cuales tienen que ser especificados *a priori*. Las simulaciones se realizaron tanto para el total de la muestra como para *P. cembroides* y *discolor/johannis* por separado. Para cada uno de los tres casos se llevaron a cabo tres distintas simulaciones, partiendo de distintas condiciones iniciales: en el primer caso se utilizaron las condiciones default del programa ($N = 3000$, $\mu = 1.4 \times 10^{-3}$), mientras que en el segundo y tercer caso se utilizó la tasa de mutación de microsatélites de cloroplasto estimada para *Pinus torreyana* ($\mu = 3.2 \times 10^{-5}$, Provan *et al.* 1999) y tamaños efectivos de 10000 y de 1000 individuos respectivamente.

Para cada simulación se llevaron a cabo 10,000 réplicas; donde en cada réplica se genera una genealogía con la cual se estima una cierta tasa de mutación, un valor de tamaño efectivo, y dos parámetros descriptivos de la topología de dicho árbol: la distancia existente entre los nodos (*height*) y el largo de la ramas (*length*). La θ se obtiene con base en la tasa de mutación y el tamaño efectivo ($\theta = 2N\mu$), mientras que el tiempo ocurrido hasta el ancestro común más cercano se obtiene con la distribución de los tiempos de coalescencia, la cual está dada en unidades del tamaño efectivo (tiempo = tN , Wilson y Balding 1998). Con los datos obtenidos para cada una de las 10000 réplicas se generó una distribución de probabilidades de μ , N , θ y el número de generaciones ocurridas hasta el ancestro común más reciente (TACMR).

4.7 Dinámica evolutiva de los microsatelites de cloroplasto en pinos

Con la finalidad de estimar qué tipo de modelo de mutación se adapta mejor a la dinámica seguida por los marcadores utilizados, se empleó el programa BOTTLENECK (Cornuet y Liukart 1996). El cual, a partir de las frecuencias alélicas estima la heterocigosis esperada bajo cada modelo de mutación (H_{exp}), y la compara con la heterocigosis observada (H_{obs}), la cual es estimada como la diversidad genética en el sentido de Nei (1987).

Este programa calcula la distribución de la heterocigosis esperada a partir del número de alelos observados (k) dado un cierto tamaño de muestra (n) y suponiendo que las poblaciones se encuentran en equilibrio entre mutación y deriva genética. El análisis se lleva a cabo de manera independiente para cada loci, así como para cada población. Esta distribución es obtenida a partir de simular el proceso de coalescencia de un cierto número de genes bajo dos posibles modelos de mutación: el modelo de mutación por alelos infinitos (IAM) y el modelo de mutación por *stepwise* (SMM). En este último caso, es posible utilizar el modelo estricto de *stepwise* o el modelo de dos fases (TPM), el cual permite una cierta proporción de mutaciones que no se ajustan a el modelo de *stepwise*.

El análisis se llevó a cabo con los tres loci para el total de los datos, así como dividiendo los datos en *P. cembroides* (subesp. *cembroides*, subesp. *orizabensis* y subesp. *lagunae*) y en el grupo de *P. discolor* y *P. johannis*. En el caso del modelo de mutación en dos fases (TPM) se permitió que un 10 % de las mutaciones involucren la pérdida o ganancia de más de una unidad de repetición.

Por otro lado, debido a que los marcadores de cloroplasto no se segregan independientemente, este se puede considerar como un sólo locus siendo cada haplotipo un estado (a alelo) de dicho locus. En este caso, es posible realizar el análisis considerando no cada loci por separado, sino la frecuencia de cada combinación observada. Esto se llevó a cabo tanto para el total de la muestra (31 haplotipos) como para el grupo de *P. cembroides* y *discolor/johannis* por separado.

5. RESULTADOS

5.1 Variación genética

Se encontraron tres loci de microsatélites de cloroplasto polimórficos para los taxa de estudio (Pt30204, Pt79958 y Pt1100). Los otros nueve loci se tuvieron que descartar ya sea o porque resultaron monomórficos (por ejemplo, Pt70204, Pt1525, Pt3655) porque no se logró una correcta amplificación, lo cual puede traducirse o bien en una gran cantidad de bandas inespecíficas, las cuales impiden la identificación de la banda correspondiente al microsatélite (por ejemplo con los loci Pt 80204, Pt 6348), o bien en la total carencia de amplificación (como con el locus Pt 1254).

El locus con mayor número de alelos fue el Pt 110048, con ocho variantes, mientras que en los loci Pt79951 y Pt 30204 se encontraron cinco y cuatro alelos, respectivamente. Las frecuencias en las cuales se encuentran los alelos difieren entre taxa. Para los tres loci, las poblaciones pertenecientes a las tres subespecies de *P. cembroides* poseen el mismo alelo más común, mientras que en el caso de las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis* es posible encontrar una mayor heterogeneidad genética (Tabla 4).

En los 385 individuos analizados se encontraron 31 haplotipos distintos, de los cuales 10 son exclusivos, restringiéndose su distribución a una sola población (Tabla 5). El haplotipo más común es el de 157-144-97 pb, presente en 45.7 % de los individuos, el cual se encuentra en todas las poblaciones excepto en ambas poblaciones de *P. johannis* y en dos poblaciones de *P. discolor*. A éste le sigue el haplotipo 158-146-94, el cual se encuentra en 11 % de los individuos, a pesar de encontrarse ausente en todas las poblaciones de *P. cembroides*. Este último haplotipo es el que se encuentra en mayor frecuencia si sólo se consideran las poblaciones de *P. johannis* y *P. discolor*. Por otro lado, existen 19 haplotipos con una representación menor al 1 % en el total de la población (Tabla 5).

Tabla 4. Frecuencia de los distintos alelos encontrados en tres loci de microsatélites de cloroplasto en *P. cembroides* subesp. *cembroides*, subesp. *orizabensis* y subesp. *lagunae*, *P. discolor* y *P. johannis*.

	Pt 30204				Pt79951					Pt 110048							
	156	157	158	159	143	144	145	146	147	92	93	94	95	96	97	98	99
Bc	0.05	0.9	0.05			0.7	0.3							0.1	0.85	0.05	
CH	0.15	0.8	0.1			0.9	0.1						0.05	0.1	0.75	0.1	
Gc	0.15	0.75	0.05	0.05			1						0.05	0.2	0.65	0.1	
Mc	0.15	0.75	0.1			0.95			0.05			0.05		0.2	0.7	0.05	
Nc	0.05	0.8	0.15			0.95	0.05							0.2	0.8		
Pc		0.8	0.2			1									0.9	0.1	
Sc	0.05	0.65	0.3		0.1	0.85	0.05							0.1	0.7	0.15	0.05
SB		1				1								0.1	0.85	0.05	
Tc	0.1	0.7	0.15	0.05	0.05	0.95								0.1	0.9		
Yc	0.15	0.75	0.1			0.9	0.1						0.05	0.1	0.75	0.1	
Ao	0.05	0.6	0.35			1								0.05	0.95		
Co		0.95	0.05			0.95	0.05							0.05	0.85	0.1	
Fo	0.05	0.9	0.05			0.95	0.05							0.35	0.65		
Pl	0.2	0.68	0.08	0.04		1									1		
Aj		0.1	0.9					1				0.65	0.3	0.05			
Lj			0.95	0.05				1		0.05	0.4	0.55					
Mj		0.05	0.95					0.95	0.05	0.05	0.5	0.35	0.05	0.05			
Jd		0.1	0.55	0.35		0.05		0.95				0.55	0.3	0.05	0.1		
SM	0.05	0.25	0.55	0.15		0.15		0.85			0.1	0.1		0.75	0.05		
Tot	0.06	0.61	0.29	0.04	0.01	0.7	0.04	0.25	0.01	0.01	0.05	0.11	0.04	0.13	0.61	0.04	0.01

Las poblaciones son: 1) pertenecientes a *P. cembroides* subesp. *cembroides*: Babícora (Bc), El Chicharo (CH), Galeana (Gc), Mazapil (Mc), Madroño (Nc), Panalachic (Pc), Saltillo (Sc), San Buenaventura (SB), Tepehuanes (Tc) y Yugarí (Yc); 2) pertenecientes a *P. cembroides* subesp. *orizabensis*: Ajalpan (Ao), Candelaria (Co) y Frijol Colorado (Fo); 3) pertenecientes a *P. cembroides* subesp. *lagunae* (Pl), 4) pertenecientes a *P. discolor*: Juárez (Jd) y San Miguelito (SM); 5) pertenecientes a *P. johannis*: Amapola (Aj), Lajas (Lj) y Mazapil (Mj).

Las poblaciones con mayor número de haplotipos son Saltillo (subesp. *cembroides*) y San Miguelito (*P. discolor*), con 10 haplotipos en cada una (Tabla 4 y 5). Por otro lado, San Buenaventura (subesp. *cembroides*), Panalachic (subesp. *cembroides*) y Ajalpan (subesp. *orizabensis*) sólo poseen tres haplotipos cada una. El promedio de haplotipos por población es de 5.74.

La mayor variación genética (*He*) se encontró en Juárez (*P. discolor*, 0.81 +/- 0.05), mientras que San Buenaventura (subesp. *cembroides*) es la población con menor variación (0.28 +/- 0.12, Tabla 6). El mismo patrón se observa cuando se utiliza θ , debido a que esta tiene una relación directa con variación genética presente en las distintas poblaciones. La variación haplotípica promedio es de 0.61. Por otro lado, el

Tabla 5. Frecuencia de los 31 haplotipos encontrados en una muestra de 385 individuos en *P. cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *orizabensis*, *P. cembroides* subesp. *lagunae*, *P. discor*, *P. johannis*. Los haplotipos están caracterizados por el tamaño de los loci Pt30204-Pt79953-Pt110048. Las abreviaturas son: para *P. cembroides*: Babícora (Bc), el Chicharo (CHc), Galeana (Gc), Mazapil (Mc), Saltillo (Sc), San Buenaventura (Sbc), Tepehuanes (Tc) y Yugari (Yc); para *P. cembroides orizabensis*: Ajalpan (Ao), Candelaria (Co) y Frijol Colorado (Fo); para *P. johannis*: la Amapola (Aj), Lajas (Lj), Mazapil (Mj); para *P. discolor*: Juárez (Jd) y San Miguelito (SMd); para *P. lagunae* (Pl).

	Haplotipo	Bc	CHc	Gc	Mc	Nc	Pc	Sc	Sbc	Tc	Yc	Ao	Co	Fo	Pl	Aj	Lj	Mj	Jd	SMd	Total
1	156 144 96			0.1	0.05					0.05		0.05								0.05	0.016
2	156 144 97	0.05		0.05	0.1	0.05		0.05		0.05	0.1			0.05	0.2						0.037
3	156 144 98										0.05										0.003
4	157 144 94																			0.05	0.003
5	157 144 95			0.05							0.05										0.005
6	157 144 96	0.1	0.15	0.1	0.15	0.15		0.05	0.1	0.05	0.1		0.05	0.25						0.05	0.068
7	157 144 97	0.55	0.7	0.5	0.5	0.6	0.7	0.45	0.85	0.65	0.45	0.6	0.8	0.6	0.68				0.05		0.457
8	157 144 98			0.1	0.05		0.1	0.05	0.05		0.05		0.05								0.024
9	157 144 99		0.05					0.05													0.005
10	157 145 96													0.05							0.003
11	157 145 97	0.25	0.05			0.05		0.05			0.1		0.05								0.029
12	157 146 93																	0.05		0.05	0.005
13	157 146 94															0.05			0.05	0.05	0.008
14	157 146 96															0.05					0.003
15	157 146 97																			0.05	0.003
16	157 147 94				0.05																0.003
17	158 143 96							0.05													0.003
18	158 143 97							0.05		0.05											0.005
19	158 144 96					0.05								0.05							0.005
20	158 144 97			0.05	0.1	0.1	0.2	0.1		0.1	0.1	0.35			0.08						0.062
21	158 144 98							0.1					0.05								0.008
22	158 145 98	0.05																			0.003
23	158 146 92																0.05	0.05			0.005
24	158 146 93																0.4	0.45		0.05	0.047
25	158 146 94															0.6	0.5	0.3	0.2	0.5	0.11
26	158 146 95															0.3		0.05	0.3		0.034
27	158 146 96																	0.05	0.05		0.005
28	158 147 94																	0.05			0.003
29	159 144 97		0.05	0.05						0.05					0.04						0.01
30	159 146 94																0.05		0.3	0.15	0.026
31	159 146 97																		0.05		0.003

promedio de θ es de 1.51 cuando se utilizan alelos infinitos para hacer la estimación, mientras que el promedio cuando se utiliza *stepwise* es de 4.51.

Tabla 6. Variación genética y estimador indirecto del tamaño poblacional (theta) calculados utilizando tres loci de microsatélites de cloroplasto en 19 poblaciones de *P. cembroides* (*subesp. cembroides*, *subesp. orizabensis* y *subesp. lagunae*), *P. discolor* y *P. johannis*.

	Población	No. Haplotipos	<i>He</i>	Theta (alelos infinitos)	Theta (<i>stepwise</i>)
<i>Pinus cembroides</i> subesp. <i>cembroides</i>	Babícora	5	0.65 ± 0.09	1.42 ± 0.60	3.64 ± 0.64
	Chícharo	5	0.51 ± 0.13	0.76 ± 0.39	1.54 ± 0.43
	Galeana	8	0.75 ± 0.10	2.29 ± 1.26	7.33 ± 1.50
	Mazapil	7	0.74 ± 0.09	2.16 ± 1.11	6.72 ± 1.24
	Madroño	6	0.63 ± 0.11	1.29 ± 0.65	3.18 ± 0.69
	Panalachic	3	0.48 ± 0.11	0.70 ± 0.32	1.34 ± 0.32
	Saltillo	10	0.80 ± 0.09	3.17 ± 1.90	12 ± 21.24
	San Buenaventura	3	0.28 ± 0.12	0.29 ± 0.18	0.46 ± 0.17
	Tepehuanes	7	0.58 ± 0.13	1.06 ± 0.56	2.39 ± 0.61
	Yugarí	8	0.79 ± 0.08	2.96 ± 1.63	10.78 ± 1.75
Subesp. <i>orizabensis</i>	Ajalpan	3	0.54 ± 0.08	0.89 ± 0.28	1.88 ± 0.31
	Candelaria	5	0.37 ± 0.13	0.43 ± 0.25	0.75 ± 0.25
	Frijol Colorado	5	0.60 ± 0.10	1.13 ± 0.49	2.62 ± 0.52
sb. <i>lagunae</i>	Sierra Laguna	4	0.51 ± 0.10	0.77 ± 0.32	1.58 ± 0.33
<i>P. johannis</i>	Amapola	4	0.57 ± 0.09	1.01 ± 0.38	2.25 ± 0.40
	Lajas	4	0.62 ± 0.07	1.21 ± 0.35	2.89 ± 0.41
	Mazapil	5	0.65 ± 0.08	1.42 ± 0.49	3.64 ± 0.57
<i>P. discolor</i>	Juárez	7	0.81 ± 0.05	3.41 ± 1.26	13.43 ± 1.35
	San Miguelito	10	0.75 ± 0.10	2.29 ± 1.27	7.33 ± 1.50
Total <i>P. cembroides</i>		18	0.59 ± 0.03	1.12 ± 0.	2.61 ± 0.72
Total grupo <i>discolor/johannis</i>		16	0.77 ± 0.04	2.64 ± 0.55	9.05 ± 1.87

5.2. Estructura genética

5.2.1. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Al realizar el análisis de varianza molecular utilizando cinco grupos diferentes (*P. cembroides* subsp *cembroides*, subesp. *orizabensis* y subesp. *lagunae*, *P. discolor* y *P. johannis*), se encontró que, en el caso de la estimación utilizando un modelo de

stepwise, el 82.75% de la variación se encuentra entre los distintos grupos ($\Phi_{ct}=0.83$), el 1.25% de la variación es encontrada entre las poblaciones de un mismo grupo ($\Phi_{sc}=0.07$), mientras que el 16% de la variación se encuentra dentro de las poblaciones (Tabla 7A). Por otro lado, al utilizar un modelo de alelos infinitos, el 55.6% de la variación genética se encuentra entre grupos ($\Phi_{st}=0.56$), entre las poblaciones de un mismo grupo hay mucha menor variación (2.19%, $\Phi_{sc}=0.05$) y la variación dentro de las poblaciones es de 42.19% (Tabla 7A). El índice de fijación entre todas las poblaciones, en el caso de utilizar un modelo de *stepwise*, es de 0.84; mientras que al utilizar un modelo de alelos infinitos es de 0.58.

Debido a la homogeneidad genética observada entre las poblaciones de *P. cembroides*, éstas se congregaron en un mismo grupo, el cual se comparó con otro grupo conformado por las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis* (tabla 7B). Al igual que en la primera prueba, la mayor variación se encuentra entre los dos diferentes grupos (88.9% con *stepwise*, 67.6 % con alelos infinitos), mientras que la variación dentro de las poblaciones se constituye como la segunda fuente de varianza (10% con *stepwise*, 30.2% con alelos infinitos), mientras que hay muy poca variación entre las poblaciones de un mismo grupo (1% con *stepwise* y 2.2% con alelos infinitos, tabla 7B). El índice de fijación entre todas las poblaciones es considerablemente grande, de 0.9 con *stepwise* y con 0.7 con alelos infinitos.

Tabla 7. Resultados de la prueba de AMOVA con dos diferentes métodos: 1) *stepwise*, donde la distancia entre los haplotipos es calculada con base en las diferencias de tamaño entre los haplotipos y 2) alelos infinitos, donde la distancia entre haplotipos se calcula con base en los diferentes alelos que estos poseen. A) Prueba realizada con cinco grupos, correspondientes a *P. cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *orizabensis*, *P. cembroides* subesp. *lagunae*, *P. discolor* y *P. johannis*. B) Prueba realizada con dos grupos diferentes, uno constituido por *P. cembroides*, mientras que el segundo incluye a *P. discolor* y *P. johannis*.

A)

5 Grupos	% de variación			Índices de fijación			
	Entre grupos	Entre las poblaciones de un grupo	Dentro de las poblaciones	Φ_{sc}	Φ_{st}	Φ_{ct}	
1 <i>cembroides</i> 2 <i>orizabensis</i>	82.74	1.25	16.01	0.07 P = 0.0000	0.84 P = 0.0000	0.83 P = 0.0000	<i>stepwise</i>
3 <i>lagunae</i> 4 <i>P. discolor</i>	55.62	2.19	42.19	0.05 P = 0.0000	0.58 P = 0.0000	0.56 P = 0.0000	alelos infinitos

Tabla 7. Continuación

B)

2 Grupos	% de variación			Indices de fijación			
	Entre grupos	Entre las poblaciones de un grupo	Dentro de las poblaciones	Φ_{sc}	Φ_{st}	Φ_{ct}	
1 <i>P. cembroides</i>	88.93	1.07	10.01	0.096 P = 0.0000	0.90 P = 0.0000	0.89 P = 0.0000	<i>stepwise</i>
2 <i>P. discolor</i> y <i>P. johannis</i>	67.6	2.17	30.23	0.067 P = 0.0000	0.70 P = 0.0000	0.68 P = 0.0000	alelos infinitos

Por otro lado, al comparar las diferencias entre los clados que conforman estos dos grandes grupos se observa, por un lado, que las diferencias entre las tres subespecies de *P. cembroides* no son significativas ($\Phi_{ct} = -0.015$, $P = 0.813$ con *stepwise*; y $\Phi_{ct} = -0.004$, $P = 0.625$, Tabla 8A), mientras que el índice de fijación entre las poblaciones de los tres taxa es muy pequeño siendo significativo al 5 % si se estima con un modelo de alelos infinitos (2.63 % de la variación, $\Phi_{st} = 0.022$, $P = 0.029$); sin embargo, al estimarse con un modelo de *stepwise* no se encuentran diferencias significativas entre las poblaciones (3.06 % de la variación, $\Phi_{st} = 0.016$, $P = 0.075$, Tabla 8A)

Cuando este mismo análisis se lleva a cabo entre *P. discolor* y *P. johannis*, encontramos que tampoco en este caso hay una diferencia significativa entre taxa ($\Phi_{ct} = 0.098$ $P = 0.279$ con *stepwise* y $\Phi_{ct} = 0.096$ $P = 0.119$ con alelos infinitos; Tabla 8B). En este caso existen diferencias significativas tanto entre las poblaciones de un mismo grupo ($\Phi_{sc} = 0.153$ $P = 0.00$ y $\Phi_{sc} = 0.07$ $P = 0.00$) como entre todas las poblaciones ($\Phi_{st} = 0.236$ $P = 0.00$ y $\Phi_{st} = 0.159$ $P = 0.00$, con *stepwise* y con alelos infinitos respectivamente; Tabla 8B)

Al realizar el análisis de varianza molecular en el interior de cada uno de estos grupos, se observó que, en el caso de *P. cembroides*, sólo entre el 2.23% (*stepwise*) y el 4.25% (alelos infinitos) de la variación se encuentra entre diferentes poblaciones, mientras que la mayoría de la variación se localiza dentro de las poblaciones (95.75%- 97.78% con

alelos infinitos y *stepwise*, respectivamente, Tabla 9A). El índice de fijación entre las poblaciones de este grupo es $R_{st}=0.04$ y $F_{st}=0.02$, ambos estadísticamente significativos al 5% (tabla 9A).

Tabla 8. Resultados de la prueba de AMOVA con dos diferentes métodos: 1) *stepwise*, donde la distancia entre los haplotipos es calculada con base en las diferencias de tamaño entre los haplotipos y 2) alelos infinitos, donde la distancia entre haplotipos se calcula con base en los diferentes alelos que estos poseen. A) Prueba realizada con tres grupos formados por cada subespecie de *P. cembroides* (subesp. *cembroides*, subesp. *orizabensis* y subesp. *lagunae*). B) Prueba realizada con dos grupos formados por *P. discolor* y *P. johannis*.

A

3 Grupos	% de variación			Índices de fijación			
	Entre grupos	Entre las poblaciones de un grupo	Dentro de las poblaciones	Φ_{sc}	Φ_{st}	Φ_{ct}	
1 subesp. <i>cembroides</i>	-1.48	3.06	98.42	0.03 P = 0.0459	0.016 P = 0.0753	-0.015 P = 0.8133	<i>stepwise</i>
2 subesp. <i>orizabensis</i>				0.026 P = 0.0166	0.022 P = 0.0293	-0.004 P = 0.6246	alelos infinitos
3 subesp. <i>lagunae</i>	-0.42	2.63	97.79				

B)

2 Grupos	% de variación			Índices de fijación			
	Entre grupos	Entre las poblaciones de un grupo	Dentro de las poblaciones	Φ_{sc}	Φ_{st}	Φ_{ct}	
1 <i>P. discolor</i>	9.79	13.35	76.36	0.153 P = 0.0000	0.236 P = 0.0000	0.098 P = 0.2790	<i>stepwise</i>
2 <i>P. johannis</i>				0.070 P = 0.0000	0.159 P = 0.0000	0.096 P = 0.1193	alelos infinitos
	9.57	6.36	84.07				

Por otro lado, al hacer el análisis al interior del grupo de *P. discolor* y *P. johannis*, al estimar la distancia utilizando *stepwise*, se encontró que el 79.5% de la variación se localiza al interior de las poblaciones, mientras el 20.5% de esta se encuentra entre las distintas poblaciones (tabla 9B). Este patrón se conserva al utilizar alelos infinitos, donde el 12.6% de la variación está entre poblaciones y el 87.4% se encuentra al interior de estas (tabla 9B). Los índices de fijación son $R_{st}=0.2$ y $F_{st}=0.13$, ambos estadísticamente significativos.

Tabla 9. Resultados de la prueba de AMOVA con dos diferentes métodos: 1) *stepwise*, donde la distancia entre los haplotipos es calculada con base en las diferencias de tamaño entre los haplotipos y 2) alelos infinitos, donde la distancia entre haplotipos se calcula con base en los diferentes alelos que estos poseen. A) Prueba realizada con un grupo formado por las poblaciones de *P. cembroides*. B) Prueba realizada con un grupo formado por las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis*.

A)

1 Grupo	% de variación		Indices de fijación	
	Entre las poblaciones	Dentro de poblaciones	Φ_{st}	
<i>P. cembroides</i>	2.32	97.68	0.0232 P = 0.0400	<i>stepwise</i>
	4.25	95.75	0.0425 P = 0.0000	alelos infinitos

B)

1 Grupo	% de variación		Indices de fijación	
	Entre las poblaciones	Dentro de poblaciones	Φ_{st}	
<i>P. discolor</i> <i>P. johannis</i>	20.53	79.47	0.2053 P = 0.0000	<i>stepwise</i>
	12.59	87.41	0.1259 P = 0.0000	alelos infinitos

5.2.2. Análisis entre pares de poblaciones

Todos los resultados de las comparaciones entre pares de poblaciones se encuentran en la tabla 10 y 11. Con fines de simplicidad los resultados se dividieron entre las comparaciones que corresponden a poblaciones del mismo taxón y las comparaciones entre poblaciones pertenecientes a taxa distintos.

A) Comparaciones entre poblaciones del mismo taxón

i) Poblaciones de *P. cembroides* subesp. *cembroides*.

Cuando se comparan las poblaciones de *P. cembroides*, suponiendo un modelo de mutación por *stepwise*, se encuentran sólo cinco pares de poblaciones donde el índice de fijación es significativo al 5 %: 1) Panalachíc - Babícora ($R_{st} = 0.134$); 2) Babícora - Saltillo ($R_{st} = 0.10$), 3) Panalachíc - Madroño ($R_{st} = 0.10$), 4) Saltillo - Mazapil y 5) Panalachíc - Mazapil ($R_{st} = 0.9$ para los dos últimos casos). El valor menor de flujo genético es 3.2 entre Bavícora y Panalachíc. Por otro lado, cuando se utiliza el

estimador derivado de un modelo de mutación por alelos infinitos, se encuentran nueve pares de poblaciones donde los índices de fijación son significativos, entre ellos: 1) Saltillo y San Buenaventura ($F_{st} = 0.116$), 2) San Buenaventura y Babícora ($F_{st} = 0.101$), 3) Panaláchic y Babícora ($F_{st} = 0.98$), mientras que los valores de flujo genético oscila entre 3.8 entre Saltillo y San Buenaventura y una gran cantidad de comparaciones con valores infinitos.

ii) Poblaciones de *P. cembroides* subesp. *orizabensis*

Al utilizar un modelo de *stepwise* se encuentra que la población de Frijol Colorado, ubicada en Veracruz, es genéticamente distinta a las otras dos poblaciones de este taxa (Ajalpan $R_{st} = 0.17$ y Candelaria $R_{st} = 0.16$), sin embargo, el índice de flujo genético es de 7.3 en los dos casos en que se puede calcular. Por otro lado, al utilizar alelos infinitos se encuentra que la población de Ajalpan (ubicada en Tehuacán, Puebla) es genéticamente distinta tanto a Frijol Colorado ($F_{st} = 0.17$), como a Candelaria ($F_{st} = 0.14$). En este caso Ajalpan tiene valores de flujo genético de 3.2 y 2.4 con Candelaria y Frijol Colorada, respectivamente; mientras estas dos poblaciones tienen una M de 7.6.

iii) Poblaciones de *P. discolor*

Para ambos modelos de mutación encontramos que las dos poblaciones de este taxa, San Miguelito en el Estado de San Luis Potosí y Juárez en Chihuahua, no presentan diferencias genéticas significativas ($R_{st} = 0.03$ y $F_{st} = 0.07$). El flujo genético estimado es de 6.9 para *stepwise* y 13.8 para alelos infinitos.

iv) Poblaciones de *P. johaniis*

Con ambos modelos de mutación, población de la Amapola es significativamente distinta a Lajas, ambas en San Luis Potosí ($R_{st} = 0.48$ y $F_{st} = 0.14$) y a Mazapil en Zacatecas ($R_{st} = 0.33$, M = 3.2 y $F_{st} = 0.18$, M = 2.3), mientras que entre Lajas y Mazapil no hay diferencias genéticas significativas.

Tabla 10. Matriz de distancia genética entre 19 poblaciones de *P. cembroides* (*P. cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *orizabensis* y *P. cembroides* subesp. *lagunae*), *P. discolor* y *P. johannis*. A) Distancia estimada a partir de un modelo de mutación por *stepwise* (R_{st}). B) Distancia estimada a partir de un modelo de mutación por alelos infinitos (F_{st}). Las abreviaturas de las poblaciones son: Para *P. cembroides* subesp. *cembroides*: Babícora (Bc), el Chicharo (CHc), Galeana (Gc), Mazapil (Mc), Madroño (Nc), Panalachic (Pc), Saltillo (Sc), San Buenaventura (SBc), Tepehuanaes (Tc) y Yugarí (Yc). Para *P. cembroides* subesp. *orizabensis*: Ajalpan (Aco), Candelaria (Cco) y Frijol Colorado (Fco). Para *P. johannis*: Amapola (Amj), Lajas (Lj) y Mazapil (Mj). Para *P. discolor*: Juárez (Jd) y San Miguelito (Smd). Para *P. cembroides* subesp. *lagunae*: Sierra de la Laguna (Pl).

A)

	Bc	CHc	Gc	Mc	Nc	Pc	Sc	SBc	Tc	Yc	Aco	Cco	Fco	Amj	Lj	Mj	Jd	Smd
CHc	0.015																	
Gc	0.03	-0.027																
Mc	-0.002	-0.002	-0.035															
Nc	0.056	-0.036	-0.054	-0.041														
Pc	0.134*	-0.01	0.057	0.09*	0.100*													
Sc	0.100*	-0.002	0.053	0.09*	0.055	-0.045												
SBc	0.083	-0.035	-0.029	0.008	0.016	0.09	0.046											
Tc	0.08	0.039	-0.027	0.011	-0.023	0.002	-0.001	-0.013										
Yo	-0.014	-0.031	-0.037	-0.03	-0.029	0.056	0.052	-0.035	-0.004									
Aco	0.137*	-0.007	0.036	0.065	0.036	0.001	-0.015	0.107	-0.022	-0.022								
Cco	0.049	-0.037	0.008	0.037	0.04	0.003	0.002	-0.013	0	-0.016	0.064							
Fco	0.110*	0.046	-0.031	-0.043	-0.019	0.24*	0.17*	0.106	0.044	0.008	0.16*	0.17*						
Amj	0.939*	0.936*	0.919*	0.887*	0.944*	0.959*	0.927*	0.964*	0.939*	0.927*	0.950*	0.958*	0.944*					
Lj	0.946*	0.941*	0.923*	0.893*	0.947*	0.962*	0.932*	0.967*	0.942*	0.932*	0.954*	0.963*	0.948*	0.475*				
Mj	0.919*	0.937*	0.923*	0.866*	0.941*	0.955*	0.908*	0.941*	0.916*	0.906*	0.947*	0.954*	0.918*	0.330*	-0.04			
Jd	0.816*	0.816*	0.792*	0.746*	0.816*	0.850*	0.812*	0.855*	0.818*	0.805*	0.823*	0.849*	0.815*	0.330*	0.412*	0.351*		
Smd	0.793*	0.795*	0.769*	0.724*	0.788*	0.829*	0.797*	0.828*	0.796*	0.782*	0.809*	0.826*	0.785*	0	0.192*	0.513*	0.07	
Pl	0.05	-0.02	-0.01	0.02	0.05	0.04	0.04	-0.04	0	-0.03	0.09	-0.02	0.09	0.948*	0.951*	0.948*	0.846*	0.826*

*Las distancias en negritas son significativas.

Tabla 10. Continuación

B)

	Bc	CHc	Gc	Mc	Nc	Pc	Sc	SBC	Tc	Yc	Aco	Cco	Fco	Amj	Lj	Mj	Jd	SMd
CHc	0.046																	
Gc	0.084*	0.021																
Mc	0.051*	0.013	-0.041															
Nc	0.045	-0.008	-0.021	-0.037														
Pc	0.098*	0.053	0.049	0.03	0.012													
Sc	0.061*	0.074*	0.011	0.062	-0.001	0.018												
SBC	0.101*	-0.026	0.06	0.051	0.034	0.064	0.116*											
Tc	0.071*	0.034	0.009	-0.011	0.018	-0.012	0.07	0.070*										
Yo	0.015	0.012	-0.028	-0.034	-0.028	0.007	-0.013	0.045	-0.017									
Aco	0.160*	0.161*	0.093*	0.061	0.05	0.018	0.017	0.216*	0.005	0.045								
Cco	0.045	-0.021	0.041	0.03	0.01	0.005	0.062	-0.031	0.032	0.005	0.141*							
Fco	0.079*	0.006	-0.007	-0.011	-0.017	0.115*	0.06	0.064	0.063*	0.018	0.172*	0.062						
AMj	0.717*	0.783*	0.705*	0.687*	0.730*	0.776*	0.626*	0.830*	0.733*	0.688*	0.744*	0.794*	0.741*					
Lj	0.732*	0.797*	0.721*	0.708*	0.745*	0.788*	0.640*	0.842*	0.745*	0.704*	0.755*	0.807*	0.756*	0.135*				
Mj	0.734*	0.798*	0.721*	0.704*	0.745*	0.789*	0.639*	0.844*	0.746*	0.705*	0.755*	0.808*	0.757*	0.178*	0.007			
Jd	0.594*	0.659*	0.579*	0.569*	0.606*	0.654*	0.507*	0.710*	0.607*	0.565*	0.622*	0.672*	0.619*	0.077*	0.178*	0.201*		
SMd	0.562*	0.628*	0.546*	0.530*	0.570*	0.624*	0.472*	0.680*	0.578*	0.594*	0.532*	0.641*	0.581*	0.100*	0.138*	0.179*	0.03	
PI	0.141*	0.118*	0.076*	0.05	0.068*	0.04	0.083*	0.154*	0.01	0.03	0.05	0.100*	0.175*	0.651*	0.801*	0.803*	0.68*	0.791*

*Las distancias en negritas son significativas.

Tabla 11. Matriz de flujo genético ($M = N\mu$) entre 19 poblaciones de *P. cembroides* (*cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *orizabensis* y *P. cembroides* subesp. *lagunae*), *P. discolor* y *P. johannis*. A) estimado a partir de un modelo de mutación por stepwise (R_{st}). B) estimado a partir de un modelo de mutación por alelos infinitos (F_{st}). Las abreviaturas de las poblaciones son: Para *P. cembroides* subesp. *cembroides*: Babícora (Bc), el Chicharo (CHc), Galeana (Gc), Mazapil (Mc), Madroño (Nc), Panalachi (Pc), Saltillo (Sc), San Buenaventura (SBc), Tepehuanaes (Tc) y Yugarí (Yc). Para *P. cembroides* subesp. *orizabensis*: Ajalpan (Aco), Candelaria (Cco) y Frijol Colorado (Fco). Para *P. johannis*: Amapola (Amj), Lajas (Lj) y Mazapil (Mj). Para *P. discolor*: Juárez (Jd) y San Miguelito (SMd). Para *P. cembroides* subesp. *lagunae*: Sierra de la Laguna (Pl).

A)

	Bc	CHc	Gc	Mc	Nc	Pc	Sc	SBc	Tc	Yc	Aco	Cco	Fco	Amj	Lj	Mj	Jd	SMd
CHc	31.12																	
Gc	16.07	inf																
Mc	inf	inf	inf															
Nc	8.39	inf	inf	inf														
Pc	3.23	inf	8.16	4.92	4.54													
Sc	4.47	inf	9.36	5.15	8.58	inf												
SBc	5.47	inf	inf	62.28	30.14	5.03	10.25											
Tc	5.74	inf	inf	43.02	inf	203.75	inf	inf										
Yo	inf	inf	inf	inf	inf	8.43	9.16	inf	inf									
Aco	3.13	inf	13.23	7.14	11.78	607.5	inf	4.19	inf	7.33								
Cco	9.65	inf	61.25	12.95	9.65	164.17	315.71	inf	inf	inf	7.27							
Fco	4.03	10.21	inf	inf	inf	1.55	2.53	4.23	10.87	61.25	2.68	2.5						
AMj	0.05	0.05	0.07	0.1	0.04	0.03	0.06	0.03	0.05	0.06	0.04	0.03	0.04					
Lj	0.03	0.03	0.04	0.06	0.03	0.02	0.04	0.02	0.03	0.04	0.02	0.02	0.03	0.55				
Mj	0.04	0.05	0.06	0.08	0.04	0.03	0.05	0.03	0.05	0.05	0.04	0.03	0.04	1.01	inf			
Jd	0.11	0.11	0.13	0.17	0.11	0.09	0.12	0.09	0.11	0.12	0.1	0.09	0.11	8.3	0.71	0.93		
SMd	0.13	0.13	0.15	0.19	0.13	0.1	0.13	0.1	0.13	0.14	0.12	0.11	0.14	inf	2.1	3.02	6.88	
Pl	8.99	inf	inf	23.77	13.21	10.85	13.11	inf	257.64	inf	5.25	inf	4.88	0.04	0.03	0.04	0.09	0.11

Tabla 11. Continuación

B)

	Bc	CHc	Gc	Mc	Nc	Pc	Sc	SBc	Tc	Yc	Aco	Cco	Fco	Amj	Lj	Mj	Jd	SMd
CHc	10.26																	
Gc	5.43	23.17																
Mc	7.52	36.34	inf															
Nc	10.42	inf	inf	inf														
Pc	4.57	8.84	9.5	16.1	42.41													
Sc	7.62	6.23	43.2	inf	inf	26.54												
SBc	4.42	inf	7.72	9.21	13.92	7.36	3.8											
Tc	6.57	14.01	54.35	inf	inf	inf	171.74	6.55										
Yo	31.17	40.67	inf	inf	inf	71.43	inf	10.5	inf									
Aco	2.62	2.59	4.82	7.74	9.47	27.07	28.9	1.81	inf	9.94								
Cco	10.69	inf	11.83	16.51	49.38	106.11	7.58	inf	15.25	90.94	3.05							
Fco	5.8	76.36	inf	inf	inf	3.82	7.82	7.27	7.32	27.11	2.41	7.6						
AMj	0.2	0.14	0.21	0.22	0.18	0.14	0.3	0.1	0.18	0.23	0.17	0.13	0.17					
Lj	0.18	0.13	0.19	0.21	0.17	0.13	0.28	0.09	0.17	0.21	0.16	0.12	0.16	3.22				
Mj	0.22	0.16	0.23	0.25	0.21	0.17	0.33	0.12	0.21	0.25	0.2	0.15	0.2	2.3	inf			
Jd	0.34	0.26	0.36	0.38	0.32	0.26	0.48	0.2	0.32	0.38	0.3	0.24	0.31	5.98	2.3	1.99		
SMd	0.39	0.3	0.42	0.44	0.38	0.3	0.56	0.23	0.36	0.44	0.34	0.28	0.36	4.5	3.1	2.29	13.81	
PI	3.05	3.73	6.06	8.8	6.77	11.79	5.46	2.74	inf	15.98	9.93	4.48	2.35	0.13	0.12	0.15	0.24	0.27

B) Comparaciones entre poblaciones de distintos taxa

i) *P. cembroides* subesp. *cembroides* y subesp. *orizabensis*

El único par de poblaciones que tiene un índice de fijación significativo para ambos modelos de mutación es el par Babícora - Ajalpan ($R_{st} = 0.14$, $M = 3.2$; $F_{st} = 0.16$, $M = 2.6$). Cuando se utiliza stepwise los pares de poblaciones distintas genéticamente son: Frijol Colorado - Babícora ($R_{st} = 0.11$, $M = 4.0$), Frijol colorado - Panalachic ($R_{st} = 0.24$, $M = 1.6$) y Frijol Colorado - Saltillo ($R_{st} = 0.17$, $M = 2.5$). Por otro lado, al utilizar alelos infinitos las poblaciones distintas genéticamente son: Ajalpan - Chicharo ($F_{st} = 0.16$, $M = 2.6$), Ajalpan - Galeana ($F_{st} = 0.09$, $M = 2.3$) y Ajalpan - San Buenaventura ($F_{st} = 0.06$, $M = 1.8$).

ii) *P. cembroides*: subesp. *cembroides*, *lagunae* y *orizabensis*

En este caso, cuando se utiliza stepwise, no se encuentra ninguna diferencia significativa entre las poblaciones de *P. lagunae* con las de *P. cembroides* y *P. cembroides* var. *orizabensis*. El menor flujo genético se encuentra con las poblaciones de Ajalpan y Frijol Colorado ($M = 5.0$ aproximadamente) ambas de *P. cembroides* var. *orizabensis*. Al utilizar alelos infinitos se encuentra que la población de *P. lagunae* es genéticamente distinta de dos de las poblaciones de *P. cembroides* var. *orizabensis* ($F_{st} = 0.18$, $M = 2.3$ y $F_{st} = 0.1$, $M = 4.5$ con Frijol Colorado y Candelaria respectivamente), así como de cinco poblaciones de *P. cembroides* donde el menor flujo genético es con San Buenaventura ($M = 2.7$).

iii) *P. discolor* y *P. johannis*

En este caso todas las poblaciones de *P. discolor* son significativamente distintas de las poblaciones de *P. johannis*, excepto en el caso de La Amapola - San Miguelito, donde el índice de fijación calculado con stepwise es prácticamente cero. Mientras que al utilizar alelos infinitos, todos los pares de poblaciones presentan distancias genéticas significativas. Con ambos modelos de mutación, el menor flujo genético es entre Lajas y Juárez ($M_{Rst} = 0.7$, $M_{Fst} = 2.0$) y Mazapil y Juárez ($M_{Rst} = 0.9$, $M_{Fst} = 2.3$).

iv) Grupo de *P. cembroides* y grupo de *P. discolor/johannis*

En este caso los índices de fijación de todos los pares de poblaciones son estadísticamente significativos, con valores que van, en el caso de utilizar *stepwise*, desde 0.76 entre San Miguelito y Galena, hasta 0.97 entre Lajas y San Buenaventura; por otro lado, al utilizar alelos infinitos los índices de fijación toman valores desde 0.84 entre Mazapil y San Buenaventura, hasta 0.47 entre San Miguelito y Saltillo. Los valores de flujo genético son menores de 0.5 en todas las comparaciones para ambos modelos de mutación.

Al hacer una correlación entre el índice de fijación y la distancia geográfica entre pares de poblaciones no se encuentra asociación significativa entre ambas matrices, tanto para *P. cembroides* como para el grupo *discolor/johannis*.

5.2.3. *Relaciones entre las distintas poblaciones*

En ambos dendogramas se pueden observar dos grupos claramente diferenciados (Figura 4). El primero de estos grupos se encuentra formado por las poblaciones de *P. cembroides* y se encuentra soportado por muy altos valores de bootstrap (99% en el caso de utilizar la distancia genética de Nei y 100% al utilizar la distancia de Shiver).

Las relaciones al interior de *P. cembroides* no se encuentran claramente establecidas. A pesar que la distancia de Nei muestra una ligera relación entre algunas poblaciones, en general ninguna de estas se encuentra bien soportada.

Los únicos clados con un valor de bootstrap mayor al 50% son: 1) Candelaria (Co, Puebla) y San Buenaventura (SBc, Chihuahua), 2) este último grupo junto con Panalachíc (Pc, Chihuahua), 3) el Chicharo (CHc, Durango) y Yugarí (Yc, Chihuahua) y 4) Madroño (Nc, Querétaro) y Frijol Colorado (Fo, Veracruz). Por otro lado, la distancia genética de Shiver no permite establecer ninguna asociación entre las poblaciones del *P. cembroides*.

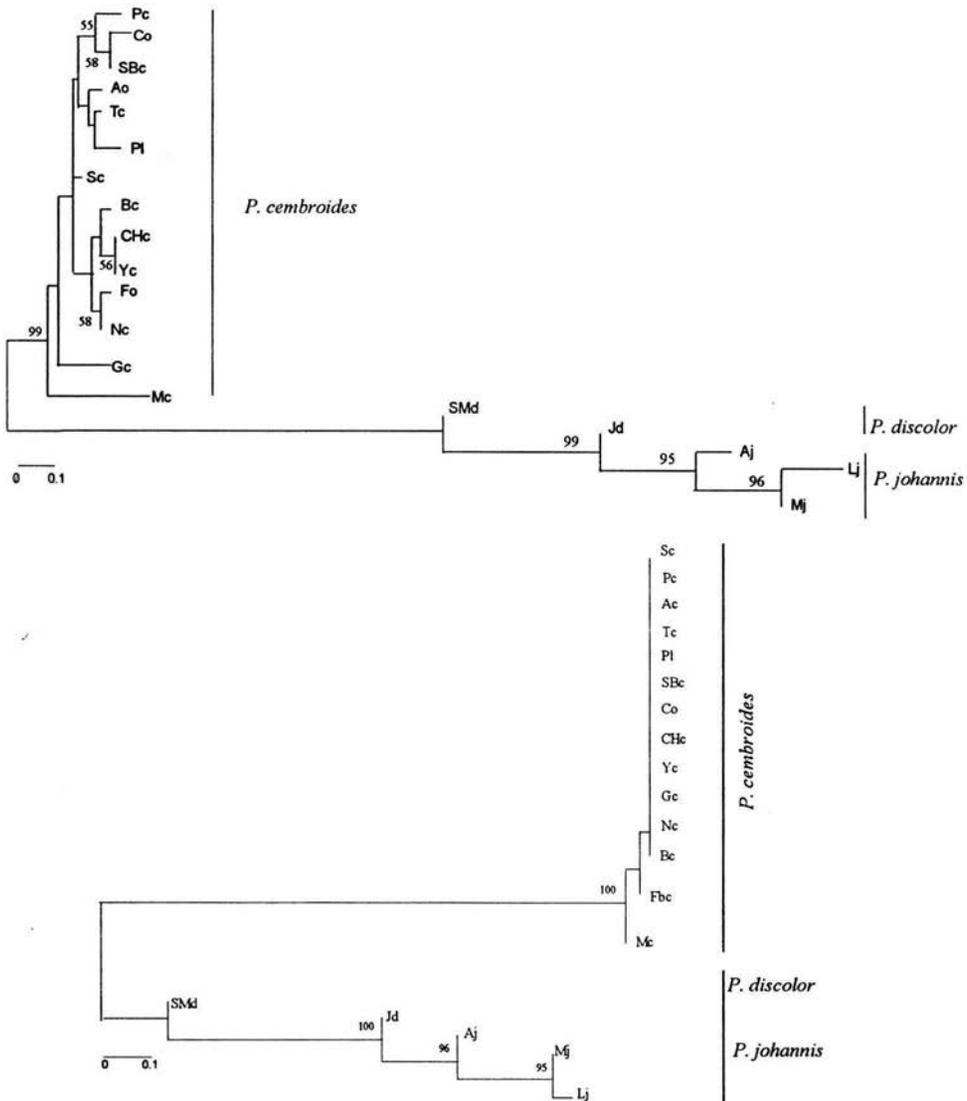


Figura 5. Arbol de N-J de 19 poblaciones mexicanas de *P. Cembroides* (subesp. *Cembroides*, subesp. *Orizabensis* y subesp. *lagunae*), *P. discolor* y *P. johannis*, basado en la distancia genética de Nei (d, 1972) y en la distancia de Shiver (1995). Los valores de bootstrap se calcularon con 1000 réplicas. Las poblaciones son: 1) de *P. cembroides* subesp. *cembroides*: Babicora (Bc), El Chicharo (CH), Galeana (Gc), Mazapil (Mc), Madroño (Nc), Panalachic (Pc), Saltillo (Sc), San Buenaventura (SB), Tepehuanes (Tc) y Yugarí (Yc); 2) de *P. cembroides* subesp. *orizabensis*: Ajalpan (Ao), Candelaria (Co) y Frijol Colorado (Fo); 3) de *P. cembroides* subesp. *lagunae* (Pl), 4) de *P. discolor*: Juárez (Jd) y San Miguelito (SM); 5) de *P. johannis*: Amapola (Aj), Lajas (Lj) y Mazapil (Mj).

En lo que respecta al grupo *discolor/johannis*, las asociaciones entre todas las poblaciones se encuentran bien establecidas, excepto en el caso de San Miguelito. Las tres poblaciones de *P. johannis* forman un grupo muy bien soportado, el cual es parafilético a la población de Juárez. Por otro lado, la topología de esta parte del dendograma no cambia independientemente de la distancia genética que sea utilizada.

5.3 Red de haplotipos, análisis de clados anidados y asociación geográfica de los distintos grupos de haplotipos

La red de haplotipos obtenida por el método de parsimonia estadística, muestra dos grupos claramente definidos (Figura 5). Al primero de estos grupos pertenecen los haplotipos encontrados en las poblaciones de *P. cembroides*, mientras que en el segundo grupo se encuentran los haplotipos de *P. discolor* y *P. johannis*. Sin embargo, existen ciertos haplotipos compartidos por ambos grupos, tal es el caso de los haplotipos 1, 6 y 7 donde, a pesar de encontrarse con mayor frecuencia en las poblaciones de *P. cembroides*, también se encuentran con una frecuencia de 5 % en San Miguelito (en el caso del haplotipo 1 y 6) y en Juárez (en el caso del haplotipo 7), ambas poblaciones de *P. discolor*. Por otro lado, a pesar que el haplotipo número 4 se encuentra únicamente en San Miguelito (*P. discolor*), resulta mucho más similar a los haplotipos propios de *P. cembroides*, con los cuales se encuentra agrupado. Lo mismo sucede con el haplotipo 16, el cual a pesar de encontrarse en un individuo de *P. cembroides*, es mucho más similar a los haplotipos de *discolor/johannis*. En este caso dicho haplotipo se encuentra en la población de Mazapil, en la cual son simpátricos *P. cembroides* subesp. *cembroides* y *P. johannis*.

Al llevar a cabo las pruebas de asociación entre grupos de haplotipos y su distribución geográfica, encontramos tanto el total del cladograma como siete clados de primer nivel (1-4, 1-5, 1-7, 1-13, 1-15 y 1-16), dos clados de segundo nivel (2-3 y 2-5) y un clado de tercer nivel (3-1) poseen distancias calculadas significativamente distintas a las esperadas por puro azar (Tabla 12).

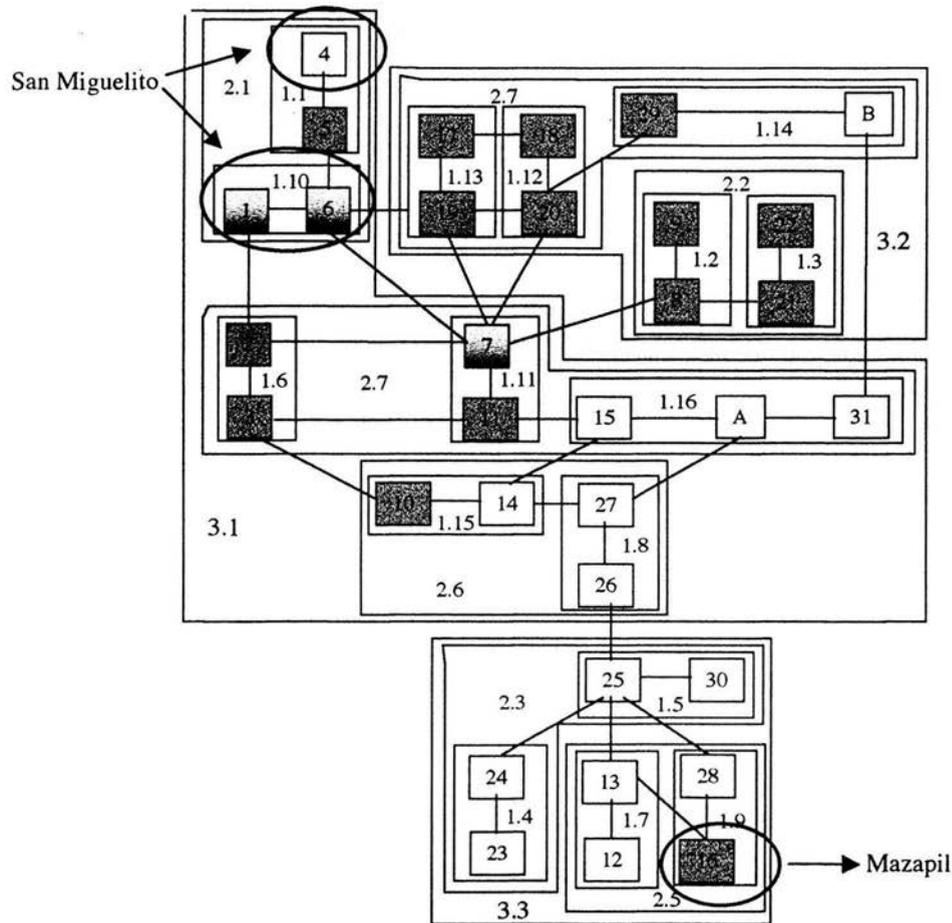


Figura 5. Red de haplotipos y análisis de clados anidados (NCA) de 31 haplotipos encontrados en 385 individuos de tres subespecies de *P. cembroides* (subesp. *cembroides*, subesp. *orizabensis* y subesp. *lagunae*), *P. discolor* y *P. johannis*, obtenidos con TCS (Clemens et al. 2001). Cada línea representa una mutación. Los haplotipos oscuros se encuentran dentro de *P. cembroides*, mientras los claros se encuentran en el grupo *discolor/johannis*. Los haplotipos A y B no se encontraron en la muestra.

Tabla 12. Resultado del análisis de asociación geográfica entre grupos de haplotipos (GeoDis), para 31 haplotipos encontrados en el total de la muestra de 19 poblaciones que incluyen a *P. cembroides* (subesp. *cembroides*, subesp. *orizabensis* y subesp. *lagunae*) *P. johannis* y *P. discolor*.

	Clado	Inferencia	Poblaciones*
<i>P. discolor</i> y <i>P. johannis</i>	1-4	Fragmentación antigua	23 Mj, Lj 26 Mj, Aj, Jd
	1-5	Expansión gradual del área de distribución	30 Lj, Jd, Aj 25 Lj, Jd, Aj, Mj, SMd
	1-7	No concluyente	
	1-16	Fragmentación alopátrica	31 Jd 15 SMd
	2-3	Flujo genético restringido con aislamiento por distancia	1-4 Lj, Mj, SMd 1-5 Lj, Mj, SMd, Jd, Aj
	2-5	No concluyente	
<i>P. cembroides</i>	1-2	Flujo genético restringido con aislamiento por distancia	9 CHc, Sc 8 Gc, Mc, Pc, Sc, SBc, Yc, Co
	1-13	Fragmentación antigua	17 Sc 19 Nc, Fo
	1-15	No concluyente	
Ambos grupos	3-1	Flujo genético restringido con aislamiento por distancia	Todas las poblaciones excepto Aj.
	TC	Fragmentación alopátrica	Todas las poblaciones

*las abreviaturas de las poblaciones son: a) para *P. johannis*: Mj (Mazapil), Lj (Lajas), Aj (Amapola); b) para *P. discolor*: Jd (Juárez), SMd (San Miguelito); c) para *P. cembroides* subesp. *cembroides*: Chc (Chicharo), Sc (Saltillo), Gc (Galeana), Mc (Mazapil), Pc (Panalachic), Sbc (San Buenaventura), Yc (Yugarí), Nc (Madroño); d) para *P. cembroides* subesp. *orizabensis*: Co (Candelaria), Fo (Frijol Colorado).

En el caso de *P. discolor* y *P. johannis* es posible observar que las poblaciones han seguido una dinámica de flujo genético restringido con aislamiento por distancia; esto es consistente con el aumento gradual en el área de distribución de este grupo. También se encuentran dos fragmentaciones importantes: una fragmentación antigua ocurrida entre las poblaciones de *P. johannis* en los estados de Zacatecas - San Luis Potosí, y una fragmentación alopátrica ocurrida entre las poblaciones de *P. discolor*, entre Chihuahua y San Luis Potosí.

Por otro lado, para *P. cembroides* se observa una fragmentación antigua entre la población de la subespecie *cembroides* ubicada en Saltillo y las poblaciones de Querétaro y Veracruz - Puebla. También en este caso se observa una dinámica reciente

de flujo genético restringido y aislamiento por distancia, la cual no involucra a todas las poblaciones de este grupo.

En lo que respecta al resto del cladograma, se observa una fragmentación alopátrica muy antigua, la cual involucra tres grupos, el de los haplotipos propios de *P. cembroides*, el de los haplotipos de *P. discolor* y *P. johannis* y un tercer clado con una mezcla de haplotipos pertenecientes a ambos grupos. Posteriormente, se observa flujo genético restringido y aislamiento por distancia dentro de este grupo mixto.

5.4 Distribución *mismatch*

En ninguno de los dos grupos fue posible llevar a cabo las simulaciones debido a que la varianza de la muestra es menor de la media, lo cual imposibilita la obtención de los parámetros de distribución (Apéndice II). Para el *P. cembroides* la media de la distribución es 0.783 diferencias y la varianza de 0.576; mientras que para el grupo *discolor/johannis* la media es 1.112 y la varianza 0.588 (Figuras 6 y 7).

Debido a la imposibilidad de estimar la distribución de las diferencias esperadas solamente considerando el número de alelos distintos, como lo indica el modelo de mutación por alelos infinitos, se llevó a cabo el mismo utilizando un modelo de mutación por *stepwise*, donde se utilizan las diferencias en el tamaño de los haplotipos. Los resultados de la χ^2 indican que el modelo de expansión súbita de Rogers (1995) no se ajusta a la distribución *mismatch* en ninguno de los dos grupos. En el caso de *P. cembroides* la media de las diferencias entre haplotipos es de 0.805, mientras que para *discolor/johannis* la media es de 1.593.

Por otro lado, las θ_0 calculadas son 0.228 y de 0.971 para *P. cembroides* y para *discolor/johannis* respectivamente y el tiempo ocurrido entre θ_0 y θ_1 es de $\tau = 2t\mu = 0.667$ y $\tau = 2t\mu = 0.622$ respectivamente. Los valores estimados de θ_1 con base en la heterocigosis son de 1.123 ± 0.157 para *cembroides* y 2.637 ± 0.545 para *discolor/johannis*.

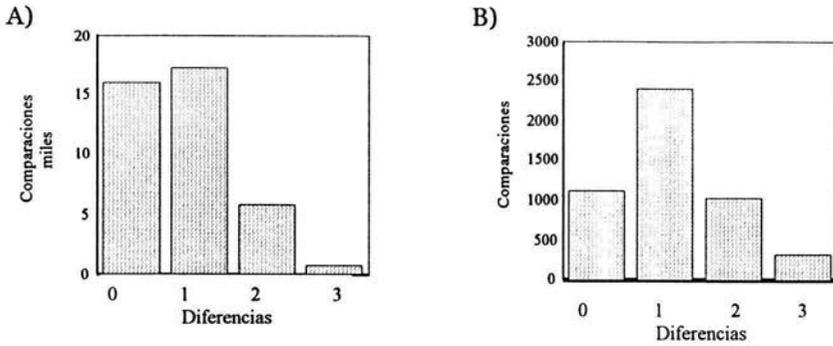


Figura 6. Distribución *mismatch* estimando las diferencias entre haplotipos con base en un modelo de alelos infinitos. A) distribución para *P. cembroides* ($m = 0.783$, $v = 0.576$) y B) distribución para el grupo *discolor/johannis* ($m = 1.112$, $v = 0.588$).

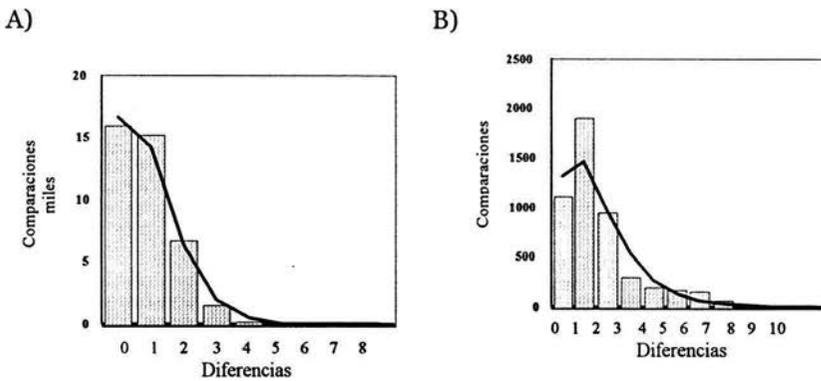


Figura 7. Distribución *mismatch* utilizando la diferencia absoluta en el tamaño de los haplotipos. Los barras corresponden a las diferencias observadas y la línea a las diferencias esperadas bajo un modelo de expansión súbita (Rogers 1995). A) Distribución para *P. cembroides* ($m = 805$, $\theta_0 = 0.228$ y $\tau = 0.667$). B) Distribución para el grupo *discolor/johannis* ($m = 1.593$, $\theta_0 = 0.971$ y $\tau = 0.622$).

5.5 Simulaciones de parámetros poblacionales

En la figuras 9, 10, 11 y 12 se muestra la distribución de las probabilidades de N_e , μ , θ y tiempo al más reciente ancestro común, obtenidas con 10,000 simulaciones. La media y los intervalos de confianza del 95% se muestran en la Tabla 13. En todas las simulaciones se observa solapamiento en los intervalos de confianza obtenidos para

cada prueba. Esto ocurre tanto para las tres pruebas llevadas a cabo con diferentes condiciones iniciales, como para los diferentes grupos (total de la muestra, *P. cembroides* y grupo *discolor/johannis*).

Tabla 13. Valores obtenidos después de 10,000 simulaciones en el programa MICSAT (Wilson and Balding 1998) para la densidad de probabilidades del tamaño efectivo, tasa de mutación, θ y tiempo al ancestro común más reciente (TACMR). Condiciones iniciales en las diferentes pruebas: 1) $N = 3000$, $\mu = 1.5 \times 10^{-3}$; 2) $N = 10000$, $\mu = 3.2 \times 10^{-5}$; 3) $N = 1000$, $\mu = 3.2 \times 10^{-5}$.

Prueba	Tasa de mutación (m)	Tamaño efectivo (Ne)	Theta ($\theta = 2N\mu$)	TACMR* (generaciones)
Total de la muestra	1 1.68×10^{-3} (0.44 - 3.85×10^{-3})	2103.8 (618 - 5891)	5.25 (3.4 - 7.6)	3046.6 (631 - 10245)
	2 1.70×10^{-3} (0.45 - 4.1×10^{-3})	2134.8 (609 - 6078)	5.30 (3.5 - 7.6)	3109.4 (624 - 10442)
	3 1.57×10^{-3} (0.43 - 3.5×10^{-3})	2209.0 (704 - 6038)	5.28 (3.4 - 7.6)	3166.2 (688 - 10702)
<i>P. cembroides</i>	1 1.49×10^{-3} (0.37 - 3.63×10^{-3})	1737.5 (489 - 5071)	3.79 (2.3 - 5.7)	3492.6 (710 - 11532)
	2 1.45×10^{-3} (0.37 - 3.53×10^{-3})	1765.9 (513 - 5063)	3.76 (2.2 - 5.8)	3627.4 (738 - 12157)
	3 1.56×10^{-3} (0.39 - 4.0×10^{-3})	1658.3 (443 - 4818)	3.74 (2.2 - 5.8)	3367.7 (672 - 11152)
<i>P. discolor</i> <i>P. johannis</i>	1 1.45×10^{-3} (0.35 - 3.5×10^{-3})	1580.5 (426 - 4532)	3.33 (1.8 - 5.4)	2425.1 (481 - 8130)
	2 1.40×10^{-3} (0.35 - 3.6×10^{-3})	1626.2 (425 - 4544)	3.32 (1.8 - 5.4)	2486.9 (485 - 8303)
	3 1.45×10^{-3} (0.37 - 3.4×10^{-3})	1553.5 (432 - 4638)	3.33 (1.8 - 5.4)	2372.1 (478 - 8257)

* tiempo al ancestro común más cercano

En todos los casos se observa una media de tasa de mutación entre 1.4 y 1.7×10^{-3} por alelo por generación. El tamaño efectivo encontrado en el total de la muestra va de 2100 a 2200 individuos, mientras que para *P. cembroides* y el grupo *discolor/johannis* se obtuvieron valores de 1660 a 1760 en el primer caso y de 1550 a 1620 en el segundo. Los estimados de theta son de aproximadamente 5.28 para el total de la muestra, de 3.76 para *P. cembroides* y de 3.33 par el grupo *discolor/johannis*. Estos valores equivalen a una diversidad genética histórica *He* de aproximadamente 0.84, 0.79 y 0.77 para el total de la muestra, *P. cembroides* y el grupo de *discolor/johannis* respectivamente.

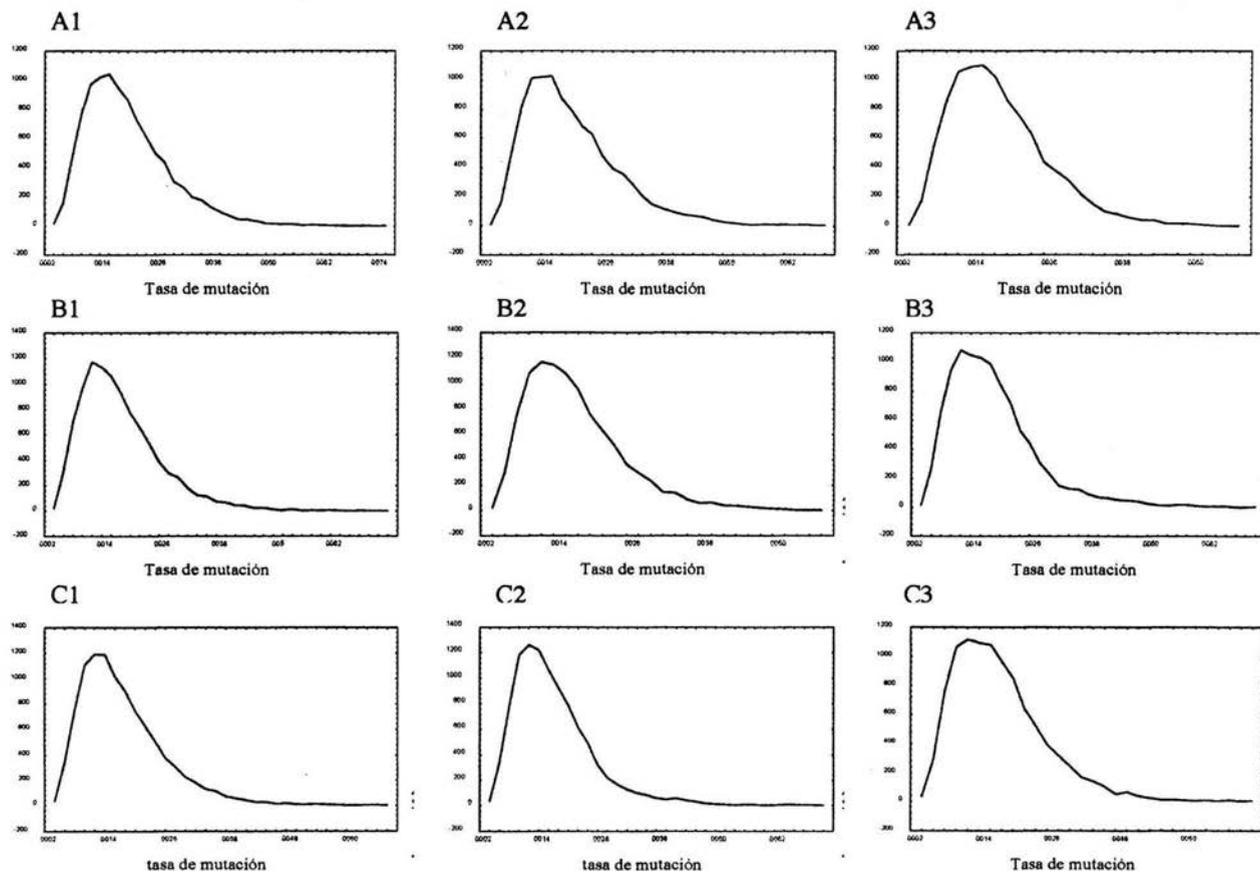


Figura 9. Distribución de la tasa de mutación (por locus por generación) obtenida para los haplotipos formados por tres loci de microsatélites de cloroplasto (Pt 30204, Pt79951 y Pt110048) con base en 10000 réplicas de 3 distintas simulaciones, con diferentes parámetros iniciales: 1) $N = 3000$, $m = 1.5 \times 10^{-3}$; 2) $N = 10000$, $m = 3.2 \times 10^{-5}$; 3) $N = 1000$, $m = 3.2 \times 10^{-5}$. Las simulaciones se llevaron a cabo en el programa MICSAT (Wilson y Balding 1998) para A) el total de la muestra (385 individuos), B) *P. cembroides* (275 individuos) y C) *P. discolor* y *P. johannis* (100 individuos).

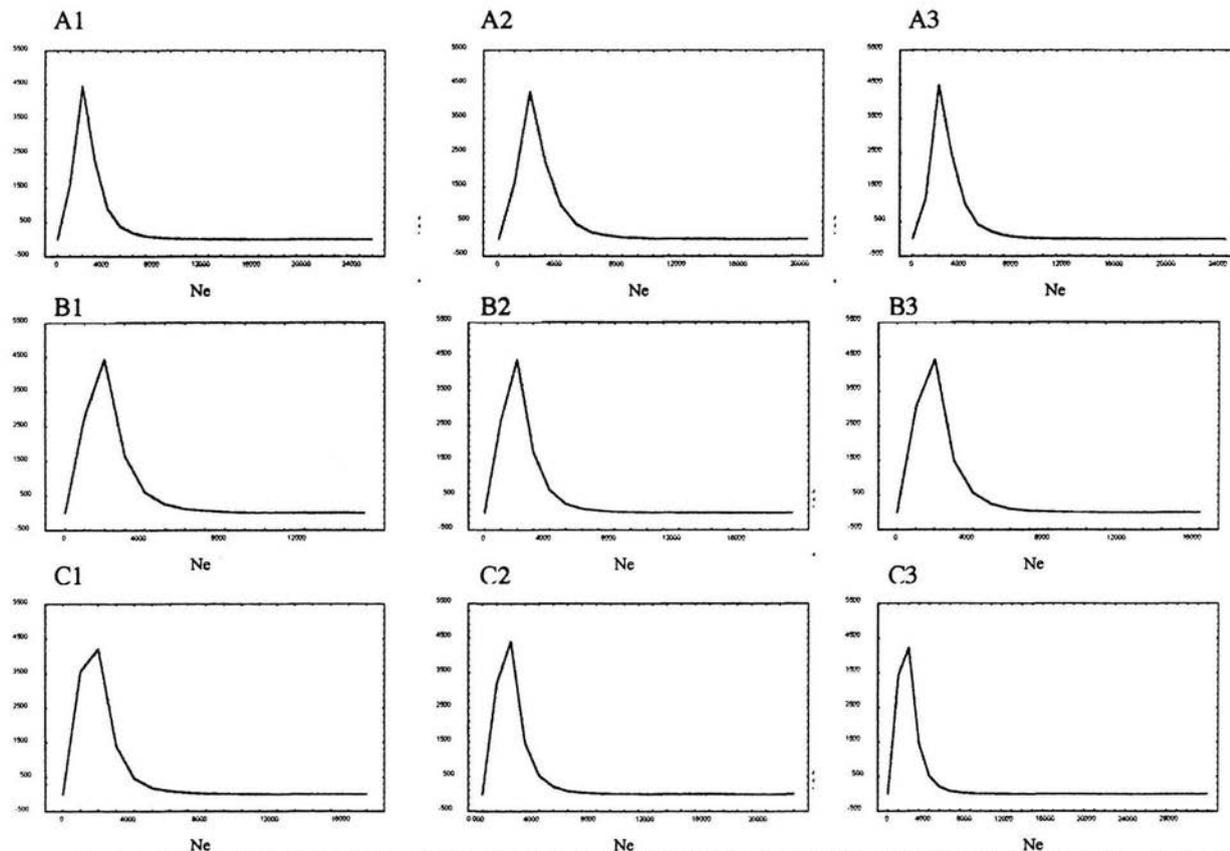


Figura 10. Distribución del tamaño efectivo (N_e) obtenida para los naptiupos formados por tres loci de microsatélites de cloroplasto (Pt 30204, Pt79951 y Pt110048) con base en 10000 réplicas de 3 distintas simulaciones, con diferentes parámetros iniciales: 1) $N = 3000$, $m = 1.5 \times 10^{-3}$; 2) $N = 10000$, $m = 3.2 \times 10^{-5}$; 3) $N = 1000$, $m = 3.2 \times 10^{-5}$. Las simulaciones se llevaron a cabo en el programa MICSAT (Wilson y Balding 1998) para A) el total de la muestra (385 individuos), B) *P. cembroides* (275 individuos) y C) *P. discolor* y *P. johannis* (100 individuos).

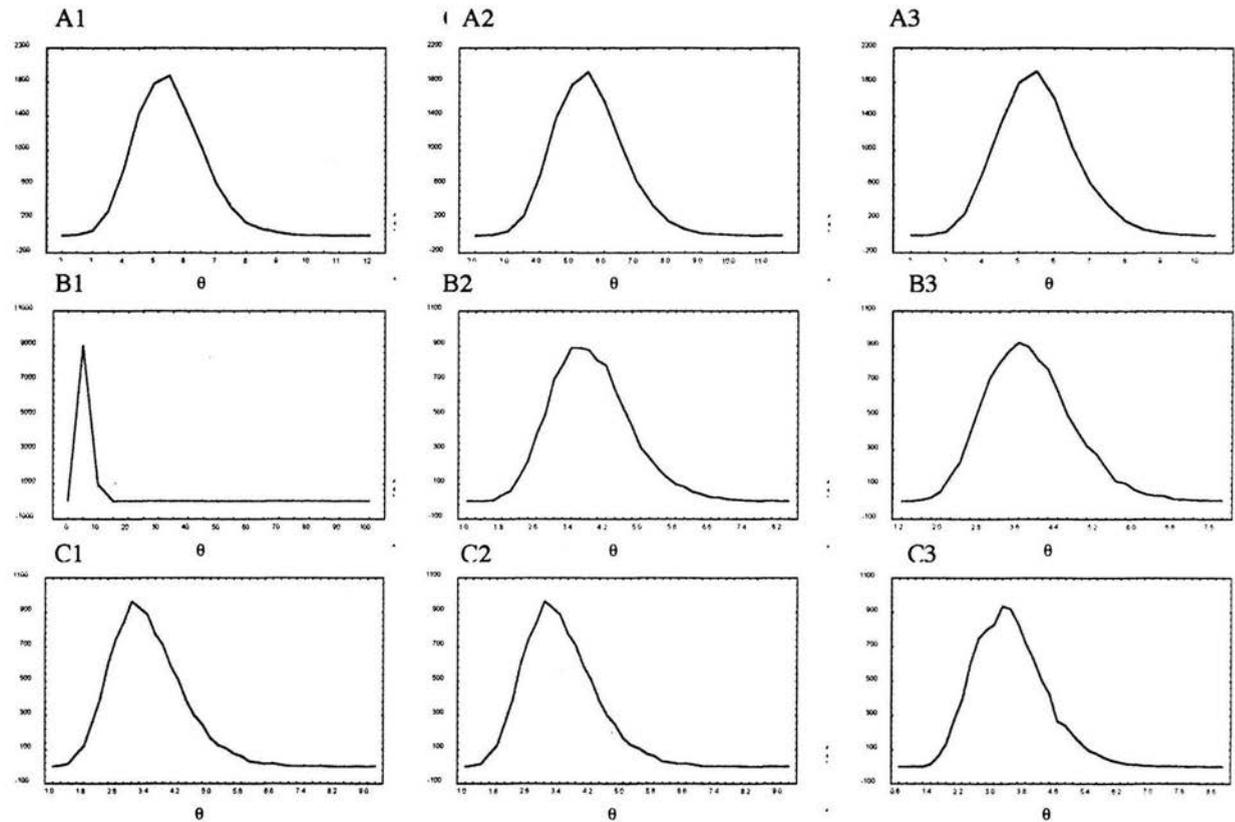


Figura 11. Distribución de theta obtenida para los haplotipos formados por tres loci de microsatélites de cloroplasto (Pt 30204, Pt79951 y Pt110048) con base en 10000 réplicas de 3 distintas simulaciones, con diferentes parámetros iniciales: 1) $N = 3000$, $m = 1.5 \times 10^{-3}$; 2) $N = 10000$, $m = 3.2 \times 10^{-5}$; 3) $N = 1000$, $m = 3.2 \times 10^{-5}$. Las simulaciones se llevaron a cabo en el programa MICSAT (Wilson y Balding 1998) para A) el total de la muestra (385 individuos), B) *P. cembroides* (275 individuos) y C) *P. discolor* y *P. johannis* (100 individuos).

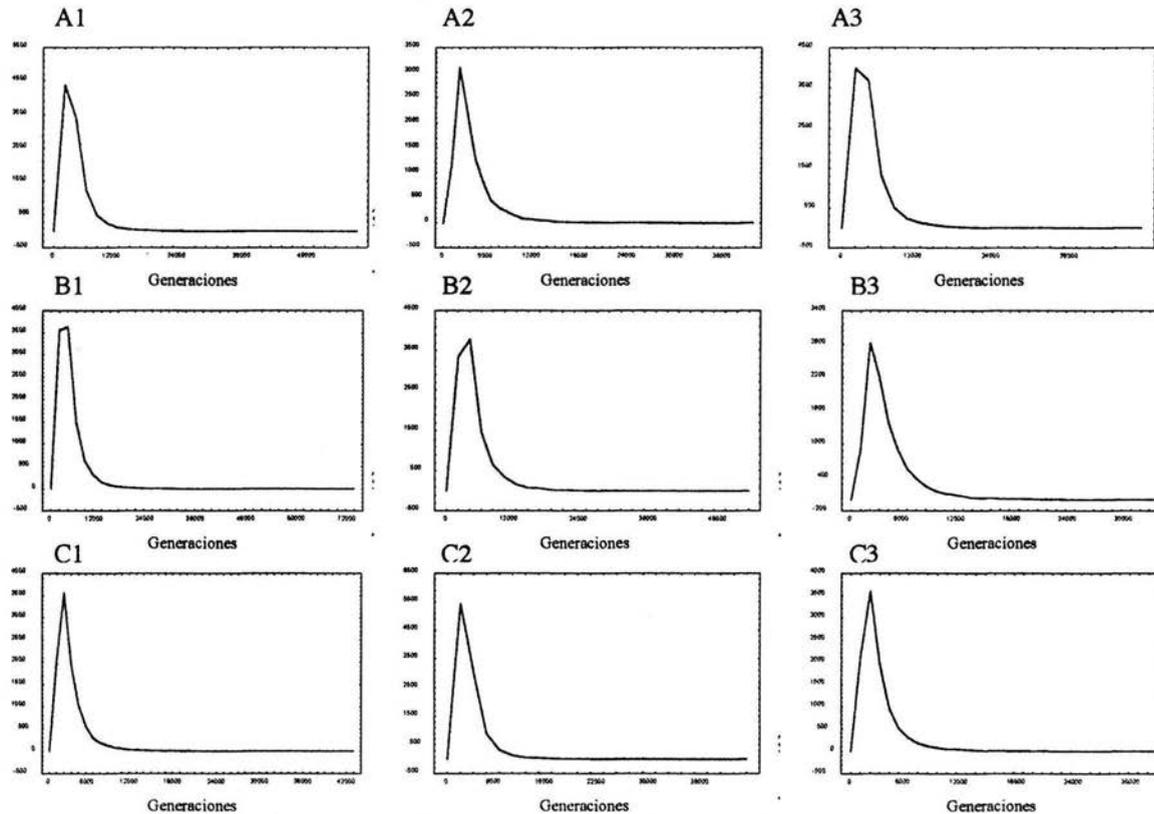


Figura 12. Distribución del tiempo al ancestro común más cercano (TACMC) obtenida para los haplotipos formados por tres loci de microsatélites de cloroplasto (Pt 30204, Pt79951 y Pt110048) con base en 10000 réplicas de 3 distintas simulaciones, con diferentes parámetros iniciales: 1) $N = 3000$, $m = 1.5 \times 10^{-3}$; 2) $N = 10000$, $m = 3.2 \times 10^{-5}$; 3) $N = 10000$, $m = 3.2 \times 10^{-5}$. Las simulaciones se llevaron a cabo en el programa MICSAT (Wilson y Balding 1998) para A) el total de la muestra (385 individuos), B) *P. cembroides* (275 individuos) y C) *P. discolor* y *P. johannis* (100 individuos).

5.6 Dinámica evolutiva de los microsatélites de cloroplasto de pinos

Para el análisis llevado a cabo con la totalidad de la muestra, se observa que el modelo que mejor se ajusta a los datos observados para los loci Pt79951 y Pt 110048 es el modelo de mutación por alelos infinitos, ya que es en este caso donde la heterocigosidad arrojada de la simulación se acerca más a la heterocigosidad observada en los datos (en el sentido de diversidad genética de Nei, 1987). Sin embargo, el modelo que mejor se ajusta a la dinámica del locus Pt 30204 es el de mutación por *stepwise* (Tabla 14). Por otro lado, cuando al análisis se lleva a cabo separando dos grupos se observa que para todos los loci el modelo que mejor se ajusta es el de alelos infinitos.

Tabla 14. Resultados arrojados por BOTTLENECK (Cornuet y Liukart 1996) con tres diferentes modelos de mutación (alelos infinitos, *stepwise* y dos fases) para tres loci de microsatélites de cloroplasto A) para 385 individuos pertenecientes a 19 poblaciones de *P. cembroides*, *P. johannis* y *P. discolor*. B) para 285 individuos de *P. cembroides*. C) Para 100 individuos del grupo *discolor/johannis*. La heterocigosidad observada se calcula como la diversidad genética de Nei (1987). Dh/sd es la heterocigosidad observada menos la esperada sobre la desviación standard. El modelo de dos fases permite que el 10% de los cambios involucren más de una unidad de repetición.

A)

Locus	Observ.	IAM			SMM			TPM		
	<i>He</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>
Pt 30204	0.535	0.363	0.188	0.917	0.555	0.122	-0.17	0.506	0.144	0.202
Pt79951	0.455	0.436	0.185	0.101	0.644	0.09	-2.1	0.59	0.121	-1.12
Pt 11004	0.595	0.582	0.151	0.101	0.78	0.051	-3.65	0.731	0.077	-1.76

B)

Locus	Observ.	IAM			SMM			TPM		
	<i>He</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>
Pt 30204	0.343	0.359	0.192	-0.08	0.564	0.114	-1.93	0.451	0.163	-0.66
Pt79951	0.139	0.364	0.188	-1.19	0.56	0.119	-3.54	0.466	0.157	-2.08
Pt 11004	0.328	0.451	0.183	-0.67	0.649	0.09	-3.57	0.545	0.137	-1.59

C)

Locus	Observ.	IAM			SMM			TPM		
	<i>He</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>	<i>He</i>	<i>SD</i>	<i>dh/sd</i>
Pt 30204	0.386	0.426	0.178	-0.22	0.587	0.107	-1.87	0.55	0.128	-1.28
Pt79951	0.078	0.319	0.182	-1.32	0.464	0.137	-2.81	0.427	0.158	-2.21
Pt 11004	0.621	0.576	0.145	0.304	0.727	0.064	-1.66	0.689	0.088	-0.77

6. DISCUSIÓN

6.1. Variación y estructura genética

En términos generales existe una alta variación genética en cada uno de los taxa, encontrándose una clara diferenciación en dos grupos, lo cual es particularmente evidente en el locus Pt79951, donde en las poblaciones de *P. cembroides* el alelo más común es de 144 pb, (con una frecuencia de entre el 70% al 100% de los individuos), mientras que en las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis* el alelo más común es el de 146 pb (presente en un 85% a 100% de los individuos), mismo que no se encuentra en ninguna de las poblaciones de *P. cembroides*. Algo similar se encuentra en el locus Pt110048, donde *P. cembroides* comparte un mismo alelo de 97 pb en frecuencias de 70 a 90%, mientras que en las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis* existe una gran cantidad de alelos para este loci (144, 145 y 146 pb) los cuales se encuentran más o menos en la misma frecuencia.

Pinus discolor es el taxon que posee los mayores niveles de diversidad, lo cual puede deberse justamente a que en las poblaciones de este taxon se puede encontrar una mezcla de haplotipos: por un lado los haplotipos que poseen los alelos mayormente representados en las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis*, y por otro lado, algunos haplotipos formados por los alelos más comunes de *P. cembroides*. Estos haplotipos son poco frecuentes (0.5%) y no se encuentran en ninguna de las poblaciones de *P. johannis*, ni siquiera en la única población donde *P. cembroides* subesp. *cembroides* y *P. johannis* conviven en simpatria. Cuando se lleva a cabo un análisis de varianza se encuentra que el 10% de la variación se encuentra entre los grupos de *P. discolor* y *P. johannis*, mientras que el 15% de la variación genética se encuentra entre las poblaciones al interior de los taxa. Debido a que la variación es mayor al interior de los taxa que entre estos, se decidió agrupar a *P. discolor* y *P. johannis* dentro de un mismo grupo. Esto es congruente con lo mencionado previamente por algunos autores (Romero *et al.* 1996, Romero *et al.* 2000) que afirman no hay una división entre estos

dos taxa y que *Pinus discolor* no existe en realidad, siendo un sinónimo de *P. johannis* Passini, nombre que se conserva por prioridad nomenclatural.

Por otro lado, la variación genética promedio encontrada en *P. cembroides* es alta en general, aunque menor a la encontrada en el grupo formado por *P. discolor* y *P. johannis*. Esto es ocasionado, en parte, por la existencia de algunas poblaciones con muy baja variación, como Ajalpan y San Buenaventura, pues dentro de este grupo existen poblaciones como Saltillo y Yugari, cuya variación genética es de la misma magnitud que la variación encontrada en *P. discolor*. Los valores de variación genética obtenidos para estos grupos son consistentes con lo que se ha encontrado en estudios previos en otras especies de pinos, utilizando microsatélites de cloroplasto. Por ejemplo, para el grupo cembroides ($He = 0.588$), los niveles de variación obtenidos son similares a los de *P. halepensis* ($He = 0.596$, Morgante et al. 1997), *P. resinosa* ($He = 0.568$, Echt et al. 1998) y *P. nelsonii* ($He = 0.531$, Cuenca et al. En prensa). Estos valores son sólo un poco menores a los encontrados en el grupo discolor/johannis ($He = 0.68$), *P. pinaster* ($He = 0.72$, Vendramin et al. 1998) y *P. pinceana* ($He = 0.78$, Escalante 2001).

A pesar de las claras diferencias en el número de haplotipos dentro de las poblaciones de *P. cembroides*, no se encontraron diferencias considerables en su composición genética ($F_{st} = 0.043$). Esto es ocasionado a la presencia de un haplotipo muy común que se encuentra en altas frecuencias dentro de todas las poblaciones que conforman este grupo, mientras hay una gran cantidad de haplotipos con frecuencias menores al 1%. Este mismo patrón de un haplotipo presumiblemente ancestral presente en todas las poblaciones se ha encontrado en otras especies de pinos piñoneros como *P. nelsonii* (Cuenca et al. En prensa), sin embargo, en este caso se trata de una especie con un área de distribución restringida, mientras que el *P. cembroides* se encuentra ampliamente distribuido, siendo de hecho el pino piñonero de más amplia distribución en México. A pesar de lo anterior, en general no se encontró una asociación significativa entre la distancia geográfica de las poblaciones y su diferenciación genética. El índice de fijación al interior de este grupo es menor a lo encontrado con otras especies de pinos ($R_{st} = 0.02$, $F_{st} = 0.04$) como por ejemplo *P. leucodermis* ($G_{st} = 0.22$, Powell et al. 1995) y *P.*

resinosa ($G_{st} = 0.12$, Echt et al. 1998), *P. nelsonii* ($R_{st} = 0.05$, $F_{st} = 0.14$, Cuenca et al. En prensa), *P. pinceana* ($R_{st} = 0.94$, $F_{st} = 0.76$, Escalante 2001), *P. pseudostrobus* ($R_{st} = 0.17$, $F_{st} = 0.15$, Delgado et al, 2002) y *P. montezumae* ($R_{st} = 0.26$, $F_{st} = 0.27$, Delgado et al. 2002). Por otro lado, los índices de diferenciación encontrados en el grupo *discolor/johannis* ($R_{st} = 0.21$ y $F_{st} = 0.13$) son muy parecidos a los encontrados en otros pinos indicando una divergencia más antigua de las poblaciones, donde ya se alcanzó el equilibrio entre migración y deriva necesario para que un modelo de *stepwise* detecte la estructura genética.

Dentro de *P. cembroides* es particularmente importante el hecho de que no parece existir una diferenciación clara entre las distintas subespecies, siendo imposible distinguir genéticamente entre ellas. Esto a pesar de las diferencias en la composición química de sus monoterpenos, ya que la subespecie *lagunae* utiliza sabinenos mientras las otras dos subespecies (*cembroides* y *orizabensis*) utilizan α -pirenos (Zabarin y Sanjberck 1985). Los resultados genéticos encontrados aquí concuerdan con lo encontrado por Gernandt et al. (En prensa) utilizando *matK* y al combinar la información de *rpl16*, *rbcL* y *matK*. En estos árboles se muestra una politomía entre las tres subespecies, debido a la falta de variación de estos marcadores. Esto lleva a la conclusión de que no es correcto separar a *P. cembroides* subesp. *lagunae* como una especie diferente (*P. lagunae*), como lo proponen algunos autores (Passini 1987, Perry 1991). Por otro lado, a pesar que la composición de monoterpenos en *P. cembroides* subesp. *lagunae* sea idéntica a la encontrada en *P. johannis*, los análisis de varianza molecular y la red de haplotipos, indican que estos pertenecen a distintos linajes genéticos.

La clara división entre el linaje de *P. cembroides* y el de *P. discolor* y *P. johannis*, se ve sustentada por los análisis de varianza, los cuales muestran que el 88.9 % de la variación se encuentra entre estos dos linajes. Esta división se observa también en los dendogramas independientemente del método de estimación de distancia que se utilice.

Lo anterior es congruente con estudios previos donde, ya sea con base a sus características ecológicas (Romero et al. 1996) o utilizando caracteres morfológicos y un enfoque feneticista, se encuentra una clara diferenciación entre *P. cembroides* y *P. johannis* (Romero et al. 2000).

Por otro lado, las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis* no forman un grupo tan homogéneo, principalmente debido a la población de San Miguelito, la cual parecería ser bastante lejana al resto de las poblaciones que forman este clado. Esto en parte pudiera deberse a que en esta población se encuentran algunos haplotipos no presentes en el resto de las poblaciones del grupo *discolor/johannis*, los cuales parecerían acercar esta población a *P. cembroides*. La presencia de estos haplotipos pudiera estar ocasionada por algún fenómeno de introgresión, lo cual ha sido documentado en algunas especies de pinos (Matos y Schaal 2000, Delgado 2002). Las distancias genéticas entre las poblaciones de *P. discolor* y *P. johannis* son considerablemente mayores a las presentes entre las poblaciones de *P. cembroides*, debido a que son más heterogeneas genéticamente; sin embargo, cabe resaltar que las poblaciones de *P. johannis* son más similares entre sí, formando un grupo parafilético con respecto una población de *P. discolor* (Juárez en Chihuahua). En los estudios previos realizados por Gerandt et al. (En prensa), se observa como al utilizar *matK* el individuo de *P. discolor* proveniente de San Miguelito (S.L.P.), se asocia como el clado hermano de *P. cembroides*, mientras el segundo el otro individuo de *P. discolor* se asocia con *P. johannis* y *P. culminicola*. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en la red de haplotipos donde se observa que, dentro del grupo *discolor/johannis* los haplotipos más cercanos a *P. cembroides*, o compartidos con este, se encuentran exclusivamente en las poblaciones de *P. discolor*, particularmente en San Miguelito (ver más adelante). Por otro lado, los análisis de AMOVA no muestran diferencias significativas entre *P. discolor* y *P. johannis*, sin embargo, las distancias genéticas muestran una división entre las poblaciones de ambos taxa. Esta discrepancia puede estar causada en parte por la población de la Amapola. Al llevar a cabo los dendogramas, esta población se agrupa a las otras poblaciones de *P. johannis*, sin embargo, cuando se estima el índice de fijación pareado y el número de migrantes entre poblaciones, se encuentra que la Amapola es

mucho más cercana a las poblaciones de *P. discolor*, existiendo un flujo genético restringido con las otras poblaciones de *P. johannis*, lo cual se ve sustentado por el análisis de clados anidados.

Una limitante de este estudio es que no se incluyeron poblaciones de *P. culminicola*, por lo que no se muestreo el grupo monofilético donde se encuentra *P. johannis* y *P. discolor*, según los árboles obtenidos con tres genes de cloroplasto (Gernandt *et al.* En prensa). Esto es debido a que cuando se diseñó este trabajo no se contaba con los resultados de los genes de cloroplasto, sin embargo, para tener un panorama más completo de la evolución de este grupo, es imprescindible incluir los haplotipos propios de *P. culminicola*.

6.2 Redes de haplotipos y análisis de clados anidados

6.2.1 Relaciones genealógicas

Según el análisis de clados, anidados el haplotipo 25 es el que cuenta con mayor probabilidad de ser el haplotipo ancestral para el total de la muestra. Este haplotipo es el que se encuentra más ampliamente distribuido y con mayor frecuencia dentro del grupo *discolor/johannis*, pero no está presente en *P. cembroides*. Según este escenario el grupo formado por *P. discolor* y *P. johannis* sería más antiguo, originándose posteriormente *P. cembroides*. Sin embargo, si sólo se toman en cuenta los haplotipos encontrados dentro de *P. cembroides*, se observa que el haplotipo ancestral es el número 7, lo cual coincide con que este es uno de los pocos haplotipos (junto con el número 1 y el 6) que se encuentran compartidos con *P. discolor*. De cualquier forma este fenómeno también pudiera ser consecuencia de algún fenómeno posterior a la divergencia de los grupos, como sería el caso de introgresión en estas poblaciones. Si se considera que el haplotipo 25 es el más antiguo, se observa como este dio origen a dos clados distintos, uno donde sólo se encuentran haplotipos de *P. discolor* y *P. johannis* (excepto por el haplotipo 16 que pudiera ser un fenómeno de introgresión en la población donde conviven en simpatria *P. cembroides* y *P. johannis*) y otro clado mixto,

donde los haplotipos más basales son los de *P. discolor* y *P. johannis*, mientras los derivados son los de *P. cembroides*.

El pensar que *P. cembroides* más reciente y divergió hace menos tiempo concuerda con lo obtenido con los análisis de distancia genética y los dendogramas, pudiendo suponer que no a ocurrido tiempo suficiente para que las poblaciones diverjan considerablemente, a pesar de las grandes distancias que las separan. Esto es congruente con que los haplotipos encontrados en el grupo *discolor/johannis* son más divergentes entre sí que los haplotipos encontrados en *P. cembroides*. Estos resultados coinciden con lo encontrado con Zavarin y Snaberck (1985 y 1986) al estudiar la composición de los monoterpenos presentes en estas taxa. En estos estudios se observa que las poblaciones de *P. johannis* presentan exclusivamente monoterpenos del tipo sabinenos, mientras que las poblaciones de *P. discolor* presentan sabinenos en mayor cantidad, pero también suelen tener pirenos. Por otro lado, *P. cembroides* subesp. *cembroides* y *P. cembroides* subesp. *orizabensis* presentan pirenos exclusivamente. Estos autores sugieren la existencia de un taxa ancestral que ocupó el altiplano mexicano y que, como respuesta a el clima más húmedo y frío del Pleistoceno, fue moviéndose hacia el norte, siendo los relictos donde se dio lugar a la diferenciación de las poblaciones. Los autores sugieren también que las poblaciones de *P. johannis* en Zacatecas son las más similares a estos ancestros y por lo tanto, las más antiguas, mientras las poblaciones de San Luis Potosí divergieron posteriormente.

El análisis de clados anidados permite observar un par de fenómenos interesantes en la población de San Miguelito (SLP). En primer lugar, dentro del grupo *discolor/johannis*, es la población que se encuentra más lejana genéticamente, quedando fuera del clado monofilético formado por todas las demás poblaciones del grupo. Esta es la población que comparte más haplotipos con el *P. cembroides* (de hecho sólo San Miguelito y Juárez comparten haplotipos con *P. cembroides*), siendo estos haplotipos compartidos bastante lejanos a los haplotipos propios del grupo *discolor/johannis*. Si aunamos estos resultados a lo encontrado por Gernandt *et al.* (En prensa), parecería encontrarse evidencia de algún fenómeno de introgresión en esta población y de flujo genético

limitado con el resto de las poblaciones de este grupo. También pudiera ser que los haplotipos 1, 6 y 7 fueran una reminiscencia de la composición genética anterior a la divergencia entre los dos grupos. Esto coincide otra vez con lo encontrado con la composición de monoterpenos, donde las poblaciones de *P. discolor* comparten monoterpenos tanto con *P. johannis* como con *P. cembroides* (Zavarín y Snaberk 1985 y 1986). Sin embargo, hace falta realizar un estudio más detallado con las pruebas estadísticas pertinentes para detectar este tipo de fenómenos.

En el clado 3-3 se encuentran únicamente haplotipos del grupo *discolor/johannis*, excepto por el haplotipo 16, el cual fue encontrado en un individuo de *P. cembroides* en la población de Mazapil. Cabe señalar que es en esta población donde *P. cembroides* y *P. johannis* conviven en simpatria y que este haplotipo forma un clado con el haplotipo 28, el cual únicamente se encuentra en la población de *P. johannis* en Mazapil. Existe la posibilidad de que el haplotipo 16 se encuentre en *P. cembroides* debido a un fenómeno de introgresión, y podría ser que también se encuentre en *P. johannis* y que, debido a su baja frecuencia no haya sido muestreado. Sin embargo, esta hipótesis tiene dos desventajas: la primera es que involucra a un haplotipo bastante raro, lo cual hace difícil la introgresión, pues es entre los haplotipos más comunes donde se tiene mayor probabilidad de encontrar este fenómeno. La segunda desventaja es que en estudios previos se ha reportado que no existe hibridación entre estos dos grupos (al menos en esta población), por la imposibilidad de encontrar individuos fenotípicamente intermedios (Zavarín y Snaberk 1986, Romero 1996). Por lo anterior, sería conveniente repetir la caracterización genética de este individuo y así descartar cualquier error metodológico. Adicionalmente, cabe señalar que el análisis de clados anidados y asociación geográfica no permite diferenciar claramente este tipo de fenómenos de introgresión, debido a que trabaja con asociaciones geográficas sin hacer diferencias entre los taxa involucrados, por lo que si dos haplotipos se encuentran en poblaciones simpátricas, como sería el caso de Mazapil, y existe un fenómeno de introgresión, entonces el programa no detecta ninguna asociación entre haplotipos, debido a la cercanía de las poblaciones, ya que no puede identificar que ambas poblaciones pertenecen a distintos taxa. Esto hace necesario que también para este caso se realicen

las pruebas diseñadas específicamente para detectar fenómenos como hibridación e introgresión.

El evento más antiguo detectado por el análisis de asociación geográfica es una fragmentación alopátrica entre tres distintos clados, el clado 3-3 con haplotipos exclusivos de *discolor/johannis*, (excepto por el haplotipo 16, lo cual ya se discutió con anterioridad), el clado 3-2 con haplotipos exclusivos de *P. cembroides* y el clado 3-1 con una mezcla de haplotipos tanto de *P. cembroides* como de *P. discolor* y *P. johannis*. Dentro de este último grupo se observa que, después de esta fragmentación se siguió una dinámica de flujo genético restringido y aislamiento por distancia, lo cual también ocurre en un subgrupo del clado 3-3. En este caso el fenómeno es un poco más reciente que en el caso anterior y parecería que hay intercambio de migrantes entre las poblaciones del norte de San Luis Potosí (Lajas) y la población de Zacatecas (Mazapil), mientras hay poco flujo genético con las poblaciones más lejanas como Juárez o aisladas como la Amapola. Cabe resaltar que es entre estas mismas poblaciones donde posteriormente se detecta una fragmentación, la cual puede tener como consecuencia un limitado flujo genético. En general dentro del grupo *discolor/johannis* se detecta una ampliación gradual del área de distribución la cual es un fenómeno relativamente reciente. Este mismo resultado se obtiene al hacer el análisis tomando en cuenta únicamente los haplotipos de este grupo; donde todos los clados que muestran asociación geográfica indican una expansión gradual del área hacia zonas continuas.

Cuando se analizan las asociaciones existentes dentro del clado con los haplotipos compartidos (clado 3-1), se encuentra una dinámica muy antigua de flujo genético restringido y aislamiento por distancia, además de una fragmentación alopátrica entre las poblaciones de San Miguelito y de Juárez, ambas de *P. discolor*. Por otro lado, en el caso de los haplotipos exclusivos de *P. cembroides*, se observa una dinámica de aislamiento por distancia y una fragmentación antigua entre las poblaciones del norte de la Sierra Madre Oriental en Saltillo y las poblaciones ubicadas en Querétaro y Veracruz. Esta fragmentación es de particular importancia debido a que ha sido

encontrada previamente en *P. pinceana* (Escalante 2001), indicando así la presencia de algún tipo de barrera física en la parte sur de la Sierra Madre Oriental.

6.2.2 Fragmentaciones antiguas

Como se mencionó anteriormente, fue posible detectar algunas fragmentaciones importantes (Figura 11): 1) entre las poblaciones de Zacatecas y el norte de San Luis Potosí con las poblaciones del sur de San Luis Potosí pertenecientes al clado *discolor/johannis*, 2) entre las poblaciones de *P. discolor* ubicadas en San Luis Potosí y Sonora y 3) entre la población de Saltillo y el las de Querétaro y Veracruz. A pesar que no existe una ubicación más precisa sobre donde se originan estas fragmentaciones, o más claramente, sobre las posibles barreras geográficas, se puede observar que la fragmentación norte-sur parecería ubicarse en San Luis Potosí, separando de esta forma las poblaciones del sur de Coahuila, norte de Zacatecas y norte de San Luis Potosí por un lado, y las poblaciones del Sur de San Luis Potosi, Querétaro y Veracruz por el otro, lo cual a su vez coincide con lo encontrado en *P. pinceana* por Escalante (2001), donde las poblaciones ubicadas en Coahuila son muy distintas genéticamente a las encontradas en el norte de San Luis Potosí ($F_{st} = 0.53 - 0.57$) y estas a su vez muy distintas a las encontradas en Querétaro e Hidalgo ($F_{st} = 0.75 - 0.83$). Esto a su vez es congruente con las diferencias en la composición química entre las poblaciones del grupo *discolor/johannis* ubicadas en Zacatecas y el norte de San Luis Potosí (Mazapil), con las ubicadas en el sur de San Luis Potosí (la Amapola y San Miguelito, Zavarín y Snaberk 1986).

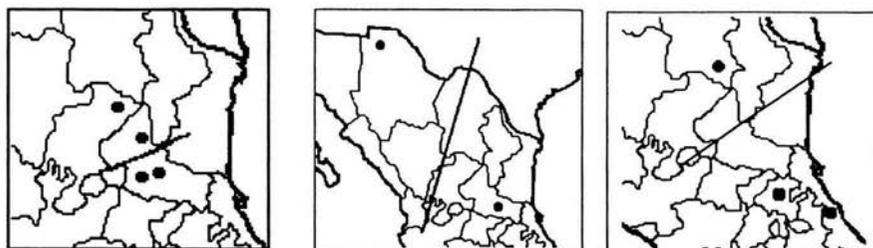


Figura 11. Fragmentaciones antiguas encontradas en el análisis de clados anidados con el programa GeoDis (Posada et al. 2000). A) Fragmentación entre las poblaciones de Zacatecas (Mazapil) y Norte de San Luis Potosí (Lajas) y las poblaciones del sur de San Luis Potosí (Amapola y San Miguelito) en el grupo *discolor/johannis*. B) Fragmentación encontrada entre las dos poblaciones de *P. discolor*: San Miguelito en San Luis Potosí y Juárez en Sonora. C) Fragmentación encontrada en el *P. cembroides* entre Saltillo y el Madroño y Frijol Colorado en Querétaro y Veracruz respectivamente.

6.2.3 Flujo genético restringido y aislamiento por distancia

El aislamiento por distancia puede ser estudiado de varias maneras. Una de las pruebas más comunes es llevar a cabo una correlación entre distancia genética y geográfica, o de distancia geográfica contra el número de migrantes. Como ya se mencionó con anterioridad, para ninguno de los taxa estudiados aquí se obtuvieron resultados significativos con este tipo de aproximación. Una segunda alternativa es la aplicación del análisis de clados anidados para detectar fenómenos de flujo genético restringido entre los distintos grupos de haplotipos.

Al utilizar esta estrategia, se detectaron tres momentos históricos donde ha existido flujo genético restringido. El más antiguo de estos involucra uno de los clados más inclusivos (3-1), donde se encuentran haplotipos tanto de *P. cembroides* como de *P. discolor*, y que presumiblemente ocurrió posteriormente a la fragmentación alopatrica ocurrida entre los dos grandes grupos. Posteriormente se encuentra este mismo fenómeno dentro del grupo formado por *P. discolor* y *P. johannis* (clado 2-3), y finalmente, en épocas más recientes, dentro de un clado de *P. cembroides* (1-2). Este último resultado podría ser sorprendente debido a la falta de aislamiento por distancia o estructura genética encontradas en otros análisis, lo cual sugiere que podría tratarse de una dinámica muy reciente o en vías de establecimiento.

6.3 Parámetros históricos de las poblaciones y análisis de coalescencia

Por un lado se observa la imposibilidad de llevar a cabo la distribución *mismatch* con base en alelos infinitos, esto porque una de las limitantes del análisis es que se necesita una muestra donde la varianza sea mayor que la media (ver Apéndice II), lo cual no se cumple en este caso, ni para los haplotipos encontrados en *P. cembroides*, ni en el interior del grupo formado por *P. discolor* y *P. johannis*. Ante esta imposibilidad, se decidió estimar las diferencias absolutas en tamaño entre haplotipos y con base a estas diferencias se llevó a cabo el análisis de distribución. En este caso se observa que la theta ancestral es 4.25 veces mayor en el caso del grupo formado por los haplotipos de *P. discolor* y *P. johannis* que en los haplotipos de *P. cembroides* ($\theta_0 = 0.228$ y $\theta_0 = 0.971$ respectivamente), lo cual nos da información directa sobre sus diferencias en el tamaño poblacional, ya que es lógico asumir una tasa de mutación similar de estos marcadores entre ambos grupos de haplotipos. Por otro lado, si comparamos las thetas actuales, estimadas a partir de la variación genética, se observa este mismo patrón; sin embargo, en este caso la theta encontrada en grupo de *P. discolor* y *P. johannis* es únicamente 2.3 veces mayor que la encontrada en *P. cembroides* (2.637 y 1.123 respectivamente). Esto nos indica que en aproximadamente el mismo tiempo (debido a que los estimados de tau son muy similares $\tau = 2N\mu = 0.622$ para el grupo de *P. discolor* y *P. johannis* y $\tau = 2N\mu = 0.677$ para *P. cembroides*), *P. cembroides* ha crecido cerca del doble de lo que lo ha hecho el grupo *discolor/johannis* (5 veces contra 2.7 veces en *P. discolor* y *P. johannis*).

Por otro lado, los valores de theta calculados en este análisis son similares a los valores obtenidos a partir de las simulaciones llevadas a cabo con MicSat (Wilson and Balding 1998). En estas simulaciones se encuentran valores de aproximadamente 5.28 para el total de la muestra, mientras que en el caso de *P. cembroides* y el grupo de *P. discolor* y *P. johannis* los valores son de $\theta_0 = 3.76$ y 3.33 respectivamente. Por otro lado, se observa un solapamiento en los intervalos del 95% de confianza de los parámetros obtenidos en las simulaciones, por lo que se puede suponer que sólo existen ciertas mínimas diferencias entre los árboles estimados para ambos grupos. En las

distribuciones obtenidas es posible observar como se pierde precisión al tratar de estimar los distintos componentes de theta, sin embargo, es posible llegar a ciertas conclusiones, como por ejemplo, la tasa de mutación promedio obtenida para las distintas simulaciones es de 1.4 a 1.7×10^{-3} por loci por generación. Estos valores no varían mayormente entre los grupos y son considerablemente mayores que los reportados previamente para estos mismos marcadores con otros métodos de estimación para *P. torreyana* (Provan *et al.* 1999). Aún si se toma en cuenta el 95% de los datos obtenidos, los valores más pequeños para la tasa de mutación son de aproximadamente 4×10^{-4} , lo que es cerca de un orden de magnitud mayor a la tasa de mutación obtenida por Provan *et al.* (1999) para *P. torreyana* (3.2 a 7.9×10^{-5}). Por otro lado, los valores obtenidos coinciden con lo reportado previamente por Marshall *et al.* (2002), donde con el mismo enfoque obtienen tasas de mutación de aproximadamente 3.7×10^{-3} para 6 loci de microsatélites de cloroplasto en *P. contorta*; sin embargo, cabe señalar que en este último caso los loci utilizados eran secuencias hipervariables con repeticiones de dinucleótidos, mientras que aquí se utilizaron repeticiones de un sólo nucleótido.

Los estimados de tamaño efectivo son bastante similares entre los grupos de *P. discolor* y *P. johannis* y de *P. cembroides*: aproximadamente 1750 individuos para *P. cembroides* y 1580 individuos para el grupo *discolor/johannis*. Sin embargo, aquí también se sobrelapan los intervalos de confianza para ambos estimados; como sucede también en el caso de las distribuciones de probabilidad para el tiempo al ancestro común más cercano. En este último caso parecería que el análisis de coalescencia arrojará resultados contradictorios respecto a la red de haplotipos, pues indica que el grupo *cembroides* divergió cerca de 500 generaciones antes que el total de la muestra (alrededor de hace 3,500 generaciones), mientras que el grupo de *P. discolor* y *P. johannis* divergió mucho tiempo después (cerca de 2,500 generaciones). Esto se puede explicar debido a la falta de precisión de la distribución de probabilidades, ya que el intervalo de confianza para el tiempo de coalescencia del grupo *cembroides* va de 700 a 12,000 generaciones, lo cual da un margen de error considerable. Por otro lado, los

tiempos de coalescencia obtenidos aquí un poco mayores que los obtenidos por Marshall *et al* (2002) en *P. contorta* (al rededor de 1500 generaciones).

A pesar de la amplitud de los intervalo de confianza de las distintas distribuciones de probabilidades, se puede llegar a distintas conclusiones: 1) el tamaño efectivo de estos grupos no es particularmente grande (menor de 2000 individuos) por lo que los altos niveles de variación genética se encuentran dados principalmente por las altas tasas de mutación de los marcadores. Adicionalmente, el tamaño efectivo de estos grupos es considerablemente menor al reportado previamente con este mismo método para *P. contorta* (3,500 individuos, Marshall *et al.* 2002). 2) las tasas de mutación pueden ser bastante más elevadas de lo que se había considerado previamente por algunos autores como Provan *et al.* (1999). 3) debido a que un modelo de coalescencia clásico nos da información de los dos parámetros anteriores (N y μ) sólo a través de su producto (θ), es mas acertado llevar a cabo comparaciones con este último estimador (Wilson y Balding 1998), el cual es entre 6 y 8 veces menor a lo encontrado con este mismo método en *P. contorta* (24.6, Marshall *et al.* 2002), 4) debido a que las unidades en las cuales se mide el tiempo en un modelo de coalescencia clásico dependen del tamaño efectivo de las poblaciones, la falta de coincidencia en los tiempos de divergencia de los distintos grupos podría estar dada también por una falta de resolución en el estimador de tamaño efectivo. Por otro lado, para llevar a cabo comparaciones en el tiempo de divergencia entre los grupos también se tiene que tomar en cuenta los distintos tiempos generacionales. En este caso y basándose en el trabajo demográfico de Suzán-Aspiri *et al.* (2001), se asumió un tiempo de 20 años por generación para ambos grupos, lo cual nos arroja tiempos de coalescencia de aproximadamente 62150 (12480 - 214000) años para el total de la muestra, de 67250 (13440 - 243140) años para *P. cembroides* y de 48560 (9560 - 166060) años para el grupo de *P. discolor* y *P. johannis*.

6.4 Homoplasia en microsatélites de cloroplasto

Debido a que los microsatélites se han caracterizado por una alta tasa de generación de nuevas variantes, generalmente se asume que presentan elevados niveles de

homoplasia. Esto es particularmente cierto en el caso de un locus con mutación tipo *stepwise*, donde teóricamente existe la misma probabilidad de ganar que de perder una unidad de repetición, por lo que si se presentan dos mutaciones en una variante, esta nueva variante tiene un 50 % de probabilidades de regresar al estado ancestral (Li 1997). Por otro lado, la probabilidad de homoplasia aumenta también debido a las restricciones al tamaño que pueden alcanzar los distintos alelos, lo cual es un fenómeno sumamente común (Nauta y Weissing 1996, Xu *et al.* 2000). Sin embargo, el grado de homoplasia que presenten los marcadores esta determinado directamente por theta, ya que combina información referente tanto a la tasa de mutación como al tamaño poblacional a largo plazo ($\theta = 2N\mu$ en el caso de marcadores haploides). La magnitud de theta está directamente relacionada a la cantidad de homoplasia que se esperaría en una muestra determinada (Estoup *et al.* 2002). Lo anterior es de particular importancia en el caso de la utilización de marcadores hipervariables, como los microsatélites de cloroplasto, y nos permite suponer que, a pesar de la elevada tasa de mutación, el grado de homoplasia no será importante si se cuenta con tamaños poblacionales pequeños, como en el caso del *P. cembroides*, *P. discolor* y *P. johannis*.

Un segundo indicador de la importancia que cobra la homoplasia en las reconstrucciones filogeográficas llevadas a cabo con microsatélites de cloroplasto, tiene que ver con el modelo de mutación al cual se ajusten estos marcadores. Dentro de este grupos en particular los resultados obtenidos por las simulaciones (Cornuet & Luikart 1996) indican que los marcadores se ajustan mejor a un modelo de mutación por alelos infinitos, lo cual refuerza la confianza en las reconstrucciones filogeográficas obtenidas, ya que bajo este modelo de mutación la probabilidad de homoplasia disminuye considerablemente.

6.5 Evolución de microsatélites de cloroplasto de pinos

En general se observa que los marcadores se ajustan mejor a un modelo de alelos infinitos que a un modelo de *stepwise*, ya sea en su forma más estricta o permitiendo una proporción de cambios (10%) donde se ganen o pierdan más de una unidad de

repetición (modelo de dos fases). Esto mismo fue encontrado en *Pinus nelsonii* utilizando microsatélites de cloroplasto (Cuenca *et al.* En prensa), mientras que cuando se lleva a cabo este análisis con los datos de *Pinus pincena*, obtenidos de Escalante (2001) se observa que el mejor modelo para predecir el comportamiento de los marcadores es el de *stepwise*. Existe un tercer caso, publicado por Marshall *et al.* (2002) para *P. contorta*, donde se observa un mejor ajuste con el modelo de dos fases, con un 70% de las mutaciones ocurriendo en un estricto *stepwise*. En este último caso los microsatélites utilizados, a pesar de también ser de cloroplasto, están constituidos por dos unidades de repetición y poseen tamaños un orden de magnitud mayores que los loci utilizados en todos los otros ejemplos. Esto cobra cierta importancia debido a que, como se ha demostrado ampliamente, los microsatélites poseen ciertas restricciones a la creación de nuevas variantes alélicas, las cuales tienen relación directa con el tamaño de los alelos.

Sin embargo, más importante que las restricciones a la mutación son las diferencias intrínsecas a la historia de los distintos grupos, particularmente el tiempo de divergencia de las poblaciones. Goldstein (1995) ha demostrado que los índices basados en un modelo de mutación por *stepwise* necesitan al menos 500 generaciones después de la divergencia para poder detectar correctamente la estructura genética de las poblaciones. Lo mismo fue descrito previamente para *P. albicaulis*, donde al utilizar un modelo de mutación por alelos infinitos (F_{ST}) se logra detectar estructura genética en poblaciones alopátricas o de reciente divergencia de una manera más eficiente que utilizando un modelo de mutación por *stepwise* (R_{ST} , Richardson *et al.* 2002). El mismo patrón se ha observado en dos especies de ovejas, *Ovis aries* y *O. canariensis* (Forbes *et al.* 1995) y en una ardilla (*Sorex araneus*, Lugon-Moulin *et al.* 1999), donde R_{ST} fue un mejor predictor de divergencia de las poblaciones en casos de divergencias profundas, como es el caso de dos razas o especies cercanas, mientras F_{ST} parece ser más sensible a detectar diferenciación intraespecífica o eventos de divergencia recientes. Esto coincide con lo encontrado dentro de *P. cembroides*, donde se encuentra una mayor diferenciación entre las poblaciones al utilizar un modelo de alelos infinitos ($F_{ST} = 0.043$), mientras que en el grupo de *P. discolor* y *P. johannis* parecería funcionar mejor

un modelo de mutación por *stepwise* ($R_{ST} = 0.21$). Esto coincide con la idea general de que el grupo de *P. discolor* y *P. johannis* es más antiguo que *P. cembroides*.

7. CONCLUSIONES

1) La variación genética encontrada en el total de muestra de 385 pertenecientes a 19 poblaciones de 5 diferentes taxa, se divide en dos grupos claramente identificados, por un lado *P. cembroides* (*P. cembroides* subesp. *cembroides*, *P. cembroides* subesp. *orizabensis* y *P. cembroides* subesp. *lagunae*) forman un grupo genéticamente distinto del formado por *P. discolor* y *P. johannis* ($R_{ct} = 0.83$, $F_{ct} = 0.56$). Estos dos grupos comparten únicamente tres haplotipos de los 31 haplotipos encontrados. Todos los haplotipos compartidos se encuentran en las poblaciones de *P. discolor*, mientras las poblaciones de *P. johannis* no comparten ningún haplotipo con *P. cembroides*.

2) Si se toma en cuenta la posición de las secuencias de *P. discolor* en el árbol filogenético obtenido utilizando *matK* (Gernandt *et al.* En prensa), así como sus características químicas (monoterpenos, Zavarin y Snaberk 1985, 7 1986) y morfológicas, intermedias entre *P. cembroides* y *P. johannis*, aunado a los resultados genéticos encontrados en este estudio, se podría pensar en *P. discolor* como un posible híbrido entre *P. cembroides* y *P. johannis*, o que por lo menos, existieron fenómenos de hibridación en el pasado entre estos grupos. Sin embargo, se necesitan llevar a cabo pruebas específicas para detectar estos fenómenos y entender mejor la evolución de este grupo.

3) Dentro de *Pinus cembroides* la variación genética es moderada ($He = 0.59$) si se compara con la obtenida en otras especies de pinos, por otro lado, la variación presente en el grupo de *P. discolor* y *P. johannis* es mayor ($He = 0.79$), siendo este grupo más heterogéneo genéticamente.

3) A pesar de las claras diferencias existentes al interior del grupo *discolor/johannis*, dadas principalmente por los haplotipos compartidos entre *P. cembroides* y *P. discolor*, y que se ven reflejados en las distancias genéticas entre poblaciones, el análisis de AMOVA no muestra diferencias significativas en la composición genética de *P. discolor* y *P. johannis* ($R_{ct} = 0.098$, $F_{ct} = 0.096$).

4) La posición de la Amapola dentro del grupo *discolor/johannis* no queda claramente establecida. Por un lado, se agrupa en un mismo clado con las otras dos poblaciones pertenecientes a *P. johannis* (Lajas y Mazapil), sin embargo, el análisis de asociación geográfica muestra una asociación entre esta población y San Miguelito, al sur de San Luis Potosí ambas, con una fragmentación antigua con las poblaciones de Lajas y Mazapil, en el norte de San Luis Potosí y Zacatecas. Esta misma diferenciación entre las poblaciones de ambas regiones fue encontrada por Romero *et al.* (1996 y 2000) basándose en las características ecológicas y haciendo un análisis fenético con base en caracteres morfológicos.

5) El análisis de clados anidados muestra que el haplotipo ancestral se encuentra dentro del grupo formado por *P. discolor* y *P. johannis*, por lo que se asume que este grupo es más antiguo. Por otro lado, el análisis de asociación geográfica muestra una fragmentación alopátrica encontrada en el clado más inclusivo. Dicha fragmentación parecería generar el grupo donde se encuentran los haplotipos exclusivos de *P. discolor* y *P. johannis* y un segundo grupo con haplotipos compartidos, del cual posteriormente pudiera haberse originado *P. cembroides*.

6) No fue posible encontrar ninguna diferenciación genética significativa entre las subespecies de *P. cembroides*, posiblemente debido a que la divergencia al interior del grupo es muy reciente, donde las poblaciones no se encuentran en equilibrio entre migración y deriva genética. Se encontró un patrón de flujo genético extensivo, el cual incluye flujo genético entre los distintos taxa, y sin la existencia de aislamiento por distancia. Dentro de este grupo se encontró una fragmentación antigua la cual incluye las poblaciones de Saltillo por un lado, y las poblaciones de Querétaro y Veracruz por el otro. Esta fragmentación al sur de la Sierra Madre Oriental coincide con lo reportado por Escalante (2001) para *P. pinceana*, donde se encuentra una diferenciación mucho más antigua entre las poblaciones de Coahuila y las de Querétaro e Hidalgo.

7) Una cuarta fragmentación fue encontrada entre las poblaciones de San Miguelito y de Juárez, ambas pertenecientes a *P. discolor*. Cabe señalar que estas son las poblaciones

que comparten haplotipos con *P. cembroides*, los cuales pudieran encontrarse en estas poblaciones por un proceso de introgresión posterior a la divergencia de los grupos.

8) A excepción de theta, no fue posible encontrar una estimación muy precisa sobre los distintos parámetros poblacionales históricos. Sin embargo, la tasa de mutación estimada a partir de las simulaciones es considerablemente mayor (dos ordenes de magnitud) a la reportada previamente para estos marcadores en pinos (Provan *et al.* 1999). Por otro lado, en general los tamaños efectivos de estos grupos no son muy grandes (de pocos miles), por lo que los valores de theta son pequeños también, por lo cual se presume los niveles de homoplasia no son considerables.

9) El modelo de mutación que mejor se ajusta a este tipo de marcadores en este grupo es el de mutación por alelos infinitos, esto nos indica que las poblaciones al interior de los grupos son de reciente divergencia. Esto se soporta por los tiempos de coalescencia obtenidos para ambos grupos, donde el ancestro común más reciente para el total de la muestra se encontró hace 3100 generaciones, o 62 mil años si consideramos un tiempo generacional de 20 años (Suzán-Aspiri *et al.* 2002).

8. REFERENCIAS

- Anzidei M., A. Medaglielle, C. Sperisen, B. Ziegenhagen y G. Vendramin. 1999. Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of diversity in conifer species. En: Which DNA marker for which purpose? Compendio final del proyecto de investigación: Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII biotechnology FW IV Research programme molecular tools for biodiversity.
- Avice JC. 2000. *Phylogeography*. Harvard University Press. London. 447 pp.
- Bailey D.K. y F.G. Hawksworth. 1979. Pinyons of the Chihuahuan Desert region. *Phytologia*, **44**(3): 129-133.
- Bailey D.K. y F.G. Hawksworth. 1983. Pinions of the Chihuahuan Desert. *Phytologia*, **53**(3): 227-234.
- Bucci G, G.G. Vendramin. 2000. Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Molecular Ecology*, **9**: 923 - 934.
- Carbone I., L. Kohn. 2001. A microbial population-species interface: nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. *Molecular Ecology*, **10**: 947-964.
- Caron H., G. Dumas, G. Marque, C. Messer, E. Bandou, R. Petit, A. Kremer. 2000. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. *Molecular Ecology*, **9**: 1089 - 1098.
- Cato S. y T. Richardson. 1996. Inter and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and the inheritance of plastids in *Pinus radiata* D. Don. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**: 587-592.
- Clement M., D. Posada, K.A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **10**: 1657-1660.
- Conkle M.T. 1992. Genetic diversity seeing the forest through the trees. *New forest*, **6**: 5 - 22
- Cornuet J.M., G. Liukart. 1996. Description and power analysis of two test of detecting recent population bottlenecks from allele frequencies data. *Genetics*, **144**: 2001 - 20014.
- Cuenca A., A.E. Escalante, D. Piñero. Long distance colonisation, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology*, En prensa.

- Delgado P. D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser, E. Alvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 86: 669-976.
- Delgado P. 2002. Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales de *Pinus montezumae* Lamb y *P. pseudostrobus* Lind (Pinaceae). Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Díaz S., C. Mercado, S. Alvarez-Cardenas. 2000. Structure and population dynamics of *Pinus lagunae* M.F. Passini. *Forest Ecology and Management*, 134: 249 - 256.
- Di Rienzo A, A.C. Peterson, J.C. Garza, A.M. Valdes, M. Slatkin, N.B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91: 3166-3170.
- Dumolin-lapegue S., B. Demesure, S. Fineschi, V. Le Corre, R. Petit. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, 146: 1475 - 1487.
- Echt CS, L. DeVerno, M. Anzidei y G. Vendramin. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology*, 7: 307-316.
- Escalante A.E. 2001. Estructura genética de poblaciones de *Pinus pincea* usando como marcadores moleculares microsatélites de cloroplasto (cpSSRs). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM
- Estoup A., y J.M. Cornuet. 1999. Microsatellites evolution: inferences from population data. En: D. Goldstein y C. Schlötterer (Eds). *Microsatellites. Evolution and applications*. Oxford University Press, Inc. N.Y. 49 - 79 pp.
- Estoup A, y B. Angers. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. En: GL. Carvallo (Ed). *Advances in molecular ecology*. Nato Sciences Series, IOS Press. Pp. 55-86.
- Estoup A, P. Jarne, J.M. Cornuet. 2002 Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology*, 11, 1591-1604.
- Excoffier L, P. Smouse, J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred for metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479 - 491.
- Farjon A. 1996. Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121: 365-384.

- Farjon A. y B.T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Organisation for Flora Neotropica. The New York Botanical Garden NY. 219 p.
- Ferrusquía-Villafranca I. 1993. Geología de México: una sinopsis. En T. Ramamoorthy, Bye R., Lot A. y Fa J. (Eds). *Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución*. 1ra. Edición en español (1998). UNAM. México. 3-108 pp.
- Forbes S.H, J.B. Hogg, F.C. Buchanan, A. Crawford, F.W. Allendorf. 1995. Microsatellites evolution in congeneric mammals: domestic and Big Horn sheep. *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 1106-1113.
- Ge S., D. Hong, H. Wuang, Z. Liu, C. Zhang. 1998. Population genetics structure and conservation of an endangered conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae). *International Journal of Plant Science*, **159**(2): 351-357.
- Gernandt D.S., A. Liston, D. Piñero. 2001. Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* subsection *Cembroides*: Implications for molecular systematic studies of pine species complexes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **21**: 449-467.
- Goldstein D.B., A.R. Linares, L.L. Cavalli-Sforza, M. Fledman. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, **139**: 463-471.
- Gugerli F., C. Sperinsen, U. Büchler, F. Magni, T. Geburek, S. Jeandroz, J. Senn. 2001. Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps. *Molecular Ecology*, **10**: 1255 - 1263.
- Hewitt G. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography -or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, **10**: 537-549.
- Harding R.M., S.M. Fullerton, G.R. Griffiths, J.B. Clegg. 1997. A gene tree for beta-globin sequences from Melanesia. *Journal of Molecular Evolution*, **44**: s133-s138.
- Hamrick J.L, J. Godt, S.M. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New forest* **6**: 95 - 124.
- Jarne P. y J. L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**: 424-429.
- Kimura M. y J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**: 725-738.
- Kimura M. y T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allele frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **75**: 2868-2872.

- Ledig T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. En: D.M. Richardson (Ed). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. UK.
- Li W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates Inc. USA. 487 p.
- Little E.L. y W.B. Critchfield. 1969. *Subdivisions of the genus Pinus (Pines)*. USDA Forest Service. Washington DC (Miscellaneous Publication 1144).
- Lugon-Moullin N., H. Brünner, A. Witterbach, J. Hausser, J. Goudet. 1999. Hierarchical analyses of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora: Soricidae). *Molecular Ecology*, **8**: 419-431.
- Malusa J. 1992. Phylogeny and biogeography of the pinyon pine (*Pinus* subsect. *Cembroides*). *Systematic Botany* **17**(1): 42-66.
- Mariette S, D. Cagné, C. Leziér, P. Pastuska, A. Raffin, C. Plonion, A. Kremer. 2001. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, **86**: 469 - 479.
- Marshall H.D., C. Newton, K. Ritland. 2002. Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 367 - 378.
- Matos J. 1998. A coalescent approach to chloroplast genome relationships within and between populations of *Pinus devoniana* in Mexico. *Aliso*, **17**(2): 145 - 156.
- Matos J.A, B. Schaal. 2000. Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: a coalescent approach to hybridisation. *Evolution*, **54**: 1218 - 1233.
- McCunne B. 1998. Ecological diversity in North American pines. *American Journal of Botany*, **75**(3): 353-368.
- Millar C. 1993. Impact of the Eocene in the evolution of *Pinus* L. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**: 471-478.
- Millar C. 1998. Early evolution of pines. En: D.M. Richardson (Ed). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. UK. 61-69 pp.
- Molina-Freaner F. P. Delgado, D. Piñero, N. Pérez-Nasser, E. Alvarez-Buylla. 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican rare species. *Canadian Journal of Botany*, **79**: 131-138.
- Morgante M, N. Felice, G. Vendramin. 1997. Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reviews a dramatic genetic bottleneck. En: A. Carp. PO. Issac y DS. Ingrams (Eds). *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. Chapman and Hall, London. Pp 407-412.

- Moreno A. 2002. Sistema de apareamiento y variación genética de *Pinus maximartinezii*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM
- Nauta M.J, F.J. Weissing (1996) Constraints on allelic size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics*, **143**, 1021-1032.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, **106**: 283 - 292.
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. NY. USA.
- Passini M.F. 1987. The endemic pinyon of lower California *Pinus lagunae* M-F Passini. *Phytologia*, **63**(5): 337-338.
- Passini M.F. 1994. Synonymie entre *Pinus discolor* Bailey & Hawksworth et *Pinus johannis* M.F. Robert. *Acta Botanica Gallica*, **3**: 387-388
- Perez de la Rosa J., S.A. Harris y A. Farjon. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theoretical and application genetics*, **91**: 1101 - 1106.
- Posada D, Crandall K.A, Templeton A.R (2000) GEODIS: a program of the cladistic nested analysis of the geographical distribution of the genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, **9**, 487-488.
- Powell W, M. Morgante, R. MacDevitt, G. Vendramin y J. Rafalski. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA*, **99**: 7759-7763.
- Price R.A, Liston A., Strauss S.H. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. En: D.M. Richardson (Ed). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press. UK pp 49-98.
- Provan J., N. Soranzo, N. Wilson, D. B. Goldstein y W. Powell. 1999. A low mutational rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, **153**: 943-947.
- Rentería M. 2002. Variación y estructura genética de una especie rara de México (*Pinus nelsonii* Shaw). Reporte final del Servicio Social. UAM Xochimilco.
- Richardson D.M. y P.W. Rundel. 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. En: D.M. Richardson (Ed). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press. UK
- Richardson D.M., BA, Brunsfeld J, Klopfenstein NB (2002) DNA from bird-disperses seed and wind-disseminated pollen provides insights into postglacial

colonisation and population genetic structure of white bark pine (*Pinus albicaulis*). *Molecular Ecology* **11**, 215-227

- Robert M.F. 1978. Un nouveau pin pignon mexicaine: *Pinus johannis* Robert. *Adansonia*, ser 2 18: 365-373.
- Rogers A. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, **49**: 608-615.
- Rogers A.R. y H.G. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 552-569.
- Romero A, E. García y M.F. Passini. 1996. *Pinus cembroides* s.l. y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano: una síntesis. *Acta Botanica Gallica*, **143**(7): 681-693.
- Romero A., M. Luna, E. García y M. Passini. 2000. Phenetic analysis of the Mexican midland pinyon pines, *Pinus cembroides* and *Pinus johannis*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **133**: 181-194.
- Schaal B.A, D.A. Hayworth, Olsen K.M, Rauscher J.T, Smith W.A (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, **7**, 465-474.
- Schaal B.A, y K.M. Olsen. 2000. Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**(13): 7024-7029.
- Shiver M.D., L. Jin, E. Boerwinkle, R. Deka, R.E. Ferrell y R. Chakraborty. 1995. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Molecular Biology and Evolution*, **12**(5): 914 - 920.
- Schneider S., D. Roessli, L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.00: a software for population genetics data analysis.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**: 457 - 462.
- Soranzo N., R. Alia, J. Provan, W. Powell. 2000. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Molecular Ecology*, **9**: 1205 - 1211.
- Sperisen C., U. Büchler, G. Mátýas, M. Anzidei, A. Madaghiele, T. Skoppa y G. Vendramin. 1998. Polymorphic tandem repeats in the chloroplast and mitochondrial genome in Norway spruce. En: Skoppa, T, L. Paule y D. Gömöri. *Genetics and breeding of Norway spruce*. Arbora publisher, Svolen, Slovakia. Pp. 15-24.

- Styles B.T. 1993. El género *Pinus*: su panorama en México. En T. Ramamoorthy, Bye R., Lot A. y Fa J. (Eds). *Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución*. 1ra. Edición en español (1998). UNAM. México. 385-408 pp.
- Suzán-Azpiri H, G. Sánchez-Ramos, JG. Martínez-Ávalos, S. Villa-Melgarejo, M. Franco. 2002. Population structure of *Pinus nelsoni* Shaw, an endemic pinyon pine in Tamaulipas, Mexico. *Forest Ecology and Management*, **165**, 193-203.
- Templeton A.R., E. Routman, C.A. 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**: 767 - 782.
- Templeton A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data and testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**: 381 - 397.
- Tomback D.F, y Y.B. Linhart. 1990. The evolution of bird dispersed pines. *Evolutionary Ecology*, **4**: 185-219.
- Van Oppen M., C. Rico, G.R. Turner, G. Hewitt. 2000. Extensive homoplasy, non stepwise mutations and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in lake Malawi cichlids. *Molecular Evolution*, **17**, 489-498.
- Vendramin G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology* **5**: 111-114.
- Vendramin G, B. Ziegenhagen. 1997. Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome*, **40**: 857-964.
- Vendramin G., M. Anzidei, A. Madaghiele y G. Bucci. 1998. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**: 456-463.
- Wakasugui T, J. Tsudzuki, S. Ito, M. Shibata, M. Sigiura. 1994. A physical map and clone bank of the black pine (*Pinus thunbergii*) chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **12**: 227-241.
- Weir B.S, Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358 - 1370
- Wilson I.J. y D.J. Balding. 1998. Genealogical inference from microsatellite data. *Genetics*, **150**: 499-510.

Xu X., M. Peng, Z. Fang, X. Xu. 2000. The detection of microsatellites mutation is dependent upon length. *Nature*, **24**, 396-399.

Zavarin E., K. Snaberk. 1985. Monoterpenoid and morphological differentiation within *Pinus cembroides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **13**(2): 89 - 104.

Zavarin E., K. Snaberk. 1986. Monoterpenoid in relation with the morphology of *Pinus discolor* and *P. johannis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **14**(1): 1 - 11.

9. APÉNDICE

9.1 Método de amplificación

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl, conteniendo de 10 a 50 ng de DNA genómico, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 2 µMol de primer reverse, 2 µMol de primer forward marcado con Cys-5 (Pharmacia) y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Pharmacia).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer con 5 minutos a 95°, 25 ciclos de 1 minuto a 95°, 1 minuto a 55° y 1 minuto a 72° y una extensión final de 8 minutos a 72°.

9.2 Algunos índices genéticos

9.2.1 Diversidad genética (*He*, Nei 1987)

Se estima como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar en una población sean diferentes. Este índice va de cero (cuando no existe variación genética, a uno cuando todos los haplotipos son distintos).

$$He = \frac{n}{n-1} (1 - \sum p_i^2)$$

donde n es el número de genes, k es el número de haplotipos y p_i la frecuencia del haplotipo i dentro de la muestra.

9.2.2 Estimación de theta

En el caso de utilizar un marcador haploide $\theta = 2N\mu$, donde N es el tamaño poblacional y μ la tasa de mutación. El estimador theta se puede estimar directamente de la diversidad genética presente en la muestra:

$$F = \frac{1}{1 + \theta} \quad \text{donde } F = 1 - He \quad (\text{Schneider et al. 2000})$$

9.2.3 Estimadores de distancia entre haplotipos

i) Con base en el número de diferentes alelos entre haplotipos:

$$d_{xy} = \sum_{i=1}^L \delta_{xy}(i)$$

donde $\delta_{xy}(i)$ es igual a 1 si los alelos del i -ésimo locus son idénticos en ambos haplotipos o igual a cero si ambos alelos son distintos (Schneider 2000). Este estimador es más apropiado para marcadores que se ajustan a un modelo de mutación por alelos infinitos y con bajos niveles de mutación (Slatkin 1995).

ii) Con base en la varianza en el número de repeticiones:

$$d_{xy} = \sum_{i=1}^L (a_{xi} - a_{yi})^2$$

Donde a_{xi} es el número de unidades de repetición del i -ésimo locus en el haplotipo x (Slatkin 1995). Este estimador asume un modelo de mutación por *stepwise* y una elevada tasa de mutación.

9.2.4 Estimadores de flujo genético

Para estimar el flujo genético entre pares de poblaciones se utilizó la ecuación:

$$M = \frac{1 - \phi_{st}}{2\phi_{st}}$$

Para datos haploides M es el tamaño efectivo por el número de migrantes ($M = N\mu$) y ϕ_{st} es el índice de fijación entre pares de poblaciones. Esta ecuación ha sido derivada por Schneider (2000) a partir de las ecuaciones originales de Slatkin (1995) y posee dos supuestos: 1) que la tasa de mutación es despreciable comparada con la tasa de migración y 2) que las poblaciones se encuentran en equilibrio entre migración y deriva genética.

9.2.5 Estimadores de distancia genética

i) Distancia de Nei

Este estimador de distancia genética se encuentra basado en un modelo de mutación por alelos infinitos y trabaja directamente con la frecuencia de los distintos alelos en un locus.

Sea x_i y y_i la frecuencia del i -ésimo alelo en un locus en particular en la población X y Y respectivamente.

$$D_N = -Ln \left(\frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}} \right)$$

donde J_x , J_y y J_{xy} son la media aritmética de $\sum x_i^2$, $\sum y_i^2$ y $\sum x_i^2 y_i^2$ respectivamente.

ii) *Distancia de Shiver*

Este tipo de distancia genética es específico para microsatélites, se basa en un modelo de mutación por stepwise y trabaja directamente estimando las diferencias en tamaño entre los distintos alelos de un locus.

$$D_{sw} = d_{xyw} - \frac{d_{xw} + d_{yw}}{2}$$

$$d_{xw} = n_x \sum \sum x_i x_j \delta_{ij} (n_x - 1), \quad d_{yw} = n_y \sum \sum x_i x_j \delta_{ij} (n_y - 1) \text{ y } d_{xyw} = \sum \sum x_i y_j \delta_{ij}$$

Donde n_x y n_y son el número de cromosomas muestreados en la población X y Y respectivamente, y x_i y y_i son los estimados de la frecuencia alélica en las poblaciones. En estas ecuaciones δ_{ij} equivale a la diferencia absoluta en el tamaño de los distintos alelos o $\delta_{ij} = |i - j|$ siendo i y j los tamaños del alelo i y del alelo j de un locus en particular.

9.2.6. *Distribución mismatch y modelo de expansión súbita (Rogers 1995)*

El modelo de expansión súbita parte de una población de tamaño inicial N_0 , la cual se encuentra en equilibrio entre deriva y mutación. Esta población se expande rápidamente hasta llegar a un tamaño N_1 en un tiempo de t generaciones. De esta manera, el modelo reduce la historia de las poblaciones a estos tres parámetros, los cuales se encuentran asociados a la tasa de mutación, por lo cual, la distribución *mismatch* nos da información acerca de:

$$\theta_0 = 2N_0\mu, \quad \theta_1 = 2N_1\mu \quad \text{y} \quad \tau = 2t\mu$$

Para estimar estos parámetros, Rogers (1995) asume que θ_1 tiende a infinito y así obtiene:

$$\theta_0 = \sqrt{v - m} \quad \text{y} \quad \tau = m - \theta_0$$

Donde m es la media y v es la varianza de la distribución *mismatch*.