



Universidad Nacional Autónoma de México
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

SISTEMÁTICA

**Estudio del límite de especie entre *Pinus douglasiana* y *P. maximinoi*
(Coniferales: Pinaceae) usando secuencias de DNA y datos
morfológicos**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALEJANDRO LÓPEZ REYES

TUTOR:

Dr. David Sebastian Gernandt. Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. María Victoria Sosa Ortega. Instituto de Ecología, A. C.

Dr. Mark Earl Olson. Instituto de Biología, UNAM

Cd. Mx. Mayo de 2017



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de enero de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **LÓPEZ REYES ALEJANDRO** con número de cuenta **510007214** con la tesis titulada: "**Estudio del límite de especie entre *Pinus douglasiana* y *P. maximinoi* (Coniferales: Pinaceae) usando secuencias de DNA y datos morfológicos**", realizada bajo la dirección del **DR. DAVID SEBASTIAN GERMANDT**:

Presidente:	DR. JOSÉ LUIS VILLASEÑOR RÍOS
Vocal:	DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Secretario:	DRA. MARÍA VICTORIA SOSA ORTEGA
Suplente:	DR. JORGE ALBERTO PÉREZ DE LA ROSA
Suplente	DRA. MERCEDES ISOLDA LUNA VEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 29 de marzo de 2017.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por abrirme sus puertas y permitir lograr mis objetivos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó (número de registro 326688), del 01 agosto de 2009 al 30 de julio de 2013, y con la cual me fue posible realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el dinero otorgado para realizar una estancia en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara en Junio de 2012.

Agradezco el apoyo económico otorgado a través del proyecto UNAM-PAPIIT-DGAPA (IN228209) a cargo del Dr. David S. Gernandt.

Agradezco al Herbario (IBUG) de la Universidad de Guadalajara, al Herbario (XAL) del Instituto de Ecología, A. C., Xalapa y al Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología de la UNAM, por permitirme revisar ejemplares de su colección.

De forma especial agradezco los comentarios y recomendaciones de mi tutor, Dr. David S. Gernandt, quien ha mostrado ser un buen amigo.

Mi más sincero agradecimiento a mi comité tutor, Dra. Victoria Sosa Ortega y Dr. Mark Earl Olson, por sus valiosos comentarios y paciente apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Agradecimientos personales

Por su ayuda a mejorar este proyecto agradezco a mi jurado de candidatura, Dra. Jenny Solange Sotuyo, Dr. Luis E. Eguiarte, Dr. Daniel Piñero y Dr. Atilano Contreras.

Agradezco al coordinador del Posgrado en Biología, Dr. Martín García Varela, por su atención y orientación. Además, todo el personal administrativo del IB por su pronta atención cuando así lo requerí.

Agradezco a la Dra. Isolda Luna Vega, el Dr. José Luis Villaseñor y el Dr. Salvador Arias por formar parte del jurado de mi examen de grado.

Agradezco al Dr. Jorge Pérez de la Rosa por su invaluable ayuda y consejos durante las colectas de campo y haber participado como jurado en mi examen de grado.

La culminación del presente trabajo fue posible por el apoyo desinteresado de muchas personas. Quiero reiterar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas: Biol. Dalia Greco, M. en C. Laura M. Márquez Valdelamar, Biol. Jerónimo Reyes, Dra. Lidia Cabrera, M. en C. Enrique Ortiz Bermúdez, Dra. Ann Willyard, Dr. Calixto León Gómez.

Un profundo agradecimiento a todos mis compañeros de laboratorio y del Posgrado en Ciencias. Chicas de Puebla, Biól. Isabel Méndez Ponce, Biól. Lourdes Serrano García, Biól. Guadalupe Manzano Flores, Biól. Regina M. y Biól. Sandra Andrea Quintero Gutiérrez, Dra. Angélica Cervantes Alcaide, Biol. Cecelic Reséndiz Arias, Biol. Diana Brenda Ramos Dorantes, M. en C. Mariana García, Biol. Mónica Duhyadi Oliva García, Biol. Patricia Rosas Escobar, Biol. Alfredo Ortiz Martínez, M. en C. Eduardo Domínguez Licon, M. en C. José Rubén Montes Montiel y M. en C. Sergio Hernández León.

DEDICATORIA

Esta tesis representa un verdadero esfuerzo por tratar de entender el mundo y compartir lo aprendido. Por todo lo bueno que esta tesis significa para mí, se la dedico a todos aquellos que me han apoyado e incentivado a realizarla; especialmente a mi familia, mamá y hermanos.

Agradezco profundamente a mi mamá, Felipa Reyes M., por su amor y apoyo en todos los momentos difíciles.

Alejandro López R.

Contenido	Pág.
Resumen	
Abstract	
Índice de cuadros	
Índice de figuras	
Índice de tablas	
Capítulo 1. Introducción general	
Concepto de especie	1
El problema de delimitación de especies en <i>Pinus</i>	9
Procesos de especiación en <i>Pinus</i>	11
Morfología del género <i>Pinus</i>	13
Taxonomía del género <i>Pinus</i>	16
La subsección <i>Ponderosae</i>	17
La relevancia de <i>P. douglasiana</i> y <i>P. maximinoi</i> como modelo de estudio de especies con problemas de delimitación	18
Distinción entre <i>P. douglasiana</i> y <i>P. maximinoi</i>	19
Problemas de delimitación morfológica entre <i>Pinus douglasiana</i> , <i>P. maximinoi</i> y especies afines.	19
Distribución de <i>P. douglasiana</i> y <i>P. maximinoi</i>	21
Hipótesis general	23
Objetivos generales	23
Objetivos específicos	23
Capítulo 2. Morfología del complejo <i>Pseudostrobus</i>	
Introducción	25
El complejo <i>Pseudostrobus</i> en la subsección <i>Ponderosae</i>	27
Diferencias morfológicas de las especies del complejo <i>Pseudostrobus</i>	27
Preferencias climáticas en las especies del complejo <i>Pseudostrobus</i>	31
Inconsistencias encontradas en la literatura con relación a la distribución de las especies del complejo <i>Pseudostrobus</i>	31
Herramientas estadísticas para el análisis de la variación cuantitativa	33
Hipótesis	36
Objetivos generales	36
Objetivos específicos.	37
Material y método	37
Resultados	46
Discusión	56
Capítulo 3. Estudio de la evidencia molecular basada en un fragmento de ADN de plasto	
Introducción	63
Hipótesis	70
Objetivos general	70
Objetivos específicos	70
Material y método.	71
Resultados	79

Contenido (continuación)	
Discusión	84
Capítulo 4. Estudio de la variación molecular de un fragmento de ADN de mitocondria	
Introducción	89
Hipótesis	92
Objetivo general	93
Objetivos específicos	93
Material y método.	93
Resultados.	98
Discusión.	101
Capítulo 5. Discusión y conclusiones generales	
Límites entre especies del complejo <i>Pseudostrobus</i> en el contexto de especie como linaje metapoblacional.	105
Conclusión basada en la presencia de caracteres fijos y exclusivos en el ADN.	105
Conclusión basada en el criterio de aislamiento reproductivo	107
Conclusión basada en la genealogía de genes.	108
Conclusión basada en el criterio fenético y en el criterio morfológico (taxonómico).	109
Conclusión basada en el criterio de divergencia ecológica.	111
Especiación de <i>P. douglasiana</i> y <i>P. maximinoi</i>	111
Conclusión final	112
Litaratura citada	115
Anexo A. Artículo de requisito	133
Anexo B. Glosario	147

Resumen

El problema de circunscripción taxonómica entre *Pinus douglasiana* Martínez y *P. maximinoi* H. E. Moore (*Pinus* subsección *Ponderosae*) se abordó usando el concepto de linaje metapoblacional como concepto de especie. Se incluyeron en el estudio a *P. pseudostrobus* Lindl. y *P. yecorensis* Debreczy & Racz porque comparten muchos caracteres con *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Sus diferencias morfológicas con *P. douglasiana* y *P. maximinoi* no son evidentes y frecuentemente se confunden entre ellas. Para estudiar los límites taxonómicos entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* se analizó, mediante técnicas estadísticas, la variación de 16 caracteres cuantitativos de la hoja o el cono ovulado. Mediante parsimonia estadística, se evaluó la variación de cuatro fragmentos de ADN —tres de plástido (ADNpl) y uno de mitocondria (ADNmt). La información perteneciente a más de 250 individuos indica que *P. douglasiana* tiene hojas y apófisis más gruesas que *P. maximinoi*. La información conjunta de las 16 variables morfológicas no es útil para formar grupos discretos en el espacio multivariado. Considerando a más de 150 individuos clasificados como *P. douglasiana* o *P. maximinoi* se encontró que la variación en el ADNpl, al contrario de lo taxonómicamente deseado, se comparte entre dichas especies. Se encontró que la información molecular y morfológica no es congruente. Se ha considerado que las intrusiones hipodérmicas que están en contacto con la endodermis (intrusiones foliares) son exclusivas de *P. douglasiana* y de las poblaciones mexicanas de *P. maximinoi*, pero la evidencia morfológica y molecular indica que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* (en México) ocasionalmente carecen de intrusiones. La morfología indica que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son especies con pedúnculo decíduo. *Pinus pseudostrobus* tiene un pedúnculo persistente. A pesar de las diferencias morfológicas, *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus* comparten haplotipos de plástido. *Pinus yecorensis* presenta haplotipos únicos de plástido, pero comparte haplotipos mitocondriales con *P. douglasiana*. Conforme a lo señalado en trabajos previos, se encontró que *P. maximinoi* prefiere climas menos templados y con mayor precipitación (Aw2) que *P. douglasiana* [(A)C(w2)]. Se encontró que *P. yecorensis* se distribuye en zonas de menor precipitación [C(w1)x' y C(w2)x'] que las zonas en donde se distribuyen *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. El haber incluido solo cinco ejemplares de *P. yecorensis* no permite hacer conclusiones definitivas en cuanto al estatus taxonómico de este taxón. Se discute la posibilidad de que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* sean especies incipientes.

Abstract

To approach the problem of taxonomic circumscription between *P. douglasiana* and *P. maximinoi* (*Pinus* subsection *Ponderosae*), the metapopulation lineage species concept was considered as background. *Pinus pseudostrobus* and *P. yecorensis*, also of subsection *Ponderosae*, also were included. Techniques of multivariate statistics were used to evaluate 16 quantitative characters of the leaf and cone. Haplotype networks were constructed to evaluate the variation in fragments of plastid DNA (pDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA). The information analyzed in more than 250 individuals revealed that *P. douglasiana* and *P. maximinoi* are two incipient species. As in previous studies, it was found that *P. douglasiana* has leaves and cone scale apophyses that are wider and thicker, respectively, than *P. maximinoi*. Unlike in previous studies, discrete groups were not found in multivariate space. The existence of individuals with morphological and molecular affinities to *P. douglasiana*, but without leaf hypodermal intrusions, is reported. *Pinus maximinoi* prefers less temperate climates with greater precipitation (Aw2) than *P. douglasiana* [(A)C(w2)]. In contrast to previous studies with pDNA (*chlN-ycf1*), it was found that *P. douglasiana* and *P. maximinoi* share haplotypes. In agreement with previous studies, it was found that *P. maximinoi* shares *ycf1* haplotypes with *P. pseudostrobus*, although *P. maximinoi* can be differentiated from *P. pseudostrobus* by its deciduous peduncle. As in previous studies with pDNA, it was found that *P. yecorensis* has exclusive haplotypes. In this study it was found that *P. yecorensis* shares mtDNA haplotypes with *P. douglasiana*. This study showed that *P. yecorensis* occurs in zones with less precipitation [C (w1) x' and C (w2) x'] than *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. With respect to the taxonomic status of *P. yecorensis*, the small sample size (n = 5) in this study prevents reaching strong conclusions.

Índice de cuadros

	Pág.
1.2. División de <i>P. pseudostrobis</i> en subespecies, variedades y formas de acuerdo con diferentes autoridades.	22
4.1. Comparación del motivo repetido (ID = A) reportado en la Tabla 2 de Potter et al. (2013) con el motivo repetido determinado en este trabajo.	97

Índice de figuras

	Pág.
1.1. Divergencia de linajes (especiación)	6
1.2. Estructuras de <i>Pinus</i>	15
1.3. Relaciones de parentesco entre las subsecciones del género <i>Pinus</i>	16
2.1. Estructuras del cono y la hoja	30
2.2. Provincias biogeográficas de México (CONABIO 1997).	33
2.3. Ejemplo de gráficas elaboradas para detectar lagunas en el espacio multivariado (Zapata y Jiménez 2012).	35
2.4. Ubicación de los sitios de recolecta.	40
2.5. Gráfica que muestra los resultados del ACP considerando los componentes 1 y 2	48
2.6. Gráficas para detectar lagunas en el espacio multivariado entre <i>P. douglasiana</i> y <i>P. maximinoi</i>	49
2.7. Gráficas para detectar lagunas en el espacio multivariado entre <i>P. maximinoi</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	49
2.8. Gráficas para detectar lagunas en el espacio multivariado entre <i>P. douglasiana</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	50
2.9. Dendrograma obtenido del análisis de agrupamiento jerárquico.	52
2.10. Gráfica que muestra los resultados del análisis de discriminantes canónicas.	53
2.11. Gráfica de las diferencias entre las especies del complejo <i>Pseudostrobus</i> obtenidas del análisis de discriminantes canónicas.	54
2.12. Sitos correspondientes a la ubicación en México de los taxa del complejo <i>Pseudostrobus</i> y su ubicación con respecto a las provincias biogeográficas	54
2.13. Comparación del número de sitios de recolecta por especie para cada tipo de clima en donde se distribuye el complejo <i>Pseudostrobus</i>	55
3.1. Diagrama que muestra las relaciones filogenéticas entre las especies de la subsección <i>Ponderosae</i>	66
3.2. Esquema que muestra la posición relativa de los fragmentos amplificados A, B y C del gen <i>ycfI</i>	76
3.3. Diagrama que muestra el número de ejemplares secuenciados para cada fragmento del ADN de plasto.	77
3.4. Red de haplotipos en donde se muestra la genealogía del fragmento A.	79
3.5. Red de haplotipos en donde se muestra la genealogía del fragmento B.	80
3.6. Red de haplotipos en donde se muestra la genealogía del fragmento C.	81
3.7. Red de haplotipos en donde se muestra la genealogía de los fragmentos concatenados A y C.	82

3.8. Mapa de México en donde se muestra la distribución de los haplotipos del fragmento concatenado (fragmentos A y C) en México.	83
4.1. Red de haplotipos construida con el gen <i>nadI</i>	100
4.2. Mapa de México en donde se muestra la distribución de los haplotipos del segundo intrón del gen <i>nadI</i> encontrados en el complejo <i>Pseudostrobilus</i>	100

Índice de tablas

	Pág.
1.1. Lista de especies de la subsección <i>Ponderosae</i> (Gernandt et al. 2005; 2009).	17
2.1. Lista de las localidades de recolecta de los ejemplares revisados para este estudio. . .	40
2.2. Número de individuos considerados en este trabajo en comparación con el número reportado por Stead (1983b) en los estados del Noroeste de México.	43
2.3. Coeficientes del primer y segundo componentes del ACP.	47
3.1. Lista de ejemplares de pino para los cuales se amplificó alguno de los tres fragmentos de ADN de plasto (A, B o C)	71
3.2. Número de haplotipos correspondientes al fragmento A	79
3.3. Número de haplotipos correspondientes al fragmento C	80
3.4. Número de haplotipos correspondientes a los fragmentos concatenados.	81
4.1. Sitios de recolecta de los individuos incluidos en el análisis del fragmento correspondiente al segundo intrón del gen <i>nad1</i>	94
4.2. Variantes en los patrones de repetición del motivo de 66 pb en las secuencias del segundo intrón del gen <i>nad1</i> para las especies del complejo <i>Pseudostrobus</i>	99
4.3. Patrones de repetición del motivo de 66 pb en el segundo intrón del gen <i>nad1</i> en especies de la subsección <i>Ponderosae</i>	99
4.4. Haplotipos del segundo intrón del gen <i>nad1</i>	100

CAPÍTULO 1

Introducción general

Concepto de especie

Aunque no existe una definición formal del término "complejo de especies", este término ha sido usado para referirse a un grupo de especies de parentesco cercano en el que los límites interespecíficos no son claros. En un complejo de especies, el estatus taxonómico de las especies está en duda (Feng et al. 2016; Barrett y Freudenstein 2009, 2011; Strandby et al. 2009; Coppée 2010; Kynčlová et al. 2010; Leavitt et al. 2015). La falta de claridad en los límites interespecíficos puede darse por la existencia de patrones complejos de variación morfológica, falta de caracteres diagnósticos, falta de aislamiento reproductivo entre especies, similitud en sus preferencias ambientales, tasas lentas de especiación, divergencia reciente, tamaños poblacionales efectivos de gran tamaño, etcétera (Burge y Zhukovsky 2013; Raxworthy et al. 2007; Petit y Excoffier 2009). Los límites pueden volverse más confusos al considerar fuentes de información, como secuencias de ADN, que señalan límites incongruentes con la morfología (DeSalle et al. 2005). La falta de claridad en los límites interespecíficos ha propiciado diferentes formas de concebir el concepto de especie.

El trabajo de Charles Darwin "*El Origen de las Especies*" trajo consigo un profundo cambio en la manera en que se entiende a la especie (Wilkins 2009). Para Darwin, la falta de una realidad discreta en las especies fue la clave para su hipótesis evolutiva de especiación (Mallet 1995). Para algunos autores, Darwin no supo explicar que es una especie. Por ejemplo, Futuyma (1983) señala que Darwin en "*El Origen de las Especies*" no explica, en realidad, como surgen las especies porque el mismo Darwin no supo como definir qué es una especie. Charles Darwin y Alfred Russell Wallace consideraron cuidadosamente las alternativas en lo referente a la definición de especie, en particular las basadas en el apareamiento, pero las rechazaron todas (Mallet 1995). Aunque aparentemente para Darwin el concepto de especie es arbitrario (Ereshefsky 2011), se puede decir que Darwin creía en la realidad de las especies (Wilkins 2009).

En la actualidad, existen diferentes conceptos de especie (Wheeler y Meier 2000). En Biología existe un desacuerdo en cuanto a la ontología del concepto de especie (Luckow 1995; Sites y Marshall 2003, 2004; de Queiroz 2005). Existen trabajos, muchos de ellos filosóficos, que abordan con detalle el problema del concepto especie (Ghiselin 1997; Wheeler y Meier 2000; Stamos 2003,

2007; Wilkins 2009; Amitani 2010; Richards 2010). Dada la existencia de varios conceptos de especie, es necesario que se mencione explícitamente el concepto y criterio de delimitación adoptado al momento de circunscribir a las especies en un complejo (Luckow 1995). Se describirán brevemente los principales conceptos y criterios usados en la delimitación de especies, para después señalar el concepto que se usó en este estudio.

El concepto biológico de especie (Mayr 1987; 2000) es uno de los más sobresalientes. Usa el criterio de aislamiento reproductivo como característica principal para delimitar especies. De acuerdo con este concepto, las especies son grupos de poblaciones naturales que se entrecruzan y muestran aislamiento reproductivo con las poblaciones de otras especies (Mayr 2000). Bajo el concepto biológico ha sido posible distinguir a las llamadas especies crípticas (también llamadas gemelas). Las especies crípticas son aquellas especies que tienen un gran parecido morfológico, a tal grado que es imposible distinguir las a simple vista, pero que muestran aislamiento reproductivo entre sí (Mayr 1996). Un ejemplo de especies crípticas son las que integran el género *Mitella* (*Asimitellaria*; Saxifragaceae). Mediante experimentos de hibridación artificial, se ha probado que existe aislamiento reproductivo entre las especies del género *Mitella* (Okuyama y Kato 2009). En la actualidad, el término especie críptica suele usarse también para referirse a taxa que muestran una gran similitud morfológica, pero que muestran muchas diferencias entre sus secuencias de ADN y por lo mismo se supone la existencia de aislamiento reproductivo entre las mismas (Johnson y Cairns-Heath 2010). Un aspecto muy criticado del concepto biológico es la falta de aislamiento reproductivo entre taxones reconocidos como especies (Mallet 2005). Por ejemplo, en el género *Quercus* es común la falta de aislamiento reproductivo entre especies (Zeng et al. 2010). Podemos decir que no todas las especies en un complejo de especies muestran aislamiento reproductivo entre sí.

El concepto evolutivo (Simpson 1951; Wiley 1978; Mayden 1997) considera a las especies como linajes filéticos. Un linaje es una secuencia de poblaciones ancestrales y descendientes en donde los individuos que las forman son capaces de entrecruzarse. Un linaje filético evoluciona de forma independiente de otros linajes, desempeña un papel evolutivo que le es propio y tiene una tendencia evolutiva que la distingue de otros linajes (Simpson 1951). Bajo este concepto se considera implícitamente que una especie mantiene su identidad mediante fenómenos como el flujo genético o limitantes genéticas, ecológicas y de desarrollo. Estos fenómenos se infieren generalmente a través de la morfología (Templeton 1989). Se argumenta que el concepto evolutivo carece de un criterio explícito y operacional para establecer la independencia de un linaje (de Pinna 1999; de Queiroz 2007; Mallet 2007a, b). Autores que promueven conceptos de especie diferentes

al de linaje evolutivo han señalado que las especies son linajes, que los linajes son un producto de la evolución o que los linajes existen como parte de un sistema temporal y jerárquico (Mishler 1985; Templeton 1989; Nixon y Wheeler 1990; Shaw 1998).

Otro concepto que hace referencia a las especies como linajes es el concepto ecológico. El principal autor del concepto ecológico, Van Valen (1976), señala primeramente que una especie es un linaje (o un conjunto de linajes estrechamente emparentados) que ocupa (u ocupan) una zona adaptativa con diferencias menores respecto de las zonas adaptativas de otros linajes en su mismo rango. En segundo lugar, Van Valen (1976) señala que una especie evoluciona por separado de los linajes en otros rangos y aclara que el rango es el espacio geográfico y temporal en que habita una especie. El criterio operacional para delimitar a una especie es mostrar que existen variables ambientales que determinan la discontinuidad fenética entre linajes (Andersson 1990). De nuevo, el concepto de linaje se refiere a una secuencia de poblaciones ancestrales y descendientes (Van Valen 1976). Un aspecto relevante de este concepto es la posibilidad de buscar una explicación de las causas que provocan la divergencia y la especiación (Andersson 1990).

Bajo el criterio filogenético, es decir de la sistemática filogenética, se reconocen varios conceptos de especie (Mishler y Theriot 2000). La sistemática filogenética emplea diferentes métodos para reconstruir las relaciones de parentesco entre grupos taxonómicos. Dichos métodos hacen una agrupación jerárquica tomando en cuenta la distribución de caracteres ancestrales y derivados en los taxa (Davis y Nixon 1992; Wilkins 2009). Los diferentes conceptos filogenéticos de especie están relacionados directamente con los métodos empleados para reconstruir la historia evolutiva de los taxa. Entre los conceptos filogenéticos de especie están el hennigiano (Hennig 1966; Ridley 1989; Meier y Willmann 2000), el monofilético (Rosen 1979; Donoghue 1985; Mishler 1985), el de diagnosticabilidad (Nelson y Platnick 1981; Davis y Nixon 1992) y el genealógico (Baum y Shaw 1995). El concepto hennigiano muestra la importancia de ver a la especie como parte temporal de un sistema jerárquico de relaciones (Meier y Willmann 2000). Este concepto señala que una especie es una población natural, o un grupo de poblaciones naturales, que muestra aislamiento reproductivo con otras especies, que se origina al mismo tiempo que se extingue la especie que le dio origen y que a su vez desaparece al dar origen a otras especies (Willmann 1986; Meier y Willmann 2000). El concepto monofilético considera la existencia de sinapomorfias (caracteres derivados compartidos) o autopomorfias (caracteres únicos exclusivos) como el principal criterio de circunscripción de una especie (Rosen 1979; Donoghue 1985; Mishler 1985). El concepto monofilético busca delimitar especies bajo la premisa de que todos los individuos de la misma especie comparten un carácter distintivo. Es decir, las especies se distinguen

por poseer uno o más caracteres fijos¹ y exclusivos (Mishler y Theriot 2000). Sin embargo, en algunas especies no ha sido posible aplicar el criterio de monofilia debido a la falta de caracteres exclusivos en las mismas. Es decir, los individuos de una misma especie no se agrupan en un mismo clado² después de realizar un análisis filogenético (de Queiroz y Donoghue 1988; Rieseberg y Brouillet 1994). Para resolver el problema de falta de autopomorfias se ha creado el concepto de especie diagnosticable. Una especie diagnosticable tiene una combinación fija y única de caracteres (Nixon y Wheeler 1990; Davis y Nixon 1992). La diagnosticabilidad permite reconocer un mayor número de especies que el criterio de monofilia (Davis y Nixon 1992). Aunque, posiblemente la diagnosticabilidad no sea por si sola evidencia suficiente para reconocer unidades evolutivas (Wilkins 2009; Tattersall 2007). Otro criterio filogenético para reconocer especies es la coalescencia exclusiva de alelos. La coalescencia es un modelo de evolución del ADN en donde se ve en retrospectiva como convergen dos o más alelos en un ancestro en común (Posada y Crandall 2001). El modelo de coalescencia es usado como criterio bajo el concepto genealógico para reconocer especies usando marcadores de ADN que muestran patrones parafiléticos o polifiléticos (Baum y Shaw 1995; Shaw 1998).

Vale la pena incluir en los conceptos con criterios útiles para delimitar a una especie al concepto taxonómico (taxonomía alfa) y el fenético (taxonomía numérica). El concepto taxonómico y el fenético usan la morfología como el principal criterio de circunscripción. Muchas especies han sido reconocidas únicamente mediante morfología (Wiens 2007). El criterio taxonómico y el fenético ofrecen criterios operacionales muy intuitivos y prácticos al momento de delimitar especies (Henderson 2005). El concepto más intuitivo y práctico es el taxonómico, también conocido como morfológico (Rieseberg et al. 2006). En biología, la morfología es una de las tareas primordiales de la taxonomía (Henderson 2005; Amitani 2010). Bajo el concepto taxonómico las especies presentan caracteres considerados intuitivamente diagnósticos (Cronquist 1981). El concepto taxonómico permite hasta cierto grado la subjetividad, pero es muy usado por la relativa facilidad para observar y registrar la información morfológica. El concepto taxonómico considera principalmente caracteres cualitativos, pero no se descartan las diferencias cuantitativas. Los patrones de variación en las dimensiones de las formas pueden ser muy complejos y a simple vista difíciles de detectar. Sin el uso de herramientas estadísticas, es muy difícil reconocer especies mediante la consideración de variables cuantificables (Henderson 2005).

¹ Se dice que un carácter está fijo en la especie cuando dicho carácter está presente en todos los individuos de la especie.

² En una misma rama de un árbol filogenético.

El concepto fenético (Sokal 1973) se distingue del taxonómico por el uso de herramientas estadísticas para tratar de evitar la subjetividad (Henderson 2005). La variación morfológica puede ser medida y analizada para encontrar grupos de individuos que se diferencian de otros grupos por el tamaño de sus elementos (estructuras, órganos, etcétera). La estadística multivariada se usa para analizar simultáneamente diferentes variables (caracteres cuantificables), con el fin de encontrar patrones discontinuos en la variación de los elementos considerados. La estadística multivariada está formada por métodos que consideran la correlación entre diferentes variables (Fisher 1936; Manly 1994). Los patrones discontinuos en la variación cuantificable hace posible formar grupos discretos de individuos. Definir grupos con morfología discreta permite formular hipótesis en cuanto a los límites taxonómicos en un complejo de especies (Sokal y Sneath 1961; Sneath y Sokal 1973; Crisci y López-Armengol 1983; Sneath 1995). Los grupos discretos encontrados mediante estadística multivariada pueden en realidad representar especies (Sokal 1973; Henderson 2006). Dichas hipótesis pueden ser contrastadas usando otros criterios de delimitación (Wiens 2007; Amitani 2010).

Se ha señalado la falta de congruencia en los límites interespecíficos encontrados bajo diferentes conceptos de especies (Luckow 1995), pero no se descarta la posibilidad de que exista congruencia entre los límites encontrados (DeSalle et al. 2005). No hay un método universal que integre los diferentes criterios de delimitación de especies, pero en principio se pueden contrastar los límites señalados por diferentes fuentes de información (morfológica, molecular o ecológica, etcétera) y diferentes criterios de delimitación (aislamiento reproductivo, monofilia, etcétera) para encontrar los límites más congruentes (DeSalle et al. 2005). El concepto de linaje metapoblacional (de Queiroz 1998; 2007) ha sido considerado para estudiar los límites interespecíficos mediante la búsqueda de congruencia taxonómica entre diversas fuentes de información y diferentes criterios de delimitación (Wiens 2007).

De Queiroz (1998) define a las especies como segmentos de linajes poblacionales que evolucionan por separado. Un linaje es una secuencia de poblaciones o metapoblaciones (conjunto de poblaciones) que forman una línea temporal de ancestros y descendientes (Simpson 1951; de Queiroz 1998). El concepto de linaje metapoblacional se basa en el proceso de especiación. La especiación es el proceso creativo mediante el cual las especies se multiplican (Barraclough y Nee 2001). La evolución darwiniana dice que las especies nacen mediante el proceso de especiación, cambian en el tiempo, producen nuevas especies y finalmente mueren o se extinguen (Richards 2010). Durante su formación un linaje metapoblacional adquiere de forma contingente atributos que varían en importancia y orden de aparición (de Queiroz 1998).

Los atributos contingentes a los que se refiere el concepto de linaje metapoblacional han sido establecidos como criterios operacionales bajo otros conceptos de especie. Por ejemplo, el concepto biológico de especie usa el criterio de aislamiento reproductivo (de Queiroz 2007; Fig. 1.1). Los atributos que puede adquirir un linaje metapoblacional no son un resultado inevitable del proceso de especiación, pero cuando se presentan dichos atributos son potencialmente útiles para circunscribir especies (de Queiroz 2007). Bajo el concepto de linaje metapoblacional se consideran a los caracteres contingentes como líneas de evidencia independientes (de Queiroz 2007). Los límites de especie más confiables o verosímiles se establecen de acuerdo a la congruencia existente entre diferentes líneas de evidencia (Padiál et al. 2009).

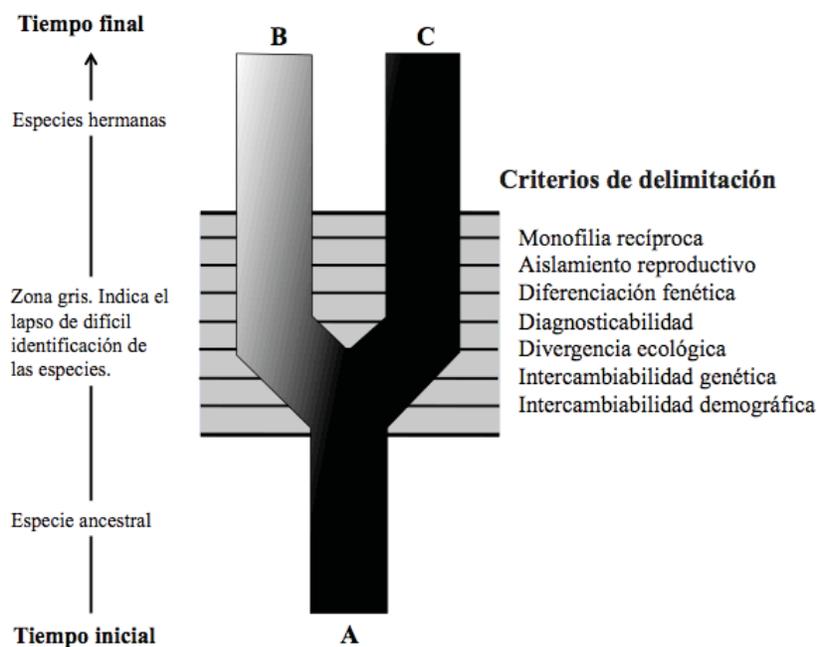


Figura 1.1. Divergencia de linajes (especiación). La especie A (ancestral) da origen a las especies A y B. Figura tomada y adaptada de Queiroz (2007).

Se espera que exista congruencia entre las diferentes líneas de evidencia al delimitar especies, pero teóricamente no siempre debe ser así. Existe heterogeneidad en el proceso evolutivo durante el proceso de especiación. Dicha heterogeneidad afecta la divergencia de linajes y origina incongruencia entre las líneas de evidencia (Padiál y de la Riva 2010). En plantas, por ejemplo, existen estudios que muestran que hay incongruencia entre los límites mostrados por la morfología con respecto de los límites mostrados por aislamiento reproductivo (Rieseberg et al. 2006). Tal vez, la incongruencia entre la morfología y el aislamiento reproductivo sea la principal razón por la que muchos botánicos duden de la existencia de especies de plantas (Rieseberg et al. 2006).

Ha habido un cambio en la forma de concebir a las especies. Existen investigadores dispuestos a aceptar que la evolución es un proceso heterogéneo y que es posible usar diferentes criterios operacionales para delimitar a las especies (Kolaczkowski y Thornton 2004; Padial y de la Riva 2010; Edwards y Knowles 2014; Harrison y Larson 2014). Debido a que los conceptos de especie son fundamentalmente diferentes, Luckow (1995) señala que la congruencia en los límites de especie obtenida usando conceptos de especie diferentes es irrelevante. Adoptando el concepto de linaje metapoblacional (de Queiroz 2007) la congruencia entre conceptos se vuelve relevante debido a que es posible asumir una causa en común que origina la congruencia en la evidencia (Padial y de la Riva 2010; DeSalle et al. 2005). Con una visión integradora o conciliadora como la asumida en el concepto de linaje metapoblacional se puede hacer uso de varios métodos previamente propuestos para delimitar especies. Dichos métodos basados en diferentes criterios de delimitación fueron propuestos en conceptos de especie diferentes al concepto de linaje metapoblacional (de Queiroz 2007). Después de todo, si las especies existen independientemente de nuestra habilidad para distinguirlas, está justificado el uso de cualquier método disponible para revelar su presencia (Luckow 1995).

Dado que existen diferentes conceptos de especie también existen diferentes métodos para delimitar especies. Es preciso señalar que no hay un método ideal para delimitar a las especies, pues todos los métodos presentan desventajas (Sites y Marshall 2003, 2004; Carstens et al. 2013). Sites y Marshall (2003, 2004) señalan que hay métodos basados en árboles y métodos que no usan árboles. Luckow (1995) señala que existen conceptos basados en patrones y métodos basados en procesos. Se puede intuir entonces que existen métodos que siguen una visión filogenética y otros una visión poblacional (basada en patrones mediante los cuales se infieren procesos de especiación). Si asumimos que la especiación es un proceso lento, que ocurre en el seno de las poblaciones y que además es un proceso heterogéneo, entonces podemos esperar que la delimitación de especies se vuelva hasta cierto punto arbitraria porque los límites aún no se definen por completo (Ghiselin 2010). Entre las principales desventajas de los métodos poblacionales es la imposibilidad de establecer límites precisos, la necesidad de un buen muestreo y disponer de marcadores muy variables (Hey y Pinho 2012). Con respecto de los métodos filogenéticos podemos decir que proporcionan límites claros debido a que están basados en la presencia de caracteres exclusivos. Estudios recientes con datos de secuenciación masiva han mostrado que es posible encontrar caracteres exclusivos en poblaciones para las que, usando un solo locus o fragmento de ADN, no era posible detectar la presencia de caracteres exclusivos (Carstens et al. 2013). De acuerdo con Harrison y Larson (2014) existen regiones genómicas que son distintas entre especies a pesar de la existencia de hibridación o introgresión entre las mismas. También es posible que las poblaciones

de una misma especie tengan caracteres exclusivos debido a un aislamiento temporal sin que esto signifique que dichas poblaciones hayan alcanzado el rango de especie (Hey y Pinho 2012). Sin embargo, si aceptamos que la especiación es un proceso lento, entonces es posible que existan especies que no muestren caracteres fijos y exclusivos en las primeras etapas de su formación, y por lo tanto estos métodos no sirven para delimitar o detectar especies de origen reciente que han retenido parte de su polimorfismo o que presentan aislamiento reproductivo incompleto.

Existen métodos que tienen una visión poblacional y filogenética. Algunos métodos basados en coalescencia (Templeton 2001; Knowles y Carstens 2007; Carstens et al. 2013) integran los métodos poblacionales con los filogenéticos. Esta integración se apoya en el supuesto de que algunas especies se originaron recientemente o están en formación, por lo que se considera que estudiar la etapa de transición entre un sistema reticular a uno jerárquico es importante para detectar el surgimiento de límites interespecíficos (Templeton 2001). Una desventaja es que las bases matemáticas de la coalescencia pueden ser muy complejas y requieren de un buen entrenamiento para dominarlas, pero la principal desventaja es que posiblemente no todos los genes estén involucrados en los procesos de especiación o estén bajo selección y por lo tanto es posible que con algunos genes no sea posible detectar los límites interespecíficos (Harrison y Larson 2014; Fujisawa et al. 2016).

Los métodos de secuenciación masiva, relativamente recientes, hacen posible la obtención de una gran cantidad de caracteres (Soltis et al. 2013). Los métodos de secuenciación masiva pueden ser usados en combinación con métodos de coalescencia y estimar los límites interespecíficos en especies formadas recientemente (Chifman y Kubatko 2014; Mirarab y Warnow 2015; Folk et al. 2016; Fujisawa et al. 2016). Sin embargo, aun existen problemas por resolver con respecto a como deben ser analizados los datos obtenidos con la secuenciación masiva (Egan et al. 2012; Fujisawa et al. 2016;). Por ejemplo, el genoma de una especie puede ser muy complejo (existen genes ortólogos, parálogos, recombinación génica, introgresión, secuencias repetitivas, elementos transponibles) por lo que la información no es sencilla de manejar y se requiere del uso de equipo de computo y entrenamiento adecuado (bioinformática), el cual no siempre es fácil o rápido de obtener (Soltis et al. 2013). Además aún se espera encontrar métodos de análisis adecuados para una gran cantidad de datos. Métodos que deben contemplar la introgresión y la retención del polimorfismo ancestral o segregación incompleta de linajes de genes (McCormack et al. 2013; Chifman y Kubatko 2014; Mirarab y Warnow 2015; Folk et al. 2016; Fujisawa et al. 2016). Estos métodos son relativamente recientes y todavía hay que esperar para ver cuales son los problemas más desafiantes por resolver.

El género *Quercus* es emblemático porque en él se han reconocido históricamente complejos de especie (Burger 1975; Grant 1971; Templeton 1989; Rzedowski et al. 2005; Nixon 2006; Zeng et al. 2010). Como en otros géneros de plantas, las especies de *Quercus* parecen mantener su integridad taxonómica a pesar de la existencia de flujo génico interespecífico. Una situación similar a la de *Quercus* ocurre con el género *Pinus* (Pinaceae). El género *Pinus* está bien representado en México. Se ha señalado a México como un centro secundario de diversificación del género *Pinus* (Richardson 1998). Muchas de las especies mexicanas de *Pinus* son de origen reciente o están en proceso de formación (Perry et al. 1998). Tal vez por su origen reciente muchas especies de pino muestran flujo génico interespecífico o carecen de caracteres moleculares exclusivos y fijos. El estudio de los límites de especie en complejos taxonómicos del género *Pinus* podría contribuir a entender los límites interespecíficos en otros grupos de plantas.

El problema de delimitación de especies en *Pinus*

El género *Pinus* presenta problemas de delimitación similares a los de *Quercus*, el cual es un género formado principalmente por árboles. Muchas de las especies de *Pinus* son árboles, lo cual explica parcialmente la existencia de problemas de delimitación en este género. En comparación con otros tipos de plantas, los árboles muestran altos niveles de diversidad genética, tasas bajas de especiación y tasas bajas de sustitución de nucleótidos en sus secuencias de ADN (Petit y Hampe 2006). Los árboles, y en general los pinos, presentan índices altos de exogamia, niveles altos de flujo génico intraespecífico, tamaños efectivos grandes en sus poblaciones y periodos largos de vida (Petit y Hampe 2006). En las especies del género *Pinus* existe mucha homoplasia. Generalmente, los ejemplares de pino son identificados mediante una combinación de caracteres (Carvajal y McVaugh 1992; Farjon et al. 1997). Para ver como afectan las características biológicas de los pinos en su delimitación taxonómica, se puede tomar en cuenta la falta de congruencia en el número de especies reconocidas históricamente.

Hay una incongruencia en el número de especies reconocidas por los taxónomos expertos en *Pinus*. Engelmann (1880) señala que "Es muy fácil identificar a un pino, pero puede ser difícil establecer a que especie pertenece". Una de las causas del desacuerdo en el número de especies es la amplia variación y similitud morfológica que exhiben las especies de pino (Shaw 1909; Carvajal y McVaugh 1992; Farjon 2005). Un ejemplo que muestra este problema es el catálogo de Roetzl "*Catalogue de Graines de Conifères Mexicains*". En el catálogo de Roetzl, publicado en 1857, se citan 82 especies mexicanas de pino. Aunque las 82 especies mencionadas pueden ser reducidas a solo seis o siete especies descritas con anterioridad (Shaw 1909). En su revisión del género, Engelmann (1880) señala la existencia de 70 u 80 especies sin poder dar una cifra exacta. Shaw

(1914) reconoce 66 especies, Critchfield y Little (1966) reconocen 94, Mirov (1967) reconoce 105, Carvajal y McVaugh (1992) reconocen ~100 especies, Price et al. (1998) enlistan 111 especies y Farjon y Filer (2013) reconocen 113 especies. Por los problemas de delimitación no existe una cifra exacta del número de especies de pinos en México. Para México, Shaw (1909) reconoce 18 especies, Standley (1920-26) reconoce 28, Martínez (1948) reconoce 39, Mirov (1967) reconoce 29 "correctamente publicadas", Little y Critchfield (1969) reconocen 35, Perry (1991) reconoce 51, Farjon y Styles (1997) reconocen 42 y Gernandt y Pérez de la Rosa (2014) reconocen 49. Las más de 40 especies mexicanas constituyen cerca del 50% de las especies del género (Gernandt y Pérez de la Rosa 2014). Para hacer un tratado completo de *Pinus*, aún se deben hacer estudios que revelen claramente los límites taxonómicos y relaciones filogenéticas entre las especies del género (Price et al. 1998).

Existen barreras ecológicas, fenológicas e intrínsecas que impiden el entrecruzamiento entre especies, especialmente entre especies no muy emparentadas (Ledig 1998). Se puede inferir indirectamente la existencia de aislamiento reproductivo entre especies si se descubren diferencias fenológicas o ecológicas que pudieran impedir el flujo génico (Schuster et al. 1989). Diferencias en el tiempo de liberación del polen (diferencias fenológicas) entre especies o poblaciones de una misma especie pueden ser importantes barreras fenológicas a la polinización (Ledig 1998). Por ejemplo, una separación de 400 metros en la elevación asegura que exista una diferencia en el tiempo de liberación de polen entre poblaciones de *P. flexilis* E. James, lo que a su vez impide la polinización entre individuos de dichas poblaciones. Sin embargo, en la misma especie existe flujo génico entre poblaciones separadas por la elevación debido a la presencia de poblaciones intermedias. El flujo génico entre las poblaciones de *P. flexilis* también puede ocurrir mediante la dispersión de las semillas (Schuster et al. 1989). Las barreras ecológicas y fenológicas pueden ser vencidas originando la formación de híbridos entre especies no hermanas (Ledig 1998). Por ejemplo, se sabe que la alteración ecológica del ambiente (tala inmoderada) ocasiona que *P. taeda* L. y *P. palustris* Mill. formen híbridos de manera natural. Aunque es posible que las poblaciones originales de *P. taeda* y *P. palustris* se restablezcan después de cierto tiempo (Ledig 1998), es decir, las barreras al flujo génico se restablecen. No obstante, la falta de aislamiento reproductivo parece ser común en muchas especies vegetales (Rieseberg y Brouillet 1994). Si se usara el aislamiento reproductivo de manera estricta se reconocerían menos especies de pino de las que ahora se reconocen.

Trabajos de hibridación artificial en *Pinus* han mostrado que el aislamiento reproductivo puede ser incompleto entre especies no emparentadas directamente (Duffield 1952; Keng y Little 1961;

Critchfield 1963, 1975, 1986). Por las características reproductivas y de crecimiento de los pinos, en periodos cortos de experimentación, es difícil obtener resultados definitivos que indiquen la existencia de aislamiento reproductivo entre especies. Si los híbridos se entrecruzan con las especies parentales, la hibridación puede ocasionar introgresión génica entre las especie involucradas (Rieseberg y Carney 1998). Debido a la introgresión génica los haplotipos de una especie no forman grupos monofiléticos (Willyard et al. 2009). En *Pinus*, a pesar de la introgresión génica, el uso de caracteres moleculares ha permitido inferir algunos de los procesos que ocurren durante la especiación y explicar por qué existen límites confusos entre sus especies (Moreno-Letelier et al. 2013).

Procesos de especiación en *Pinus*

En general, debido a que la especiación o la evolución es un proceso heterogéneo se considera que son muchos factores ambientales los que pueden causar la especiación (Kolaczowski y Thornton 2004; Padial y de la Riva 2010). Generalmente los factores involucrados en la evolución de las especies imponen límites en la distribución de las mismas. Por ejemplo, el tipo de suelo puede ser determinante en la distribución de algunas especies de pino. *Pinus Rzedowski* Madrigal & M.Caball. no crece en taludes de piedra caliza a pesar de que otras especies, por ejemplo *P. pseudostrobus* Lindl., *P. herrerae* Martínez y *P. oocarpa* Schiede, en su misma área de distribución si lo hacen (Farjon y Styles 1997). En general se puede decir que entre la vegetación, el suelo y microorganismos simbioses (por ejemplo, las micorrizas)³ suele existir una fuerte relación de interdependencia. En resumen los pinos, y la vegetación en general, están acoplados a su ambiente, formando un sistema dinámico de interacciones (Scholes y Nowicki 1998). El clima es un factor importante en la distribución y evolución de los pinos (Axelrod 1986; van Zonneveld et al. 2009).

En México, la diversificación de *Pinus*, influenciada por el clima, se hace evidente porque las especies presentan patrones de distribución muy marcados por la elevación. Hay una zonación altitudinal en la distribución de los taxa de *Pinus*. Un taxón reemplaza a otro conforme se incrementa la elevación del terreno (Perry et al. 1998). Las condiciones climáticas pueden influir más en la especiación de plantas que en animales, quizá porque las plantas son más sensibles a la heterogeneidad de las condiciones ambientales debido a su naturaleza sésil (Anacker y Strauss 2014). La adaptación de los pinos a grandes fluctuaciones climáticas y fisiográficas ha tenido un enorme impacto en la diversificación de especies en México y América Central (Perry et al. 1998).

³ La micorriza es una estructura formada por la raíz de una planta y un hongo. Los hongos micorrízicos crecen en asociación con los pinos formando hifas que envuelven o penetran su raíz (Richardson 1998).

Los gradientes ambientales muy marcados facilitan la diversificación y especiación ecológica en plantas (Kawakami y Butlin 2012).

El crecimiento de los pinos está influenciado directamente por su entorno, en especial el clima (Rundel y Yoder 1998). En México los pinos se encuentran desde hábitats tropicales o subtropicales o en climas templados sobre cordilleras (Rundel y Yoder 1998). México es un país montañoso y las montañas le imprimen al clima características que dependen de la elevación. En México el cambio de un tipo de clima a otro puede deberse a un cambio de latitud, a un cambio de elevación o a ambos factores (García 2004). La corteza terrestre que corresponde al territorio mexicano se cuenta entre las más accidentadas de la Tierra. México cuenta con ocho serranías —el Sistema Montañosos de Baja California, la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental, el Eje Volcánico Transversal, la Sierra Madre del Sur, el Sistema Montañoso del Norte de Oaxaca, el Macizo Central de Chiapas y la Sierra Madre de Chiapas (Rzedowski 2006). Dichas serranías tienen una alta correlación con los límites de las provincias biogeográficas de México (CONABIO 1997; Morrone 2005). Por hallarse dentro de una zona tropical, los climas templados de México tienen características distintas de los climas templados en latitudes medias o boreales (García 2004). Hay que recordar que el territorio mexicano está en ambos lados del Trópico de Cáncer (Rzedowski 2006). El esquema biogeográfico de Morrone (2005) reconoce una Zona de Transición Mexicana que reúne entre otras áreas geográficas a la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico y Sierra Madre del Sur. Esta Zona de Transición Mexicana puede ser definida como un área compleja y variada en donde se superponen elementos bióticos neotropicales y neárticos (Morrone 2005). Las fluctuaciones climáticas asociadas con procesos geológicos intensos han promovido el aislamiento y divergencia de las poblaciones mexicanas de pinos (Mirov 1967; Farjon y Styles 1997).

La determinación de los límites taxonómicos entre especies hermanas es muy importante en los estudios de especiación (Hey et al. 2005). En el proceso de especiación se reconocen tradicionalmente el modelo alopátrico, el simpátrico y el parapátrico. Los tres modelos están enmarcados en un contexto de distribución geográfica de las poblaciones (Veltsos y Ritchie 2011). La especiación alopátrica hace referencia al surgimiento de especies a partir de poblaciones coespecíficas que están aisladas geográficamente. El aislamiento geográfico, conocido como alopatría, ha sido considerado un prerrequisito para que ocurra aislamiento reproductivo entre poblaciones (Anacker y Strauss 2014). En *Pinus* (Pinaceae) se ha propuesto la alopatría como primer promotor de la especiación, aunque existen casos en donde el contacto secundario ha sido la causa de que existan especies de origen híbrido. Por ejemplo, *Pinus densiflora* Siebold & Zucc. es

una especie de origen híbrido (Gao et al. 2012; Wang y Wang 2014). La especiación simpátrica se refiere al surgimiento de especies hermanas en la misma área geográfica, es decir, sin la existencia de aislamiento geográfico entre las poblaciones parentales (Fitzpatrick et al. 2009). La especiación parapátrica se refiere al surgimiento de especies a partir de poblaciones coespecíficas que se distribuyen en áreas geográficas muy cercanas o en las que su distribución se sobrepone en sus extremos (Petit y Excoffier 2009). La simpatria o parapatria han sido consideradas poco frecuentes o de poca importancia en el surgimiento de aislamiento reproductivo o promoción de los procesos de especiación (Barraclough y Nee 2001; Veltsos y Ritchie 2011). Se piensa que en *Pinus* la especiación alopátrica es la más importante (Wang y Wang 2014; Mastretta-Yanes et al. 2015). Antes de describir a las especies usadas como modelo en este estudio se describen las características más relevantes de la morfología de *Pinus* y su taxonomía.

Morfología del género *Pinus*

El género *Pinus* está formado por plantas leñosas, generalmente árboles. Los pinos habitan principalmente zonas templadas, aunque algunos pinos se han adaptado a las condiciones tropicales (Mirov 1967; Jardón-Barbolla et al. 2011). En *Pinus* existen especies cuyos individuos pueden llegar a vivir más de mil años (e. g. *Pinus longaeva* D.K.Bailey). Otras especies de *Pinus* están formadas por individuos muy altos. Por ejemplo, la altura de algunos individuos de *Pinus lambertiana* Douglas alcanza los 70 m (Mirov 1967; Richardson 1998). El principal patrón de ramificación en pinos es monopodial, pero algunas veces su crecimiento es arbustivo (Farjon 2005). Sus individuos poseen un tronco leñoso, comúnmente de fuste recto y con ramificaciones laterales (Shaw 1914). El crecimiento meristemático del primordio apical domina sobre el crecimiento meristemático de los primordios laterales. Por consiguiente existe un patrón de ramificación simétrico y jerárquico desde el centro (eje principal) hacia la periferia (Farjon y Styles 1997). La mayoría de los pinos desarrollan una corteza rugosa y gruesa que puede presentar patrones de crecimiento muy semejantes entre especies (Fig. 1.2). Los pinos presentan dimorfismo en sus ramas. Un primer tipo de rama soporta directamente a las hojas, es muy reducido y poco evidente. El segundo tipo de rama es una estructura larga y conspicua que soporta a otras ramas o a ramas del primer tipo (Farjon y Styles 1997). Los pinos contienen resina en todas sus partes y presentan permanentemente follaje verde.

En *Pinus* las hojas son de cuatro tipos, cotiledones (hojas embrionarias), hojas primarias, catáfilas y hojas secundarias (Farjon y Styles 1997). Los cotiledones son muy parecidos entre especies. Las hojas primarias aparecen después que los cotiledones. La forma de las hojas primarias es entre linear y acicular, sus márgenes son serrados, son anfistomáticas (tienen estomas en su cara

adaxial y abaxial) y generalmente son glaucas (Farjon y Styles 1997). Las catáfilas o brácteas son hojas laminares, escariosas, subuladas o lanceoladas, a menudo recurvadas, pulvinuladas y en algunas especies de márgenes ciliados. La morfología indica que evolutivamente las hojas primarias dieron origen a las catáfilas. En pinos la catáfila es el único tipo de hoja que no fotosintetiza (Farjon y Styles 1997). Los cotiledones y las hojas primarias de pino solo se producen en las primeras etapas de vida de una planta. Puede decirse que las hojas secundarias son las últimas en surgir. En individuos adultos solo se observan catáfilas y hojas secundarias. En los individuos adultos las catáfilas son las que crecen en la base de fascículos foliares. Con excepción de *Pinus krempfii* Lecomte, las hojas secundarias en *Pinus* tienen forma acicular, todos crecen sobre ramas muy cortas que están rodeadas por una vaina formada de hojas escariosas (Perry 1991). En *Pinus krempfii* las hojas son anchas y planas (Ickert-Bond 2000). Los individuos de *Pinus* son monoicos.

Las estructuras reproductoras en *Pinus* son el cono polínico (estróbilo microesporangiado) y el cono ovulífero (estróbilo megaesporangiado; productor de semillas). El cono polínico es muy pequeño comparado con el cono ovulífero y está formado por un eje con muchos microsporófilos arreglados de manera helicoidal (Farjon et al 1997; Farjon 2005). La forma del cono polínico varía de ovoide-oblonga a cilíndrica y mide, por lo general, menos de 5 cm. En su base el cono polínico tiene hojas escariosas que se unen al eje en un arreglo helicoidal (Mirov 1967; Farjon y Styles 1997; Wang et al. 2000). El cono ovulífero está formado por un eje y escamas leñosas que están soportadas en su base por una bráctea muy pequeña e insignificante. En un cono maduro el extremo distal y abaxial de las escamas presenta dos estructuras fácilmente distinguibles, el umbón y la apófisis. La existencia del umbón y apófisis es el reflejo del desarrollo del cono en dos etapas de crecimiento (Ledig 1998; Tomlinson y Takaso 2002). Las escamas sostienen a las semillas, las cuales pueden tener alas prominentes o rudimentarias.

La semilla consta de una cubierta externa (testa) que protege al embrión, al megagametofito y la nucela. Las alas de la semilla son estructuras laminares y escariosas que se originan de la escama del cono. Cuando el ala es prominente sirve para la dispersión eólica de la semilla (Farjon y Styles 1997). Por la forma en que el ala está sujeta a la semilla se le califica como articulada o no articulada (adnata). Las alas articuladas están sujetas de manera laxa a las semillas mediante extremos en forma de ganchos, pero las alas adnatas rodean el cuerpo de la semilla y están sujetas firmemente a la misma (Carvajal y McVaugh 1992).

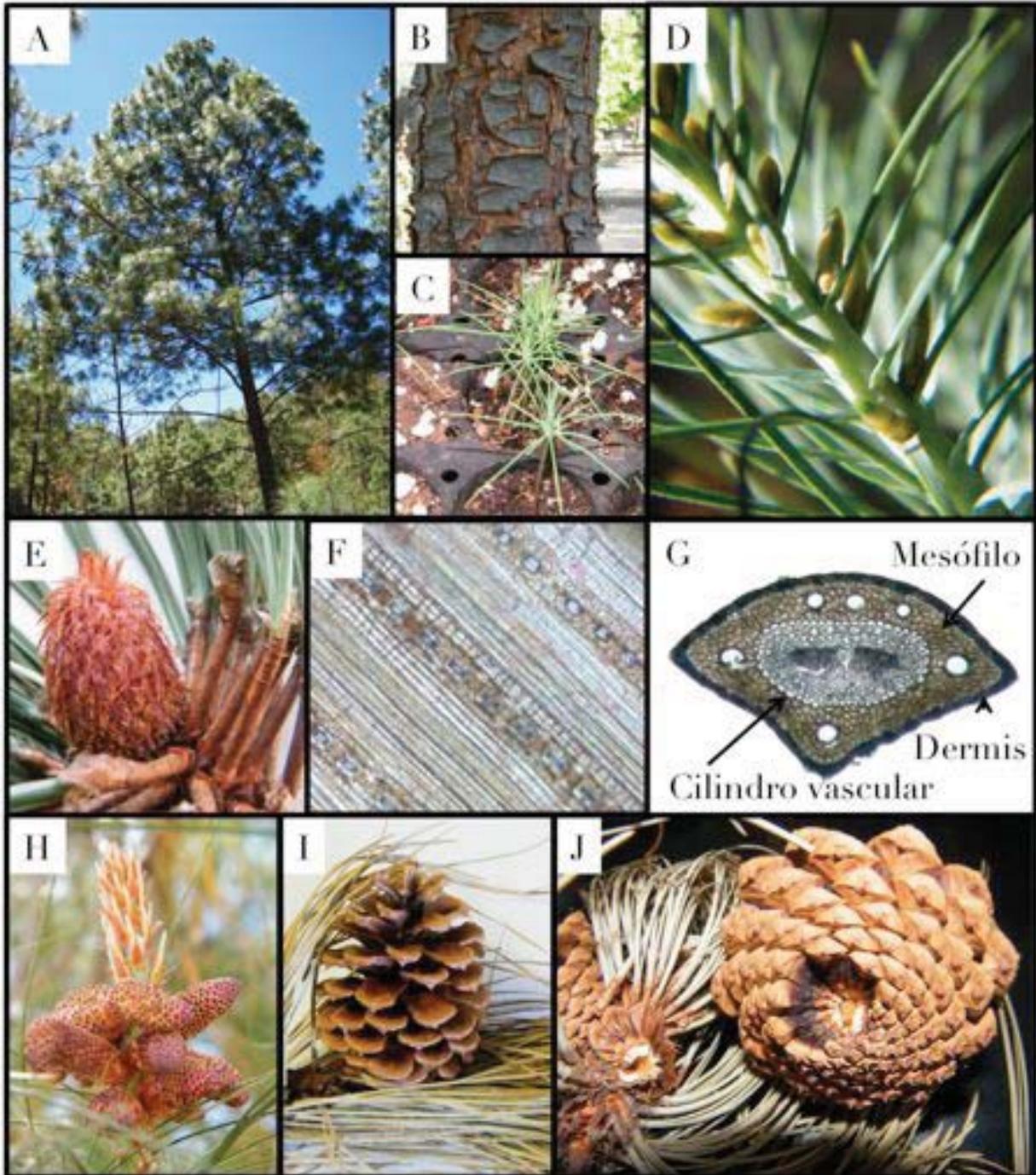


Figura 1.2. Estructuras de *Pinus*. A. Ejemplar adulto; B) Corteza de un ejemplar adulto; C) Plántulas; D) Rama lateral con hojas primarias y brotes de ramas secundarias; E) Vástago con brácteas y hojas maduras con vainas rodeando el fascículo; F) Líneas de estomas en la superficie abaxial de una hoja, vistas con microscopio de luz; G) Vista de una sección transversal de hoja; H) Conos polínicos y vástago con catáfilas de vainas en desarrollo; I) Cono ovulífero; J). Vista inferior de un cono con pedúnculo caedizo.

Taxonomía del género *Pinus*

Por la gran importancia económica y ecológica de *Pinus* (Carvajal y McVaugh 1992), la sistemática del género ha recibido mucha atención (Price et al. 1998; Wang y Wang 2014). En los tratamientos taxonómicos de este género se ha considerado a la morfología, la citología, el entrecruzamiento, productos químicos secundarios, proteínas y caracteres moleculares —sitios de restricción, secuencias de ADN de plasto (ADNpl), de núcleo (ADNnc) y de mitocondria (ADNmt) (Price et al. 1998; Wang y Wang 2014). Los análisis sistemáticos basados en la morfología indican que *Pinus* es un género claramente monofilético. El desarrollo de hojas en forma de acícula es una de las características que distingue a *Pinus* de otras pináceas (Farjon y Styles 1997; Price et al. 1998; Gernandt et al. 2005). Los análisis filogenéticos basados en la morfología indican que existe mucha homoplasia entre las especies de *Pinus* (Farjon y Styles 1997). Un reflejo de la gran cantidad de homoplasia en *Pinus* es la existencia de varias propuestas para clasificar a sus especies. Las propuestas de clasificación basada en la morfología han sido en cierta medida incongruentes (Price et al. 1998). La evidencia molecular del ADNpl, aunque sin descartar del todo a la morfología, ha servido para hacer una clasificación en donde se reconocen 11 subsecciones (Fig. 1.3) (Gernandt et al. 2005).

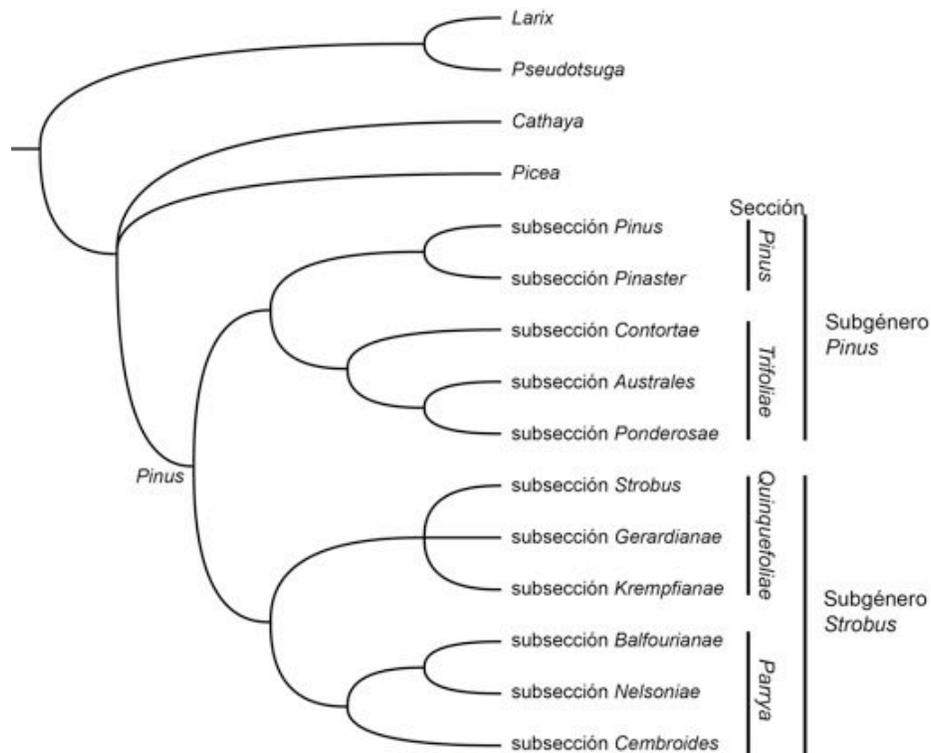


Figura 1.3. Relaciones de parentesco entre las subsecciones del género *Pinus*. Imagen basada en la información mostrada por Gernandt et al. (2005). Se muestra a *Cathaya*, *Larix*, *Picea* y *Pseudotsuga* como los géneros más emparentados a *Pinus*. Imagen cortesía de David S. Gernandt.

La subsección *Ponderosae*

Las principales especies de las que se ocupa este trabajo, *Pinus douglasiana* Martínez y *P. maximinoi* H. E. Moore, pertenecen a la subsección *Ponderosae* Loudon, en la sección *Trifoliae* Duhamel del subgénero *Pinus* (Little y Critchfield 1969; Price et al. 1998; Gernandt et al. 2009). Análisis filogenéticos usando ADN de núcleo y de plasto muestran que la subsección *Ponderosae* es monofilética y hermana de la subsección Australes (Liston et al. 1999, 2003; Gernandt et al. 2005; Syring et al. 2005; Eckert y Hall 2006). La subsección *Ponderosae* está formada por 17 especies o 20 (Tabla 1.1), si se reconoce a *P. yecorensis*, *P. arizonica* y *P. scopolorum* (Gernandt et al. 2009). Siguiendo la clasificación de Gernandt et al. (2009) podemos decir que la subsección *Ponderosae* se distribuye desde el oeste de Norte América hasta América Central (Little y Critchfield 1969; Farjon y Styles 1997; Price et al. 1998; Gernandt et al. 2005). La subsección *Ponderosae* se forma de especies con vaina persistente, canales de resina con una posición media o interna, conos ovulados de tamaño mediano (de los 5 cm de largo por 3.5 cm de ancho a los 35 cm de largo por 20 cm de ancho), conos que se abren al madurar, umbón dorsal y alas articuladas (Gernandt et al. 2005, 2009). En esta subsección, el número de hojas por fascículo es un carácter altamente polimórfico (2) 3–5 (8). La variación en el número de hojas por especie implica que el número de hojas no está fijo en la subsección (Gernandt et al. 2005).

Tabla 1.1. Lista de especies de la subsección *Ponderosae* (Gernandt et al. 2005; 2009)

#	Especie	Distribución
1	<i>P. cooperi</i> C. E. Blanco	En el oeste de México
2	<i>P. durangensis</i> Martínez	En el oeste de México
3	<i>P. engelmannii</i> Carrière	En el oeste de México
4	<i>P. jeffreyi</i> A.Murray bis	Al sur de Oregón en Estados Unidos de América hasta el norte de Baja California en México
5	<i>P. ponderosa</i> Douglas ex C. Lawson	Desde el oeste de Canadá hasta el sur de California en Estados Unidos de América
6	<i>P. arizonica</i> (Engelm.) Shaw	Desde Arizona y Nuevo México en Estados Unidos de América hasta el norte de México
7	<i>P. scopolorum</i> (Engelm.) Lemmon	Desde Montana en Estados Unidos de América hasta el norte de México
8	<i>P. washoensis</i> H. Mason & Stockw.	Desde el este de California hasta el oeste de Nevada en Estados Unidos de América
9	<i>P. devoniana</i> Lindl.	Desde el oeste y la parte central de México hasta Guatemala
10	<i>P. donnell-smithii</i> Mast.	En Guatemala
11	<i>P. hartwegii</i> Lindl.	Desde el norte de México hasta Honduras
12	<i>P. montezumae</i> Lamb.	Desde el norte de México hasta Guatemala
13	<i>P. douglasiana</i> Martínez	Del oeste hasta el sur de México

Tabla 1.1. (Continuación)

#	Especie	Distribución
14	<i>P. maximinoi</i> H. E. Moore	Del oeste de México hasta el norte de Nicaragua
15	<i>P. nubicola</i> J. P. Perry	Desde el sur de México hasta Guatemala
16	<i>P. pseudostrobus</i> Lindl. var. <i>apulcensis</i> (Lindl.) Shaw var. <i>estevezii</i> Martínez var. <i>pseudostrobus</i>	Desde el centro de México hasta el Salvador Al este de México Desde el norte de México hasta el Salvador
17	<i>P. yecorensis</i> Debreczy & I. Rácz	En el noroeste de México
18	<i>P. coulteri</i> D. Don	Desde California en Estados Unidos de América hasta Baja California en México.
19	<i>P. sabiniana</i> Douglas	En California, Estados Unidos de América
20	<i>P. torreyana</i> Parry ex Carrière	En la Isla de Santa Rosa, California (Estados Unidos de América)

La relevancia de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* como modelo de estudio de especies con problemas de delimitación

El estudio de los límites de especie entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* es importante porque puede generar información relevante en la delimitación de otras especies de pino o especies de plantas con atributos similares. Posiblemente *P. douglasiana* y *P. maximinoi* sean especies de origen reciente o estén aún en un proceso de formación. El estudio de especies de origen reciente o de especies en formación puede contribuir a entender cual es el patrón o patrones mediante los cuales surge una especie y si dichos patrones están asociados a los criterios operacionales que suelen emplearse para delimitar especies. De acuerdo a lo reportado para especies de *Pinus* (Richardson 1998; Farjon y Filer 2013) tanto *Pinus douglasiana* como *P. maximinoi* presentan tiempos de vida largos, fertilización cruzada, distribución amplia y posiblemente forman híbridos con otras especies de pino. Estos atributos biológicos en los pinos están relacionados con la falta de límites claros entre especies. La delimitación taxonómica de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* pueden servir como antecedente para delimitar a otras especies de *Pinus* u otros grupos de plantas, en especial árboles. *Pinus douglasiana* y *P. maximinoi* han sido estudiadas anteriormente (Martínez 1948; Stead 1983a, b; Stead y Styles 1984), por lo que se sabe que las estructuras más variables de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son el cono ovulífero y la hoja. Afortunadamente el cono ovulífero y la hoja de pino pueden observarse y colectarse con relativa facilidad.

En México, *P. douglasiana* y *P. maximinoi* forman parte importante de los bosques de pino. Además de la importancia ecológica de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, es pertinente señalar que la madera de *P. douglasiana* es de buena calidad y podría ser aprovechada en la industria (Olvera-Coronel 1985), de la misma forma en que se aprovecha la madera de *P. maximinoi* (Dvorak et al.

2000). El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de dichas especies y por lo tanto en su aprovechamiento ecológico y forestal.

Distinción entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*

George Bentham, botánico inglés, describió y nombró en 1842 a *Pinus tenuifolia* Benth. de material recolectado por Hartweg cerca de la Ciudad de Guatemala. El material del ejemplar tipo consiste exclusivamente de ramas sin conos (Farjon y Styles 1997). Después de un siglo, Moore (1966) señaló que el nombre *P. tenuifolia* Benth. es ilegal por ser homónimo de *Pinus tenuifolia* Salisb. (Salisbury 1796). Este último nombre es actualmente sinónimo de *Pinus strobus* L. (Linneo 1753; Stead y Styles 1984), especie del este de E. U. y Canadá (Farjon 2005). Moore (1966) propuso cambiar el nombre de *P. tenuifolia* Benth por el de *P. maximinoi*.

A partir de material recolectado en Nayarit (México), Martínez (1943) distinguió a *P. douglasiana* de *P. maximinoi* por tener hojas más gruesas y conos ligeramente más grandes (con escamas y apófisis más gruesas). Stead (1983a, b), con técnicas de estadística multivariada, mostró evidencia que apoya la distinción entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Esta distinción taxonómica es comúnmente aceptada por diferentes autores (Perry 1991; Farjon y Styles 1997; Farjon 2005). Debido a que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son morfológicamente semejantes son consideradas especies hermanas (Martínez 1948). A pesar de las diferencias morfológicas entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, los errores de identificación cometidos en herbario, en campo y la literatura indican que estas diferencias no son consistentes y existe un problema de delimitación taxonómica entre dichas especies (Farjon y Styles 1997). Los principales caracteres con los que se ha distinguido a *P. douglasiana* de *P. maximinoi* son cuantitativos (Stead y Styles 1984), por lo que es posible que los rangos de variación en dichos caracteres se sobrepongan causando dificultades en la identificación de dichas especies.

Problemas de delimitación morfológica entre *Pinus douglasiana*, *P. maximinoi* y especies afines

El problema de circunscripción entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* se complica porque comparten muchos caracteres con *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis* y se piensa que tienen un parentesco muy cercano con estas dos últimas especies. Martínez (1948) agrupa a *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus* en la subsección *Pseudostrobus*. Esta subsección es informalmente tratada por Stead y Styles (1984) como grupo *Pseudostrobus*, y por Carvajal y McVaugh (1992), también informalmente, como complejo *Pseudostrobus*. Por sus caracteres morfológicos y moleculares

(ADNpl), *P. yecorensis* puede ser incluida en el complejo *Pseudostrobus* (Gernandt et al. 2009). Se considera que *P. yecorensis* es endémica de México y solo se distribuye en la mitad norte de la Sierra Madre Occidental (Debreczy y Rácz 1995; Ferguson et al. 2001). Las cuatro especies tienen comúnmente cinco hojas por fascículo (Martínez 1948; Farjon y Styles 1997). Para referirnos al conjunto formado por *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis* se usará el término "complejo *Pseudostrobus*".

Análisis filogenéticos usando secuencias moleculares de plasto indican que, con excepción de *P. pseudostrobus*, las especies del complejo *Pseudostrobus* presentan una relación estrecha de parentesco. En un estudio filogenético de la subsección *Ponderosae* (Gernandt et al. 2009), en donde se emplearon secuencias de ADNpl como fuente de información (*matK*, espaciadores *trnD-trnY-trnE*, espaciador *chlN-ycf1* y dos fragmentos codificadores del gen *ycf1*), se encontró que los haplotipos correspondientes a *P. douglasiana* forman un grupo monofilético, junto con haplotipos de *P. yecorensis* y dos de tres haplotipos encontrados en *P. maximinoi*. Dichos haplotipos de *P. douglasiana*, *P. yecorensis* y *P. maximinoi* se anidan formando un grupo monofilético (llamado "Devoniana") con haplotipos de *P. arizonica*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. scopulorum*, *P. devoniana* y *P. engelmannii* en la subsección *Ponderosae*. Debido a que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* presentan intrusiones de la hipodermis y un cono con pedúnculo persistente —este último carácter también presente en *P. yecorensis*— se diferencian del resto de las especies del clado Devoniana. Por su parte, *P. pseudostrobus* se agrupa en un clado monofilético (clado Montezumae) con *Pinus nubicola* J. P. Perry, *P. montezumae*, *P. hartwegii* y un ejemplar de *P. maximinoi*. Entonces, existe la posibilidad de que *P. pseudostrobus* sea más cercana a otras especies de la subsección *Ponderosae* que al resto de las especies del complejo *Pseudostrobus*. Como se señaló, no todos los haplotipos de *P. maximinoi* se agrupan en un mismo clado, es decir, los haplotipos (ADNpl) de *P. maximinoi* no forman un grupo monofilético (Gernandt et al. 2009). Se infiere entonces la posibilidad de que exista introgresión de ADNpl de *P. pseudostrobus* Lindl. hacia *P. maximinoi* (Gernandt et al. 2009; Willyard et al. 2009; Hernández-León et al. 2013). Por la similitud morfológica de algunos ejemplares de *P. pseudostrobus* con los de *P. maximinoi*, Critchfield y Little (1966) y Little y Critchfield (1969) consideran que *P. maximinoi* es un sinónimo de *P. pseudostrobus*.

Algunos taxónomos no reconocen *P. yecorensis* como una especie válida (Farjon y Styles 1997; Farjon 2005), pero la evidencia molecular (ADNpl) apoya su existencia (Gernandt et al. 2009). La misma evidencia molecular indica el parentesco cercano de *P. yecorensis* con *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Dada la similitud morfológica y parentesco cercano de *P. yecorensis* con *P. douglasiana*

y *P. maximinoi* se incluyó a *P. yecorensis* para esclarecer los límites taxonómicos entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

Pinus pseudostrabus es morfológicamente muy variable y de amplia distribución (Farjon 1995; Farjon y Styles 1997). Esta especie se distribuye, sobre las cordilleras montañosas, desde el noroeste (Sinaloa) y noreste (Coahuila) de México hasta el norte de Nicaragua. La variación morfológica de *P. pseudostrabus* ha originado controversias en cuanto al reconocimiento de variedades o grupos que la integran (Farjon 1995; Debreczy y Rácz 2011). Farjon y Styles (1997) reconocen dos variedades de *P. pseudostrabus* (Cuadro 1.2). Las variedades de *P. pseudostrabus* reconocidas por Farjon y Styles (1997) son *Pinus pseudostrabus* var. *pseudostrabus* (de material recolectado en Michoacán y la Ciudad de México, antes D. F.) y *P. pseudostrabus* var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw (de material recolectado en Hidalgo). De material recolectado en Oaxaca, Martínez (1945) reconoce a *P. pseudostrabus* var. *oaxacana*, pero Mirov (1958) la reconoce como especie —*Pinus oaxacana* Mirov. La especie *P. oaxacana* es reconocida por expertos en *Pinus*, como Perry (1991) y Debreczy et al. (2011). Sin embargo, Farjon (1995) considera que Martínez (1945) y Mirov (1958) están en un error y señala que el material oaxaqueño pertenece a la variedad *P. pseudostrabus* var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw, descrita de material hidalguense (Shaw 1909).

Distribución de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*

Entre diferentes autores existen controversias en cuanto a los rangos de distribución señalados para *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Dichas controversias se deben en parte al problema de circunscripción entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Se considera que *P. douglasiana* es endémica de México. A grandes rasgos, *P. douglasiana* se distribuye desde Sinaloa hasta Oaxaca (Martínez 1948; Farjon y Styles 1997). Se ha señalado que *P. maximinoi* se distribuye desde Sonora, en el noroeste de México (Ferguson et al. 2001), hasta Nicaragua (Critchfield y Little 1966; Perry 1991). Otros autores consideran que *P. maximinoi* se distribuye desde Jalisco hasta Nicaragua (Stead y Styles 1984). Con fines de aprovechamiento *P. maximinoi* se cultiva fuera de su rango de distribución natural, en países tropicales como Sudáfrica, Colombia y Brasil (Zamora-Zerrano 1993; Dvorak et al. 2000; Etori et al. 2004).

Cuadro 1.2. División de *Pinus pseudostrabus* en subespecies, variedades y formas de acuerdo a diferentes autoridades.

Shaw (1909)

P. pseudostrabus Lindl.
P. pseudostrabus var. *apulcensis* Lindl.
P. pseudostrabus var. *tenuifolia* Benth.

Martínez (1948)

P. pseudostrabus Lindl.
P. pseudostrabus var. *oaxacana* Martínez
P. pseudostrabus var. *apulcensis* (no sensu Shaw 1909)
P. pseudostrabus var. *coatepecensis* Martínez
P. pseudostrabus var. *estevezi* Martínez
P. pseudostrabus f. *protuberans* (Roezl) Martínez

Mirov (1967)

P. oaxacana Martínez
P. pseudostrabus

Stead y Styles (1984)

P. pseudostrabus Lindl. subsp. *pseudostrabus*
P. pseudostrabus Lindl. subsp. *pseudostrabus* var. *oaxacana* (Mirov) Harrison
P. pseudostrabus Lindl. subsp. *apulcensis* (Lindl.) Stead

Perry (1991)

Subsección *Pseudostrabus*
P. pseudostrabus Lindl.
P. pseudostrabus f. *protuberans* Martínez
P. pseudostrabus f. *megacarpa* Loock
Subsección *Oaxacana*
P. estevezi Martínez
P. pseudostrabus var. *apulcensis* Martínez
P. pseudostrabus var. *coatepecensis* Martínez
P. oaxacana Mirov
P. nubicola Perry

Farjon y Styles (1997)

P. pseudostrabus Lindl.
P. pseudostrabus var. *pseudostrabus* f. *pseudostrabus*
P. pseudostrabus var. *pseudostrabus* f. *protuberans* Martínez
P. pseudostrabus var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw

Price et al. (1998)

P. pseudostrabus Lindl.
P. pseudostrabus var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw [*P. apulcensis* Lindl. incluyendo a *P. oaxacana* Mirov]
P. pseudostrabus var. *estevezi* Martínez
P. pseudostrabus var. *pseudostrabus*

Se considera que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* prefieren climas distintos. Las diferencias en las preferencias climáticas de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* se ven reflejadas en sus diferencias de distribución tomando en cuenta la elevación del terreno. *Pinus douglasiana* prefiere climas en general más templados que *P. maximinoi* y se distribuye en elevaciones de entre los 1400 y 2500 m. Por su parte, *P. maximinoi* prefiere climas subtropicales y se distribuye de manera óptima en elevaciones de entre 800 y 1400 m (Farjon y Styles 1997). Los patrones de distribución determinados por la altura no son exclusivos de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, pues dichos patrones también se observan en otras especies de *Pinus*. Ya que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* pueden estar en simpatria se sugiere la posibilidad de que ambas especies tengan similitudes en cuanto a sus preferencias climáticas (Carvajal y McVaugh 1992). La confusión en cuanto a los límites taxonómicos (basados en morfología) entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* permite especular que la distinción en sus preferencias climáticas no es del todo exacta.

En este trabajo se consideró el concepto de linaje metapoblacional (de Queiroz 2007), junto con información morfológica y molecular, para abordar los límites taxonómicos entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Se incluyeron a *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis* por ser parte del problema de delimitación taxonómica de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. En este trabajo se hará referencia al complejo *Pseudostrobus* (Carvajal y McVaugh 1992) para señalar al grupo formado por *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis*, a menos que se indique lo contrario.

Hipótesis general

Pinus douglasiana y *P. maximinoi* han divergido una de la otra de forma que es posible diferenciarlas mediante caracteres morfológicos, moleculares y sus preferencias climáticas.

Objetivo general

Evaluar los límites taxonómicos entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, en el contexto del complejo *Pseudostrobus*, considerando el concepto de linaje metapoblacional.

Objetivos específicos

1. Evaluar diferentes caracteres morfológicos con variación continua en *P. douglasiana* y *P. maximinoi* para determinar si es posible formar grupos discretos. Evaluar la posibilidad de formar un grupo de caracteres diagnósticos en las respectivas especies.

2. Obtener secuencias de ADN de plasto y mitocondria para evaluar si su variación revela patrones que indiquen que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son especies diferentes.
3. Conocer las preferencias climáticas de *P. maximinoi* y *P. douglasiana* para evaluar si existen diferencias ecológicas correlacionadas con la divergencia de dichas especies.
4. Hacer recomendaciones, con base en lo encontrado en *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, para delimitar a otras especies de *Pinus* con divergencia reciente.

CAPÍTULO 2

Morfología del complejo *Pseudostrobus*

Introducción

La taxonomía de *Pinus* está respaldada por trabajos sobresalientes sobre la anatomía de la madera, corteza, conos polínicos y estructuras de crecimiento —amén de compuestos químicos y preferencias climáticas. Los resultados taxonómicos indican que la madera, la corteza, los conos polínicos, las estructuras de crecimiento y los compuestos químicos presentan poca variación y por sí solos son insuficientes para circunscribir a las especies de pino (Shaw 1914; Martínez 1948; Mirov 1967; Greguss 1972; Perry 1991; Carvajal y McVaugh 1992; Farjon 2005; Wang et al. 2000). En *Pinus*, a diferencia de las angiospermas, son escasos los caracteres de utilidad taxonómica (Styles 1993). Algunos trabajos revelan que la variación estructural de la semilla y el ala puede ser de utilidad taxonómica (Businský 2004; Jardón-Barbolla et al. 2011), pero en otros trabajos se concluye que las semillas y las alas son estructuras sin mucha variación interespecífica (Farjon y Styles 1997; Gernandt et al. 2005).

Para clasificar y circunscribir a las especies de pino, los taxónomos basan principalmente sus decisiones en los caracteres de la hoja y el cono ovulífero, los cuales son muy variables en el género (Shaw 1914; Perry 1991; Carvajal y McVaugh 1992; Richardson 1998). Diferentes trabajos han señalado que las hojas secundarias de *Pinus* muestran mucha variación interespecífica. En las hojas secundarias se encuentra el mayor número de caracteres útiles para identificar a las especies de pino. En cambio los cotiledones, las catáfilas y las hojas primarias (los otros tipos de hojas de *Pinus*) no muestran mucha variación interespecífica y son de poca utilidad para distinguir especies de parentesco cercano (Shaw 1914; Farjon y Styles 1997). De aquí en adelante solo se hará referencia a los caracteres de las hojas secundarias.

Los caracteres de las hojas y vainas de los fascículos son de utilidad para identificar a las especies de pinos. La hoja de *Pinus* puede presentar un haz vascular (subgénero *Strobus*) o dos (subgénero *Pinus*). El número de hojas por fascículo varía de 2–8. La única especie en donde se puede encontrar acículas creciendo solitarias y envueltas por una vaina es *Pinus monophylla* Torr. & Frém. (Farjon y Styles 1997). En algunas especies el número de hojas por fascículo es casi constante (Carvajal y McVaugh 1992; Farjon y Styles 1997). La longitud de la vaina del fascículo

es casi constante en cada especie, pero la longitud de la vaina puede variar entre especies (Carvajal y McVaugh 1992). Después de unos pocos meses, al madurar las hojas, las vainas cambian de color, se tornan negruscas o grisáceas y reducen su tamaño debido a que las puntas de las escamas se desgastan y se quiebran (Carvajal y McVaugh 1992). En el subgénero *Pinus* los márgenes de la hoja secundaria son serrados. En este mismo subgénero la hoja es anfistomática. Los estomas crecen alineados en surcos a lo largo de la hoja. El número de líneas estomáticas es un carácter que permite el reconocimiento de grupos de especies. Por ejemplo, el número de hileras estomáticas en la superficie abaxial de la hoja es de (2-) 3-5 (-6) en el grupo *Pseudostrobus* sensu Martínez (1948). Pero en el grupo *Montezumae* típicamente hay (4-) 5-8 (-9, -10) hileras (Carvajal y McVaugh 1992). Los estomas están rodeados por células subsidiarias que forman un anillo conocido como anillo de Florín. El anillo de Florín se puede reconocer porque sobresale ligeramente de la superficie foliar. La morfología indica que los estomas y las células subsidiarias son útiles para distinguir grupos de especies (Farjon y Styles 1997). Las crestas y estriaciones del anillo de Florín también podrían ser de utilidad taxonómica (Whang et al. 2001).

El valor diagnóstico de los caracteres internos de la hoja fue enfatizado por Shaw (1909), quien señala que el conocimiento de la estructura interna de la hoja y la comprensión de la variación en dichas estructuras son un recurso invaluable para reconocer especies. Martínez (1948) también enfatizó la importancia de la anatomía interna de las hojas, que puede ser vista haciendo secciones transversales de la hoja. En las secciones transversales de la hoja se reconocen principalmente tres regiones: la región de la dermis, la del mesófilo y los trazos del cilindro vascular (Farjon y Styles 1997). La dermis está formada por la cutícula, la epidermis e hipodermis. En la dermis se encuentran embebidos los estomas. En el mesófilo se observan ductos de resina formados por células esclerenquimatosas de apariencia similar a las células de la hipodermis. El número de ductos de resina y su posición en el mesófilo son caracteres que varían entre especies y pueden ser usados como caracteres diagnósticos. Existen ductos conocidos como septales porque tocan tanto la hipodermis como la endodermis. Cuando los ductos no son septales, los ductos pueden ser externos, medios o internos, según su posición (Farjon y Styles 1997). Lo más común es que cada especie de pino tenga ductos ubicados predominantemente en dos de las tres posibles posiciones (Jährić 1962). Por ejemplo, *Pinus luzmariae* Pérez de la Rosa, endémica de México, tiene predominantemente canales externos, pero en raras ocasiones llega a tener internos o medios (Pérez de la Rosa 1998). En el trazo del cilindro vascular se pueden distinguir a la endodermis, tejido esclerenquimatoso y el haz vascular (floema y xilema) (Farjon y Styles 1997).

El cono ovulado muestra más variación interespecífica que el cono polínico, por lo cual el cono ovulado ha sido de mayor utilidad taxonómica (Farjon 2005). En el cono ovulado, la apófisis de la escama es una estructura conspicua que muestra variación interespecífica. Entre especies, la apófisis puede variar en color, forma, textura y grosor. Cuando el umbón es dorsal, como en la subsección *Ponderosae*, la figura de su borde es cuadrangular, pentagonal o hexagonal, dependiendo del arreglo de las escamas contiguas (Shaw 1914; Carvajal y McVaugh 1992; Farjon 2005). Los caracteres de la apófisis y el umbón han sido usados en la identificación de pinos, pero como en otros caracteres su uso pueden ser subjetivo y frustrante porque dichos caracteres son extremadamente variables — y su variación se puede traslapar entre especies (Carvajal y McVaugh 1992). El pedúnculo es otra estructura de valor taxonómico en el cono. Mediante el pedúnculo el cono se une a la rama de donde se desarrolla. Algunas especies presentan conos con pedúnculos bien desarrollados, pero otras especies presentan conos con pedúnculos cortos o casi ausentes. Saber si el cono cae con o sin su pedúnculo permite identificar a algunas especies (Carvajal y McVaugh 1992).

El complejo *Pseudostrobus* en la subsección *Ponderosae*

Pinus douglasiana, *P. maximinoi* y *P. yecorensis* tienen menos de 160 escamas en su cono ovulífero (Farjon y Styles 1997; Debreczy y Rácz 1995). Farjon y Styles (1997) reportan que *P. pseudostrobus* tiene de 140–190 escamas por cono, pero Delgado et al. (2007) reportan un promedio de 120.6 escamas por cono y una desviación estándar de 15.7. Si se considera que *P. pseudostrobus* tiene menos de 150 escamas por cono, es posible decir que las especies del complejo *Pseudostrobus* tienen menos escamas por cono que otras especies mexicanas de la subsección *Ponderosae*. Por ejemplo, *P. devoniana* Lindl, *P. montezumae* Lamb. o *P. hartwegii* Lindl. poseen más de 150 escamas por cono (Farjon y Styles 1997). Las especies del complejo *Pseudostrobus* presentan predominantemente cinco hojas por fascículo. Las especies del complejo *Pseudostrobus* tienen una gran similitud morfológica, lo cual permite diferenciar a dichas especies del resto de las especies de la subsección *Ponderosae* (Carvajal y McVaugh 1992; Farjon et al. 1997; Ferguson et al. 2001).

Diferencias morfológicas de las especies del complejo *Pseudostrobus*

Se considera que *P. douglasiana* tiene hojas más gruesas y conos con apófisis más abultadas que *P. maximinoi* (Martínez 1948). La distinción entre *P. maximinoi* y *P. douglasiana*, con base en el grosor de la hoja y la apófisis de la escama, es congruente con el trabajo de morfometría realizado

por Stead (1983b), quien consideró 18 variables cuantitativas y dos cualitativas de la hoja y del cono. La distinción entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* es apoyada por la información molecular obtenida de secuencias de ADNpl (Gernandt et al. 2009). A pesar de las diferencias entre *Pinus douglasiana* y *P. maximinoi*, la identificación morfológica de dichas especies —en campo y herbario— sigue siendo difícil por la existencia de individuos con caracteres intermedios (Perry 1991; Carvajal y McVaugh 1992; Farjon y Styles 1997). Las diferencias de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* respecto de *P. pseudostrobus* parecen ser más evidentes, pero aun así la identificación de dichas especies no está libre de errores (Farjon y Styles 1997; Carvajal y McVaugh 1992).

De acuerdo con Stead y Styles (1984), *P. pseudostrobus* puede diferenciarse de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* por las características de su cono. Tanto *P. douglasiana* como *P. maximinoi* desarrollan un pedúnculo claramente visible. Dicho pedúnculo crece oblicuo con respecto al eje longitudinal del cono. Se dice que el cono tiene un pedúnculo persistente debido a que el pedúnculo permanece unido al cono ovulífero después de que este último ha madurado y caído del árbol (Mittak y Perry 1979). En cuanto a *P. pseudostrobus* se ha reportado que su cono puede ser sésil, casi sésil o presentar un pedúnculo corto con un grosor de hasta 10-15 mm o excepcionalmente de hasta 23 mm (Martínez 1948; Stead y Styles 1984; Perry 1991). El cono de *P. pseudostrobus* presenta un pedúnculo caedizo, es decir, el cono de *P. pseudostrobus* se desprende del árbol dejando su pedúnculo en la rama (Mittak y Perry 1979; Stead y Styles 1984). De acuerdo con Martínez (1948), *P. pseudostrobus* forma *protuberans* presenta comúnmente un cono con pedúnculo persistente. Este dato es interesante porque al parecer Martínez (1948) no consideraba que la presencia de conos con pedúnculo caedizo fuera un carácter fijo en *P. pseudostrobus*. También es interesante porque a pesar de que Stead y Styles (1984) consideran que el cono con pedúnculo caedizo es un carácter fijo en *P. pseudostrobus*, dichos autores comentan que la forma *protuberans* de Martínez (1948) es parte de la variación de *P. pseudostrobus*. De acuerdo con Martínez (1948), *P. pseudostrobus* forma *protuberans* es una forma intermedia entre *P. pseudostrobus* variedad *oaxacana* y *P. douglasiana* o *P. maximinoi*. Con respecto de *P. yecorensis* debemos señalar que su cono puede ser casi sésil o tener un pedúnculo de 10 a 12 mm (Debreczy y Rácz 1995). De acuerdo con Debreczy y Rácz (2011), el cono de *P. yecorensis* tiene un pedúnculo persistente, pero, Ferguson et al. (2001) consideran que la presencia de un cono con pedúnculo persistente no es un carácter fijo en *P. yecorensis*. Ferguson et al. (2001) señalan que ocasionalmente el cono de *P. yecorensis* se desprende sin su pedúnculo, como en *P. pseudostrobus*. Ferguson et al. (2001) consideran que *P. yecorensis* presenta más variación que la indicada por Debreczy y Rácz (1995), y por lo tanto, Ferguson et al. (2001) incluyen en *P. yecorensis* a ejemplares clasificados previamente como *Pinus* aff. *durangensis* Martínez.

La estructura interna de la hoja, observable en secciones transversales, es útil para distinguir a *P. douglasiana* y *P. maximinoi* de *P. pseudostrobus* (Stead y Styles 1984). Las intrusiones de la hipodermis son células que crecen hacia el interior del clorénquima (Stead y Styles 1984; Farjon y Styles 1997). En *P. douglasiana* y *P. maximinoi* las intrusiones de la hipodermis penetran en el clorénquima hasta tocar la endodermis⁴ (Stead y Styles 1984; Farjon y Styles 1997). En cortes transversales de hojas de *P. douglasiana* o *P. maximinoi*, las intrusiones parecen septos que dividen el clorénquima (Fig. 2.1). Las únicas especies que tienen intrusiones que tocan la endodermis son *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Cuando en *P. pseudostrobus* se observan intrusiones, éstas no hacen contacto con la endodermis (Martínez 1948; Stead y Styles 1984; Carvajal y McVaugh 1992; Farjon y Styles 1997). De acuerdo con varios autores (Mittak y Perry 1979; Stead y Styles 1984; Farjon y Styles 1997), *P. douglasiana* tiene invariablemente intrusiones en contacto con la endodermis. Pero se ha reportado que pueden existir individuos de *P. maximinoi* —en el extremo sur de su distribución (i. e. Nicaragua)— que no tienen intrusiones en contacto con la endodermis (Stead y Styles 1984). Debido a la existencia de individuos de *P. maximinoi* sin intrusiones en contacto con la endodermis, es importante señalar que Martínez (1948) reconoce la existencia de individuos con formas semejantes a *P. maximinoi*, los cuales relacionan a *P. maximinoi* con *P. douglasiana* y *P. pseudostrobus*. Las formas semejantes a *P. maximinoi* que describió Martínez (1948) tienen hojas de grosor similar a las hojas de *P. maximinoi*, pero con intrusiones que no tocan la endodermis. El cono de las formas similares a *P. maximinoi* es muy semejante en tamaño, forma y características del pedúnculo, al cono de *P. maximinoi*, pero presenta escamas un poco más gruesas y fuertes. En estas formas, las ramillas son ásperas con las hojas amontonadas, por lo que las brácteas son cortas y están muy próximas (Martínez 1948). En la opinión de Stead y Styles (1984) los individuos con formas similares a *P. maximinoi* pertenecen a *P. pseudostrobus*. Ni Martínez (1948) ni Stead y Styles (1984) precisan si el cono de estos individuos con formas similares a *P. maximinoi* tiene un pedúnculo persistente o caedizo. Con respecto de *P. yecorensis* no se reporta la presencia de intrusiones hipodérmicas en contacto con la endodermis (Debreczy y Rácz 1995; 2011), por lo que se infiere que carecen de ellas.

⁴ Las hojas de los pinos, a diferencia de angiospermas, presentan una endodermis.

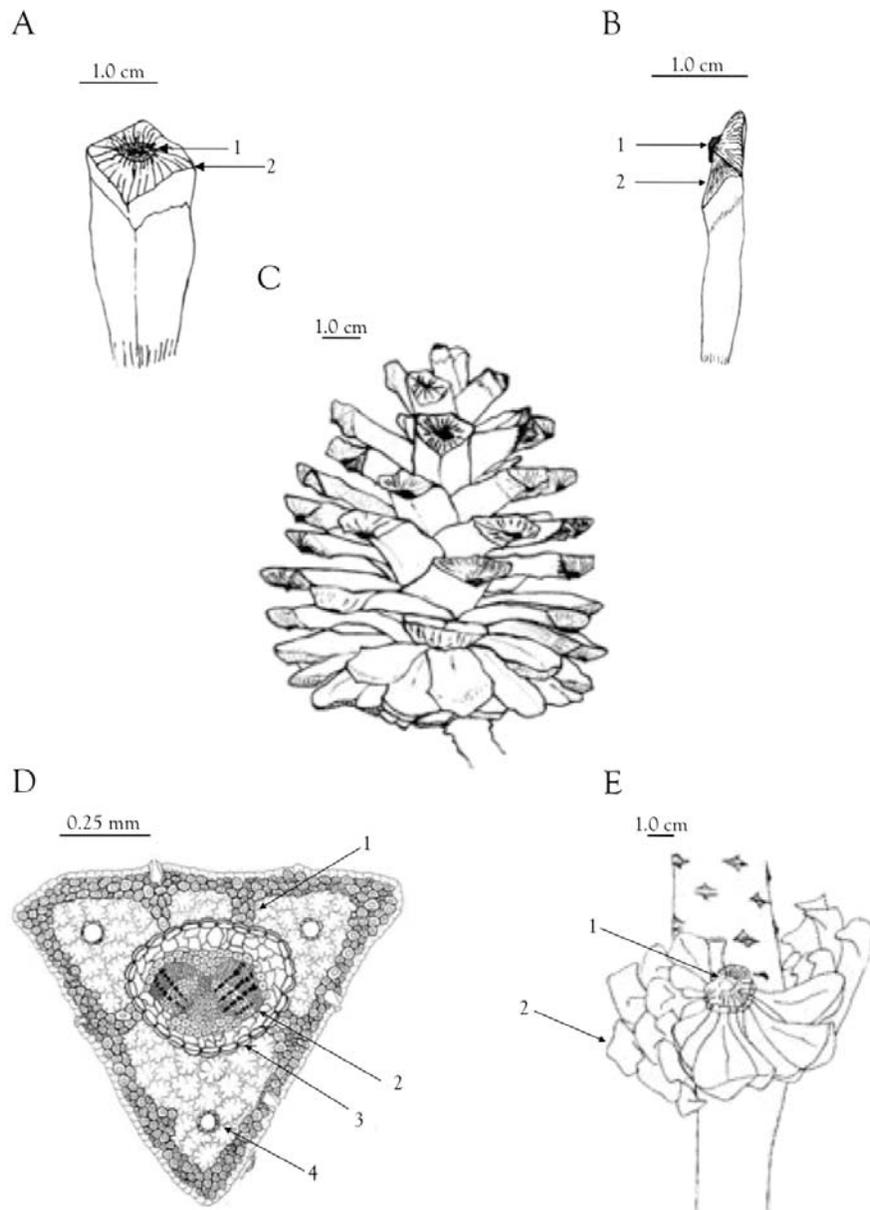


Figura 2.1. Estructuras del cono y la hoja (vistas en secciones transversales). A) Vista frontal de una escama: Umbón (1), apófisis (2); B) Vista lateral de una escama: Umbón (1), apófisis (2); C) Cono con pedúnculo; D) Sección transversal de la parte media de una acícula (cortesía de Gretchen Rodríguez). En la sección transversal se pueden observar las intrusiones de la hipodermis en contacto con la endodermis (1), el haz vascular (2), la endodermis (3) y canales de resina (4); E) Pedúnculo persistente con escamas de la base del cono: Pedúnculo (1), escamas (2).

Preferencias climáticas en las especies del complejo *Pseudostrobus*

En diferentes trabajos (Martínez 1948; Perry 1991; Carvajal y McVaugh 1992; Farjon y Styles 1997) se menciona de manera breve las preferencias climáticas de las especies del complejo *Pseudostrobus*. Se han señalado que *P. douglasiana* se distribuye en áreas con una precipitación promedio de 1000 mm anuales y que habita zonas cálidas a templadas (Stead y Styles 1984; Perry 1991). *Pinus maximinoi* se distribuye en zonas de precipitación del rango de 1000 a 2000 mm anuales, o incluso más, y en general habita áreas subtropicales (Stead y Styles 1984; Perry 1991). *Pinus pseudostrobus* es una especie con un rango ecológico amplio, ya que habita áreas en donde la precipitación tiene un rango entre los 800 y 1500 mm (Perry 1991), aunque Farjon y Styles (1997) señalan que en América Central esta especie habita áreas en donde el promedio de la precipitación puede ser de más de 2000 mm. En general *P. pseudostrobus* se distribuye en zonas templadas en las que son frecuentes las heladas en invierno (Perry 1991). Posiblemente *P. yecorensis* se distribuye en áreas con clima más seco que el resto de las especies del complejo *Pseudostrobus*. En la descripción sobre el descubrimiento de *P. yecorensis* (Debreczy y Rácz 1995) se indica que dicha especie fue encontrada en una barranca seca de Sonora. En Sinaloa, *P. yecorensis* fue encontrada en pendientes rocosas, secas y calientes (Debreczy y Rácz 1995). Se ha señalado que *P. maximinoi* habita áreas en donde ocurren heladas esporádicas en invierno (Farjon y Styles 1997), pero en general, se considera que *P. maximinoi* no tolera las heladas (Dvorak et al. 2000; Mitchell et al. 2013).

Inconsistencias encontradas en la literatura con relación a la distribución de las especies del complejo *Pseudostrobus*

Se ha señalado que *P. maximinoi* se distribuye en la parte noroeste de México, Nayarit, Chihuahua (suroeste) Sinaloa y Sonora (Martínez 1948; Perry 1991; Debreczy y Rácz 1995; Farjon y Styles 1997; Ferguson 2001), pero Stead y Styles (1984) indican que solo *P. douglasiana* se distribuye en el noroeste de México (Nayarit y Sinaloa) y que *P. maximinoi* se distribuye desde el oeste de México, en Jalisco, hasta el norte de Nicaragua. Otro desacuerdo es en cuanto a la distribución de *P. maximinoi* en Michoacán y el Estado de México. Se ha señalado que *P. maximinoi* se distribuye en el norte de Michoacán y el oeste del Estado de México (Martínez 1948; Perry 1991; Farjon y Styles 1997), pero Stead y Styles (1984) indican que es poco probable que *P. maximinoi* se distribuya en tales áreas. Perry (1991) menciona que *P. maximinoi* se distribuye también en Morelos, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla, pero Farjon y Styles (1997) no citan a Morelos como parte de la distribución de *P. maximinoi*—Farjon y Styles (1997) tampoco señalan en su mapa de distribución de *P. maximinoi* (Mapa 15) a Morelos como área de distribución de dicha especie.

Considerar la fisiografía y clima de México con relación a la distribución del complejo *Pseudostrobus* podría contribuir a mejorar nuestro entendimiento taxonómico del mismo. Tanto la flora como la fauna tienen límites naturales. Estos límites naturales de la flora y fauna definen áreas biogeográficas. Estos límites están determinados en parte por el clima y la fisiografía (Morrone 2005; Escalante 2009). Para México, la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) definió 19 provincias biogeográficas que se distribuyen en tres medios (árido subtropical, tropical y montano). Las 19 provincias se definieron con base en la distribución de grupos taxonómicos de flora y fauna, así como en los principales rasgos fisiográficos y climáticos de México (Morrone 2005). Estudiar cómo se distribuyen las especies del complejo *Pseudostrobus* en el sistema biogeográfico de la CONABIO (Fig. 2.2) podría ayudar a entender los límites taxonómicos del grupo.

La clasificación de los climas de México también podría servir para entender la distribución de las especies del complejo *Pseudostrobus*. La CONABIO elaboró un mapa con los tipos de climas de la República Mexicana. La clasificación climática de la CONABIO está basada en las modificaciones de García (2004) al sistema climático de Köppen (1936). El sistema climático de Köppen (1936) ha servido para hacer una clasificación de los climas a nivel mundial. El sistema de Köppen (1936) considera los datos de temperatura y precipitación media, mensual y anual para reconocer cinco grupos de climas: tropical lluvioso (A), seco (B), templado lluvioso (C), boreal (D) y frío o polar (E). Los climas boreales no existen en México y las áreas con clima fríos o polares son muy reducidas. Cada grupo, del sistema de Köppen (1936), está dividido para formar un total de once tipos climáticos (García 2004). Los cinco grupos climáticos se mantiene en el sistema modificado de García (2004), pero las subdivisiones de los grupos principales fueron adaptados a las condiciones climáticas de México. De acuerdo con García (2004) existen zonas con clima de características intermedias entre los grupos A y C, este clima es llamado semicálido. Los climas semicálidos [i. e. A(C) y (A)C] se caracterizan porque su temperatura media anual es de 18 a 22° C y la temperatura del mes más frío está por encima o por debajo de los 18° C (existe una tendencia hacia el clima cálido o templado respectivamente). Estos grupos de transición o de características intermedias entre los climas A y C se denotan poniendo entre paréntesis el clima hacia el cual existe dicha tendencia, por ejemplo, (A)C(fm), A(C)f(m)... etcétera. En el mapa de climas de México (García y CONABIO 1998) se pueden identificar 61 tipos de clima para México.

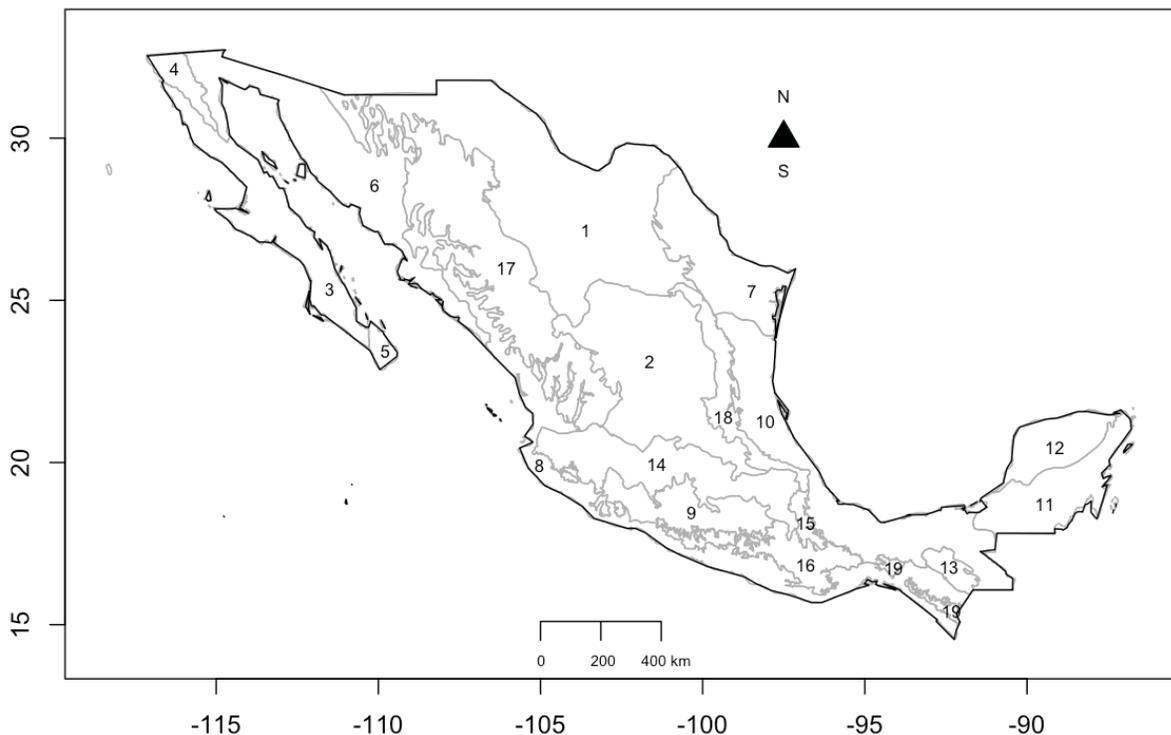


Figura 2.2. Provincias biogeográficas de México (CONABIO 1997). Las provincias se agrupan en tres medios. El medio árido subtropical comprende a las provincias Altiplano Norte o Chihuahuense (1), Altiplano Sur o Zacatecano-Potosino (2), Baja California (3), California (4), Del Cabo (5), Sonorense (6) y Tamaulipeca (7). El medio tropical húmedo y subhúmedo comprende a las provincias Costa del Pacífico (8), Depresión del Balsas (9), Golfo de México (10), Petén (11) y Yucatán (12). El Medio montano comprende a las provincias Altos de Chiapas (13), Eje Volcánico Transversal (14), Oaxaqueña (15), Sierra Madre del Sur (16), Sierra Madre Occidental (17), Sierra Madre Oriental (18) y Soconusco (19). Este mapa fue elaborado con el Programa R v.2.14.2 y la información en archivos con formato "shp" descargados de la página de la CONABIO en Internet.

Herramientas estadísticas para el análisis de la variación cuantitativa

Cuando los límites taxonómicos entre las especies de un complejo son confusos debido a la falta de caracteres diagnósticos o por la existencia de patrones de variación complejos en caracteres cualitativos, la morfometría ha sido una herramienta útil para visualizar los patrones de variación y hacer hipótesis de delimitación entre especies (Sokal y Sneath 1961; Sneath y Sokal 1973; Henderson 2005). La morfometría es la cuantificación y análisis de la variación de las formas biológicas (Henderson 2006). La técnica más usada para hacer comparaciones considerando un solo carácter cuantitativo (variable estadística) es el análisis de la varianza (ANOVA). La ANOVA es una técnica de la estadística inferencial que bajo un cierto nivel de confianza ($\alpha = 0.05$) permite establecer la existencia de diferencias entre grupos de objetos (Zar 1984). También es posible analizar simultáneamente más de dos variables mediante técnicas de estadística multivariada (Fisher

1936; Stead 1983b). Como ejemplo se puede citar a Valcárcel y Vargas (2010) quienes usaron la estadística multivariada para mostrar evidencia que apoya y clarifica los límites interespecíficos en 12 especies de *Hedera* (Araliaceae).

Al inicio de un análisis multivariado todas las variables involucradas tienen la misma importancia y la misma categoría. Esta característica la diferencia de los análisis univariados en donde existen variables independientes y dependientes (Manly 1994). Stead (1983a, b) empleó estadística multivariada para visualizar la variación en caracteres cuantificables del cono y la hoja de *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus*. Mediante un análisis de componentes principales (ACP), Stead (1983b) encontró que varios caracteres del cono ovulado (por ejemplo, la longitud del cono, anchura del cono, anchura de la apófisis, la profundidad o altura de la apófisis) contribuyen a diferenciar a *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus*.

El ACP reduce el número de variables cuantitativas a unos cuantos componentes, generalmente dos o tres, que expresan las principales diferencias entre los grupos formados. Estos componentes principales (CP) son una combinación lineal de las variables originales (Henderson 2006). Es posible graficar la variación morfológica capturada por los componentes principales y observar si existen grupos discretos que potencialmente podrían constituir especies (Stead 1983b; Henderson 2005). El ACP es una técnica descriptiva y no inferencial, es decir, el ACP no permite evaluar si las diferencias observadas entre los grupos son estadísticamente significativas como para asegurar, con cierto nivel de confianza, que existen dos grupos taxonómicamente diferentes. Zapata y Jiménez (2012) desarrollaron un método para delimitar especies. En el método de Zapata y Jiménez (2012) se incluye una técnica que permite evaluar estadísticamente los resultados de un ACP cuando se consideran comparaciones entre pares de especies.

La técnica de Zapata y Jiménez (2012) permite evaluar, con un nivel de confianza (γ) de 0.05, si existen grupos discretos en el espacio multivariado de distribución. El objetivo de la técnica es descubrir más de una moda en la distribución (multivariada) del conjunto de datos (Zapata y Jiménez 2012). Si existe más de una moda se infiere que existe la posibilidad de encontrar lagunas en el espacio multivariado o pequeñas áreas de sobreposición en los rangos de variación de dos grupos diferentes, es decir posiblemente existen grupos que comparten parte del espacio multivariado. Para tener una apreciación estadística de la importancia de las lagunas o la cantidad de sobreposición en la distribución multivariada se evalúa estadísticamente la sobreposición entre las regiones de tolerancia de los dos grupos. La región de tolerancia está representada por una curva elipsoidal dentro de la cual se distribuye una cierta proporción (β) del tamaño de la muestra poblacional de cada grupo. Si se corrobora la inexistencia de sobreposición en las regiones de

tolerancia considerando una $\beta \geq 0.9$ y aun nivel de confianza de $\gamma = 0.05$ (Fig. 2.3) se considera que la evidencia apoya la existencia de dos especies (Zapata y Jiménez 2012).

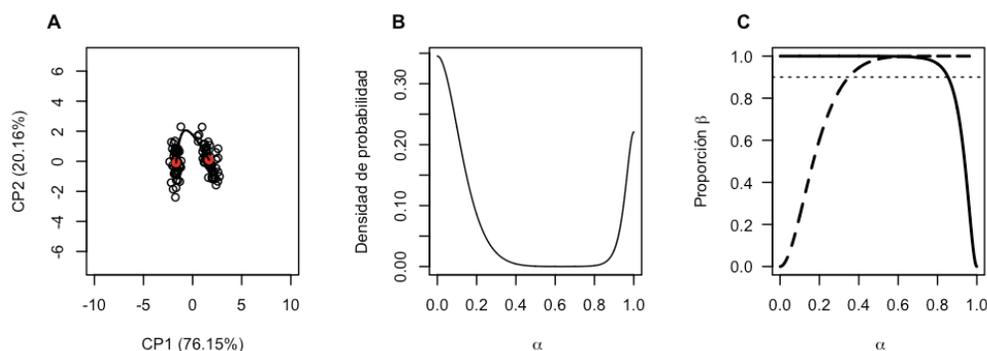


Figura 2.3. Ejemplo de gráficas elaboradas para detectar lagunas en el espacio multivariado (Zapata y Jiménez 2012). Las gráficas se obtuvieron con el programa R v.2.14.2. (R Development Core Team 2004) y los datos de las especies *Iris setosa* Pall. ex Link e *I. versicolor* L. (Fisher 1936). A) Distribución de individuos en el espacio multivariado representado por el componente uno (CP1) y el dos (CP2). B) Silla de montar en donde se observan las diferencias de distribución de las variables consideradas en conjunto. C) Gráfica de inferencia de laguna en el espacio multivariado, las líneas discontinuas representan a *I. setosa* y la línea continua a *I. versicolor*. Se puede apreciar que ambas líneas se cruzan por encima de la línea que indica el umbral de tolerancia, indicando que existe una laguna en el espacio multivariado.

Otra técnica de estadística multivariada es el análisis de agrupamiento, con el cual se busca mostrar el parecido entre los objetos de un conjunto determinado. Mediante el análisis de agrupamiento los objetos bajo estudio (en este caso individuos) se agrupan en clases, de forma que los objetos más similares están en la misma clase (Manly 1994). En este análisis no es necesaria la formación previa de grupos. Existen numerosos algoritmos para realizar un análisis de agrupamiento. Las técnicas más empleadas para realizar los análisis de agrupamiento siguen un proceso jerárquico para producir un dendrograma en el que se puede apreciar la similitud entre los objetos analizados. Los análisis de agrupamiento comienzan con el cálculo de las distancias entre los elementos de la muestra, es decir la similitud entre individuos. Después se forman grupos mediante un proceso de aglomeración (análisis de conglomerados) o división. En el análisis de conglomerados los objetos se van agrupando hasta obtener un solo grupo. En el análisis de división se parte de un solo grupo que se divide hasta que todos los objetos quedan separados (Manly 1994). El resultado final nos permite evaluar si existen conjuntos de individuos que podrían constituir taxa.

Otra técnica de estadística multivariada es el análisis de discriminantes canónicas (ADC) que ayuda a saber si es posible separar dos grupos, previamente establecidos, con base en la información disponible de un grupo de variables continuas. Al igual que con el ACP, con el ADC se

busca la función lineal más adecuada para diferenciar entre dos o más grupos. Es decir, con el ADC se busca una combinación lineal de las variables originales (Manly 1994). Como en el ADC ya existen grupos predeterminados desde el inicio del análisis, se puede calcular un cociente F, de manera análoga a como se hace una ANOVA o una MANOVA (análisis multivariante de la varianza), para determinar cuál es la función que tiene el mayor poder de discriminación de grupos (McGarigal et al. 2000).

Para esclarecer la confusión taxonómica en los límites de especie entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* fue necesario evaluar la variación morfológica desde una perspectiva actual. Se incluyeron a *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis* por ser especies de parentesco cercano. También se incluyeron ejemplares con afinidades morfológicas respecto de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Se consideraron los caracteres mediante los cuales se ha diferenciado a las especies del complejo *Pseudostrobus* (Martínez 1948, Stead 1983b). Usando técnicas estadísticas, principalmente el ACP y el ADC, se determinó que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* difieren en el tamaño de sus hojas y conos, como lo han señalado varios autores (Martínez 1948; Stead y Styles 1984; Farjon et al. 1997) pero se señala la posibilidad de que en *P. douglasiana* existan individuos que no presenten intrusiones hipodérmicas en contacto con la endodermis.

Hipótesis [capítulo 2]

Por ser especies diferentes *Pinus douglasiana* y *P. maximinoi* forman grupos discretos en el espacio multivariado al cuantificar y analizar la variación de sus hojas y conos mediante técnicas de estadística multivariada.

Objetivos generales [capítulo 2]

1. Establecer las diferencias cuantitativas entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* con base en caracteres de la hoja y el cono.
2. Comparar la variación morfológica de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* con la de *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis* para evaluar si es posible establecer una hipótesis en cuanto al límite de especie basada en las diferencias cuantitativas entre dichas especies.

Objetivos específicos [capítulo 2]

3. Evaluar mediante técnicas de análisis multivariados (ACP, AC, ADC) si las hojas y conos ovulíferos en *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus*, *P. yecorensis* y formas afines presentan variables cuantificables que sirvan para distinguir a las especies del complejo *Pseudostrobus*.
4. Buscar lagunas en el espacio multivariado que indiquen la divergencia entre las especies consideradas; de encontrar grupos discretos proponer caracteres que puedan ser usados para diagnosticar a las especies del complejo *Pseudostrobus*.
5. Establecer el patrón de distribución de las especies en el complejo *Pseudostrobus* y determinar cuáles son sus preferencias climáticas.

Materiales y Métodos [capítulo 2]

Obtención del material—Se recolectó y se revisó material del Herbario MEXU. Los sitios de recolecta se establecieron con base en la información bibliográfica y la existente en etiquetas de material de herbario —Herbario de Guadalajara (IBUG); el Herbario Nacional (MEXU) y el Herbario del Instituto de Ecología, A. C., Xalapa (XAL). Para Guatemala, Honduras y Nicaragua se consideró exclusivamente material de herbario. Las recolectas, que solo se realizaron en México, consistieron en la obtención de ramas laterales, hojas y conos ovulíferos de individuos adultos. Los conos maduros y abiertos fueron recolectados en el periodo comprendido entre finales de marzo a mediados de junio. Algunos ejemplares se localizan en lugares de difícil acceso y presentan tallas de hasta 40 metros de altura, por lo que el material se recolectó de las ramas inferiores. Se recolectó material de individuos identificados como *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis*. También se recolectaron individuos con formas intermedias, como se reporta en la literatura (Martínez 1948; Mittak y Perry 1979). Dichos individuos con formas intermedias fueron identificados como *P. aff. maximinoi* o *P. aff. douglasiana* siguiendo los criterios de clasificación explicados más adelante. El material recolectado se prensó, secó y depositó en el MEXU.

Identificación del material—Se determinó de manera previa a los análisis la identidad de los individuos colectados. Los ejemplares fueron identificados por su morfología externa (e. g., número de hojas por fascículo, grosor de las hojas, tamaño y forma del cono ovulado, grosor de la apófisis y persistencia del pedúnculo) y la estructura interna de las hojas (intrusiones en contacto con la endodermis y canales de resina). Los ejemplares con intrusiones fueron clasificados como *P. douglasiana* o *P. maximinoi*. Se distinguió a *P. douglasiana* de *P. maximinoi* por tener hojas más

gruesas, escamas del cono ovulífero de mayor dureza y apófisis más abultadas. Los ejemplares con formas intermedias fueron clasificados como *P. aff. douglasiana* o *P. aff. maximinoi*. Los ejemplares sin intrusiones en contacto con la endodermis, con pedúnculos persistentes, conos con escamas duras y de apófisis ligeramente abultada se clasificaron como *P. aff. douglasiana*. De manera similar, los ejemplares sin intrusiones en contacto con la endodermis, conos con pedúnculos persistentes, escamas delgadas y apófisis planas se clasificaron como *P. aff. maximinoi*. Los ejemplares de *P. aff. maximinoi* corresponden a *P. maximinoi* bajo el criterio de Stead (1983b). Como se mencionó en los objetivos, se incluyó a *P. pseudostrobis* en los análisis por ser una especie muy emparentada con *P. maximinoi* y *P. douglasiana*. Debido a que *P. pseudostrobis* es una especie con mucha variación intraespecífica, se siguió el criterio de Farjon y Styles (1997) para clasificar a las variedades de *P. pseudostrobis* y simplificar los análisis. Se consideró a *P. pseudostrobis* var. *oaxacana* como sinónimo de *P. pseudostrobis* var. *apulcensis* (Lindley) Shaw, de forma que se reconocieron dos variedades: *P. pseudostrobis* var. *pseudostrobis* y *P. pseudostrobis* var. *apulcensis*. Se clasificaron como *P. pseudostrobis* a los ejemplares sin intrusiones y conos con pedúnculo caedizo. Se identificaron como ejemplares de *P. pseudostrobis* var. *apulcensis* a los individuos que presentaron conos con umbón y apófisis abultada. Se clasificaron como *P. yecorensis* a los ejemplares sin intrusiones hipodérmicas en contacto con la endodermis y un cono ovoide, con pedúnculo relativamente corto, escamas gruesas y de apófisis ligeramente levantada (ejemplares recolectados en Yécora, Sonora) y de entre 5.8 y 9.0 cm de largo por 5.0 y 9.0 cm de ancho. Durante las colectas se encontraron ejemplares sin conos maduros. La identidad de estos ejemplares se estableció con base en caracteres de las hojas, y de manera indirecta por la presencia de conos encontrados en el suelo. Estos ejemplares de conos inmaduros no fueron incluidos en los análisis, pero se tomaron en consideración para mostrar su ubicación y tener una idea más clara de la distribución de las especies. En cuanto a los ejemplares de herbario, se redeterminó su identidad si su morfología así lo indicaba.

Colectas—Se consideraron para este trabajo sitios en donde se distribuye primordialmente *P. douglasiana* y *P. maximinoi* (Fig. 2.4; Tabla 2.1). No se incluyen sitios en la Sierra Madre Oriental porque no se conocen poblaciones de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en dicha sierra. Debido a que la distribución de *P. douglasiana* tiene su límite sur en la parte central de México, en este trabajo el muestreo en Chiapas (México) y América Central (n = 37) fue menor al muestreo de la parte noroccidental y central de México (n = 194). Se recolectó material de El Tuito (Jalisco) y de Zacapoaxtla (Puebla), pero no se encontraron conos maduros en los individuos de dichas localidades (Tabla 2.1). Por tanto, no se incluyeron en los análisis los datos de las recolectas realizadas en El Tuito y Zacapoaxtla. Por el grosor de las hojas y la presencia de intrusiones en contacto con la

endodermis, se concluyó que las colectas del Tuito y Zacapoaxtla pertenecen a *P. maximinoi* y *P. douglasiana*. En el IBUG se revisó material (conos y hojas) de *P. maximinoi* recolectados en El Tuito (Jalisco), lo cual apoya la identificación del material de dicha localidad. Dado que fue posible determinar la identidad de las poblaciones en El Tuito y Zacapoaxtla, dichas poblaciones fueron incluidas en la determinación de las preferencias climáticas de *P. maximinoi* y *P. douglasiana*.

El trabajo de Stead (1983b) es un antecedente importante para este trabajo. Por tanto, es conveniente señalar algunas diferencias entre este trabajo y el de Stead (1983b) con respecto de las recolectas realizadas. Stead (1983b) siguió un muestreo poblacional, recolectando predominantemente 25 individuos por población, pero en este trabajo en ciertos casos se incluyen solo uno o dos individuos por población, algunos de estos casos se deben a la consideración de material de herbario. Otra de las diferencias relevantes correspondientes al muestreo en el noroeste de México (Tabla 2.2). Trabajos posteriores al de Stead (1983b), ver por ejemplo Debreczy y Rácz (1985) o Ferguson et al. (2001), indican la necesidad de considerar poblaciones del complejo *Pseudostrobus* que se distribuyen en Sonora, México. El límite noroeste de las poblaciones incluidas en el trabajo de Stead (1983b) corresponde a la localidad "El Batel" (Concordia, Sinaloa). Se revisó en el MEXU material de Sonora. Dicho material tiene formas similares a *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, pero carece de intrusiones en contacto con la hipodermis. Por ejemplo, se puede citar la recolecta de Reina, A. L. # 96-63 que muestran caracteres similares a *P. maximinoi*, pero que carece de intrusiones hipodérmicas en contacto con la endodermis. En este trabajo se incluye material identificado como *P. aff. douglasiana* de Sonora. También de Sonora se incluye a *P. yecorensis*. Stead (1983b) no incluyó recolectas de Sonora. Además, *P. yecorensis* fue descrita en 1995 y no fue considerada por Stead (1983b). Algunas áreas en México, para las cuales se reporta la presencia de *P. douglasiana* o *P. maximinoi*, han sido deforestadas o modificadas substancialmente y no fue posible recolectar en dichos sitios. Por ejemplo, las coordenadas de Gómez Farías, Jalisco, reportadas por Stead (1983b) apuntan a una zona urbana rodeada de zonas deforestadas. Cabe señalar que se reporta la distribución de *P. maximinoi* en Cinco Palos y las Vigas (Veracruz), pero en una visita al sitio no se encontró dicha especie. Como en Gómez Farías, Jalisco, en Cinco Palos y Las Vigas se encontraron zonas deforestadas. Narave-Flores y Taylor (1997) reportan que en Veracruz los ejemplares de *P. maximinoi* son escasos y están en peligro de desaparecer.

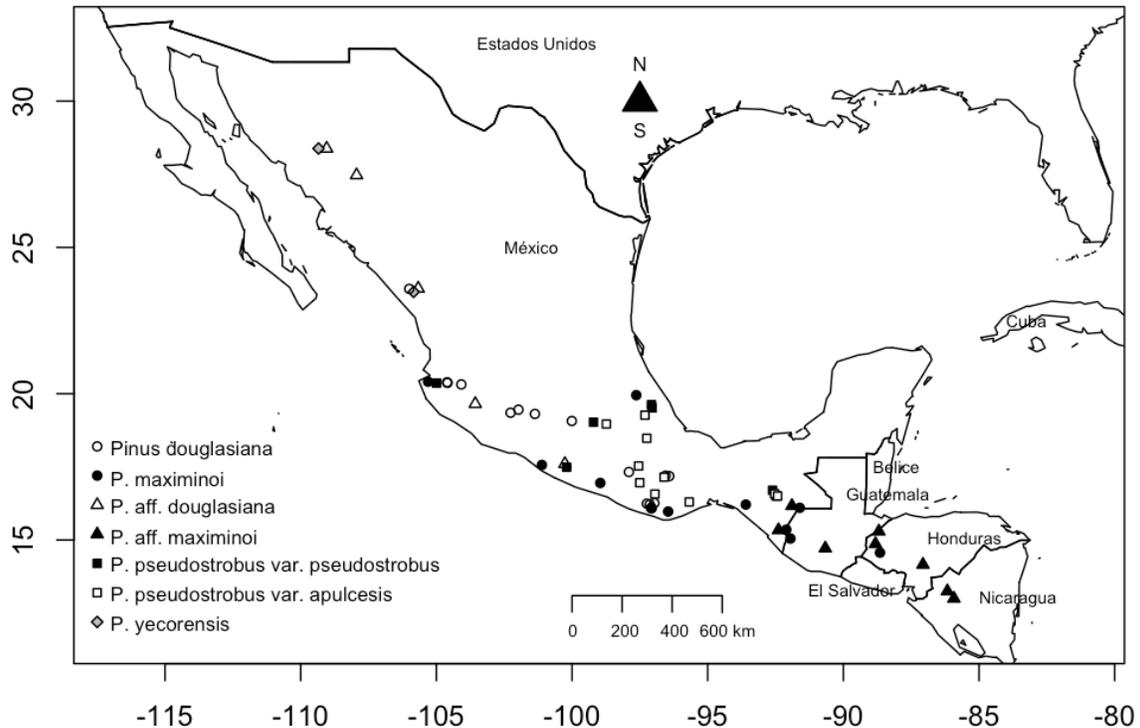


Figura 2.4. Ubicación de los sitios de recolecta. Se incluyen los puntos de material recolectado para el presente trabajo y los puntos de recolecta de material previamente depositado en el herbario MEXU. Los individuos con forma intermedia fueron clasificados como *P. aff. maximinoi* o *P. aff. douglasiana*.

Tabla 2.1. Lista de las localidades de recolecta de los ejemplares revisados para este estudio. Las localidades están ordenadas según el país y el departamento (Guatemala, Honduras y Nicaragua) o estado (México). En la columna de especies se indica entre paréntesis el número de ejemplares. El símbolo (*) indica que la información fue inferida de la bibliografía y datos de herbario. La estimación de dichas coordenadas se realizó, con la ayuda de Google Earth 5.1.3509.4636 (beta), ubicando en un mapa las áreas de referencia (poblados, cerros etcétera).

Localidad	Latitud Norte	Longitud Oeste
<i>P. aff. douglasiana</i>		
Yécora, Sonora	28.38073	-109.04286
Cerro Gallego, Chihuahua	27.47063	-107.94114
Concordia, Sinaloa	23.58277	-105.83911
Nevado de Colima, Jalisco	19.65197	-103.56622
La Campana, Jalisco	20.37197	-104.59036
Tancítaro, Michoacán	19.34980	-102.26536
El Baúl, Guerrero	17.60191	-100.26241
<i>P. aff. maximinoi</i>		
Motozintla, Chiapas	15.35348	-92.25225

Tabla 2.1. (Continuación)

Localidad	Latitud Norte	Longitud Oeste
Montebello, Chiapas	16.09961	-91.74675
Sacatepéquez, Sacatepéquez	14.71666*	-90.66666*
Dulce Nombre, Santa Rosa	14.86666	-88.81666
La Fortuna, Santa Bárbara	15.29592*	-88.69116*
Cofradía, Cortés	15.52269*	-88.25444*
Metagalpa-Jinotega, Jinotega	12.99974*	-85.92436*
Volcán Yalí, Jinotega	13.25000	-86.16667
<i>P. douglasiana</i>		
La Lobera, Sinaloa	23.48000	-105.83806
Concordia, Sinaloa	23.58277	-105.83911
Sierra de Quila, Jalisco	20.31754	-104.08003
La Campana, Jalisco	20.37197	-104.59036
Las Cruces, Jalisco	20.38772	-104.60783
Villa Madero, Michoacán	19.30944	-101.36842
Tancítaro, Michoacán	19.34980	-102.26536
Uruapan, Michoacán	19.45397	-101.97322
Cerro Zacatón, Michoacán	19.71694*	-100.88000*
Temascaltepec, México	19.06775	-100.00806
Avándaro, México	19.19444*	-100.12000*
Puente Tecuiculco, Puebla	19.95000	-97.63333
San Mateo, Oaxaca	15.97347	-96.45772
Juquila, Oaxaca	16.24350	-97.24250
Cerro Anole, Oaxaca	16.26308	-96.96530
Yavesía, Oaxaca	17.18333	-96.41666
Yuvila, Oaxaca	17.19663	-96.55497
Ixtlán, Oaxaca	17.32722*	-96.46638*
<i>P. maximinoi</i>		
El Tuito, Jalisco	20.41008	-105.30458
Agua Zarca, Michoacán	19.60528*	-101.12*
Rancho Ocapa, Guerrero	16.94900	-98.95813
Predio Cementerio, Guerrero	17.56425	-101.11078
San Mateo, Oaxaca	15.97347	-96.45772
La Mielera, Oaxaca	16.08658	-97.06519
San Gabriel, Oaxaca	16.09638	-97.09027
Juquila, Oaxaca	16.24350	-97.24250
Motozintla, Chiapas	15.35348	-92.25225
Montebello, Chiapas	16.09961	-91.74675
Tres Picos, Chiapas	16.21138	-93.59444
Aldea Tola, San Marcos	15.04958*	-91.95186*

Tabla 2.1. (Continuación)

Localidad	Latitud Norte	Longitud Oeste
Bucará, Progreso	Inf. des.	Inf. des.
Celaque, Lempira	14.56666	-88.65000
Valle de los Ángeles, Francisco Morazán	15.00916*	-90.12305*
<i>P. pseudoctrobus</i>		
El Cuale, Jalisco	20.36330	-104.99378
Villa Madero, Michoacán	19.30944	-101.36842
Tancítaro, Michoacán	19.34980	-102.26536
Temascaltepec, México	19.06775	-100.00806
Cinco Palos, Veracruz	19.51838	-97.05111
Las Vigas, Veracruz	19.62602	-97.07244
El Iris, Guerrero	17.48722	-100.19861
Yavesía, Oaxaca	17.18333	-96.41666
Teopisca, Chiapas	16.50344	-92.48083
Mercedes-Bazón, Chiapas	16.70138	-92.60972
Coajomulco, Morelos	19.02722	-99.21000
<i>P. pseudoctrobus</i> var. <i>apulcensis</i>		
Atlautla, México	18.96500	-98.73416
San Luis del Pino, Puebla	18.47777	-97.24450
Canoítas, Puebla	19.26638	-97.31252
Las Vigas, Veracruz	19.62602	-97.07244
Loma de Espina, Oaxaca	16.30069	-95.68066
Zimatlán-Sola de Vega, Oaxaca	16.57104	-96.94537
Barranca Cerro Montura, Oaxaca	16.77955	-97.60319
Cueva de la Llorona, Oaxaca	16.96147	-97.64427
Nu'mandi, Oaxaca	17.00569	-97.59555
El Rosal, Oaxaca	17.05419	-96.37272
Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca	17.14765	-96.60797
La Soledad, Oaxaca	17.53111	-97.54555
Teopisca, Chiapas	16.50344	-92.48083
La Gloria, Chiapas	16.50361	-92.42388
<i>P. yecorensis</i>		
Yécora, Sonora	28.38073	-109.04286

Tabla 2.2. Número de individuos considerados en este trabajo en comparación con el número reportado por Stead (1983b) en los estados del Noroeste de México.

Estado	Número de colectas en este trabajo	Número de colectas en el trabajo de Stead (1983b)
Yécora, Sonora	7	-
Cerro Gallego, Chihuahua	1	-
La Concordia, Sinaloa	33	25
La Lobera, Sinaloa	1	-
El Cuale, Jalisco	6	-
Las Cruces, Jalisco	4	-
La Campana, Jalisco	13	-
Sierra de Quila, Jalisco	11	-
Nevado de Colima, Jalisco	13	-
Gómez Farías, Jalisco	-	25

Variables consideradas—Como se mencionó en la introducción, la hoja y el cono son estructuras muy variables que presentan caracteres cuantitativos útiles para diferenciar a *P. douglasiana* de *P. maximinoi*. Por consiguiente, se eligieron 13 variables cuantitativas tomando como referencia el trabajo de Stead (1983b). De acuerdo con el trabajo de Stead (1983b), el número de estomas por fila (de un segmento de hoja de 5 mm), el número de dientes en el borde de la hoja (de un segmento de hoja de 5 mm), el número de células de la hipodermis en contacto con la endodermis y el número de células de la endodermis en la cara abaxial del haz vascular, son variables que no contribuyen significativamente a la distinción de *P. douglasiana* respecto de *P. maximinoi* (Stead 1983b), por lo que no se incluyeron en los análisis a dichas variables. Como se reportó, *P. douglasiana* y *P. maximinoi* comparten muchos caracteres, por lo que es difícil encontrar variables potencialmente útiles en la hoja y el cono, diferentes a las ya reportadas, que sirvan para distinguir a dichas especies. No obstante, las principales diferencias entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son cuantitativas, por lo que se decidió incluir el grosor de la hoja, el grosor de la vaina del fascículo y el número de células de la endodermis en los análisis. Estas tres últimas variables no fueron incluidas como tal en el trabajo de Stead (1983b). Se decidió incluir el grosor de la hoja y la vaina después de revisar ejemplares previamente identificados como *P. douglasiana* y *P. maximinoi* y percibir que la variación de dichos caracteres podría ser diferente entre dichas especies. Además, las mediciones correspondientes al grosor de la hoja y de la vaina serían fáciles de obtener. El número de células de la endodermis es una variable aparentemente similar al número de células de la endodermis en la cara abaxial de la hoja. No obstante, dichas variables pueden arrojar resultados diferentes debido a que el número de células de la endodermis en la cara abaxial de la hoja solo

guarda relación con la anchura de la hoja, pero el número de células de la endodermis guarda relación con el grosor y la anchura de la hoja. En resumen, por cada individuo se incluyeron 16 caracteres cuantitativos de la hoja y el cono. A continuación se enumeran los 16 caracteres: 1. Longitud de la hoja (cm) (como un promedio de cinco hojas); 2. Anchura de la hoja (μm) (como un promedio de cinco hojas); 3. Grosor de la hoja (μm) (como un promedio de cinco hojas); 4. Longitud de la vaina (cm) (como un promedio de cinco fascículos); 5. Grosor de la vaina en mm (como un promedio de cinco fascículos); 6. Número de líneas estomáticas en la cara abaxial (con base en un solo registro correspondiente a una sola hoja); 7. Número de líneas estomáticas en la cara adaxial (con base en un solo registro); 8. Número de canales de resina (con base en un solo registro); 9. Número de intrusiones hipodérmicas en la parte dorsal (con base en un solo registro); 10. Número de intrusiones hipodérmicas en ambas caras ventrales (con base en un solo registro por individuo); 11. Número de células de la endodermis (con base en un solo registro para cada individuo); 12. Longitud del cono en mm (con base en un solo registro para cada individuo); 13. Anchura del cono en mm (con base en un solo registro para cada individuo); 14. Anchura de la apófisis en mm; 15. Altura de la apófisis en mm (promedio de cinco escamas); 16. Grosor de la apófisis en mm (como un promedio de cinco escamas). Para una mejor comprensión de las variables consultar la Figura 1 del anexo A.

Obtención de datos—Las mediciones se obtuvieron de material prensado y seco. Se incluyeron en los análisis solo aquellos individuos para los cuales fue posible obtener datos de las 16 variables. Con respecto al material de herbario se procuró obtener el mayor conjunto posible de datos. Por ejemplo, para obtener el grosor de la apófisis se procuró obtener el promedio de cinco mediciones por cono (cada medición de una escama diferente), pero cuando no fue posible se usó el promedio obtenido de menos de cinco mediciones diferentes. Los datos obtenidos promediando menos de cinco mediciones se incluyeron en los análisis para tratar de obtener una buena representación de la variación en las especies. Para medir la morfología externa se usó una regla con divisiones de hasta un mm y un vernier digital de la marca Mitotuyo con un rango de error de 0.01 mm.

Para obtener la información de la estructura interna de la hoja se hicieron preparaciones fijas de secciones transversales de la misma. Con relación al material recolectado se eligieron cinco hojas frescas y maduras para obtener de cada una de ellas un segmento de ~ 0.5 cm de la parte media. Dichos segmentos de hoja se conservaron en FAA. Con respecto a los ejemplares de herbario se obtuvieron uno o dos segmentos de hoja, se ablandaron en agua caliente por al menos una hora y finalmente se conservaron en FAA. Los cortes de la hoja se hicieron a mano con una navaja para afeitar, las secciones obtenidas se aclararon con cloro al 50% por ~ 2 min., se deshidrataron en una

serie de alcoholes (50, 75, 96 y 100%, durante ~3 min. en cada ocasión), se tiñeron con una solución al 0.15% de verde rápido (verde rápido disuelto en etanol absoluto; Sandoval-Zapotitla et al. 2005) y al final se montaron en un portaobjetos usando resina sintética (Entellan). Para las mediciones del grosor y anchura de la hoja se usó un lente objetivo de 5x y 10x de un microscopio de luz de campo claro (marca Zeiss, modelo DMLB) y una lente ocular con reglilla graduada previamente calibrada.

Análisis—Para evaluar simultáneamente el conjunto de variables se usaron técnicas de estadística multivariada (i. e. análisis de componentes principales, análisis de conglomerados y análisis de discriminantes canónicas). En todos los análisis se usó el sistema R v.2.14.2 (R Development Core Team 2012).

Para evaluar si es posible distinguir grupos discretos en el complejo *Pseudostrobus* se hizo un análisis de componentes principales. En este análisis se incluyeron 231 individuos, 78 de *P. douglasiana*, 60 de *P. maximinoi*, 41 de *P. aff. douglasiana*, 7 de *P. aff. maximinoi*, 41 de *P. pseudostrobus* (23 de la variedad *pseudostrobus* y 18 de la variedad *apulcensis*) y 4 de *P. yecorensis*. Todas las variables se estandarizaron en el análisis. Los resultados se evaluaron considerando los primeros dos componentes, es decir, los componentes que explican la mayor variación. Se graficó la distribución de los individuos en el espacio multivariado considerando los dos primeros CP.

Se realizaron análisis para detectar lagunas en el espacio multivariado (Zapata y Jiménez 2012) y tener un criterio basado en la significancia estadística que permita inferir la presencia de grupos discretos. En el análisis se consideraron las 16 variables continuas. La técnica de detección se aplica en la comparación de pares de taxones, por lo que se comparó a *P. douglasiana* con *P. maximinoi*. En el análisis se incluyeron a los individuos clasificados como *P. aff. douglasiana* como parte de *P. douglasiana* y los identificados como *P. aff. maximinoi* como parte de *P. maximinoi*. También se hizo la comparación de *P. maximinoi* contra *P. pseudostrobus*. En este análisis se incluyeron las dos variedades de *P. pseudostrobus*. De igual forma se comparó *P. douglasiana* con *P. pseudostrobus*. En este último análisis se incluyó a *P. aff. douglasiana* como parte de la variación de *P. douglasiana*. El tamaño de muestra de *P. yecorensis* ($n = 4$) es pequeño por lo que no se compararon con ninguna otra especie del complejo *Pseudostrobus*. En todos los análisis se usó, una $\beta = 0.90$ y una $\gamma = 0.95$.

Para evaluar la similitud morfológica entre las especies del complejo *Pseudostrobus* se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico usando los datos de las 16 variables cuantitativas. Se consideraron 231 individuos previamente identificados como especies del complejo *Pseudostrobus*

o afines al grupo, 78 de *P. douglasiana*, 60 de *P. maximinoi*, 41 de *P. aff. douglasiana*, 7 de *P. aff. maximinoi*, 41 de *P. pseudostrobus* (23 de la variedad *pseudostrobus*, 18 de la variedad *apulcensis*) y 4 de *P. yecorensis*. Se usó el paquete 'cluster' y la función 'agnes' (Maechler et al. 2012) del sistema R v.2.14.2 (R Development Core Team 2012). El análisis se hizo calculando las distancias euclidianas entre las observaciones. El proceso de ordenamiento se hizo mediante un procedimiento aglomerante usando el método de promedios no ponderados entre pares de grupos (UPGMA, por sus siglas en inglés). Los resultados se visualizaron mediante un dendrograma.

Para evaluar si es posible distinguir a *P. douglasiana* de *P. maximinoi* en el complejo *Pseudostrobus*, se realizó un análisis de discriminantes canónicas con el paquete 'candisc' (Friendly y Fox 2011). Se incluyeron 231 individuos, 78 de *P. douglasiana*, 60 de *P. maximinoi*, 41 de *P. aff. douglasiana*, 7 de *P. aff. maximinoi*, 41 de *P. pseudostrobus* (23 de la variedad *pseudostrobus* y 18 de la variedad *apulcensis*) y 4 de *P. yecorensis*. Se consideraron 16 variables del cono y la hoja, como se indicó en el párrafo correspondiente a las variables consideradas. Dado que el análisis requiere de una clasificación previa de los ejemplares, se usó la determinación preliminar del material de acuerdo a la morfología del cono y la hoja como se señaló en el párrafo de identificación del material.

Para estudiar la distribución de las especies del complejo *Pseudostrobus* con respecto a las características fisiográficas y climáticas de México, primero se elaboró un mapa en donde se muestra la ubicación de los sitios de recolecta de los ejemplares mexicanos que fueron considerados en este estudio con relación a las provincias biogeográficas de México (CONABIO 1997). Adicionalmente, se determinó el tipo de clima de los sitios de recolecta del material considerado en este estudio. Para esto se obtuvo de la página de la CONABIO los archivos, en formato KML, de los tipos de clima de México (García y CONABIO 1998). Usando Google Earth 5.1.3509.4636 (β) (<https://www.google.es/intl/es/earth/index.html>). Con los archivos KML se graficaron en un mapa los tipos de clima de México y sobre el mapa se ubicaron los sitios de recolecta (según las coordenadas geográficas). Se graficó para cada tipo de clima el número de sitios por especie con la finalidad de determinar el tipo de clima en el que habita cada especie del complejo *Pseudostrobus*.

Resultados [Capítulo 2]

Análisis de componentes principales—Los resultados del ACP indican que existen diferencias de tamaño en las estructuras de las especies del complejo *Pseudostrobus*, pero que dichas diferencias no son lo suficientemente grandes como para distinguir grupos discretos. El componente uno explica 41.8 % de la variación. Aunque todas las variables parecen contribuir en el componente uno, las variables de las escamas del cono resultaron ser las más importantes. El componente dos

explica 17.24% de la variación. La variable más importante del componente dos es el número de intrusiones (Tabla 2. 3). No se encontraron grupos claramente delimitados.

Tabla 2.3. Coeficientes del primer y segundo componente (CP1 y CP2 respectivamente) del ACP.

Variable	CP 1 (41.81%)	CP 2 (17.24%)
Longitud de la hoja	-0.200	0.251
Longitud de la vaina	-0.240	0.188
Grosor de la vaina	-0.250	0.366
Longitud del cono	-0.225	-0.271
Grosor del cono	-0.270	-0.308
Anchura de la apófisis	-0.304	-0.221
Altura de la apófisis	-0.308	-0.123
Grosor de la apófisis	-0.254	-0.168
Longitud de la escama	-0.263	-0.249
Número de líneas estomáticas en la cara abaxial	-0.193	-0.165
Número de líneas estomáticas en la cara adaxial	-0.273	0.013
Número de canales de resina	-0.234	-0.038
Número de Intrusiones	0.052	0.424
Número de células de la endodermis	-0.281	0.249
Grosor de la acícula	-0.278	0.288
Ancho de la acícula	-0.264	0.302

En la gráfica de distribución de los individuos de acuerdo con el componente uno y el componente dos, obtenidos de los resultados del ACP, es evidente la similitud en las formas de las especies del complejo *Pseudostrobus*. La mayoría de los individuos identificados como *P. aff. douglasiana* se agrupan junto con los individuos de *P. douglasiana* en la mitad izquierda de la gráfica (Fig. 2.7). Algo similar ocurre con los individuos clasificados como *P. aff. maximoi*, los cuales se agrupan con los individuos identificados como *P. maximoi* en la parte derecha de la gráfica (Fig. 2.5). En cuanto a los ejemplares de *P. yecorensis*, aunque solo fueron cuatro los individuos incluidos en el análisis, se puede inferir su similitud con *P. douglasiana* y *P. aff. douglasiana*. Sin embargo, es importante señalar que *P. yecorensis*, por su falta de intrusiones, se asemeja más a *P. aff. douglasiana* que a *P. douglasiana*.

Los ejemplares de *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* se diferencian parcialmente de los ejemplares de *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*, agrupandose del lado izquierdo en la mitad inferior de la gráfica (Fig. 2.5). Los ejemplares de *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* de conos grandes y apófisis abultadas se agrupan cerca de *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (ejemplares de

cono ovoide-esférico, apófisis abultada y umbón largo). Los ejemplares de *P. pseudostrobis* var. *pseudostrobis* se agrupan más cerca de *P. maximinoi*.

Detección de lagunas en el espacio multivariado—los resultados indican que, bajo los parámetros establecidos ($\beta = 90.0$ y $\gamma = 95.0$) no es posible detectar lagunas en la distribución de las especies del complejo *Pseudostrobis* en el espacio multivariado. En ninguna de las comparaciones se pueden distinguir dos modas (Fig. 2.6; Fig. 2.7; Fig. 2.8), aunque existe una ligera tendencia en la comparación entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. En la comparación entre *P. douglasiana* y *P. pseudostrobis* solo se puede observar una moda (Fig. 2.8.A).

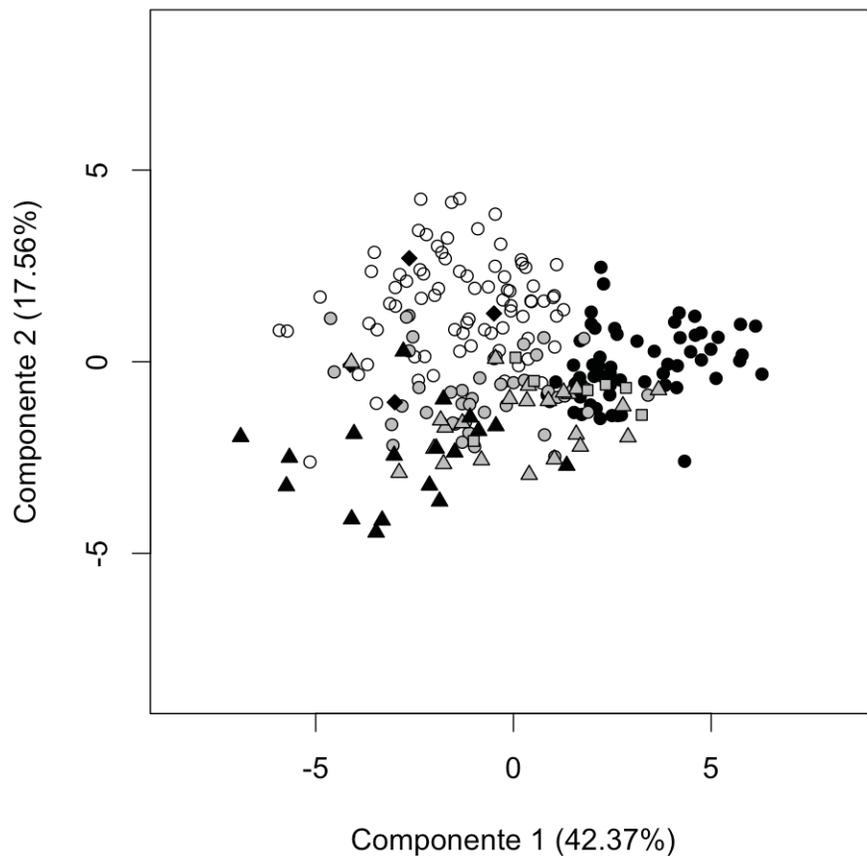


Figura 2.5. Gráfica que muestra los resultados del ACP considerando los componentes 1 y 2. Se observa la distribución de las especies del complejo *Pseudostrobis* en el espacio multivariado. En esta gráfica están representados los ejemplares de *P. douglasiana* (\circ), *P. maximinoi* (\bullet), *P. pseudostrobis* var. *apulcensis* (\blacktriangle), *P. aff. maximinoi* (\triangle), *P. pseudostrobis* var. *pseudostrobis* (\blacktriangle), *P. aff. douglasiana* (\bullet) y *P. yecorensis* (\blacklozenge).

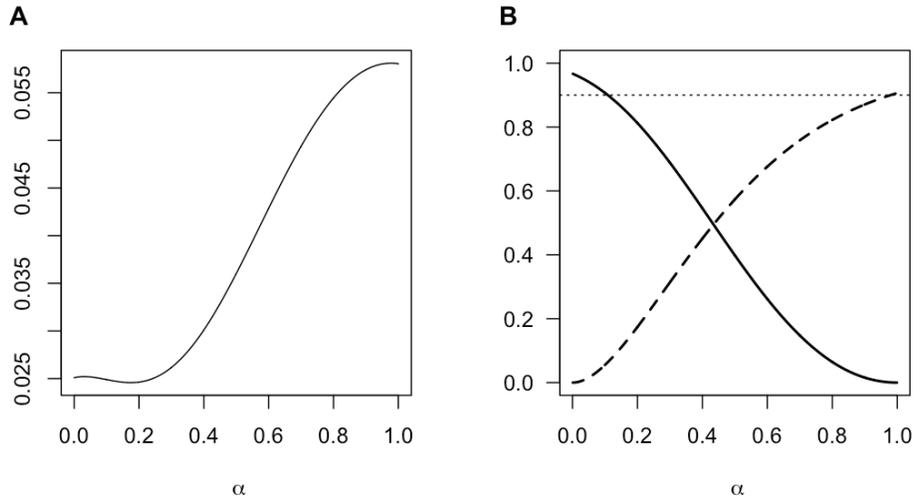


Figura 2.6. Gráficas para detectar lagunas en el espacio multivariado. Comparación entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Dentro de *P. douglasiana* (se incluye a *P. aff. douglasiana* y dentro de *P. maximinoi* se incluye a *P. aff. maximinoi*. A) Gráfica para detectar modas ($\alpha = 0.95$). B) Gráfica para detectar la sobreposición de las regiones de tolerancia. *Pinus douglasiana* (línea continua) y *P. maximinoi* (línea discontinua). La línea punteada indica un límite de tolerancia (β) de 0.90, un α de 0.95 y un nivel de confianza (γ) de 0.95.

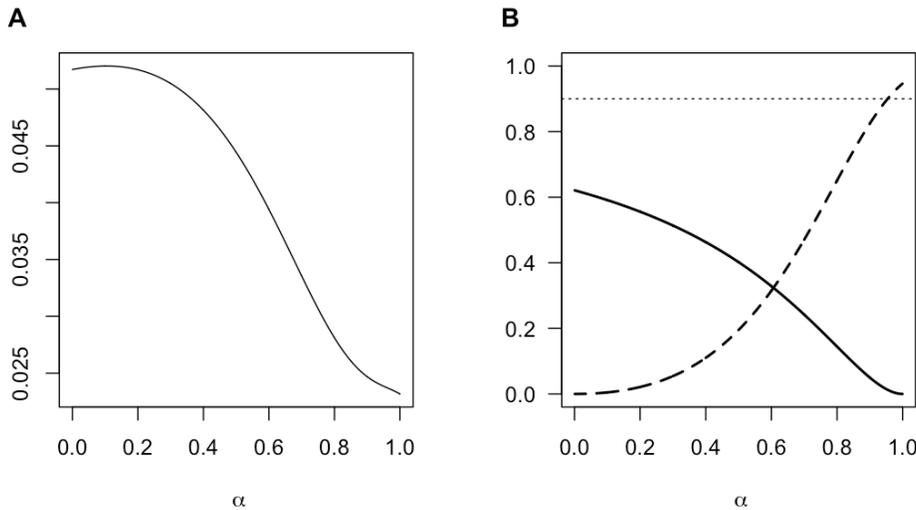


Figura 2.7. Gráficas para detectar lagunas en el espacio multivariado. Comparación entre *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus* (se incluyen las dos variedades, *pseudostrobus* y *apulcensis*). Dentro de *P. maximinoi* se incluye a *P. aff. maximinoi*. A) Gráfica para detectar modas ($\alpha = 0.95$). B) Gráfica para detectar la sobreposición de las regiones de tolerancia. *P. pseudostrobus* (línea continua) y *P. maximinoi* (línea discontinua). La línea punteada indica el límite de tolerancia (β) de 0.90, $\alpha = 0.95$ y $\gamma = 0.95$.

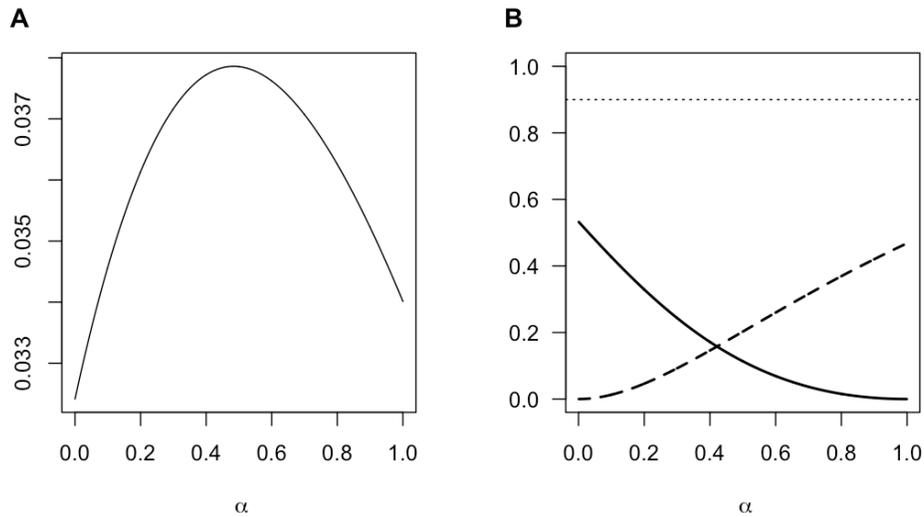


Figura 2.8. Gráficas para detectar lagunas en el espacio multivariado. Comparación entre *P. douglasiana* y *P. pseudostrobis* (incluye las dos variedades, *pseudostrobis* y *apulcensis*). Dentro de *P. douglasiana* se incluye a *P. aff. douglasiana*. A) Gráfica para detectar valles entre dos modas ($\alpha = 0.95$). B) Gráfica para detectar la sobreposición de las regiones de tolerancia. *P. pseudostrobis* (línea continua) y *P. maximinoi* (línea discontinua). Línea punteada un límite de tolerancia (β) de 0.90, un α de 0.95 y un nivel de confianza (γ) de 0.95.

Análisis de agrupación jerárquica—Los resultados son, de manera general, congruentes con los resultados del análisis de componentes principales. En el dendrograma (Fig. 2.9) correspondiente a los resultados se pueden distinguir seis ramas interceptadas perpendicularmente por una línea discontinua. Dichas ramas son las que mejor agrupan en el dendrograma a los ejemplares identificados de forma preliminar según su morfología. En una de las ramas interceptadas se aglomeran la mayoría de los ejemplares de *P. douglasiana* (número de ejemplares, $n = 72$). En esta rama también se agrupan ejemplares de *P. aff. douglasiana* ($n = 30$), *P. maximinoi* ($n = 3$), *P. aff. maximinoi* (1), *P. pseudostrobis* var. *pseudostrobis* ($n = 12$), *P. pseudostrobis* var. *apulcensis* ($n = 3$) y *P. yecorensis* ($n = 4$). En una segunda rama se aglomeran la mayoría de los ejemplares de *P. maximinoi* ($n = 57$). En esta segunda rama también se encuentran agrupados ejemplares de *P. aff. maximinoi* ($n = 6$), *P. douglasiana* ($n = 4$), *P. aff. douglasiana* ($n = 11$), *P. pseudostrobis* var. *pseudostrobis* ($n = 11$) y *P. pseudostrobis* var. *apulcensis* ($n = 1$). En una tercera rama se agrupan exclusivamente ejemplares de *P. pseudostrobis* var. *apulcensis* ($n = 13$). Las restantes tres ramas están formadas por un solo ejemplar cada una, un ejemplar de *P. pseudostrobis* var. *apulcensis* y dos ejemplares de *P. douglasiana*.

Análisis de discriminantes canónicas—Los resultados del análisis de discriminantes son parcialmente congruentes con el análisis de componentes principales y el análisis de agrupamiento jerárquico. La primera función discriminante explica la formación de grupos en un 49.5% y el

segundo componente en un 33% (Fig. 2.10). Las variables que mejor explican la formación de grupos según el discriminante uno es el grueso de la apófisis y las intrusiones (Fig. 2.11). El grueso de la vaina y el ancho de la hoja contribuyen a la formación de grupos usando la función discriminante dos. En este análisis, el número de ejemplares de *P. yecorensis* (n = 4) hace que el resultado, distinción de *P. yecorensis* con respecto de los otros grupos, sea poco confiable (Fig. 2.10). Con una muestra mayor de *P. yecorensis* posiblemente se pueda diferenciar a esta especie de *P. douglasiana*, especie con la cual *P. yecorensis* muestra mayor parecido. De manera similar, el número pequeño de ejemplares de *P. aff. maximinoi* (n = 7) hace dudar de su posible diferenciación con respecto de *P. aff. douglasiana*, o de su similitud con *P. maximinoi*. Contrario a la forma en que fueron clasificados, los ejemplares de *P. aff. douglasiana* muestran una mayor cercanía a los ejemplares de *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* y los ejemplares de *P. aff. maximinoi*. Se puede observar que *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* es la que mejor se distingue en el complejo *Pseudostrobus*, aunque los ejemplares de *P. douglasiana* también se distinguen bien si no se toma en cuenta los ejemplares de *P. yecorensis*. En general los resultados de este análisis muestran como es nuestra apreciación de la variación en el grupo *Pseudostrobus*.

Distribución del grupo *Pseudostrobus* en México—Se encontró que la mayoría de los sitios de colecta están ubicados sobre las provincias Altos de Chiapas, Costa del Pacífico, Eje Volcánico, Oaxaca, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre del Sur y el Soconusco (Fig. 2.12). *Pinus douglasiana* se distribuye principalmente en las provincias Eje Volcánico y la Sierra Madre Occidental, en una zona de transición entre la región neártica y la neotropical (Morrone 2005). También se encontraron ejemplares con la morfología de *P. douglasiana* en la provincia Sierra Madre del Sur, en Oaxaca y Guerrero. En contraste, *P. maximinoi* se distribuye principalmente en las provincias Costa del Pacífico, Sierra Madre del Sur, Altos de Chiapas y El Petén, las cuales son parte de la región neotropical. No es raro observar que los sitios en donde se ubican las poblaciones, principalmente de *P. douglasiana* y en menor grado de *P. maximinoi*, se encuentran en los límites de las provincias biogeográficas, en donde comienzan las principales sierras mexicanas. En general se puede decir que los sitios en donde se distribuyen las especies del complejo *Pseudostrobus* se encuentran en áreas en donde prosperan los bosques templados.

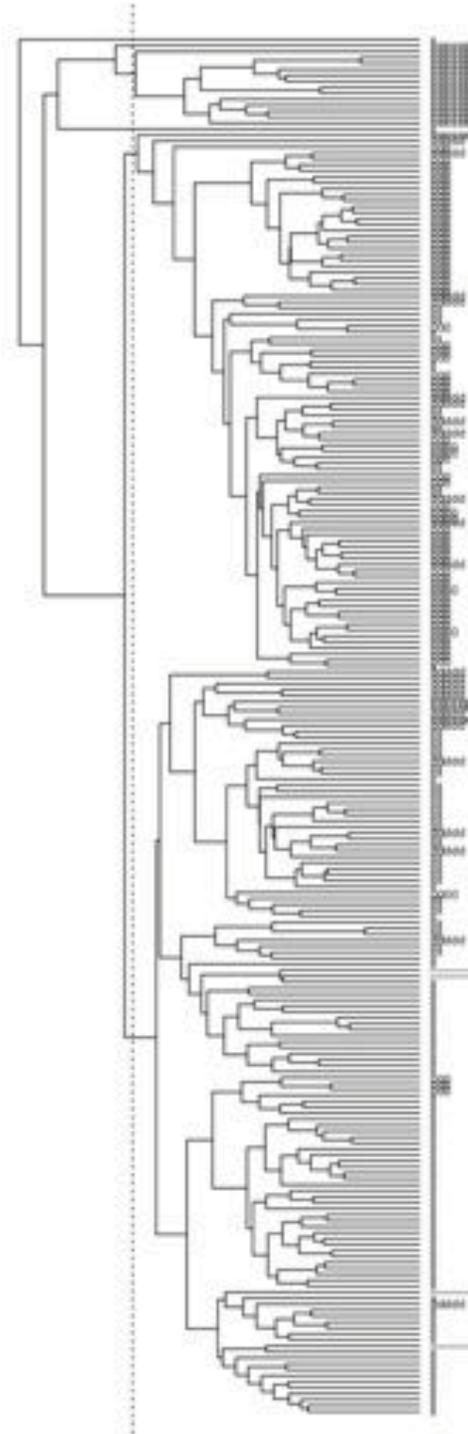


Figura 2.9. Dendrograma que muestra el resultado del análisis de agrupamiento jerárquico. Se usaron distancias euclidianas y el método de agrupamiento UPGMA. *Pinus douglasiana* (x), *P. aff. douglasiana* (xx), *P. maximinoi* (000), *P. aff. maximinoi* (0000), *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* (ppppp), *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (aaaaaaa), *P. yecorensis* (-----). La línea achurada corta las ramas que representan de la manera más adecuada a los taxa incluidos en el análisis.

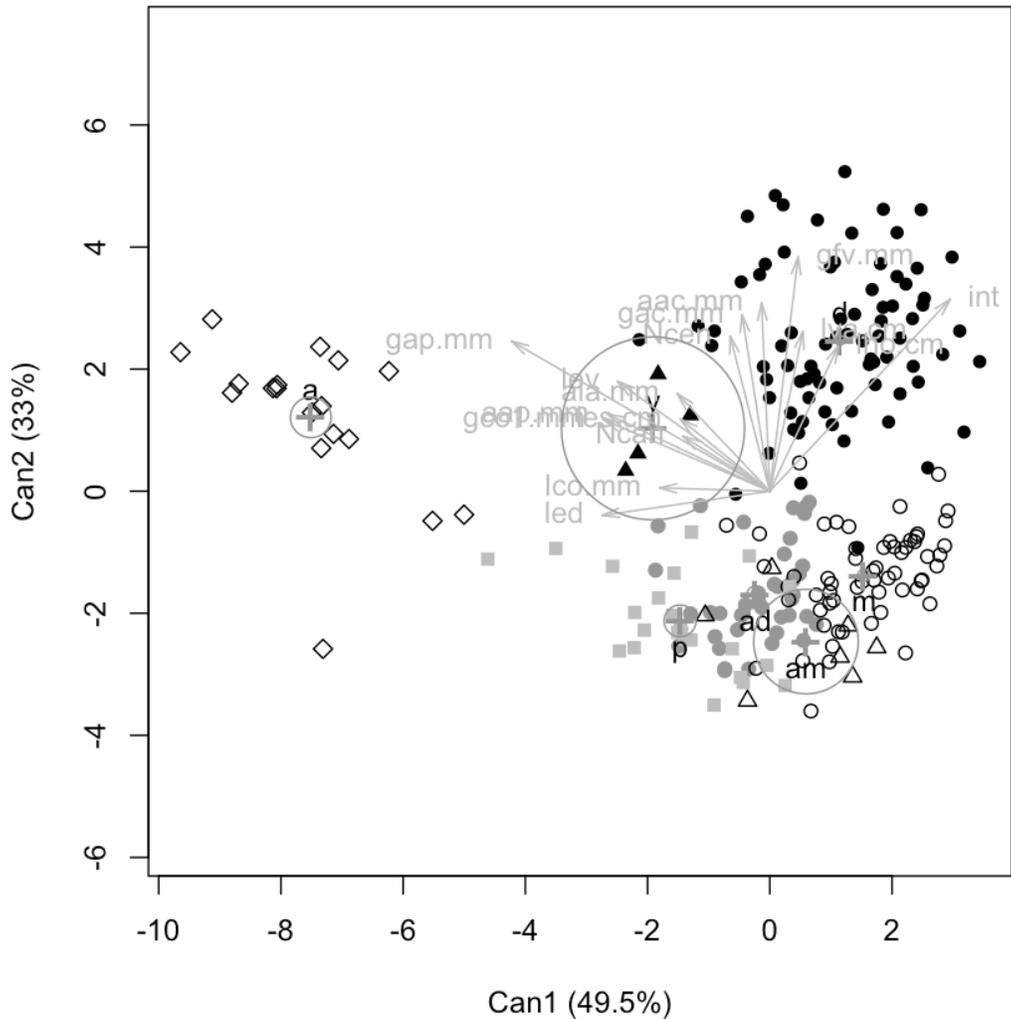


Figura 2.10. Gráfica que muestra los resultados del ADC. A. Distribución de los ejemplares del complejo *Pseudostrobus* usando los valores de los discriminantes 1 y 2 ($\alpha = 0.95$). Los vectores representan la importancia de las variables para distinguir a los taxa. *Pinus* aff. *douglasiana* (●), *P. douglasiana* (●), *P. aff. maximinoi* (△), *P. maximinoi* (○), *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* (■), *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (◇), *P. yecorensis* (▲). Los vectores indican la importancia de las variables al momento de separar a los grupos. Longitud de la hoja (lho.cm), longitud de la vaina (lav.cm), grosor de la vaina (gac.mm), longitud del cono (lco.mm), grosor del cono (gco.mm), anchura de la apófisis (aap.mm), altura de apófisis (ala.mm), grosor de la apófisis (gap.mm), longitud de la escama, (les.cm), número de líneas estomáticas en la cara abaxial (led), número de líneas estomáticas en la cara adaxial (lev), número de canales de resina (Ncan), número de Intrusiones (int), número de células de la endodermis (Ncen), grosor de la acícula (gac.mm) y ancho de la acícula (aac.mm). *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* (a), *P. aff. douglasiana* (ad), *P. aff. maximinoi* (am), *P. douglasiana* (d), *P. maximinoi* (m), *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* (p) y *P. yecorensis* (y).

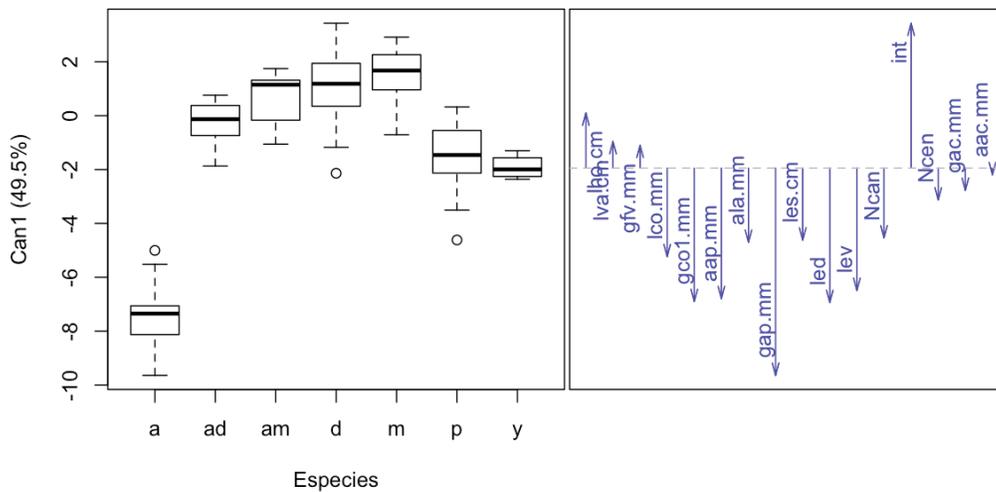


Figura 2.11. Gráfica de las diferencias entre las especies del complejo *Pseudostrobus* obtenidas del análisis de discriminantes canónicas. En el cuadro de la izquierda se comparan los promedios obtenidos considerando el discriminante uno para cada uno de los grupos del complejo *Pseudostrobus* ($\alpha = 0.95$). *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* (a), *P. aff. douglasiana* (ad), *P. aff. maximinoi* (am), *P. douglasiana* (d), *P. maximinoi* (m), *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* (p) y *P. yecorensis* (y). Los vectores mostrados en la gráfica de la derecha representan la importancia de las variables para distinguir a las especies. Para identificar las variables por sus abreviaturas ver la Fig. 2.12.

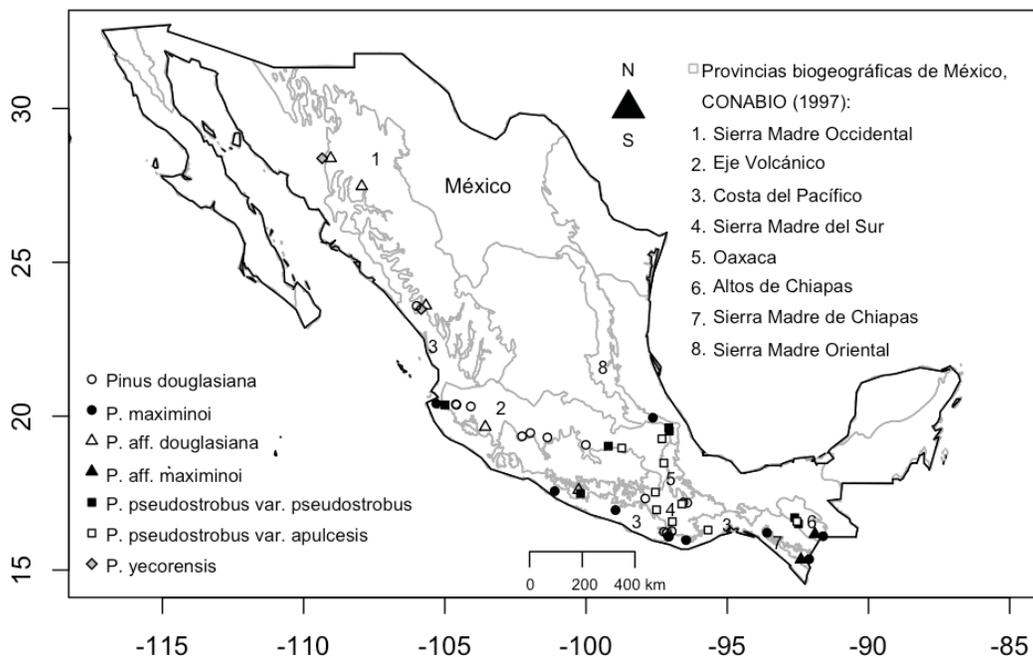


Figura 2.12. Sitos correspondientes a la ubicación en México de los taxa del complejo *Pseudostrobus* y su ubicación con respecto a las provincias biogeográficas.

Las especies del complejo *Pseudostrobus* se distribuyen en climas principalmente templados. *Pinus douglasiana* habita en climas templados con influencia de climas tropicales, (A)C(w2) (Semicálido y subhúmedo) —este tipo de clima puede ser considerado un clima de transición entre un clima cálido y uno templado. *Pinus douglasiana* también se distribuye en climas francamente templados. *Pinus maximinoi*, a diferencia de *P. douglasiana*, puede habitar áreas con clima cálido y subhúmedo (Aw2), aunque también puede habitar climas de transición (A)C(w2) y con menos frecuencia climas francamente templados (Fig. 2.13). *Pinus pseudostrobus* se distribuye en climas templados y en climas con influencia de climas tropicales (A)C(w2). En congruencia con lo esperado, *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* puede crecer en climas más templados que el resto de las especies del complejo *Pseudostrobus*, es decir, *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* puede prosperar en un clima semifrío húmedo [Cb'(m)] o semifrío subhúmedo [Cb'(w2)] (Tabla 2.3). A diferencia de *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*, *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* se puede distribuir en climas cálidos subhúmedos o templados subhúmedos, (A)C(w0) y C(w0) respectivamente. Esto indica que *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* puede crecer en un clima con lluvia abundante en verano y poca lluvia en invierno. En cuanto a *P. yecorensis*, puede crecer, aunque no exclusivamente, en climas de tipo templado subhúmedo [C(w1)x' y C(w2)x'], climas en donde la precipitación es mayor en invierno.

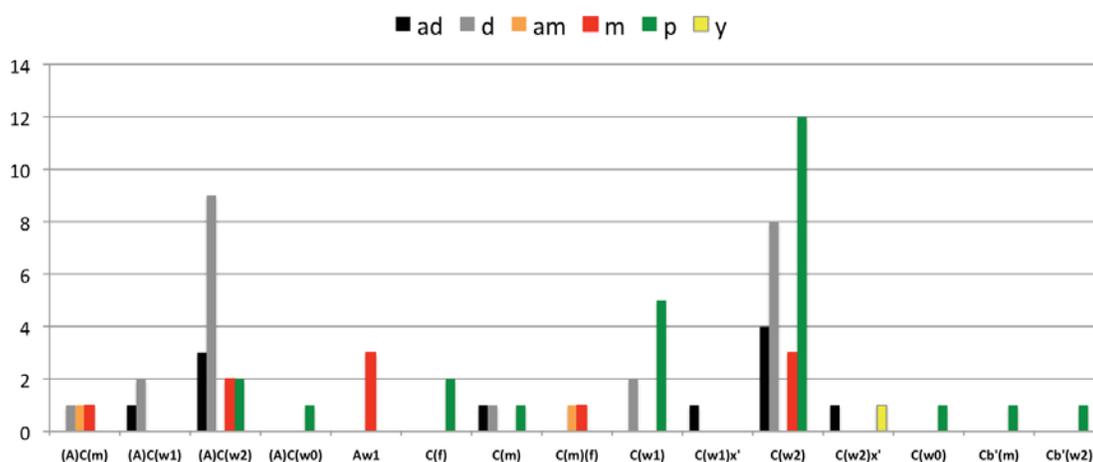


Fig. 2.13. Comparación del número de sitios de recolecta por especie para cada tipo de clima en donde se distribuye el complejo *Pseudostrobus*. *Pinus* aff. *douglasiana* (ad), *P. douglasiana* (d), *P.* aff. *maximinoi* (am), *P. maximinoi* (m), *P. pseudostrobus* (p) y *P. yecorensis* (y).

Discusión [capítulo 2]

El trabajo de Stead (1983b), que trata la morfología del grupo *Pseudostrobus* (sensu Martínez 1948), es una referencia para comparar los resultados de este trabajo. Aunque este trabajo es similar al estudio morfométrico de Stead (1983b), ambos trabajos no son completamente comparables. En este trabajo la formación de grupos en el espacio multivariado fue menos evidente que en el trabajo de Stead (1983b). La incongruencia parcial entre este trabajo y el de Stead (1983b) posiblemente se deba en parte a las diferencias en los métodos. Otra posible razón puede ser la diferencia en los muestreos. Los sitios de recolecta considerados en este trabajo son diferentes a los sitios de recolecta de Stead (1983b). En este trabajo no se realizó un muestreo poblacional como en el trabajo de Stead (1983b), mas bien se trató de tener representados el mayor número de sitios posibles. Una tercer razón de la falta de congruencia es no haber usado las mismas variables. En este trabajo se excluyó el número de dientes y el número de estomas por unidad de longitud foliar, variables que si fueron incluidas en el trabajo de Stead (1983b). En este trabajo se incluyeron el número de células de la endodermis, el grueso de las hojas, el grueso de los fascículos, y la longitud promedio de las escamas del cono, variables que no fueron incluidas en el trabajo de Stead (1983b).

En cuanto a *P. yecorensis* el número de individuos incluidos impide hacer una apreciación general de su variación, pero la evidencia parece indicar que tiene una mayor afinidad morfológica con *P. douglasiana* que con *P. maximinoi*. La falta de intrusiones en *P. yecorensis* la asemeja a *P. aff. douglasiana*, la cual posiblemente es parte de la variación de *P. douglasiana*. Debido a los problemas taxonómicos encontrados en la delimitación de *P. yecorensis* y su escasa representación en este trabajo, es recomendable ahondar en su morfología.

Grupos en el complejo *Pseudostrobus*—En este trabajo se consideró a *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* Martínez como sinónimo de *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw. En contraste, Stead (1983b) consideró a *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* Martínez y *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw como dos taxa diferentes. En este trabajo se consideró a *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* en un sentido amplio, de acuerdo al esquema de Farjon y Styles (1997). De manera que *Pinus pseudostrobus* var. *coatepecensis* y *P. pseudostrobus* var. *estevezii*, si consideradas por Stead (1983b), no fueron reconocidas como tal en el presente trabajo.

Una contribución importante de este trabajo es el reconocimiento de *P. aff. douglasiana*. Es importante recordar que *P. aff. douglasiana* fue recolectada principalmente en la Sierra Madre Occidental y el oeste del Eje Volcánico y que dicha especie no presenta intrusiones de la hipodermis en contacto con la endodermis. En este trabajo se señala la posibilidad de que *P. aff. douglasiana* forme parte de la variación de *P. douglasiana* principalmente porque presenta conos

con pedúnculos persistentes, como *P. douglasiana*. La carencia de intrusiones de la hipodermis en contacto con la endodermis en *P. douglasiana* no sería un hecho raro. Hay que recordar que *Pinus maximinoi*, en el extremo sur de su distribución (Nicaragua principalmente), puede carecer de intrusiones en contacto con la endodermis (Stead y Styles 1984). Es muy probable que Stead y Styles (1984) hayan identificado como *P. pseudostrobus* a ejemplares que en este trabajo se reconocen como *P. aff. douglasiana*. Dichos autores, Stead y Styles (1984), señalan claramente que la diferencia entre *P. douglasiana* y *P. pseudostrobus* en el Oeste del Eje Volcánico y la Sierra Madre Occidental se debe principalmente a la presencia de intrusiones. Martínez (1948) reporta la existencia de formas afines a *P. maximinoi* en el noroeste de México. De acuerdo con Martínez (1948), dichas formas afines a *P. maximinoi* indican el parentesco cercano de *P. maximinoi* con *P. douglasiana* y *P. pseudostrobus*. Es preciso recordar que dichas formas afines a *P. maximinoi* carecen de intrusiones en contacto con la endodermis, tienen apófisis ligeramente abultadas y presentan escamas gruesas (Martínez 1948). Existe la posibilidad de que *P. aff. douglasiana* sea un híbrido, tal vez originado de la cruce entre *P. douglasiana* y *P. pseudostrobus*, aunque hay que recordar que no todos los híbridos muestran formas intermedias con respecto de las especies paternas (Rieseberg 1997). Estudios de hibridación artificial o el empleo de marcadores moleculares (ADN) pueden ayudar a definir la identidad de *P. aff. douglasiana*.

Importancia de la morfología en la taxonomía del complejo *Pseudostrobus*—Es necesario establecer la relación entre la morfología y la existencia de un linaje evolutivo o un linaje que evoluciona de forma independiente (Tattersall 2007). En este sentido convendría saber la relación que hay entre los patrones morfológicos observados respecto de las fuerzas que rigen el proceso de especiación. Por ejemplo, en algunos estudios la morfometría ha servido para apoyar los límites interespecíficos en complejos en donde se sabe de la formación de híbridos con aislamiento reproductivo (Nagahama et al. 2014). En otros grupos de plantas las diferencias morfométricas están asociadas a una relación con insectos polinizadores o aislamiento geográfico (Abdelaziz et al. 2011). Otros estudios morfométricos han mostrado que las diferencias cuantitativas pueden ser confiables cuando son apoyadas por evidencia molecular (Valcárcel y Vargas 2010). La evolución de los pinos está muy relacionada con las condiciones ambientales en la que prosperan. Los pinos se han adaptado a una amplia variedad de climas, principalmente templados. La variación encontrada en el cono ovulífero y la hoja acicular son el reflejo de su adaptación a diversas condiciones climáticas. Por ejemplo, las hojas cortas y rígidas son encontradas en especies adaptadas a sequías prolongadas y periodos de radiación intensa (Farjon 1996).

Se encontraron diferencias de tamaño en las hojas y conos de *P. douglasiana* con respecto a las hojas y conos de *P. maximinoi*. Dichas diferencias fueron señaladas por Martínez (1948) y apoyadas por el trabajo de Stead (1983b). El análisis de componentes principales muestra que las formas de *P. maximinoi* son más homogéneas que las de *P. douglasiana*. Esto último se puede observar en la gráfica correspondiente al ACP (Fig. 2.10) en donde los rangos de variación de *P. maximinoi* son menores que los de *P. douglasiana*. Dicha diferencia en la homogeneidad de la variación morfológica entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* es congruente con lo reportado por Stead y Styles (1984). En la figura cuatro mostrada en el trabajo de Stead (1983b), y que representa los resultados del análisis de componentes principales realizado por dicho autor, el componente uno explica 38.33% de la variación. Dicho porcentaje es similar al 42.37%, encontrado en este trabajo, asociado al componente uno del análisis de componentes principales —análisis equivalente al realizado por Stead (1983b). No obstante la similitud en la variación encontrada en este trabajo con respecto a la encontrada por Stead (1983b), en este trabajo, la distribución de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en el espacio multivariado no indica la existencia de grupos claramente discretos que hayan sido formados por la existencia de límites bien definidos entre ambas especies. Como en el trabajo de Stead (1983b) se encontró que *P. pseudostrobus* es una especie con mucha variación.

Los resultados de la variación cuantitativa indican que no hay límites tan claros entre *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus* como los encontrados en el trabajo de Stead (1983b). Los ejemplares de *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* son fácilmente distinguibles de *P. maximinoi*, por lo que, la mayor similitud se da entre *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* y *P. maximinoi*. De acuerdo con Stead (1983b) en el extremo occidental de la Provincia Biogeográfica Eje Volcánico, Jalisco principalmente, existen ejemplares de *P. pseudostrobus* con formas afines a *P. maximinoi* (Fig. 3 del trabajo de Stead 1983b). De manera similar, en este trabajo se encontró la existencia de ejemplares jaliscienses de *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* con formas muy afines a *P. maximinoi*. Se sabe que dichos ejemplares pertenecen a *P. pseudostrobus* porque carecen de intrusiones en contacto con la endodermis y presentan un cono con pedúnculo caedizo (Mittak y Perry 1979; Carvajal y McVaugh 1992).

La amplia variación de *Pinus pseudostrobus* hace posible señalar algunos caracteres que pudieran distinguir a *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* de *P. maximinoi*. De acuerdo con la revisión taxonómica de los ejemplares de herbario y la experiencia obtenida en las recolectas es posible indicar que ocasionalmente *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* presenta un cono más simétrico que el de *P. maximinoi*. El cono de *P. maximinoi* presenta un eje ligeramente curvo que hace que el pedúnculo parezca oblicuo con respecto del cono (Martínez 1948). El cono de *Pinus*

pseudostrobus puede ser sésil o casi sésil (Perry 1991). Algunos individuos de esta especie tienen hojas anchas como en *P. douglasiana*, mientras que otros pueden tener hojas angostas como en *P. maximinoi*. Se han encontrado diferencias en la velocidad de crecimiento entre plántulas de *P. pseudostrobus* y de *P. maximinoi* distribuidas en América Central (Stead 1983a; Dvorak et al. 2000). En *P. pseudostrobus* la presencia de un cono con pedúnculo caedizo contribuye a diferenciar a esta especie del resto de las especies en el grupo *Pseudostrobus*. De hecho, se cree que *P. pseudostrobus* forma híbridos con otras especies de la subsección *Ponderosae* y que guarda un estrecho parentesco con ellas, en particular con *P. montezumae* (Delgado et al. 2007; Gernandt et al. 2009).

Se incluyeron solo tres ejemplares de *P. maximinoi* de poblaciones fuera de México (Guatemala, Honduras y Nicaragua), pero sin duda los ejemplares de Chiapas (n = 24) ofrecen una aproximación de la variación de la forma de *P. maximinoi* en América Central. Los análisis morfológicos, el análisis de componentes principales y el de conglomerados, indican que los ejemplares de Guatemala, Honduras y Nicaragua son morfológicamente similares a los ejemplares mexicanos de *P. maximinoi*. Esto último es congruente con el trabajo de Stead (1983b) y Stead y Styles (1984) quienes señalan que, salvo por el número de intrusiones que disminuye de norte a sur, los ejemplares de *P. maximinoi*, desde Oaxaca hasta Nicaragua, presentan formas homogéneas.

Se consideró a *P. aff. maximinoi* sinónimo de los ejemplares de *P. maximinoi* sin intrusiones que reportan Stead (1983b) y Stead y Styles (1984). Los ejemplares de *P. aff. maximinoi* merecen una atención especial debido a su parecido con *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*. La forma de diferenciar a *P. aff. maximinoi* de *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* es observando si el cono presenta un pedúnculo persistente o caedizo. La única manera en que pudiera persistir la confusión en cuanto a la distinción de *P. aff. maximinoi* con respecto de *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*, es encontrando ejemplares de *P. aff. maximinoi* en los que la persistencia del pedúnculo en el cono sea un carácter polimórfico, es decir, que un mismo individuo presente tanto conos con pedúnculo persistente como conos con pedúnculo caedizo.

Las especies de pino son a primera vista muy similares. Los pinos comparten muchos de sus caracteres. Pocos pinos pueden ser identificados por un solo carácter. De hecho, las especies de pino generalmente son reconocidas mediante una combinación de caracteres (Farjon et al. 1997). Esta práctica es similar al criterio de diagnosticabilidad, usado bajo el concepto filogenético de especie (Nixon y Wheeler 1990; Davis y Nixon 1992). Con grupos discretos en el espacio multivariado sería factible elegir caracteres cuantitativos para diagnosticar especies. De acuerdo con los resultados de este trabajo, no es posible usar las variables consideradas en los análisis

morfométricos para aplicar el criterio de diagnosticabilidad y diferenciar a *P. douglasiana* de *P. maximinoi*. Esta imposibilidad se debe a que las variables tienen rangos que se superponen entre especies, de forma que no se observan grupos discretos en el espacio multivariado.

La distribución del complejo *Pseudostrobus* y su asociación con los tipos de clima—Las diferencias ecológicas pueden apoyar el estatus taxonómico de las especies en un complejo taxonómico (Raxworthy et al. 2007; Wiens 2007). *Pinus maximinoi* se distribuye principalmente en climas subtropicales y húmedos. A su vez, *P. douglasiana* se distribuye en climas templados. Sin embargo, tanto *P. douglasiana* como *P. maximinoi* pueden distribuirse en zonas de transición entre los climas subtropicales (A) y los climas templados (C), principalmente el clima (A)C(w2). Esta afinidad en las preferencias climáticas de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* no permite hacer una clara diferenciación de sus preferencias ecológicas. Esto es quizá una muestra más de que ambas especies son muy recientes. Si existe plasticidad fenotípica en *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, es posible que la misma plasticidad sea la causante de las afinidades en forma entre dichas especies cuando ambas especies habitan en climas de transición [e. g. (A)C(w2)]. El clima (A)C(w2) se extiende al noroeste de México, a la Sierra Madre Occidental, entonces no sería raro encontrar a *P. maximinoi* distribuida en la parte media de Sinaloa y posiblemente en Durango, en las mismas latitudes que las poblaciones de Sinaloa. Martínez (1948) señala que *P. maximinoi* se distribuye en Sinaloa. Stead y Styles (1984) señalan que es poco probable que *P. maximinoi* se distribuya en Nayarit y Sinaloa, en la Sierra Madre Occidental. En este trabajo, los ejemplares recolectados en Sinaloa, con intrusiones en contacto con la endodermis, fueron identificados como *P. douglasiana*. Aunque, algunos ejemplares de *P. aff. douglasiana*, también de Sinaloa, podrían ser confundidos con *P. aff. maximinoi*. Es poco probable que *P. maximinoi* se distribuya hasta Sonora y Chihuahua, al norte de la Sierra Madre Occidental, aunque Ferguson et al. (2001) señalan que *P. maximinoi* se distribuye en Sonora. La Sierra Madre Occidental es muy extensa, y sin duda hay sitios en esta sierra que no se incluyeron en este trabajo, sitios en los que podrían distribuirse poblaciones de *P. maximinoi*. El clima de transición, (A)C(w2), también existe en algunas partes del Eje Volcánico, lo que indica la posibilidad de que *P. maximinoi* se distribuyan en dicha sierra, aunque en áreas menos extensas que las poblaciones de *P. douglasiana*. En cuanto a *P. douglasiana*, a diferencia de *P. maximinoi*, es posible que alcance áreas muy al norte de México (Chihuahua, Sonora y Durango), en el extremo norte de la Sierra Madre Occidental. Por el tipo de clima en donde se distribuye *P. douglasiana*, esta especie tiene una posibilidad mayor que *P. maximinoi* de estar en simpatria con *P. yecorensis*. Como los climas (A)C(w2) y C(w2) se extienden hasta las provincias biogeográficas El Soconusco y Altos de Chiapas, resulta curioso que no se haya reportado la distribución de *P. douglasiana* en dichas provincias. *Pinus pseudostrobus* es una especie que se distribuye en climas más templados

que *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, pero puede estar en simpatria con dichas especies, en áreas menos templadas. Esto muestra que *P. pseudostrobis* es una especie con un mayor rango climático que *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

Las diferencias morfológicas en grupos de poblaciones son consideradas evidencias de su divergencia. La divergencia entre grupos de poblaciones puede ser evidencia de la existencia de más de una especie. Posiblemente los resultados morfológicos de este trabajo subestiman la divergencia entre las especies del complejo *Pseudostrobis*, en tal caso, estudios más detallados podrían servir para encontrar caracteres diagnósticos que efectivamente diferencien a *P. douglasiana* de *P. maximinoi*. Si en realidad existe poca divergencia evolutiva entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, es posible que estudios más detallados, por ejemplo, análisis con marcadores moleculares, apoyen los resultados morfológicos de este trabajo. La falta de caracteres diagnósticos entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* indica que quizás éstas sean especies de origen reciente. En especies de divergencia reciente se esperaría que muestren pocas diferencias, en gran medida por que han retenido parte del polimorfismo de la especie ancestral de la cual surgieron.

CAPÍTULO 3

ADN de plasto (ADNpl)

Introducción

El desarrollo de técnicas moleculares han dado un gran impulso a los estudios de delimitación de especies (Zurawski y Clegg 1987; Matos y Schaal 2000; Templeton 2001; Hebert et al. 2003; Delgado et al. 2007; Knowles y Carstens 2007; Soltis et al. 2013). El objetivo de usar las técnicas moleculares para delimitar especies es encontrar caracteres variables en el ADN que permitan distinguir entre los taxa de un complejo de especies (Petit y Excoffier 2009). Este objetivo es similar al de encontrar una o unas pocas regiones en el ADN que funcionen como “código de barras genético” para identificar especies (Hebert y Gregory 2005; CBOL Plant Working Group 2009; Hollingsworth 2011). De los trabajos enfocados a encontrar regiones de ADN que sirvan como código de barras, nos podemos dar cuenta que el genoma de plasto presenta regiones con la variación necesaria para circunscribir especies (Hollingsworth et al. 2011; Dong et al. 2015). El ADN de mitocondria ha sido más usado en trabajos con animales que aquellos realizados en plantas. En los trabajos con plantas ha predominado el uso de ADN de plasto (Petit et al. 2005; Hollingsworth et al. 2011; Wang y Wang 2014; Potter et al. 2013). Este capítulo está enfocado a estudiar la variación en el ADN de plasto. Dejo el estudio del ADN mitocondrial para el capítulo siguiente.

En la década de los 80's del siglo pasado, hubo un avance enorme en el mejoramiento de las técnicas usadas para reunir información molecular (Wheeler 2012). En esa misma década las ideas de sistemática, a las que Hennig (1966) contribuyó notablemente, ya estaban muy difundidas por lo que la información molecular se integró a los análisis filogenéticos. A su vez los análisis filogenéticos han influido en las técnicas de análisis molecular a nivel poblacional (Harding 1996; Templeton 1998b). En la actualidad los datos moleculares (secuencias de ADN) de taxones vivientes son muy comunes y relativamente fáciles de obtener, constituyendo un componente en la mayoría de los análisis modernos de sistemática (Wheeler 2012).

El ADN de plasto ha sido estudiado en muchos grupos de plantas, por lo que en la actualidad se conocen algunas de sus principales características (Ennos et al. 1999). En pinos el genoma de plástido (plastoma) es una molécula circular que codifica cerca de ~71 genes, 36 ARN de

transferencia y cuatro ARN ribosomales (Wakasugi et al. 1994; Parks et al. 2009). En ausencia de heteroplasmia, presencia de más de un genotipo de plástido por célula, el plastoma puede ser considerado verdaderamente haploide (Birky et al. 1989; Ennos et al. 1999). Además, debido a que es poco probable que exista recombinación, el plastoma puede considerarse como un solo cromosoma (Birky et al. 1989; Ennos et al. 1999). La estructura del plastoma es muy conservada, esto significa que la mayoría de las diferencias observadas entre genomas de especies cercanas se deben a mutaciones puntuales (Matos y Schaal 2000). En plantas el plasto se hereda por vía uniparental. En las coníferas el plasto se hereda por vía paterna y se dispersa por medio del polen y semilla (Wagner et al. 1987; Hipkins et al. 1994; Birky 1995; Mogensen 1996). La variación molecular en el ADN de plástido se ha empleado para delimitar especies mediante análisis filogenéticos y análisis poblacionales (Luckow 1995; Matos y Schaal 2000; Templeton 2001; Sites y Marshall 2004; Leliaert et al. 2014).

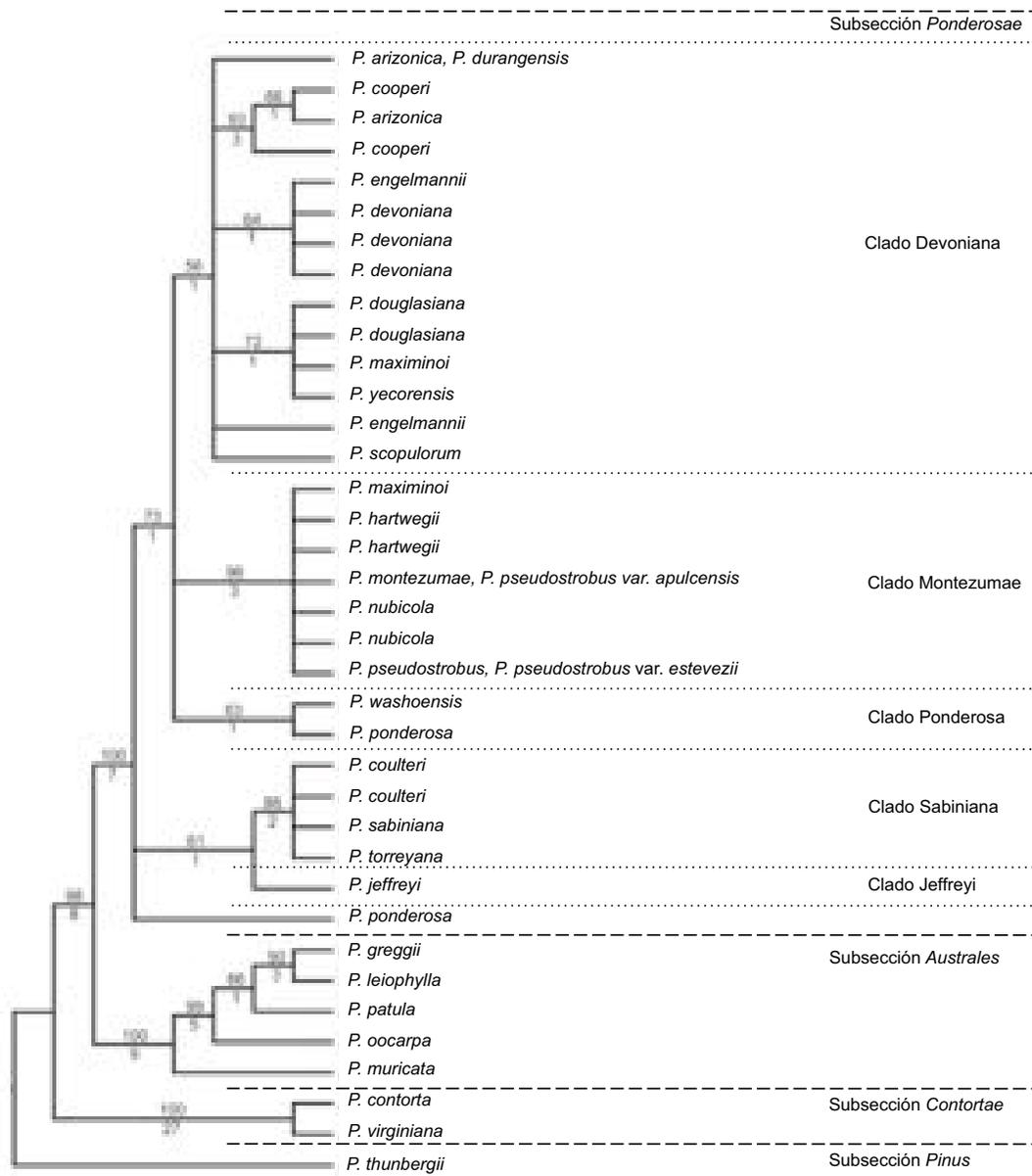
El ADN de plasto ha sido útil para esclarecer las relaciones filogenéticas en el género *Pinus* (Wang et al. 1999, Gernandt et al. 2005, Parks et al. 2009). El ADNpl (*trnV*, *rpl20-rps18*, *matK*, *trnG*, *chlN-ycf1*, *ycf1*, *trnC-trnD*, *trnD-trnY-trnE*)⁵ ha servido para distinguir grupos taxonómicos en *Pinus* (Wang et al. 1999; Geada-López et al. 2002, Gernandt et al. 2003, 2005; Hao et al. 2015). Como se menciona en el capítulo anterior, con base en secuencias de ADNpl (*matK* y *rbcL*), *Pinus* se puede dividir en 2 subgéneros, 4 secciones y 11 subsecciones (Gernandt et al. 2005). La clasificación de Gernandt et al. (2005) es una de las más aceptadas por su congruencia parcial con clasificaciones basadas en ADN de núcleo (Liston et al. 1999) y mitocondria (Wang y Wang 2014). Los análisis filogenéticos considerando el plastoma de varias especies de *Pinus* (Wakasugi et al. 1994; Parks et al. 2009) apoya la clasificación de Gernandt et al. (2005).

La información proporcionada por los genes *matK* y *rbcL* indica que la divergencia entre especies en la subsección *Ponderosae*, subsección en donde se ubican *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, es menor que la mostrada por otras subsecciones del género (Gernandt et al. 2005). En la subsección *Ponderosae* tanto *matK* como *rbcL* son muy conservados. Es decir, *matK* y *rbcL* muestran una tasa baja de sustitución de nucleótidos (Gernandt et al. 2005). Considerando varios individuos por especie y usando en los análisis filogenéticos secuencias de *ycf1* y *chlN-ycf1* junto con secuencias de *matK* y *rbcL*, Gernandt et al. (2009) encontraron que se pueden distinguir grupos

⁵ Las abreviaturas corresponden al gen maturasa K (*MatK*), la subunidad grande de la enzima RuBisCO (*rbcL*), el gen del componente proteico Tic214 (*ycf1*), el intrón del gen para la RNA de transferencia del par Valina-UAC (*trnV*), la región entre el gen de la proteína ribosomal grande y la proteína ribosomal chica (*rpl20-rps18*), al gen del RNA de transferencia (*trnG^{UCC}*), región entre el gen de la reductasa protocloro-filide y el gen *ycf1* (*chlN-ycf1*), región entre genes correspondientes a RNA de transferencia (*trnC-trnD*, *trnD-trnY-trnE*) (Wicke et al. 2011).

monofiléticos de haplotipos en la subsección *Ponderosae*. Dichos grupos monofiléticos son identificados por Gernandt et al. (2009) como clado Devoniana, Montezumae, Ponderosae, Sabiniana y Jeffreyi (Fig. 3.1). El clado Montezumae, el cual presenta un buen apoyo, está integrado por *P. pseudostrobus*, *P. montezumae*, *P. hartwegii*, *P. maximinoi* (una secuencia de tres), *P. nubicola*, *P. donnell-smithii* (Gernandt et al. 2009). Sin embargo, el resultado general del trabajo de Gernandt et al. (2009) indica que para la mayoría de las especies en la subsección *Ponderosae* sus respectivos haplotipos no forman grupos monofiléticos (Gernandt et al. 2009). En estudios previos al de Gernandt et al. (2009), basados en morfología (Martínez 1948; Stead y Styles 1984) o morfología y ADN de plasto (Price et al. 1998), se agrupa a *P. pseudostrobus* junto con *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Es probable que la agrupación de uno de los haplotipos de *P. maximinoi* en el clado Montezumae se deba al fenómeno de introgresión génica. *Pinus douglasiana* y *P. yecorensis* pertenecen al clado Devoniana (Gernandt et al. 2009). Los haplotipos encontrados en *P. douglasiana* y *P. yecorensis* forman un grupo monofilético junto con el haplotipo de dos individuos de *P. maximinoi*. Por consiguiente, se infiere la estrecha relación de parentesco entre *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. yecorensis* (Gernandt et al. 2009). Como resultado del trabajo de Gernandt et al. (2009), es dudosa la integración de *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. yecorensis* y *P. pseudostrobus* en un mismo grupo.

Los trabajos filogenéticos en *Pinus* han mostrado que el gen *ycf1* muestra más sitios variables que otras regiones de plasto (Parks et al. 2009; Hernández-León et al. 2013). El gen *ycf1* ha sido propuesto para ser usado como código de barras para las plantas (Dong et al. 2015). Se encontró que el gen *ycf1* codifica al componente proteínico Tic214 (transponedor 214 de la membrana interna de plasto). El Tic214 es uno de los cuatro componentes vitales del complejo TIC de *Arabidopsis* (Kikuchi et al. 2013, Nakai 2015). En pinos la mayor variación y exceso de sustituciones no sinónimas en comparación con las sustituciones sinónimas indica que existe selección positiva actuando en el gen *ycf1* (Parks et al. 2009; Hernández-León et al. 2013). Con respecto a esto último, Parks et al. (2009) advierten que en *Pinus* la selección positiva podría reflejar episodios adaptativos más que una genealogía neutral. El gen *ycf1*, junto con otras regiones de ADN de plástido (*matK*, *trnD-trnY-trnE* y el espaciador *chlN-ycf1*), ha mostrado ser útil para esclarecer las relaciones filogenéticas al interior del género *Pinus* (Gernandt et al. 2009; Hernández-León et al. 2013, Hao et al. 2015).



----- Límite entre subsecciones

..... Límite entre clados

Figura 3.1. Diagrama que muestra las relaciones filogenéticas entre las especies de la subsección *Ponderosae*. Árbol de consenso estricto obtenido de 50 árboles más parsimoniosos. Los valores de apoyo de ramas con base en porcentajes de bootstrap mayores al 50% se muestran en las ramas. Los valores de decaimiento se muestran debajo de las ramas. En los cuadros de la derecha se muestran las subsecciones y los clados de la subsección *Ponderosae*. Imagen obtenida y modificada de Gernandt et al. (2009).

Para delimitar especies mediante criterios filogenéticos se debe tomar en cuenta la posibilidad de encontrar polimorfismo compartido entre especies. Por esta posibilidad se deben usar múltiples ejemplares por especie para construir la filogenia de los grupos taxonómicos (Wiens y Serverdio 2000). El estatus taxonómico de las especies inicialmente definidas mediante criterios morfológicos (morfoespecies) podría considerarse una conjetura (De Pinna 1999). El estatus taxonómico de una morfoespecie puede ser apoyado por criterios filogenéticos basados en la topología de uno o más árboles moleculares (Leliaert et al. 2014). Después de realizar un análisis filogenético, se espera que en los árboles obtenidos los haplotipos de una misma morfoespecie formen grupos monofiléticos, en algunos casos parafiléticos (Rieseberg y Brouillet 1994), lo cual sería indicativo de que las especies son evolutivamente independientes. Sin embargo, muchas veces al momento de observar la topología de un árbol génico se hace evidente que los haplotipos de individuos coespecíficos son polifiléticos (Neigel y Avise 1986; Avise y Ball 1990; Baum y Shaw 1995).

Debido a los patrones de polifilia o parafilia en los haplotipos de una especie se puede suponer que la filogenia de un gen no siempre refleja la filogenia de un grupo de especies o el árbol de especie (Posada et al. 2001; Knowles y Carstens 2007). La incongruencia entre un árbol de un gen y el árbol de especie puede deberse a un error en la estimación del árbol, transferencia lateral, eventos de hibridación e introgresión entre especies o por un arreglo incompleto de linajes (Takahata y Nei 1985; Neigel y Avise 1986; Saitou y Nei 1986; Pamilo y Nei 1988; Maddison 1997; Degnan y Rosenberg 2009). El arreglo incompleto de linajes es un proceso en el cual se asume que el polimorfismo génico de una especie (ancestral) se segrega en sus especies hijas de forma que estas últimas comparten parte de su polimorfismo. La retención del polimorfismo ancestral complica o imposibilita la delimitación de especies mediante análisis filogenéticos que se basan en la presencia de caracteres exclusivos en las especies (Knowles y Carstens 2007). Si existe arreglo incompleto de linajes en dos especies hermanas de origen reciente, los métodos filogenéticos tradicionales, como parsimonia, vecino-cercano y verosimilitud, pueden encontrar patrones no monofiléticos en los árboles génicos (Avise et al. 1987; Clement et al. 2000; Leliaert et al. 2014).

Se puede apoyar el estatus taxonómico de las especies en un complejo estudiando el patrón histórico revelado por la genealogía de un gen, aun cuando existan patrones que indiquen hibridación o arreglo incompleto de linajes (Harding 1996; Templeton 1998b). Se puede usar la teoría de coalescencia en combinación con análisis filogenéticos o poblacionales para encontrar patrones de evolución molecular que indiquen que ha ocurrido especiación en un complejo de especies, y de esta forma apoyar la existencia de más de una especie (Knowles y Carstens 2007). Asumiendo que no existe recombinación en el genoma y siguiendo una dirección del presente hacia

el pasado, el modelo de coalescencia revela como las variantes génicas (homólogas) se van uniendo (coalescen) hasta formar un mismo linaje, el linaje ancestral que les dio origen (Griffiths 1980; Hudson 1990). La coalescencia es un modelo que trata de la evolución neutral de un gen. El patrón evolutivo se representa mediante un árbol génico, también conocido como genealogía de un gen o genealogía de alelos (Kingman 1982). Desde un punto de vista poblacional, la coalescencia es un modelo de deriva genética que pone en retrospectiva la evolución de un locus génico de una población o especie (Tavaré 1984; Donnelly y Tavaré 1995).

Los análisis empleados en genética de poblaciones han servido para estudiar los límites taxonómicos en especies recientes, especies que han retenido parte de su polimorfismo ancestral. La genealogía de un gen en forma de una red de haplotipos puede ser usada para estudiar la interfase que hay entre la evolución intraespecífica y la interespecífica (Avice et al. 1987; Templeton 1998b; Templeton 2001; Degnan y Rosenberg 2009). Es en esta interfase o periodo de transición en donde ocurre el proceso de especiación (Harrison 1991). Para estudiar los límites interespecíficos mediante la genealogía de un gen es necesario separar el patrón histórico del patrón observado en la estructura poblacional (Templeton 1998a). La teoría de coalescencia permite separar el patrón histórico del patrón poblacional (Templeton 1998a; Kuhner 2009). Para realizar dicha separación se agrupan los haplotipos más emparentados y después se juntan con otros grupos, formando un patrón de anidamiento entre grupos de haplotipos (Templeton et al. 1987).

A diferencia de los métodos filogenéticos tradicionales que suponen que los haplotipos ancestrales no existen en las especies, los métodos que emplean redes de haplotipos, como el método de clados anidados, consideran que los haplotipos más abundantes en una población son los haplotipos ancestrales o más antiguos (Clement et al. 2000). Esto es así debido a que el análisis de clados anidados se apoya en la teoría de coalescencia, la cual predice que los haplotipos ancestrales son los más abundantes en una muestra poblacional (Watterson y Guess 1977; Donnelly y Tavaré 1986; Crandall y Templeton 1993).

Considerando la información de sitios de restricción y secuencias de ADN, la teoría de coalescencia ha sido usada para inferir la genealogía de genes entre poblaciones con poca divergencia (Templeton et al. 1992; Templeton y Sing 1993). Es mediante la genealogía de genes en forma de redes de haplotipos que se han logrado entender los límites taxonómicos en algunas especies de pino (Matos y Schaal 2000; Delgado et al. 2007; Flores-Rentería et al. 2013; Jardón-Barbolla et al. 2011; Potter et al. 2013).

Usar marcadores de plasto en vez de núcleo presenta algunas ventajas en la delimitación de especies de origen reciente. Los genes de plasto tienen un tamaño poblacional efectivo hasta cuatro

veces más pequeño que el de núcleo, debido a que es haploide y se hereda de forma uniparental (Birky et al. 1983). Es por el tamaño poblacional efectivo de los genes de plasto que su coalescencia es más rápida que la coalescencia experimentada por alelos de núcleo (Willyard et al. 2009).

Además de la información de la genealogía de haplotipos, el índice de fijación (F_{ST}) es usado para apoyar la delimitación de especies. Generalmente se puede reconocer que una especie dada está formada por más de una población, es decir, la especie muestra una distribución fragmentada. Cuando una especie está dividida en poblaciones se espera que las poblaciones se empiecen a diferenciar como consecuencia del incremento de la diversidad de haplotipos y el aumento en el número de sitios segregados en los genomas de diferentes demos (Slatkin 1987). Es por la divergencia⁶ entre las secuencias de especies hermanas que se pueden detectar diferencias estructurales entre sus poblaciones. No obstante, no siempre la diferenciación entre poblaciones pueden ser un indicio del inicio del proceso de especiación (Wright 1943). La diferenciación entre poblaciones puede ser medida usando el estadístico F_{ST} de Wright (1943, 1951).

El F_{ST} es un estimador de la covarianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Hay diferentes formas de estimar la F_{ST} , o sus equivalentes como la G_{ST} de Nei (1973) o la θ de Weir y Cockerham (1984). Excoffier et al. (1992) diseñaron un método llamado análisis de la varianza molecular (AMOVA por sus siglas en inglés) para estimar la diferenciación entre poblaciones. El grado de diferenciación se designa con el estadístico Φ_{ST} (equivalente al F_{ST}). El método de Excoffier et al. (1992) consiste en hacer un análisis de la varianza de las frecuencias génicas, como lo sugerido por Weir y Cockerham (1984). Para hacer dicho análisis de la varianza se sigue un diseño de anidamiento jerárquico que se define de manera preliminar por el investigador según la estructura poblacional observada. La significancia estadística de los componentes de la covarianza asociados con los diferentes niveles posibles de estructura genética (dentro de individuos, entre poblaciones, dentro de grupos de poblaciones, entre grupos de poblaciones) es probada usando un procedimiento no paramétrico de permutación (Excoffier et al. 1992).

Se evaluó la posibilidad de que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* sean especies de origen reciente que aún comparten parte de su polimorfismo ancestral. Como se indicó en el capítulo anterior, existen individuos con formas afines a *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, en este trabajo identificados como *P. aff. douglasiana* y *P. aff. maximinoi*. Tanto *P. aff. douglasiana* como *P. aff. maximinoi* podrían ser parte *P. douglasiana* y *P. maximinoi* o por lo menos estar muy emparentados con dichas

⁶ Dobzhansky et al. (1977) definen a la divergencia como la evolución del incremento de diferencias morfológicas. En este trabajo se entiende como divergencia a la diferenciación entre secuencias de ADN debido a la ocurrencia de mutaciones puntuales.

especies, aunque no es posible descartar que *P. aff. douglasiana* y *P. aff. maximinoi* sean parte de *P. pseudostrobis*. Entonces es necesario establecer cuál es la relación de *P. aff. douglasiana* y *P. aff. maximinoi* con *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. pseudostrobis*. Ya que posiblemente existe introgresión de ADNpl del grupo Montezumae, definido por Gernandt et al. (2009), hacia *P. maximinoi*, es deseable valorar qué tan común es este fenómeno, y evaluar si en realidad *P. maximinoi* tiene un parentesco más cercano con *P. pseudostrobis*. De acuerdo con la evidencia molecular, *P. yecorensis* está más emparentada con *P. douglasiana* y *P. maximinoi* que con otras especies de la subsección *Ponderosae*. Por lo tanto, es factible incluir a *P. yecorensis* en los análisis debido a que podría arrojar información complementaria en cuanto a la variación del ADNpl en *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobis*, *P. aff. douglasiana* y *P. aff. maximinoi*. Aunque es probable que *P. pseudostrobis* guarde un parentesco más lejano con *P. douglasiana* y *P. maximinoi* que con las especies del clado Montezumae (Delgado et al. 2007; Gernandt et al. 2009), aún existen dudas en cuanto a la relación de *P. maximinoi* con *P. pseudostrobis*. Por lo tanto se decidió evaluar los límites de especie entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en el contexto del complejo *Pseudostrobis* —grupo *Pseudostrobis* como lo definió Martínez (1948) y Stead y Styles (1984), incluyendo a *P. yecorensis* por su parentesco cercano con dichas especies.

Hipótesis [capítulo 3]

La variación en el ADN de plasto muestra relaciones genealógicas que apoyan la divergencia reciente (especiación) de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

Objetivo general [capítulo 3]

Estudiar los límites interespecíficos en *P. douglasiana* y *P. maximinoi* usando la variación molecular de tres fragmentos de plástido (ADNpl).

Objetivos específicos

1. Amplificar y secuenciar el fragmento *chlN-ycf1* y dos fragmentos del gen *ycf1* de plástido.
2. Determinar las relaciones genealógicas de los fragmentos secuenciados del ADN de plasto (*chlN-ycf1* y *ycf1*) para evaluar si las relaciones apoyan la divergencia evolutiva de las especies en el complejo *Pseudostrobis*.
3. Determinar si existen alelos representativos de las especies del complejo *Pseudostrobis*, poniendo énfasis en *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

4. Evaluar el grado de diferenciación en las especies del complejo *Pseudostrobus* mediante estimados del índice de fijación y un análisis molecular de la varianza (AMOVA).

Material y Métodos [Capítulo 3]

Obtención de material—Se recolectaron hojas de ejemplares mexicanos de *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis* (Tabla 3.1). Los ejemplares considerados en los análisis del ADNpl fueron identificados considerando los caracteres diagnósticos de cada especie, como se reporta en la literatura (Martínez 1948; Stead y Styles 1984; Farjon y Styles 1997) (ver capítulo dos). También se recolectó material de individuos que fueron identificados como *P. aff. douglasiana* y *P. aff. maximinoi* siguiendo su morfología. *Pinus aff. douglasiana* y *P. aff. maximinoi* carecen de intrusiones en contacto con la endodermis y presentan un cono ovulífero con pedúnculo persistente (ver párrafo de identificación de especies del capítulo dos). Se incluyeron secuencias de ejemplares de Honduras y Guatemala. Las secuencias de los ejemplares de Honduras y Guatemala se obtuvieron de material de herbario (MEXU).

Tabla 3.1. Lista de ejemplares de pino para los cuales se amplificó alguno de los tres fragmentos de ADN de plasto (A, B o C). † Ejemplares recolectados para el Inventario Nacional Forestal. La mayoría de las secuencias son de ejemplares recolectados en México. ‡ Municipio de Honduras. § Ejemplar recolectado en Estados Unidos. * Ejemplar recolectado en el departamento de Guatemala, Guatemala. Las siguientes son las claves de acceso de las secuencias obtenidas en la página del GenBank de Internet: 1) FJ580198, 2) JN854205 ,3) FJ580199, 4) FJ580200, 5) FJ580209, 6) FJ580210, 7) FJ580236, 8) FJ580234, 9) FJ580235, 10) FJ580238, 11) FJ580237, 12) FJ580240, 13) FJ580239, 14) FJ580242, 15) FJ580241, 16) KC157205 y 17) KC157128.

Colector y número de colecta	Taxón o afinidad	Localidad	Estado	Fragmento		
				A	B	C
Gernandt 1076 Calvillo sin no. † JCCG1	aff. <i>douglasiana</i>	Cerro Gallego	Chihuahua	–	–	+
López-Reyes 239	aff. <i>douglasiana</i>	El Baúl	Guerrero	–	–	+
López-Reyes 249	aff. <i>douglasiana</i>	Nevado de Colima	Jalisco	+	–	+
López-Reyes 153	aff. <i>douglasiana</i>	Nevado de Colima	Jalisco	–	–	+
López-Reyes 197	aff. <i>douglasiana</i>	Tancítaro	Michoacán	+	–	+
López-Reyes 199	aff. <i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	+	–	+
López-Reyes 199	aff. <i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	+	–	–
López-Reyes 191	aff. <i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	–	–	+
López-Reyes 196	aff. <i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	–	–	+
López-Reyes 198	aff. <i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	–	–	+
López-Reyes 226	aff. <i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	–	–	+
Gernandt 1047	aff. <i>douglasiana</i>	Yécora	Sonora	–	–	+
Gernandt 1056	aff. <i>douglasiana</i>	Yécora	Sonora	+	+	+
Gernandt 1061	aff. <i>douglasiana</i>	Yécora	Sonora	–	+	+
López-Reyes 132	aff. <i>maximinoi</i>	Motozintla	Chiapas	–	–	+

Tabla 3.1. (Continuación)

Colector y número de colecta	Taxón o afinidad	Localidad	Estado	Fragmento		
				A	B	C
Gernandt 1046	aff. <i>maximinoi</i>	Yécora San Juan	Sonora	-	+	+
Armas 8	aff. <i>maximinoi</i>	Sacatepéquez	Guatemala*	-	-	+
Gernandt 434 ⁽¹⁾	<i>douglasiana</i>	Sultepec	México	+	-	+
López-Reyes 141	<i>douglasiana</i>	Temascaltepec	México	+	-	+
López-Reyes 140	<i>douglasiana</i>	Temascaltepec	México	+	+	+
López-Reyes 142	<i>douglasiana</i>	Temascaltepec	México	-	+	+
López-Reyes 143	<i>douglasiana</i>	Temascaltepec	México	-	-	+
López-Reyes 146	<i>douglasiana</i>	Temascaltepec	México	-	-	+
López-Reyes 148	<i>douglasiana</i>	Temascaltepec	México	-	-	+
OSC213834 ⁽²⁾	<i>douglasiana</i>	Atenquique	Jalisco	+	-	+
López-Reyes 81	<i>douglasiana</i>	Juquila	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 1165	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	-	-	+
López-Reyes 13	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	+	-	+
López-Reyes 14	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	-	-	+
López-Reyes 16	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 17	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 19	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	+	+	+
López-Reyes 20	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 21	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 22	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	+	-	+
López-Reyes 23	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 24	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	+	+	+
López-Reyes 26	<i>douglasiana</i>	La Campana	Jalisco	+	+	+
López-Reyes 27	<i>douglasiana</i>	Las Cruces	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 28	<i>douglasiana</i>	Las Cruces	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 29	<i>douglasiana</i>	Las Cruces	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 30	<i>douglasiana</i>	Las Cruces	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 32	<i>douglasiana</i>	Las Cruces	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 183	<i>douglasiana</i>	Sierra de Quila	Jalisco	-	-	+
Gernandt 643 ⁽³⁾	<i>douglasiana</i>	Dos Aguas	Michoacán	+	-	+
Gernandt 798 ⁽⁴⁾	<i>douglasiana</i>	Uruapan	Michoacán	+	-	+
López-Reyes 158	<i>douglasiana</i>	Uruapan	Michoacán	-	+	+
López-Reyes 159	<i>douglasiana</i>	Uruapan	Michoacán	-	-	+
López-Reyes 161	<i>douglasiana</i>	Uruapan	Michoacán	+	-	+
López-Reyes 162	<i>douglasiana</i>	Uruapan	Michoacán	+	-	+
López-Reyes 82	<i>douglasiana</i>	Juquila	Oaxaca	+	+	+
López-Reyes 90	<i>douglasiana</i>	Juquila	Oaxaca	+	+	+
López-Reyes 91	<i>douglasiana</i>	Juquila	Oaxaca	+	+	+
López-Reyes 1172	<i>douglasiana</i>	La Campana	Oaxaca	-	-	+
López-Reyes 144	<i>douglasiana</i>	Temascaltepec	Oaxaca	+	-	-
Trejo 3059	<i>douglasiana</i>	Sta. Ma. Yavesía	Oaxaca	-	-	+
Ramos-Dorantes 28	<i>douglasiana</i>	-	Puebla	+	-	-
Ramos-Dorantes 30	<i>douglasiana</i>	-	Puebla	+	-	-

Tabla 3.1. (Continuación)

Colector y número de colecta	Taxón o afinidad	Localidad	Estado	Fragmento		
				A	B	C
Ramos-Dorantes 31	<i>douglasiana</i>	-	Puebla	+	-	-
López-Reyes 204	<i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	-	-	+
López-Reyes 205	<i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	-	-	+
López-Reyes 207	<i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	-	-	+
López-Reyes 211	<i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	-	-	+
López-Reyes 212	<i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	-	-	+
López-Reyes 213	<i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	-	-	+
López-Reyes 216	<i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	-	-	+
López-Reyes 219	<i>douglasiana</i>	Concordia	Sinaloa	-	-	+
López-Reyes 107	<i>maximinoi</i>	Montebello	Chiapas	-	-	+
López-Reyes 114	<i>maximinoi</i>	Montebello	Chiapas	+	-	+
López-Reyes 130	<i>maximinoi</i>	Motozintla	Chiapas	-	-	+
López-Reyes 135	<i>maximinoi</i>	Motozintla	Chiapas	-	-	+
Gernandt 742 ⁽⁵⁾	<i>maximinoi</i>	Atoyac de Álvarez	Guerrero	+	-	+
Calvillo 2 sin no.†	<i>maximinoi</i>	Predio Cementerio	Guerrero	-	-	+
Calvillo 5 sin no.†	<i>maximinoi</i>	Predio Cementerio	Guerrero	-	-	+
Calvillo 6 sin no.†	<i>maximinoi</i>	Predio Cementerio	Guerrero	-	-	+
Bautista-Martínez 3 sin no.†	<i>maximinoi</i>	Rancho Ocapa	Guerrero	-	-	+
López-Reyes 42	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 43	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	+
López-Reyes 44	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	+
López-Reyes 45	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	+	+	+
López-Reyes 46	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	+
López-Reyes 47	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	+
López-Reyes 48	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	+	+	-
López-Reyes 49	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	+	+	-
López-Reyes 50	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	+	+	-
López-Reyes 51	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 52	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	+
López-Reyes 53	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	+	-	-
López-Reyes 54	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 55	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 56	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 57	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	+	+	-
López-Reyes 58	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	+
López-Reyes 59	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 60	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 61	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 62	<i>maximinoi</i>	El Tuito	Jalisco	-	+	-
López-Reyes 114	<i>maximinoi</i>	Montebello	Chiapas	-	+	-
Pérez de la Rosa 1970 ⁽⁶⁾	<i>maximinoi</i>	Candelaria Loxicha	Oaxaca	+	-	-
López-Reyes 83	<i>maximinoi</i>	Juquila	Oaxaca	-	-	+

Tabla 3.1. (Continuación)

Colector y número de colecta	Taxón o afinidad	Localidad	Estado	Fragmento		
				A	B	C
López-Reyes 84	<i>maximinoi</i>	Juquila	Oaxaca	–	–	+
López-Reyes 85	<i>maximinoi</i>	Juquila	Oaxaca	+	–	–
López-Reyes 89	<i>maximinoi</i>	Juquila	Oaxaca	–	–	+
López-Reyes 69	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	+	–	–
López-Reyes 70	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	+	–	+
López-Reyes 73	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	+	–	+
López-Reyes 75	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	–	+	+
López-Reyes 77	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	+	–	+
López-Reyes 78	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	–	–	+
López-Reyes 79	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	+	–	–
López-Reyes 79	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	–	–	+
López-Reyes 80	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	+	–	–
López-Reyes 80	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	–	–	+
López-Reyes 98	<i>maximinoi</i>	San Mateo Piñas	Oaxaca	–	+	–
Gernandt 1055	<i>maximinoi</i>	Yécora	Sonora	–	+	+
Guerrald 734	<i>maximinoi</i>	Aldea Tola	San Marcos [‡]	–	–	+
López-Reyes 106	<i>pseudostrobis</i>	Teopisca	Chiapas	+	+	+
Gernandt 769 ⁽⁷⁾	<i>pseudostrobis</i>	Picacho	México	+	–	+
López-Reyes 150	<i>pseudostrobis</i>	Temascaltepec	México	–	–	+
Gernandt 446	<i>pseudostrobis</i>	Valle de Bravo	México	–	–	+
Gernandt 752	<i>pseudostrobis</i>	El Iris	Guerrero	–	+	–
Gernandt 411 ⁽⁸⁾	<i>pseudostrobis</i>	Apulco	Hidalgo	+	–	+
Gernandt 631 ⁽⁹⁾	<i>pseudostrobis</i>	Zimapán	Hidalgo	+	–	+
López-Reyes 35	<i>pseudostrobis</i>	El Cuale	Jalisco	–	+	–
López-Reyes 37	<i>pseudostrobis</i>	El Cuale	Jalisco	–	–	+
López-Reyes 38	<i>pseudostrobis</i>	El Cuale	Jalisco	+	–	+
López-Reyes 39	<i>pseudostrobis</i>	El Cuale	Jalisco	–	–	+
López-Reyes 40	<i>pseudostrobis</i>	El Cuale	Jalisco	–	–	+
Gernandt 815 ⁽¹⁰⁾	<i>pseudostrobis</i>	Angangueo	Michoacán	+	–	+
López-Reyes 165	<i>pseudostrobis</i>	Villa Madero	Michoacán	–	–	+
Gernandt 822 ⁽¹¹⁾	<i>pseudostrobis</i>	Coajomulco	Morelos	+	–	+
		Santa Catarina				
Gernandt 531 ⁽¹²⁾	<i>pseudostrobis</i>	Ixtepeji	Oaxaca	+	–	+
Reyes 64812	<i>pseudostrobis</i>	Tejocotes	Oaxaca	+	–	–
Reyes 6482C	<i>pseudostrobis</i>	Tejocotes	Oaxaca	–	–	+
Reyes 6482F	<i>pseudostrobis</i>	Tejocotes	Oaxaca	–	+	–
Trejo 3077	<i>pseudostrobis</i>	Sta. Ma. Yavesía	Oaxaca	+	+	+
Gernandt 7499 ⁽¹³⁾	<i>pseudostrobis</i>	Soltepec	Puebla	+	–	–
Gernandt 543 ⁽¹⁴⁾	<i>pseudostrobis</i>	Miquihuana	Tamaulipas	+	–	–
Gernandt 1181	<i>pseudostrobis</i>	Cinco Palos	Veracruz	–	–	+
Gernandt 1178	<i>pseudostrobis</i>	Las Vigas	Veracruz	–	–	+
Gernandt 1185	<i>pseudostrobis</i>	Las Vigas	Veracruz	+	–	+
Gernandt 1186	<i>pseudostrobis</i>	Las Vigas	Veracruz	–	–	+
Gernandt 1178	<i>pseudostrobis</i>	Las Vigas	Veracruz	–	–	+

Tabla 3.1. (Continuación)

Colector y número de colecta	Taxón o afinidad	Localidad	Estado	Fragmento		
				A	B	C
Gernandt 1179	<i>pseudostrobis</i>	Las Vigas	Veracruz	+	+	+
Gernandt 1180	<i>pseudostrobis</i>	Xalapa	Veracruz	-	-	+
Gernandt 681 ⁽¹⁵⁾	<i>pseudostrobis</i>	Inst. de Gen. For.	California*	+	-	+
Ferguson 2422	<i>yecorensis</i>	Yécora	Sonora	-	-	+
Gernandt 1052 ⁽¹⁶⁾	<i>yecorensis</i>	Yécora	Sonora	+	+	+
Gernandt 1054 ⁽¹⁷⁾	<i>yecorensis</i>	Yécora	Sonora	+	+	+
Gernandt 1063	<i>yecorensis</i>	Yécora	Sonora	-	-	+

Obtención de ADN total—Se aisló ADN total siguiendo el método de CTAB (Doyle y Doyle 1987). Para el aislamiento del ADN se usaron hojas frescas y ocasionalmente hojas secas. Para el material de herbario muy viejo no fue posible obtener ADN útil.

Amplificación—Mediante la técnica de PCR se amplificaron tres fragmentos de ADN de plástido. Estos fragmentos corresponden a tres de los cinco fragmentos reportados por Gernandt et al. (2009). El primer fragmento (fragmento A) corresponden a la región espaciadora *chlN-ycfI*. En una revisión previa de secuencias en el GenBank se encontró que la región espaciadora *chlN-ycfI* tiene un sitio variable que permite distinguir a *P. douglasiana* de *P. maximinoi*. Los fragmentos restantes (B y C) corresponden a dos fragmentos del gen *ycfI* (Fig. 3.2). Los tres fragmentos fueron amplificados usando una mezcla de reactivos bajo las siguientes concentraciones (Gernandt et al. 2009): buffer (1x), MgCl₂ (1.25 mM), primer 0.4 μM, ADN (~50 nM), 0.2 μM de cada dNTP y *Taq* polimerasa (0.6-1 unidades). Las condiciones de PCR se realizaron en tres etapas. La primera etapa correspondió a la desnaturalización del ADN a una temperatura de 94° C por 3 min. La segunda etapa consistió de 30 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió de un periodo de desnaturalización (94° C x 1 min), seguido de uno de alineación (50° C x 50 s) y otro de extensión (72° C x 80 s). La tercera y última etapa correspondió a una extensión de los productos de amplificación a 72 °C por 5 min.

Gen *ycf1* de plasto
Cadena patrón de *Pinus thunbergii*

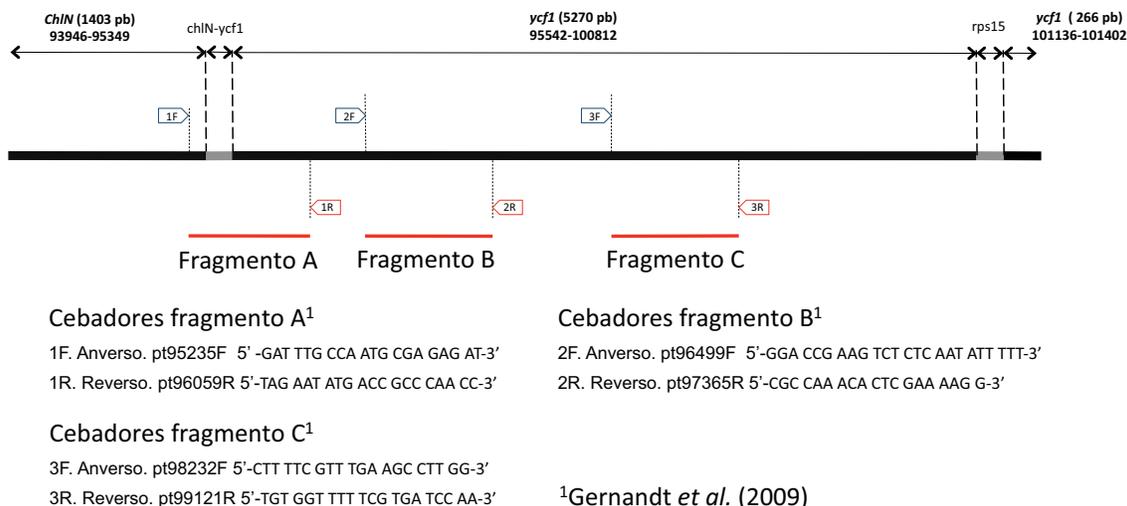


Figura 3.2. Esquema que muestra la posición relativa de los fragmentos amplificados A, B y C del gen *ycf1*.

Secuenciación y alineamiento—Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación mediante el método de Sanger al laboratorio comercial (High-Throughput Genomics Unit) de la Universidad de Washington (Seattle, E. U. A). Para ensamblar las secuencias en sentido anverso y reverso (antiparalelas) y obtener secuencias de consenso se utilizó el programa Sequencher v.4.8 (Gene Codes, Inc., Ann Arbor, Michigan). Para alinear las secuencias de consenso se usó Clustal W (Thompson et al. 1994) del programa BioEdit v.7.0.5 (Hall 1999). En las regiones codificadoras se consideró el marco de lectura para afinar el alineamiento. En el alineamiento del fragmento A se incluyeron 58 secuencias, de las cuales 15 de obtuvieron del GenBank (Tabla 3.1). El resto de las secuencias pertenecen a *P. aff. douglasiana* (n = 5), *P. douglasiana* (n = 16), *P. maximinoi* (n = 14), *P. pseudostrobus* (n = 6) y *P. yecorensis* (n = 2). La longitud de las secuencias obtenidas en este trabajo fue de ~800 pb. Por la variación nula en la segunda mitad del fragmento y para incluir las secuencias obtenidas del Genbank, que tienen un menor tamaño, sólo se consideraron las primeras 401 pb. En el alineamiento del fragmento B se incluyeron 58 secuencias, de las cuales dos pertenecen a *P. yecorensis* (obtenidas del GenBank) y el resto pertenecen a *P. aff. douglasiana* (n = 3), *P. aff. maximinoi* (n = 1), *P. douglasiana* (n = 21), *P. maximinoi* (n = 26), y *P. pseudostrobus* (n = 5). La longitud del alineamiento del fragmento B es de ~749 pb. En el alineamiento del fragmento C se incluyeron 107 secuencias de las cuales 14 fueron obtenidas del GenBank (tres de *P.*

douglasiana, una de *P. maximinoi*, siete de *P. pseudostrobus* y cuatro de *P. yecorensis*), el resto de las secuencias se obtuvieron de *P. aff. douglasiana* (n = 15), *P. aff. maximinoi* (n = 2), *P. douglasiana* (n = 33), *P. maximinoi* (n = 26), *P. pseudostrobus* (n = 16) y *P. yecorensis* (n = 1). La longitud del alineamiento del fragmento C es de ~800 pb. Los alineamientos se exportaron con formato NEXUS (Maddison et al. 1997).

Análisis moleculares—Se analizaron por separado cada una de las regiones. Se consideraron secuencias de un total de 151 ejemplares. No fue posible obtener secuencias de los tres fragmentos para cada uno de los 151 ejemplares. Para el fragmento A se consideraron 58 secuencias, para el fragmento B se incluyeron 58 secuencias y para el fragmento C se incluyeron 107 secuencias (Fig. 3.3). Se usó el programa TCS v1.21 (Clement et al. 2000) para estimar la genealogía de los haplotipos bajo el criterio de parsimonia estadística (Templeton et al. 1992). En cada uno de los análisis se consideró un límite de probabilidad de 0.95. El alineamiento de la región espaciadora *chlN-ycf1* tiene una inserción-delección (indel) de tres pares de bases. Para dicha región, *chlN-ycf1*, se codificó el indel encontrado con el método de codificación sencilla (Simmons y Ochoterena 2000). Para realizar la codificación sencilla se utilizó el programa SeqState (Müller 2005). Como resultado del método de codificación sencilla de indels se obtuvo un nuevo carácter codificado con datos de presencia (1) y ausencia (0). El nuevo carácter fue incluido en la matriz de secuencias sustituyendo los 0 por letras “a” y los 1 por “g” debido a que TCS v.1.21 no puede analizar datos de presencia y ausencia. En los análisis se excluyó el indel, ya que, como se mencionó, los indel fueron incluidos mediante el método de codificación sencilla. Debido a que el número de ejemplares para los cuales se tienen secuencias de los tres fragmentos es reducido (14 ejemplares), se decidió realizar una matriz concatenando los fragmentos A y C. Dichas matriz de datos concatenados incluye las secuencias de 40 individuos. Para el análisis de la matriz concatenada se siguió el mismo método de codificación (Simmons y Ochoterena 2000) que se usó cuando se analizó por separado el fragmento A.

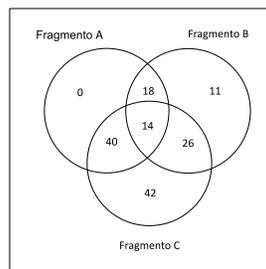


Figura 3.3. Diagrama que muestra el número de ejemplares secuenciados para cada fragmento de ADN de plasto. Las intersecciones entre los círculos indican el número de individuos para los cuales se secuenciaron más de uno de los fragmentos.

El número de haplotipos en la matriz es congruente con el número de haplotipos encontrados al construir la genealogía de los genes. En los análisis de estructura génica, se consideró el número de haplotipos encontrados al estimar la genealogía de genes. Con el programa Arlequin v.1.3.1.2 (Excoffier y Lischer 2010) se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés). Para el análisis se empleó un archivo con los datos de las frecuencias de haplotipos y las respectivas secuencias de los haplotipos, según los resultados obtenidos en la construcción de la red de haplotipos usando el fragmento C. Debido a que *P. yecorensis* solo está representada por cuatro secuencias, dicha especie no fue incluida en el análisis. Los individuos de *P. aff. douglasiana* (n = 15) se incluyeron como parte de la variación de *P. douglasiana*, en total se incluyeron 51 individuos. Los individuos clasificados como *P. aff. maximinoi* (n = 2) se incluyeron como parte de la variación de *P. maximinoi*, por lo que en total se incluyeron 29 individuos de *P. maximinoi*. Finalmente se incluyeron 23 individuos de *P. pseudostrobus*. En total se incluyeron 103 secuencias (las mismas que se consideraron para construir la red de haplotipos con el fragmento C, pero sin incluir las secuencias de *P. yecorensis*). En la AMOVA se consideró a cada especie como una población distinta dentro de un grupo. Para estimar las distancias se eligió la opción de diferencias entre pares. Se hicieron 1000 permutaciones para obtener una buena significancia estadística de la F_{ST} . También, se estimó el índice de fijación entre pares de poblaciones usando la opción de diferencias entre pares. Para este análisis se realizaron más de 1000 permutaciones con un nivel de confianza de $p < 0.05$.

Se realizó un AMOVA usando la matriz de datos concatenados, fragmentos A y C. Para el análisis se consideraron los datos pertenecientes a 40 individuos (los mismos que se consideraron para construir la red de haplotipos con la matriz de fragmentos concatenados). *Pinus yecorensis* no fue incluida en el análisis debido a que solo se obtuvieron dos secuencias concatenadas para dicha especie. Los individuos de *P. aff. douglasiana* (n = 3) se incluyeron como parte de la variación de *P. douglasiana*. En total se incluyeron 22 individuos de *P. douglasiana*, 6 individuos de *P. maximinoi* y 12 de *P. pseudostrobus*. En la AMOVA se consideró a cada especie como una población distinta dentro de un grupo. Para estimar las distancias se usó el algoritmo de diferencia entre pares. Se hicieron 1000 permutaciones para obtener una buena estimación de la significancia estadística de la F_{ST} . También se estimó el índice de fijación entre pares de poblaciones usando el algoritmo de diferencias entre pares. Para este análisis se realizaron más de 1000 permutaciones para tener una buena estimación del nivel de confianza estadística ($p < 0.05$).

Resultados [capítulo 3]

Al construir la red de haplotipos, se produjeron seis haplotipos para el fragmento A (Tabla. 3.2). El fragmento A es el segundo más variable. Se encontraron dos haplotipos en *P. pseudostrobis*. El haplotipo II es el más común en *P. pseudostrobis*. Este fragmento no tiene variación útil para distinguir a *P. yecorensis* de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* (Fig. 3.4). Muchas de las secuencias correspondientes al haplotipo I fueron generadas en este trabajo y son idénticas a las ya reportadas por Gernandt et al. (2009). Además de las secuencias idénticas a las de Gernandt et al. (2009), se encontraron otras variantes del fragmento A, pero como se esperaba guardan una notable relación con las secuencias encontradas por los citados autores.

Tabla 3.2. Número de haplotipos correspondientes al fragmento A.

Taxón	h1	h2	h3	h4	h5	h6
<i>P. aff. douglasiana</i>	5	0	0	0	0	0
<i>P. aff. maximinoi</i>	0	0	0	0	0	0
<i>P. douglasiana</i>	11	5	1	2	1	1
<i>P. maximinoi</i>	7	1	8	0	0	0
<i>P. pseudostrobis</i>	0	14	0	0	1	0
<i>P. yecorensis</i>	2	0	0	0	0 <td 0	
Total	25	20	9	2	1	1

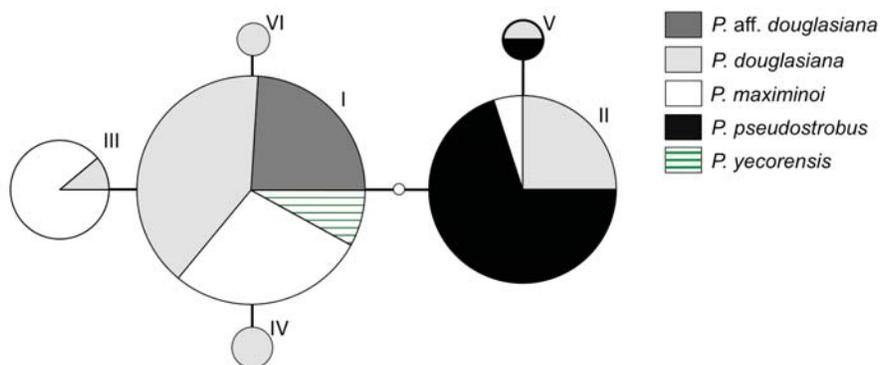


Figura 3.4. Red de haplotipos en donde se muestra la genealogía del fragmento A. El círculo blanco más pequeño representa a un posible haplotipo.

Con respecto al fragmento B se encontraron tres haplotipos (Fig. 3.5). De los tres fragmentos considerados, el fragmento B en el que mostró menos variación. El haplotipo más abundante del fragmento B, haplotipo I, representa al 76% de los individuos. El segundo haplotipo más abundante, haplotipo II, representa al 21% de los individuos. Los dos individuos de *P. yecorensis* incluidos en el análisis de este fragmento tienen un haplotipo exclusivo.

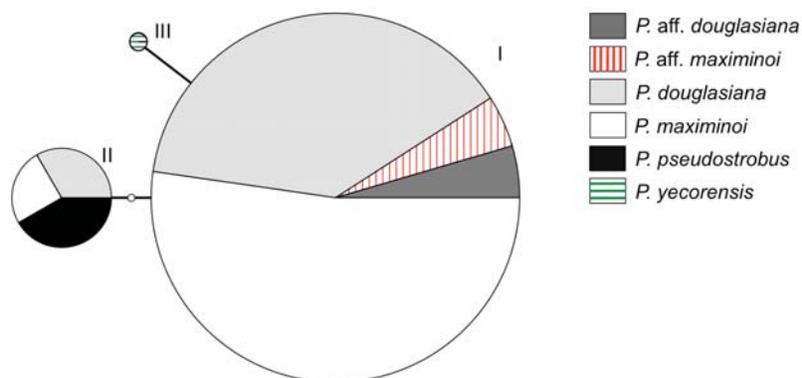


Figura 3.5. Red de haplotipos en donde se muestra la genealogía del fragmento B. El círculo blanco más pequeño representa a un haplotipo faltante.

La elaboración de la red de haplotipos del fragmento C produjo ocho haplotipos (Tabla 3.3). El haplotipo más abundante, el haplotipo I, está presente en el 62.6% del total de individuos considerados. Ningún individuo de *P. pseudostrobus* presentó el haplotipo I. El segundo haplotipo más abundante, haplotipo II, representa al 21.49% del total de individuos considerados. La mayoría de los ejemplares de *P. pseudostrobus* presentaron el haplotipo II. El tercer haplotipo más abundante, haplotipo III, representa al 5% del total de individuos considerados. Los individuos de *P. yecorensis* presentaron el mismo haplotipo, el cual es exclusivo de esta especie. El haplotipo de *P. yecorensis* está emparentado directamente con el haplotipo I, el cual está presente en *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. aff. douglasiana* (Fig. 3.6). El resto de los haplotipos representan es su conjunto menos del 7% del total de los individuos.

Tabla 3.3. Número de haplotipos correspondientes al fragmento C.

Taxa	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8
<i>P. aff. douglasiana</i>	15	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aff. maximinoi</i>	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>P. douglasiana</i>	31	5	0	0	0	0	0	0
<i>P. maximinio</i>	21	0	4	0	0	1	1	0
<i>P. pseudostrobus</i>	0	17	1	4	0	0	0	1
<i>P. yecorensis</i>	0	0	0	0	4	0	0	0
P. Total	67	23	6	4	4	1	1	1

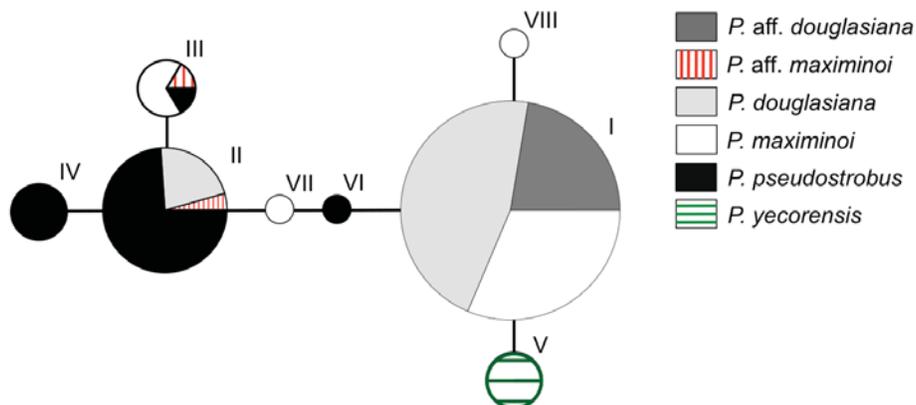


Figura 3.6. Red de haplotipos en donde se muestra la genealogía del fragmento C.

Los ejemplares de *P. pseudostrobus* que tienen el haplotipo II se distribuyen en varios estados de la República Mexicana — Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Veracruz. Los ejemplares de *P. douglasiana* que presentaron el haplotipo II se distribuyen en Oaxaca. El único individuo de *P. maximinoi* con el haplotipo II se distribuye en Guatemala. Los ejemplares de *P. maximinoi* con el haplotipo III se distribuyen en Chiapas (n = 3) y Honduras (n = 1).

El análisis de la matriz con datos concatenados (fragmentos A y C) produjo una red genealógica con 11 haplotipos (Tabla 3.4). El haplotipo más abundante, haplotipo I, representa el 37.5% de los individuos considerados. El segundo haplotipo más abundante de la red se encontró en el 30% de los individuos. Los dos únicos ejemplares de *P. yecorensis* incluidos en el análisis del fragmento concatenado mostraron un haplotipo único. Los haplotipos restantes están representados por menos de tres ejemplares.

Tabla 3.4. Número de haplotipos correspondientes a los fragmentos concatenados.

Taxon	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	h9	h10	h11
<i>P. aff. douglasiana</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. douglasiana</i>	10	3	0	0	0	1	1	2	0	0	0
<i>P. maximinoi</i>	2	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0
<i>P. pseudostrobus</i>	0	13	0	1	0	0	0	0	0	1	1
<i>P. yecorensis</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	15	16	2	1	3	1	1	2	1	1	1

El haplotipo de *P. yecorensis* está emparentado directamente con el haplotipo I, el cual parece ser típico de *P. aff. douglasiana*, *P. douglasiana* y *P. maximinoi* (Fig. 3.7). Los haplotipos I, V, VI, VII y VIII están emparentados directamente y fueron encontrados en *P. aff. douglasiana*, *P.*

douglasiana y *P. maximinoi*, lo cual muestra el parentesco cercano entre estas especies. Los haplotipos II, IV, X y XI fueron encontrados en ejemplares de *P. pseudostrobis* y mostraron un parentesco cercano. El haplotipo II fue el más común en *P. pseudostrobis*. En términos generales, la variación del fragmento concatenado es coherente con la variación de los fragmentos A y C analizados por separado. Se observa una mayor diferenciación de *P. pseudostrobis* con respecto de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* que la diferenciación encontrada entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

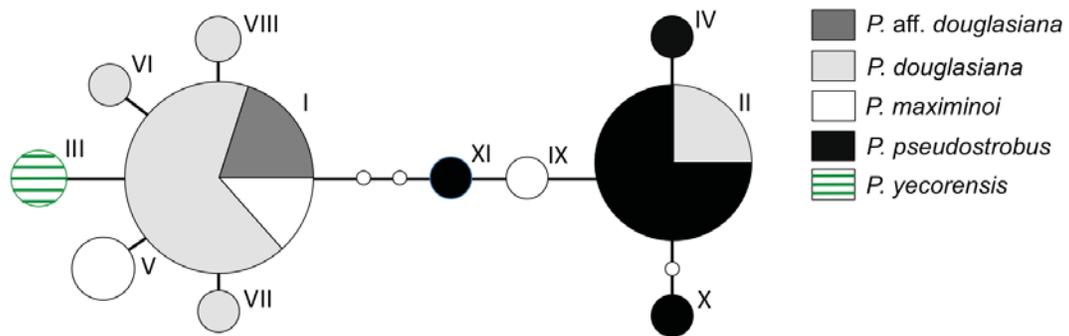


Figura 3.7. Red de haplotipos en donde se muestra la genealogía de los fragmentos concatenados A y C. Los círculos blancos más pequeños representan haplotipos faltantes.

Los resultados del análisis de fragmentos concatenados permiten señalar que, de manera general, el haplotipo I, común en *P. aff. douglasiana*, *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, se distribuye principalmente en el oeste y noroeste de México. El haplotipo II, que es más común en *P. pseudostrobis*, se distribuye en la zona sur y este de México (Fig. 3.8).

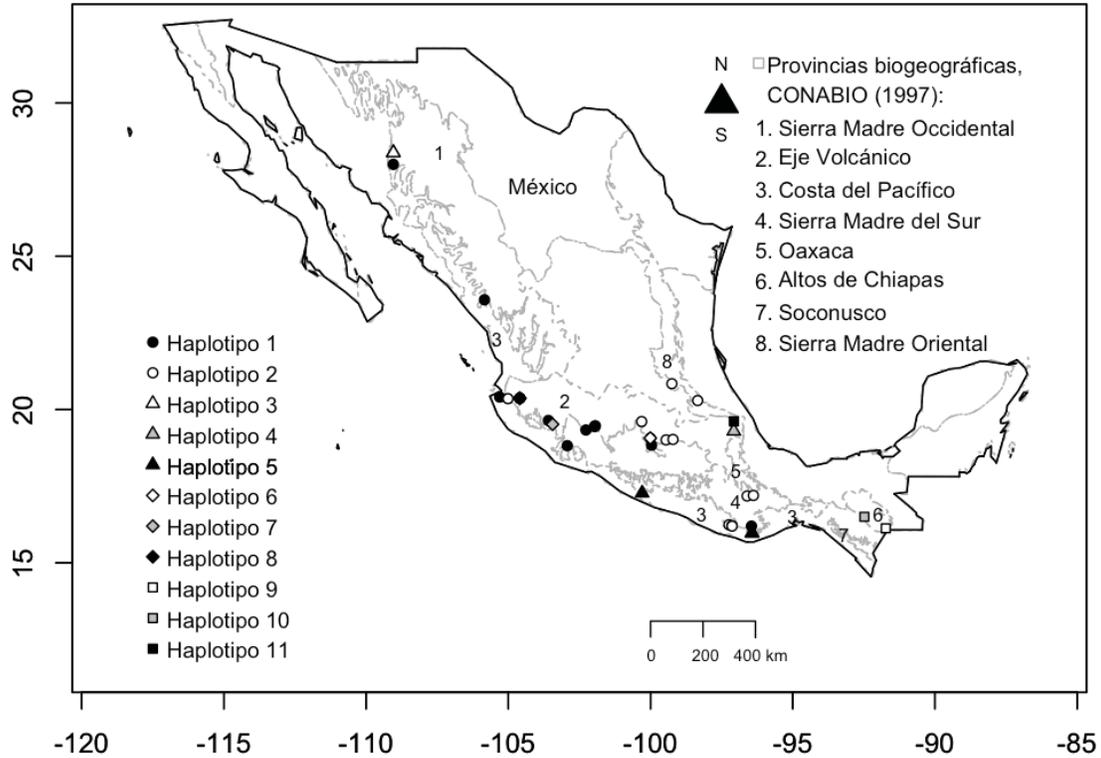


Figura 3.8. Mapa de México en donde se muestra la distribución de los haplotipos del fragmento concatenado (fragmentos A y C) en México.

Los resultados del AMOVA para el fragmento C indican que existe diferenciación génica entre las especies. Se obtuvo una F_{ST} de 0.59346 ($p < 0.05$). El análisis F_{ST} comparando entre pares de especies indica que *P. pseudostrobus* muestra una mayor diferenciación. La F_{ST} entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* es de 0.06464 ($p > 0.05$), lo que indica que existe poca diferenciación entre estas especies. Por el contrario, la F_{ST} entre *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana* fue de 0.80794 lo que indica que existe una diferenciación significativa ($p < 0.05$) entre estas especies. De igual forma, la comparación entre *P. pseudostrobus* y *P. maximinoi* produjo un F_{ST} de 0.60823, lo que indica que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las mismas.

Los resultados del AMOVA usando la matriz de datos concatenados (fragmento A y C) indica que existe diferenciación génica entre las especies. Se obtuvo una F_{ST} de 0.62277 ($p < 0.05$). El análisis de F_{ST} comparando entre pares de especies indica que *P. pseudostrobus* es la que muestra una mayor diferenciación. La F_{ST} entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* es 0.06129 ($p > 0.05$), lo que indica que existe poca diferenciación entre estas especies. Por el contrario, la F_{ST} entre *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana* fue de 0.69847, lo que indica que existe una diferenciación significativa ($p < 0.05$) entre estas especies. De igual forma la comparación entre *P. pseudostrobus*

y *P. maximinoi* produjo un F_{ST} de 0.75410, lo que indica que existe una diferencia significativa entre estas especies.

Discusión [capítulo 3]

En pinos es poco común hacer estudios de la variación intraespecífica con fragmentos codificadores de plástido, debido a que generalmente el plastoma es muy conservado (Wicke et al. 2011). Sin embargo, el trabajo de Liston et al. (2007) muestra que es posible estudiar la variación genética en especies de pino mediante fragmentos codificadores. Liston et al. (2007) usaron un fragmento del gen *matK* y un intrón del gen *trnG*, ambos de plasto, para estudiar la variación genética en *Pinus lambertiana* Douglas. La divergencia entre dos haplotipos (diferencias fijas en 10 sitios) hizo posible determinar que existen poblaciones de *P. lambertiana* que han sufrido introgresión génica de *P. albicaulis* Engelm. (Liston et al. 2007). El gen *ycfI* y la región espaciadora *chlN-ycfI*, considerados en este trabajo, han mostrado ser muy variables y útiles en la formación de hipótesis filogenéticas (Gernandt et al. 2009; Hernández-León et al. 2013). La variación en los fragmentos A, B y C fue útil para distinguir diferentes haplotipos. Con excepción de *P. yecorensis*, el muestreo razonable de individuos del complejo *Pseudostrobus* permitió ubicar los haplotipos más frecuentes y su relación genealógica. Los haplotipos encontrados fueron útiles para establecer una hipótesis de parentesco entre las especies del complejo *Pseudostrobus*. La variación encontrada en las secuencias indican que *P. pseudostrobus* es la especie más diferenciada en el complejo *Pseudostrobus*. Sin embargo, los límites taxonómicos entre las especies del complejo *Pseudostrobus* no son totalmente claros.

El análisis de las secuencias analizadas muestra que *P. pseudostrobus* está menos emparentada con *P. douglasiana* y *P. maximinoi* de lo que lo están estas dos últimas especies entre sí. En el trabajo de Gernandt et al. (2009), se reportan haplotipos de *P. pseudostrobus* que forman un grupo monofilético, clado Montezumae, junto con haplotipos de especies como *P. montezumae* y *P. hartwegii* de la subsección *Ponderosae*. Por el contrario, *P. douglasiana* y *P. maximinoi* forman un clado monofilético, clado Devoniana, junto con haplotipos de especies como *P. devoniana* (Gernandt et al. 2009). El estudio de Delgado et al. (2007), basado en ADNpl, apoya el parentesco cercano de *P. pseudostrobus* con *P. montezumae* y *P. hartwegii*. Posiblemente *P. pseudostrobus* comparte haplotipos con *P. douglasiana* y *P. maximinoi* debido al proceso de introgresión. La hipótesis de introgresión de material génico (ADNpl) de *P. pseudostrobus* hacia *P. maximinoi* parece probable debido a que pocos individuos de *P. douglasiana* o *P. maximinoi* comparten haplotipos con *P. pseudostrobus*. Muchas de las secuencias de *P. pseudostrobus*, generadas para

este trabajo, fueron iguales a las secuencias reportadas por Gernandt et al. (2009) para mostrar que *P. pseudostrobus* no forma un grupo monofilético con *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. yecorensis*.

No es difícil suponer que ocurre hibridación natural entre *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana* o *P. maximinoi*. En congruencia con lo reportado por otros autores (Farjon et al. 1997), se encontró que *P. pseudostrobus* puede estar en simpatria con *P. douglasiana* o *P. maximinoi*. Por ejemplo, en el sur de Oaxaca se identificaron poblaciones cercanas de *P. pseudostrobus* y *P. maximinoi*. En Oaxaca se recolectaron individuos de *P. douglasiana* que tienen haplotipos típicos de *P. pseudostrobus*. Oaxaca es un estado que presenta una gran complejidad morfoestructural y biótica (Ferrusquía-Villafranca 1993; Morrone 2005), la cual posiblemente ha promovido eventos de hibridación entre especies (Mastretta-Yanes et al. 2015). Posiblemente también ocurra introgresión de *P. pseudostrobus* a *P. aff. maximinoi*, ya que se encontraron individuos de *P. aff. maximinoi* con haplotipos muy emparentados con los haplotipos predominantes en *P. pseudostrobus*.

A pesar de que posiblemente *P. pseudostrobus* se entrecruza con *P. douglasiana* o *P. maximinoi*, es posible suponer que, con base en los resultados del análisis de estructura poblacional (AMOVA y F_{ST}), *P. pseudostrobus* presenta flujo génico reducido respecto de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Lo anterior sería dudoso si se hubiera encontrado que muchos individuos de *P. maximinoi* o *P. douglasiana* comparten haplotipos con *P. pseudostrobus*. Los resultados indican que la estructura génica de *P. pseudostrobus* es diferente de la estructura inferida de las muestras de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

La evidencia fósil indica que posiblemente *P. pseudostrobus* surgió y evolucionó de manera independiente de *P. douglasiana*, *P. maximinoi*. Posiblemente los ancestros de *P. pseudostrobus*, *P. montezumae* Lamb. y *P. hartwegii* Lindl. llegaron a México por su lado este, mientras que los ancestros de especies como *P. devoniana* Lindl., *P. douglasiana* y *P. maximinoi* lo hicieron por el Oeste (Axelrod 1986). Se ha postulado que el mar del Cretácico dividió a los pinos de América del Norte en poblaciones orientales y occidentales, originando la divergencia de las poblaciones orientales y occidentales de pino en ese tiempo. La separación de las poblaciones de pinos en el oeste con respecto de las del este pudo ser una de las causas principales de la diversificación de la subsección *Ponderosa* en América del Norte. Las poblaciones ancestrales de occidente emigraron al sur a principios del Pleistoceno a través de la Sierra Madre Occidental en el oeste y la Sierra Madre Oriental en el este (Perry et al. 1998). Posiblemente la divergencia inicial de la subsección *Ponderosae* causó que posteriormente surgiera el grupo ancestral de *P. pseudostrobus* en el este y el de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en el oeste.

Las secuencias de ADNpl indican que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son especies hermanas que comparten mucha de su variación molecular. La divergencia entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, indicada por las diferencias de bases en sus secuencias de ADNpl o por los haplotipos compartidos, es menor que la divergencia existente entre otras especies de la subsección *Ponderosae* (Gernandt et al. 2009; Hernández-León et al. 2013). Gran parte de las secuencias de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* generadas en este trabajo son idénticas a las ya reportadas por Gernandt et al. (2009) para las mismas especies. Con excepción del haplotipo de *P. maximinoi* en el clado Montezumae, se puede decir que las secuencias de plástido de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* mostraron monofilia recíproca en el trabajo de Gernandt et al. (2009). Se esperaba que incluyendo un mayor número de ejemplares se mantuviera el patrón de diferenciación entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en congruencia con el patrón encontrado por Gernandt et al. (2009), pero se encontró que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* comparten haplotipos. Muchos de los individuos de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* presentaron el mismo haplotipo (ADNpl).

Se espera que entre especies hermanas de origen reciente y con sorteo incompleto de linajes génicos existan diferencias en la frecuencia de sus haplotipos compartidos debido a un flujo génico reducido, deriva génica o selección disruptiva actuando sobre dichas especies (Mallet 2007a). Se espera entonces que en una especie predomine uno o varios haplotipos con relación a su especie hermana (Matos y Schaal 2000). El hecho de que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* compartan haplotipos indica que ambas especies han retenido gran parte de su polimorfismo ancestral y que posiblemente se formaron recientemente. Esto último es congruente con el resultado obtenido en el análisis de estructura poblacional y la construcción de redes de haplotipos. Como *P. maximinoi* y *P. douglasiana* son especies que se han adaptado a climas poco templados, en áreas debajo de los 2000 m, es posible que el efecto de isla altitudinal (sky-islands; Mastretta-Yanes et al. 2015) haya tenido un menor efecto en la divergencia de una especie respecto de la otra.

Se señaló en el capítulo 2 de esta tesis que la evidencia molecular podría ayudar a discernir la identidad de *P. aff. douglasiana* y *P. aff. maximinoi*. Con respecto *P. aff. douglasiana* la variación molecular indica que dicho taxón podría ser parte de *P. douglasiana*. Si se considera a *P. aff. douglasiana* como parte de la variación de *P. douglasiana*, entonces los haplotipos más comunes, por ejemplo el haplotipo I del fragmento A, serían más típicos de *P. douglasiana* que de *P. maximinoi*. En cuanto a *P. aff. maximinoi*, ejemplares sin intrusiones (Stead y Styles 1984), la evidencia apoya la hipótesis de que este taxón es parte de *P. maximinoi*. La posible introgresión de material génico (ADNpl) de *P. pseudostrobis* hacia *P. maximinoi* es apoyada por la presencia de haplotipos típicos de *P. pseudostrobis* en *P. aff. maximinoi*.

Un caso especial es *P. yecorensis*, especie aceptada por algunos expertos (Ferguson et al. 2001; Gernandt et al. 2009). Los haplotipos exclusivos encontrados en esta especie y el tipo de clima en el cual prospera, C(w1)x' y C(w2)x' (distintos de los climas preferidos por *P. douglasiana* y *P. maximinoi*), hace evidente su divergencia con respecto de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Es posible que *P. yecorensis* sea una especie de origen reciente. *Pinus yecorensis* y *P. aff. douglasiana* son morfológicamente similares. La similitud entre *P. yecorensis* y *P. aff. douglasiana* impiden hacer una clara distinción entre *P. yecorensis* y *P. douglasiana*. En este trabajo se revisaron pocos individuos de *P. yecorensis*, por lo que es necesario hacer un muestreo mayor de las poblaciones de esta especie y los taxa emparentados con ella.

El grupo ancestral de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* seguramente emigró desde el Oeste de los Estados Unidos a México, a través de la Sierra Madre Occidental (Axelrod 1986). Si consideramos el haplotipo más abundante como el haplotipo más ancestral (Watterson y Guess 1977; Clement et al. 2000), entonces los resultados de este trabajo apoyan lo señalado por Axelrod (1986). Los haplotipos ancestrales, encontrados tanto en *P. douglasiana* como en *P. maximinoi*, están presentes predominantemente en el noroeste, oeste y centro de México. Aquí sería conveniente señalar que los individuos de *P. maximinoi* recolectados en el Tuito, Jalisco (en el extremo occidental del Eje Volcánico) poseen dichos haplotipos ancestrales. Además, los haplotipos que posiblemente derivaron del haplotipo ancestral se distribuyen desde el centro hacia sur de México. Por ejemplo, en Oaxaca y Guerrero, el haplotipo V del fragmento concatenado se presenta de forma exclusiva en *P. maximinoi*. Por el momento, es necesario hacer un muestreo mucho más intenso de las poblaciones de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* para poder hacer conclusiones contundentes en lo referente a su estructura poblacional y su historia evolutiva. Quizá el uso de fragmentos con sitios más variables, como el ADN de mitocondria, podrían ayudar a entender mejor los límites taxonómicos entre estas especies.

CAPÍTULO 4

Estudio de la variación molecular de un fragmento de ADN de mitocondria (ADNmt)

Introducción

El uso de ADNmt ha revolucionado los estudios de variación genómica y de flujo génico en poblaciones naturales de plantas (Birky et al. 1989; Powell et al. 1996). El ADN de mitocondria se hereda en *Pinus* por vía materna y se dispersa por medio de la semilla (Neale y Sederoff 1989; Wu et al. 1998). El ADN de plasto se hereda por vía paterna y se dispersa por medio del polen y semilla (Wagner et al. 1987). Debido a la forma de herencia y dispersión de la mitocondria, la información contenida en el ADN de dicho orgánulo tiene patrones que pueden ser contrastados con los patrones mostrados por el ADN de plasto (Petit et al. 2005). El plasto y la mitocondria representan loci que pueden revelar historias similares en su evolución (Hao et al. 2015). La similitud en patrones ha sido útil en estudios filogenéticos (Wang y Wang 2014). En pinos y otras coníferas, la distribución y frecuencia de los haplotipos de ADN mitocondrial puede revelar eventos de diferenciación y dispersión mucho tiempo después de que el flujo génico ha borrado las señales de dichos eventos en el ADN de plasto y núcleo (Sinclair et al. 1999; Potter et al. 2013). Dichos eventos de diferenciación y dispersión de las poblaciones pudieran estar asociados con eventos de especiación y por lo tanto pueden ayudar a entender los límites taxonómicos entre especies.

La forma de herencia, las tasas y patrones de recombinación, la tasa de sustitución de nucleótidos y los cambios estructurales en el ADN son elementos útiles para caracterizar la evolución del genoma a nivel de especie (Wang y Wang 2014; Hao et al. 2015). El genoma mitocondrial es haploide, no está sujeto a recombinación, puede ser considerado como un solo locus, se hereda por vía materna y se dispersa por medio de la semilla (Hipkins et al. 1994; Powell et al. 1996). En plantas el genoma mitocondrial (200-2500 kb) es de mayor tamaño que el genoma de plasto (120-160 kb) (Hipkins et al. 1994). En comparación con el genoma de plasto, el genoma mitocondrial codifica un menor número de proteínas, tiene una tasa menor de sustituciones silenciosas y presenta cambios más rápidos en su estructura y su tamaño (Wang y Wang 2014). En

plantas, el genoma mitocondrial presenta estructuras quiméricas que probablemente han surgido por recombinación intergenómica (Song et al. 2008; Wang y Wang 2014).

La variación del ADN mitocondrial se debe en parte a la presencia de secuencias cortas (motivos) que se repiten en serie a lo largo de segmentos específicos del ADN. La recombinación entre dichas secuencias repetidas origina patrones complejos (Hipkins et al. 1994). El ADN repetitivo es conocido en inglés como SSR (single sequence repeats) o microsátélites. En el genoma mitocondrial existen secuencias repetitivas que se encuentran esparcidas en varias regiones del ADN (Hipkins et al. 1994; Godbout et al. 2010). Los motivos pueden ser secuencias de dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos (Powell et al. 1996). Una forma diferente de estas secuencias repetidas son los minisátélites, los cuales están formados por motivos de 10 a 100 nucleótidos que se repiten en serie. Estas secuencias repetidas no se limitan al genoma mitocondrial, se encuentran con mayor frecuencia en el genoma de plasto y de núcleo (Weising et al. 2005). Los SSR representan una porción significativa de los genomas eucarióticos. Además, los SSR pueden servir como marcadores genéticos si son muy variables. Los SSR presentan muchos alelos que se expresan de forma codominante⁷, son fáciles de detectar mediante la técnica de PCR, son relativamente abundantes, constituyen una porción grande del genoma y solo se requiere una pequeña cantidad de ADN para poder amplificarlos mediante PCR (Powell et al. 1996). Los SSR causan que ciertos segmentos de ADN varíen en longitud entre taxa, por lo que pueden servir como marcadores genéticos (Powell et al. 1996).

En plantas el polimorfismo del ADNmt ha permitido estudiar los procesos intraespecíficos que rigen la distribución de linajes, lo que a su vez ha permitido tener una nueva visión de los procesos micro y macroevolutivos (Powell et al. 1995; Liston et al. 2007; Potter et al. 2013; Vargas-Mendoza et al. 2011). En especies de coníferas se ha observado una fuerte diferenciación en el ADN de mitocondria entre poblaciones (Hipkins et al. 1994). Por ejemplo, estudios comparativos usando un minisátélite (*L2T1*) y tres microsátélites (*10F/R*, *Pt51873* y *Pt9383*) de plasto junto con un minisátélite (gen *nad7*)⁸ de mitocondria fue posible establecer que en *P. banksiana* Lamb. el flujo genético causado por el polen (ADNpl), en comparación al ocasionado por la semilla (ADNmt), es más efectivo para homogenizar la estructura de las poblaciones en dicha especie (Godbout et al. 2010).

⁷ Codominancia hace referencia a la expresión fenotípica, en un mismo individuo, de las formas alternas de un gen de forma que ningún fenotipo enmascara o es enmascarado por los otros fenotipos.

⁸ *Nad7*. Subunidad 7 del gen de la deshidrogenasa NADH.

La variación molecular del gen *nad1*⁹ ha sido utilizado en estudios filogenéticos junto con otras regiones de mitocondria (Dombrovska y Qiu 2004). El gen *nad1* tiene un rango de mutación relativamente bajo y contiene un mecanismo de reemplazo intralelico relativamente simple (Potter et al. 2013). Los análisis filogenéticos de los intrones en el gen *nad1* son congruentes con la evolución de las plantas, lo cual sugiere su transmisión vertical a través de los grupos ancestrales a los actuales (Dombrovska y Qiu 2004). El segundo intrón del gen *nad1* en las angiospermas es un minisatélite muy polimórfico que presenta motivos repetidos que van de 10 a más de 100 pb (Demesure et al. 1995; Dombrovska y Qiu 2004; Potter et al. 2013). En el género *Picea* el segundo intrón del gen *nad1* ha sido usado junto con ADN de plástido y nuclear para establecer una hipótesis filogenética al interior de dicho género (Lockwood et al. 2013). En *Pinus* el segundo intrón del gen *nad1* es variable en longitud. El segundo intrón del gen *nad1* y el primer intrón del gen *nad5* fueron usados junto con ADN de plástido y núcleo por Tsutsui et al. (2009) para estudiar las relaciones filogenéticas en el subgénero *Strobus*. Se determinó que en el subgénero *Strobus* las relaciones filogenéticas reveladas por el ADN de mitocondria son incongruentes con las reveladas por el plasto o el núcleo (Tsutsui et al. 2009). En el subgénero *Pinus* el segundo intrón del gen *nad1* está formado en parte por un motivo de 66 pb que se repite en serie. Vargas-Mendoza et al. (2011) estudiaron las relaciones filogenéticas de las especies mexicanas de *Pinus* usando la información de la variación molecular del segundo intrón del gen *nad1*, la de fragmentos de plástido (*MatK*) y la de núcleo (ITS). Por la falta de resolución en la filogenia mostrada por Vargas-Mendoza et al. (2011), se puede inferir que la variación en el segundo intrón del gen *nad1* es inadecuada para estimar la filogenia de las especies mexicanas de *Pinus*. Las especies estrechamente emparentadas del subgénero *Pinus* tienen generalmente el mismo número de copias de este motivo de 66 pb (Wang y Wang 2014). A pesar de la falta de variación para establecer las relaciones filogenéticas en *Pinus*, la variación del segundo intrón gen *nad1* ha sido utilizado en estudios poblacionales (Soranzo et al. 2000). Por ejemplo, la variación molecular del segundo intrón del gen *nad1* ha servido para investigar la estructura poblacional de *P. ponderosa* Douglas ex C. Lawson y *Pinus flexilis* E. James (Potter et al. 2013). De acuerdo con el estudio de Potter et al. (2013) la distribución geográfica de los haplotipos del gen *nad1* es congruente con la distribución de los taxa infraespecíficos de *P. ponderosa* (Potter et al. 2013). El estudio de Potter et al (2013) indica que, por un periodo relativamente largo, *P. ponderosa* var. *ponderosa* Laws. (distribuida en las costas de Pacífico) ha estado separada de *P. ponderosa* var. *scopulorum* Engelm. (distribuida en las Montañas Rocosas). Tal vez la información molecular en el segundo intrón del gen *nad1*, como lo encontrado por Potter et al. (2013), sea útil para reconocer especies al interior de *P. ponderosa*.

⁹ *Nad1*. Subunidad 1 del gen de la deshidrogenasa NADH.

Existe evidencia que indica que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son especies hermanas y que posiblemente surgieron recientemente (Gernandt et al. 2009; Hernández-León et al. 2013). Debido al fenómeno de hibridación o introgresión no sería raro encontrar que comparten parte de su polimorfismo génico con especies como *P. hartwegii* Lindl. y *P. montezumae* Lamb. en la subsección *Ponderosae* (Gernandt et al. 2005; Eckert y Hall 2006). Como se mencionó en el capítulo anterior, Templeton et al. (1992) desarrollaron un método, conocido como análisis de clados anidados, mediante el cual se pueden identificar linajes en grupos taxonómicos que muestran hibridación y arreglo incompleto de linajes. El análisis de clados anidados se basa en la teoría de coalescencia la cual hace concebible la existencia de especies que muestran patrones de hibridación o retención del polimorfismo ancestral (grupos polifiléticos o parafiléticos) (Templeton 1998a). Si consideramos que las especies son linajes (pero no todos los linajes son especies) es posible usar el análisis de clados anidados para poner a prueba el estatus taxonómico en especies con problemas de delimitación (Templeton 1998b). El método de Templeton (1999) se usa para construir una red de haplotipos que pone de manifiesto la genealogía en un fragmento de ADN. La red de haplotipos es útil para inferir patrones génicos en las poblaciones de forma que hace posible hacer inferencias con respecto al estatus de especie en grupos con problemas de delimitación (Templeton 2001).

El estudio del ADN de mitocondria puede ayudar a entender aun más los límites taxonómicos entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. El ADN de mitocondria se dispersa mediante el polen y semilla, mientras que el ADN de plasto solo se herada mediante el polen. No obstante, la variación en el ADN de mitocondria puede revelar un patrón que apoye al observado con el ADN de plasto. (Ennos 1994). Es posible que el gen *nad1* tenga información útil para estudiar los límites de especies entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en el complejo *Pseudostrobus*. El análisis se realizó construyendo una red de haplotipos. La variación en el segundo intrón del gen *nad1* se comparó con los patrones de variación observados en el ADNpl para ver si ambos patrones son congruentes. El presente estudio, basado en el segundo intrón del gen *nad1*, representa una evaluación preliminar de la divergencia molecular entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Ya que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* muestran una amplia distribución, pero discontinua y fragmentada, se requerirá de un muestreo mucho mayor para obtener conclusiones definitivas.

Hipótesis [capítulo 4]

La variación en el segundo intrón del gen *nad1* de mitocondria muestra relaciones genealógicas que apoyan la divergencia reciente (especiación) de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en el complejo *Pseudostrobus*.

Objetivo general [capítulo 4]

Evaluar la información molecular contenida en el segundo intrón del gen *nadI* para evaluar los límites de especie entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

Objetivos específicos [capítulo 4]

1. Obtener secuencias del segundo intrón del gen *nadI* de ejemplares de *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus* y *P. yecorensis*.
2. Evaluar si la información molecular del segundo intrón del gen *nadI* es útil para agrupar y diferenciar al complejo *Pseudostrobus* con respecto de otros grupos en la subsección *Ponderosae*.
3. Realizar una red de haplotipos usando la información encontrada en la variación molecular del segundo intrón del gen *nadI*, para estudiar la relación genealógica entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.
4. Determinar la frecuencia de los alelos del gen *nadI* en *P. douglasiana* y *P. maximinoi* para evaluar si existen alelos representativos en dichas especies y evaluar si es posible considerarlas como especies de origen reciente.
5. Evaluar la estructura poblacional revelada por el gen *nadI* en las especies del complejo *Pseudostrobus* mediante estimados del índice de fijación y un análisis molecular de la varianza (AMOVA) para ver si *P. douglasiana* y *P. maximinoi* constituyen grupos divergentes.
6. De ser posible determinar la existencia de un patrón en la distribución espacial de los haplotipos que sea congruente con la genealogía observada y los límites de distribución de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

Material y Método [capítulo 4]

Se determinó, previo a los análisis moleculares, la identidad de los individuos con base en la forma de sus hojas y conos (en el capítulo 2 se indican cuáles son los caracteres morfológicos usados para identificar estas especies). Se incluyeron secuencias de individuos pertenecientes a *P. douglasiana* (n = 15), *P. aff. douglasiana* (n = 5), *P. maximinoi* (n = 18), *P. pseudostrobus* (n = 12) y *P. yecorensis* (n = 2) recolectados en diferentes localidades de México. En total de incluyeron 56 secuencias, nueve de las cuales fueron proporcionadas por colaboradores (Dra. Ann Willyard et al.) en E. U. y cuatro descargadas del GenBank (Tabla 4.1). Los mismos colaboradores en Estados Unidos proporcionaron secuencias de *P. arizonica* Engelm., *P. cooperi* C. E. Blanco, *P. engelmannii* Carrière, *P. hartwegii* Lind., *P. jeffreyi* A.Murray bis, *P. montezumae* Lamb., *P.*

nubicola J.P. Perry, *P. ponderosa* Douglas ex C. Lawson. En este estudio preliminar no fue posible incluir secuencias de *P. aff. maximinoi*.

Tabla 4.1. Sitios de recolecta de los individuos incluidos en el análisis del fragmento correspondiente al segundo intrón del gen *nadI*. *Secuencias publicadas por Vargas-Mendoza et al. (2011). **Secuencias publicadas por Wang y Wang (2014).

Taxa/Localidad	Longitud	Latitud
<i>P. aff. douglasiana</i>		
Yécora, Sonora	-109.043831	28.00000
Concordía, Sinaloa	-105.839111	23.58277
Nevado de Colima, Jalisco	-103.620417	19.64541
Nevado de Colima, Jalisco	-103.591917	19.64527
Tancítaro, Michoacán	-102.271139	19.33561
<i>P. douglasiana</i>		
GenBank (JN225482)*	Desconocida	Desconocida
Las Cruces, Jalisco	-104.60783	20.38772
La Campana, Jalisco	-104.59827	20.37008
La Campana, Jalisco	-104.59827	20.37008
La Campana, Jalisco	-104.59827	20.37008
La Campana, Jalisco	-104.59827	20.37008
La Campana, Jalisco	-104.59827	20.37008
La Campana, Jalisco	-104.59827	20.37008
La Campana, Jalisco	-104.59827	20.37008
La Campana, Jalisco	-104.59827	20.37008
La Campana, Jalisco	-104.59036	20.37197
Uruapan, Michoacán	-101.95627	19.45594
Uruapan, Michoacán	-101.94083	19.47091
Temascaltepec, México (Estado)	-100.06713	19.07258
Temascaltepec, México (Estado)	-100.00805	19.07138
Temascaltepec, México (Estado)	-100.00805	19.06775
<i>P. maximinoi</i>		
GenBank (JN225486)*	Desconocida	Desconocida
GenBank (KM244262)**	Desconocida	Desconocida
El Tuito, Jalisco	-105.30733	20.40213
El Tuito, Jalisco	-105.30733	20.40213
El Tuito, Jalisco	-105.30458	20.41008
El Tuito, Jalisco	-105.30458	20.41008
El Tuito, Jalisco	-105.30458	20.41008
El Tuito, Jalisco	-105.30458	20.41008
El Tuito, Jalisco	-105.30458	20.41008
El Tuito, Jalisco	-105.30458	20.41008
San Gabriel, Oaxaca	-97.08038	16.0848
San Mateo, Oaxaca	-96.68236	15.93503
San Mateo, Oaxaca	-96.45747	15.97369

Tabla 4.1. (Continuación)

Taxa/Localidad	Longitud	Latitud
San Mateo, Oaxaca	-96.43713	15.97286
San Mateo, Oaxaca	-96.42683	15.97
San Mateo, Oaxaca	-96.42597	15.9703
San Mateo, Oaxaca	-96.42597	15.9703
Montebello, Chiapas	-91.74675	16.09961
<i>P. pseudoastrobus</i>		
GenBank (JN225487)*	Desconocida	Desconocida
El Cuale, Jalisco	-105.011472	20.356778
El Cuale, Jalisco	-105.011472	20.356778
El Cuale, Jalisco	-105.000806	20.359611
El Cuale, Jalisco	-104.998972	20.358583
El Cuale, Jalisco	-104.993778	20.363306
Valle de Bravo, México (Estado)	-100.109722	19.306111
Sultepec, México (Estado)	-99.966667	18.838056
Sultepec, México (Estado)	-99.96389	18.837778
Ecatzingo de Hidalgo, México (Estado)	-98.734167	18.964444
Las Vigas, Veracruz	-97.072611	19.3
Las Vigas, Veracruz	-97.06719	19.62052
Las Vigas, Veracruz	-97.04813	19.61894
Yavesía, Oaxaca	-96.38333	17.2
San Cristóbal, Chiapas	-92.3063	16.4955
San Cristóbal, Chiapas	-92.301667	16.492500
<i>P. yecorensis</i>		
Yécora, Sonora	-109.042861	28.380731
Yécora, Sonora	-109.0425	28.379939

Se aisló ADN total de hojas de pino mediante el método modificado de aislamiento con CTAB (Doyle y Doyle 1987). Se amplificó el fragmento correspondiente al segundo intrón del gen *nadl* siguiendo la técnica de PCR. En la PCR se usó solución amortiguadora (1x), MgCl₂ (2.5 mM), el cebador *nadl*-in2_F2 (GGGGCTTATGGGTGAGCAAT; Potter et al. 2013) (0.4 μM), el cebador *nadl*-in2_R2 (CTCTGAATTGACGAATGCCG; Potter et al. 2013) (0.4 μM), DNA (10-40 pmol), desoxirribonucleótidos trifosfato, también conocidos como dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (0.2 μM por cada uno) y *Taq* polimerasa (2.0 unidades). Las condiciones de amplificación se realizaron en tres etapas. En la primera etapa se desnaturizó el ADN a 94 °C durante 15 min. En la segunda etapa el ADN se sometió a 35 ciclos de amplificación. En los primeros 10 ciclos de esta segunda etapa la temperatura de desnaturización se mantuvo en cada ciclo a 94 °C por 20 s. El tiempo de alineamiento siempre fue de 30 s en cada ciclo, pero la temperatura disminuyó 0.5 °C

después de cada ciclo. La temperatura inicial de alineamiento fue de 65 °C y terminó en 60 °C. La extensión se realizó a 72 °C por 2 min. en cada ciclo. En esta segunda etapa también se realizaron 25 ciclos de amplificación bajo las condiciones alcanzadas en el décimo ciclo. La tercera y última etapa de la PCR consistió de una extensión final a 72 °C por 10 min.

Los productos de amplificación fueron enviados para su secuenciación al laboratorio comercial (High-Throughput Genomics Unit) de la Universidad de Washington (Seattle, E. U. A). Cuando se obtuvieron secuencias de buena calidad, en ambos sentidos, se generaron secuencias de consenso con Sequencher v.4.8 (Gene Codes, Inc., Ann Arbor, Michigan). En 11 ejemplares no fue posible obtener con el cebador de retroceso secuencias de la calidad necesaria, por lo que, solo se consideraron las secuencias de buena calidad obtenidas con el cebador de avance.

Para alinear las secuencias del gen *nad1*, Potter et al. (2013) y Bonhomme et al. (2007) sugieren que el alineamiento de microsatélites se realice a mano debido a que de esta forma se hace una mejor valoración de las repeticiones en serie de los motivos o del acortamiento y repetición de dichos motivos. Por lo tanto, para considerar los motivos repetidos las secuencias fueron alineadas con Clustal W (Thompson et al., 1994) dentro de BioEdit v.5.0.9.1. (Hall 1999), pero la alineación y edición final se hicieron mediante inspección visual. En congruencia con la información de Wang y Wang (2014) respecto de las secuencias del gen *nad1*, se detectó un motivo de 66 pb que se repite en las secuencias amplificadas (Cuadro 4.1). En el proceso de alineamiento se pudo identificar el motivo repetido de 34 pb reportado en la Tabla 2 de Potter et al. (2013). El motivo de Potter et al. (2013) está incluido dentro del motivo de 66 pb reportado por Wang y Wang (2014), por lo que, se tomó en consideración el motivo de 66 pb para realizar los alineamientos (Cuadro 4.1). Durante el alineamiento de las secuencias se abrieron espacios creando inserciones-delecciones (indels). El alineamiento se recortó eliminando los segmentos de poca calidad en los extremos inicial y final de las secuencias. El alineamiento se exportó en formato NEXUS.

Para evaluar si la variación en el segundo intrón del gen *nad1* es suficiente para agrupar a las especies del complejo *Pseudostrobis* y por lo tanto diferenciarlo de otras especies o grupos en la subsección *Ponderosae*, se evaluó si las especies en el complejo comparten haplotipos con otras especies de la subsección *Ponderosae*. Se determinó el patrón de repetición del motivo de 66 pb en el segundo intrón del gen *nad1* (como se explica en el cuadro 4.2), y se compararon los patrones encontrados en las especies del complejo *Pseudostrobis* con relación a otras especies en la subsección *Ponderosae*. Esto fue posible porque las secuencias incluidas no presentan sitios variables entre sí.

Se hizo un análisis con parsimonia estadística para construir una red de haplotipos con el programa TCS v.1.21 (Clement et al. 2000). Para incluir la información de los indels, se usó el programa SeqState (Müller 2005) para codificar los indels con el método de codificación simple de Simmons y Ochoterena (2000). Como resultado de codificar los indels se produjeron nuevos caracteres codificados como presencias y ausencias. Como TCS v.1.21 no acepta información codificada como presencia o ausencia, en la matriz de datos cada ausencia se sustituyó por una “a” y cada presencia por una “g”. En el análisis se siguió el procedimiento por defecto considerando los espacios abiertos como información faltante. Cuando se encontraron estructuras cerradas en la red de haplotipos (Crandall y Templeton 1993; Posada y Crandall 2001), se decidió resolver la ambigüedad originada por tales formas evitando las convergencias ocasionada por la presencia de indels en los haplotipos derivados (haplotipos posiblemente más recientes) (Crandall y Templeton 1993).

Cuadro 4.1. Comparación del motivo repetido (ID = A) reportado en la Tabla 2 de Potter et al. (2013) con el motivo repetido encontrado en este trabajo. El motivo "A" de 66 pb, mostrado en la lista de abajo, es el usado en este trabajo como base de referencia para hacer los alineamientos. El fragmento "B" corresponde al motivo repetido de la Tabla 2 de Potter et al. (2013). El motivo "A" se repite en todas las secuencias generadas. Las secuencias amplificadas están formadas también por fragmentos cortos (fragmentos B, D, E y F) que posiblemente se originaron del acortamiento del motivo de 66 pb (A). El fragmento E, presente en todas las secuencias, es difícil de alinear con el motivo A.

Id Longitud Secuencia

A.	66	ccctctcctggacagtcgagtgctgaacgcaccctcaccatgaatagtgagtgcttacgca
B.	34ccctcaccatgaatagtgagtgcttacgca
C.	58	ccctctcctggacagtcgagtgctgaacgcaccctcaccatgaatagtgagtgac.....
D.	31ccctcaccatcggaatagtgagtgctccgc...
E.	17	ccctaataataggg.....
F.	66	ccctctcctggacagtcgagtgcttacgcaccctcaccataatgggtgagtgctcttatag

Al estimar la genealogía de genes fue posible saber el número de haplotipos en la matriz. Por lo tanto, en los análisis de estructura génica, se consideró el número de haplotipos encontrados al estimar la genealogía de genes. Se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) con el programa Arlequin v.1.3.1.2 (Excoffier y Lischer 2010). Para el análisis se empleó un archivo con

los datos de las frecuencias de los haplotipos y las secuencias de los haplotipos. El archivo con los datos de los haplotipos se construyó con base en los resultados obtenidos en la construcción de la red de haplotipos. Debido a que los ejemplares de *P. yecorensis* solo están representados por dos secuencias se excluyeron de los análisis de estructura poblacional. Los individuos de *P. aff. douglasiana* (n = 5) se incluyeron como parte de la variación de *P. douglasiana*. El archivo con los datos de los haplotipos y sus frecuencias contiene la información de 54 secuencias de individuos identificados como *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus*. En el análisis de AMOVA se consideró a cada especie como una población distinta dentro de un grupo. Para estimar las distancias se usó la opción de diferencias entre pares. Se hicieron 1000 permutaciones para obtener una buena estimación de la significancia estadística de la F_{ST} . También se estimó el índice de fijación entre pares de poblaciones usando el algoritmo de diferencias entre pares. Para este análisis se realizaron más de 1000 permutaciones para obtener una buena estimación del nivel de confianza ($p < 0.05$).

Resultados [capítulo 4]

En la matriz de secuencias se encontraron nueve variantes en tamaño que van de los 439 a 569 pb. Algunas variantes tienen un tamaño muy similar, pero el patrón de repetición del motivo de 66 pb es diferente (Tabla 4.2). Como consecuencia del arreglo de los motivos repetidos y de la variación en la longitud entre las secuencias, la matriz con las secuencias alineadas tiene indels. El método de codificación simple de Simmons y Ochoterena (2000) produjo 11 caracteres correspondientes a los indels generados en la alineación. La matriz con las secuencias alineadas tiene ~729 sitios, más 11 sitios correspondientes a los resultados de codificar los indels con el método de codificación simple de Simmons y Ochoterena (2000).

Se encontró que otras especies de la subsección *Ponderosae* presentan el patrón ("ABAAACDEF") también presente en las especies del complejo *Pseudostrobus* (Comparar Tabla 4.3 con la Tabla 4.2). No se encontraron sustituciones entre secuencias, por lo que se puede considerar que las secuencias con el mismo patrón en la repetición de los motivos representan el mismo haplotipo. Por tal motivo, es difícil suponer que la variación de los patrones de repetición en las secuencias sirva para distinguir a las especies del complejo *Pseudostrobus* de otras especies o grupos de especies en la subsección *Ponderosae*. Esto último es parcialmente congruente con lo reportado por Wang y Wang (2014), quienes indican que el segundo intrón del gen *nad1* suele tener la misma longitud entre especies de *Pinus* de parentesco cercano .

Tabla 4.2. Variantes en los patrones de repetición del motivo de 66 pb en las secuencias del segundo intrón del gen *nadI* para las especies del complejo *Pseudostrobos*. Cada variante está identificada por un número de haplotipo (de acuerdo con los resultados de la elaboración de red de haplotipos).

Variantes en tamaño	pb	Número de haplotipo	Ejemplares (n)
ABAAAACDEF	536	2	10
ABAAAACEF	505	3	2
ABAAACDEF	470	1	26
ABAAAACEF	439	4	1
ABAABACDEF	504	5	4
ABBAAACDEF	504	6	1
BAABAACDEF	504	8	1
BABAAAACDEF	536	9	3
BABAAAACEF	539	10	6
BABABAACDEF	504	11	1

Tabla 4.3. Patrones de repetición del motivo de 66 pb en el segundo intrón del gen *nadI* en especies de la subsección *Ponderosae*.

Motivos	pb	Especie
AAAAACDEF	502	<i>P. ponderosa</i>
ABABABABACDEF	539	<i>P. nubicola</i>
ABAAACDEF	470	<i>P. jeffreyi</i>
ABAAACDEF	470	<i>P. nubicola</i>
ABAAACDEF	470	<i>P. arizonica</i>
ABAAACDEF	470	<i>P. engelmannii</i>
ABAAACDEF	470	<i>P. arizonica</i>
ABAAACDEF	470	<i>P. arizonica</i>
ABAAACDEF	470	<i>P. montezumae</i>
ABAAACDEF	470	<i>P. hartwegii</i>
ABBAAACDEF	504	<i>P. cooperi</i>

Los resultados de la construcción de la red genealógica indican que es posible reconocer 10 haplotipos (Tabla 4.4). Las diferencias entre haplotipos se debe a la presencia de sustituciones y la duplicación completa o incompleta en el motivo de 66 pb. Ocho de los caracteres variables se generaron al codificar los indels con el método de codificación simple. Un aspecto curioso es que a pesar de haber incluido más individuos de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* que de *P. pseudostrobos*, esta última mostró más haplotipos que las dos primeras. Siete de los ocho haplotipos encontrados en *P. pseudostrobos* son exclusivos de esta especie.

Tabla 4.4. Haplotipos del segundo intrón del gen *nad1*. Los números indican el número de individuos por haplotipo para cada taxón.

Taxa	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	h9	h10
<i>P. aff. douglasiana</i>	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>P. douglasiana</i>	9	6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. maximinoi</i>	0	9	0	0	0	0	0	1	3	5
<i>P. pseudostrobis</i>	1	6	3	0	4	1	1	0	0	0
<i>P. yecorensis</i>	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0

En la red de haplotipos se puede ver que los haplotipos de *P. pseudostrobis* no están emparentados entre sí. A simple vista se puede percibir una leve estructura genealógica en los haplotipos de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

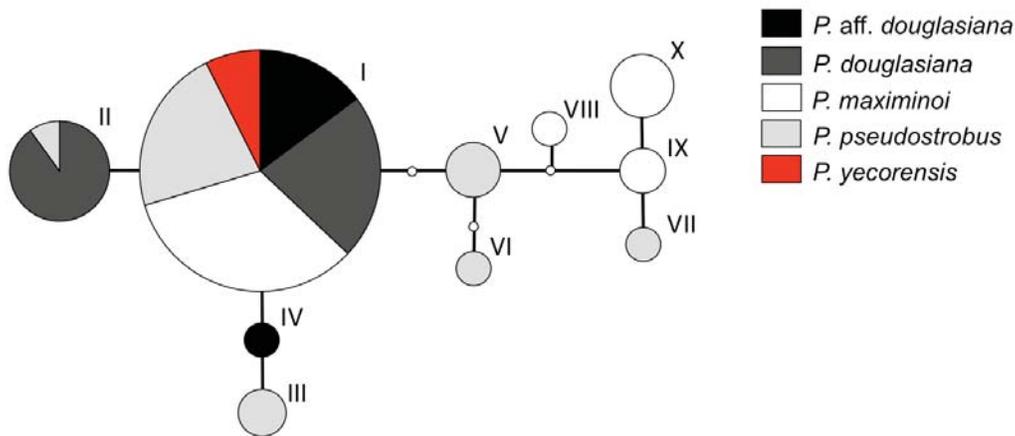


Fig. 4.1. Red de haplotipos construida con el gen *nad1*. Círculos pequeños en color blanco representan haplotipos faltantes.

Los haplotipos I (el más abundante), II, IV, V y VI se distribuyen en la parte noroccidental de México en la Provincia Biogeográfica Eje Volcánico y la Provincia Biogeográfica Sierra Madre Occidental (Fig. 4.2). En contraste los haplotipos III y X, encontrados en ejemplares de *P. maximinoi*, se ubican en la parte sur y este de México. El haplotipo IX se distribuye tanto en la parte noroccidental como sur de México.

Los resultados del AMOVA indican que existe poca diferenciación génica entre las especies ($F_{ST} = 0.13972$; $p < 0.05$). Al comparar entre pares de especies los resultados indican que *P. maximinoi* y *P. pseudostrobis* son las que más se parecen ($F_{ST} = 0.09029$; $p < 0.05$). Aunque también la diferenciación entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* o *P. pseudostrobis* podría considerarse poca, $F_{ST} = 0.16537$ y $F_{ST} = 0.15876$ respectivamente ($p > 0.05$).

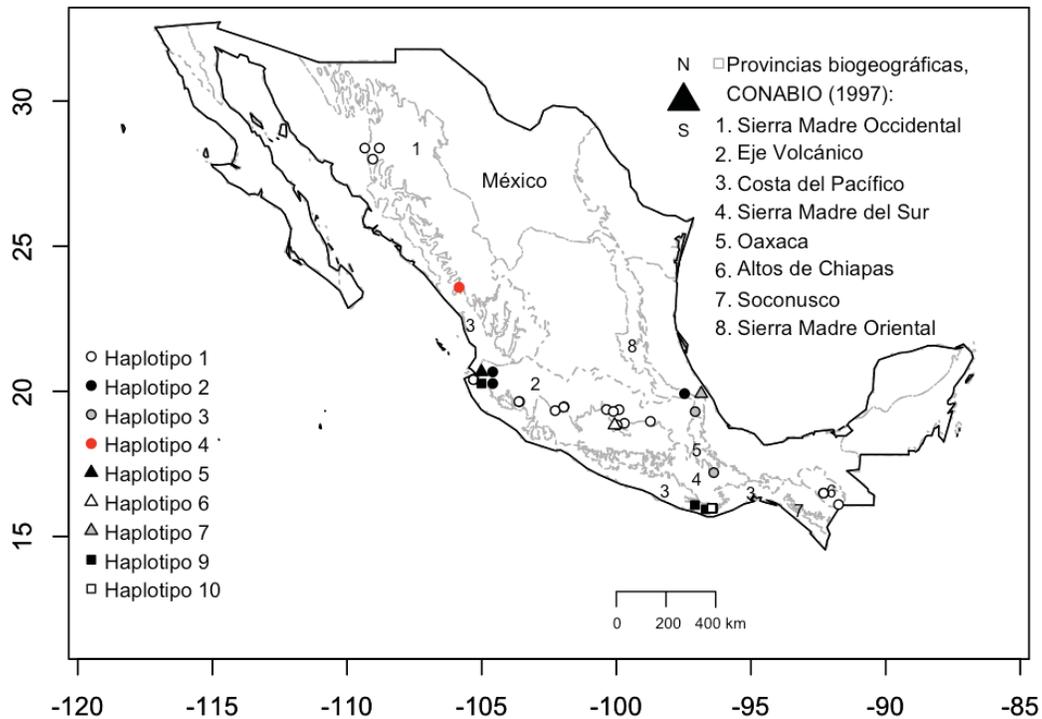


Fig. 4.2. Mapa de México en donde se muestra la distribución de los haplotipos del segundo intrón del gen *nadI* encontrados en el complejo *Pseudostrobus*. La distribución del haplotipo ocho se desconoce.

Discusión [capítulo 4]

La variación en el gen *nadI* es compartida entre especies de la subsección *Ponderosae*, por lo que es poco probable que dicha variación sea de utilidad para diferenciar al complejo *Pseudostrobus*. En este sentido, parece que la variación observada por los diferentes arreglos de los motivos del gen *nadI* es muy conservada y que prevalecen patrones ancestrales. El hecho de que el complejo comparta haplotipos con especies no directamente emparentadas hace suponer que la variación en el gen *nadI* está muy conservada. Posiblemente la variación del segundo intrón del gen *nadI* refleja eventos históricos no recientes.

La divergencia encontrada en el segundo intrón del gen *nadI* entre las especies del complejo *Pseudostrobus* es escasa. Aunque *P. pseudostrobus* y *P. maximinoi* mostraron algunos haplotipos exclusivos no hay una clara agrupación de ellos de acuerdo con la especie de donde fueron obtenidos. Las relaciones de parentesco entre los haplotipos exclusivos de *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus* parecen ser incongruentes con la información de la morfología o el ADNpl, que indica que *P. maximinoi* está más emparentada con *P. douglasiana* que con *P. pseudostrobus*.

Las poblaciones de *P. maximinoi* en la parte occidental de la Provincia Biogeográfica Eje Volcánico comparten haplotipos con *P. douglasiana* —principalmente en donde estas especies están en simpatria. Los haplotipos compartidos entre *P. maximinoi* y *P. douglasiana* en el Eje Volcánico no sólo son del fragmento *nad1*, también comparten haplotipos de plasto (Capítulo 3). Existen trabajos (Matos y Schaal 2000; Delgado et al. 2007; Jardón-Barbolla et al. 2011; Flores-Rentería et al. 2013) en donde se reporta que las especies de pino pueden mostrar una mayor afinidad molecular debido a su cercanía geográfica que a su taxonomía revelada por la morfología.

Pinus aff. *douglasiana* puede ser parte de la variación de *P. douglasiana*. Los ejemplares de *P. aff. douglasiana* comparten haplotipos con *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Este taxón también comparte haplotipos de ADNpl con *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Quizá, *P. pseudostrobus* comparte haplotipos del segundo intrón del gen *nad1* con *Pinus* aff. *douglasiana*, *P. douglasiana* y *P. maximinoi* debido a eventos de hibridación.

Por la poca diferenciación en la estructura poblacional revelada con el gen *nad1* y los valores de F_{ST} , se puede pensar que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* presentan una estrecha relación de parentesco entre sus poblaciones. Cuanto más aislamiento exista entre dos poblaciones (o especies) se espera que compartan menos haplotipos o que los haplotipos compartidos entre dichas poblaciones muestren frecuencias diferentes —de manera que en una de las especies predomine la presencia de un haplotipo con respecto de la otra (Jardón-Barbolla et al. 2011; Huang y Friar 2011; Flores-Rentería et al. 2013). La F_{ST} indica que hay poca diferencia en la estructura génica entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, lo cual indica que posiblemente no existe independencia en la evolución de las especies consideradas (Hey y Pinho 2012). Debido a que la variación molecular en el segundo intrón del gen *nad1* es muy conservada, es posible que falta de independencia evolutiva entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* sea un reflejo del flujo génico en los grupos ancestrales, aunque en la actualidad dicho flujo génico se haya reducido.

Considerando al haplotipo más abundante como el más ancestral, que dicho haplotipo fue encontrado en la parte norte de la Provincia Biogeográfica Sierra Madre Occidental y la mitad este de la Provincia Biogeográfica Eje Volcánico, y que además este haplotipo es compartido por *P. aff. douglasiana*, *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, es posible pensar que el grupo ancestral de ambas especies se distribuía en la parte Norte y Noroeste de México. Esto concuerda con la evidencia obtenida del ADN de plasto (ver capítulo anterior) y con la hipótesis formulada por Axelrod (1986) con relación a la migración de los grupos ancestrales de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, establecida con base en la evidencia fósil. En la genealogía del fragmento *nad1* (Fig. 4.1) puede observarse que *P. maximinoi* presenta haplotipos (arreglo de motivos serie) exclusivos. Dichos haplotipos

exclusivos de *P. maximinoi* se distribuyen en la parte sur (Oaxaca) y oriental de México (límites entre Puebla y Veracruz) (Fig. 4.2). La distribución de los haplotipos permite postular que *P. maximinoi* surgió debido a la expansión del rango de distribución de las poblaciones ancestrales en el noroeste de México hacia el sur del continente. Posiblemente la Provincia Biogeográfica Depresión del Balsas ha sido una barrera geográfica que ha contribuido a la diferenciación entre las poblaciones del noroeste con respecto de las del sur y este de México.

La falta de caracteres fijos se puede atribuir a la introgresión de material genético entre especies de parentesco cercano o a la retención del polimorfismo ancestral en especies de origen reciente (Mirov 1967; Maddison 1997; Ellstrand 2014). La introgresión es un fenómeno muy conspicuo en la evolución de los pinos (Matos y Schaal 2000; Liston et al. 2007; Delgado et al. 2007). La filogenia de *Pinus* subsección *Ponderosae* basada en fragmentos de ADN de núcleo (gen *WD40* y *LEA-Like*) muestra patrones no monofiléticos, que se podrían atribuir a procesos como introgresión o a un arreglo incompleto de linajes (Willyard et al. 2009). El método de Templeton (2004) reconoce que la hibridación es una fuerza importante y potencialmente creativa en los procesos de especiación. Otros autores también han reconocido en el flujo genético una fuerza evolutiva importante en los procesos de especiación en plantas (Ellstrand 2014). Los resultados a largo plazo del flujo genético como fuerza cohesiva dependen de la magnitud del flujo génico (Ellstrand 2014). Posiblemente, el intercambio de información ocasionada por el flujo genético reducido entre especies sea una forma de abatir las presiones ambientales ocasionadas por la colonización de nuevas áreas (Ellstrand 2014).

CAPÍTULO 5

Discusión y conclusiones generales

Límites entre especies del complejo *Pseudostrobus* en el contexto de especie como linaje metapoblacional

Considerando diferentes criterios de delimitación de especies bajo el concepto de linaje metapoblacional, la evidencia mostrada en este estudio no es suficiente para apoyar contundentemente el estatus taxonómico de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Los resultados indican que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* aún comparten muchos atributos morfológicos y moleculares. En otras palabras, *P. douglasiana* y *P. maximinoi* no mostraron una divergencia significativa una respecto de la otra. *Pinus pseudostrobus* es la especie que tiene límites más claros dentro del complejo *Pseudostrobus*. Aunque se consideró en este estudio a *P. yecorensis*, la información de esta especie fue escasa. La divergencia molecular y ecológica de *P. yecorensis* amerita un estudio detallado. Dichos trabajos deben de realizarse incluyendo a *P. douglasiana* y en especial a *P. aff. douglasiana*, ya que la evidencia indica que son grupos hermanos de *P. yecorensis*. Considerando las diferencias ecológicas, filogenéticas, reproductivas y morfológicas, en los párrafos que siguen, se discute acerca de los límites encontrados en las especies del complejo, especialmente los límites encontrados entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

Conclusión basada en la presencia de caracteres fijos y exclusivos en el ADN

Los caracteres moleculares presentaron patrones polifiléticos entre las especies del complejo *Pseudostrobus*. Algunas especies de pino han mostrado caracteres fijos y exclusivos. Por ejemplo, *P. chiapensis* (Martínez) Andresen es una especie de parentesco cercano a *P. strobus* L., posiblemente hermana. *Pinus chiapensis* tiene haplotipos exclusivos de ADN de núcleo (gen *cesA1* y *LEA-like*) que la diferencian de *P. strobus* (Syring et al. 2007a). No obstante, *P. chiapensis* es una excepción debido a que en muchas especies mexicanas de pino de parentesco cercano hay una notable ausencia de caracteres fijos y exclusivos (Gernandt et al. 2005; 2009; DeGiorgio et al. 2014). El trabajo de filogenia molecular basado en ADNpl de la sección *Trifoliae* (Hernández-León et al. 2013), en donde se incluyen cerca de cuatro individuos por especie, mostró que los haplotipos correspondientes a 23 especies, de las 49 incluidas en los análisis, no forman grupos monofiléticos. Los conceptos filogenéticos siguen criterios basados en esquemas dicotómicos y jerárquicos (Hennig 1966; de Pinna 1999). Por consiguiente, solo es posible aplicar los métodos filogenéticos

cuando los caracteres, moleculares o morfológicos, muestran relaciones dicotómicas y jerárquicas (Davis y Nixon 1992; Rieseberg y Brouillet 1994). A una escala evolutiva relativamente grande, muchos grupos taxonómicos siguen un patrón jerárquico y dicotómico en la evolución, siendo el problema los grupos muy emparentados y de origen reciente (Avice et al. 1987; Wiens y Servedio 2000; Kizirian y Donnely 2004; Rieppel 2010).

Convendría explorar la variación molecular en el ADN de núcleo para tratar de encontrar caracteres fijos y exclusivos que apoyen el rango de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* mediante análisis filogenéticos. El uso de ADN de núcleo como marcador genético es limitado debido a la existencia de familias multigénicas, retrotransposones o DNA repetitivo (Syring et al. 2005; 2007b), pero no sería improbable encontrar genes útiles para esclarecer los límites taxonómico en *P. douglasiana* y *P. maximinoi* (Neves et al. 2014). Syring et al. (2005) evaluaron genes nucleares de pocas copias para esclarecer los límites en las relaciones filogenéticas entre subsecciones de *Pinus*. De los 73 genes evaluados, Syring et al. (2005) eligieron cuatro para realizar su trabajo. Los métodos de secuenciación masiva (de nueva generación) podrían servir para encontrar sitios polimórficos en el ADN que ayuden a resolver problemas taxonómicos como la delimitación de especies (Parks et al. 2009; McCormack et al. 2013; Zimin et al. 2014). La búsqueda de más caracteres moleculares podría ser útil para encontrar caracteres fijos y exclusivos en las especies de pino en donde existen problemas de delimitación, aunque es necesario considerar que los árboles de genes no son necesariamente equivalentes al árbol evolutivo de las especies (Avice et al. 1987; Knowles y Carstens 2007). La fijación de caracteres posiblemente no es un resultado inmediato de la especiación en pinos u otros grupos de plantas (Wiens y Servedio 2000; de Queiroz 2007).

Una de las explicaciones del por qué *P. douglasiana* y *P. maximinoi* comparten muchos atributos y no muestran caracteres fijos en su ADN, es la posibilidad de que dichas especies se hayan formado en tiempos geológicos recientes y han retenido parte de su polimorfismo ancestral. La evidencia molecular (ADNpl) indica que las especies de la subsección *Ponderosae* se formaron en tiempos geológicos recientes (Hernández-León et al. 2013). Especies del género *Pinus* aparecen en el registro fósil hace más de 100 millones de años, en el Cretácico temprano (Ryberg et al. 2012). Según Axelrod (1986) se puede ubicar la existencia de especies similares a las de la subsección *Ponderosae* en el registro fósil del Oligoceno tardío. Mediante la aplicación de relojes moleculares, se ha estimado que en la subsección *Ponderosae* el tiempo de divergencia es menor que el de otras subsecciones de *Pinus* (Willyard et al. 2007; Hernández-León et al. 2013). Tal vez el grupo ancestral de la subsección *Ponderosae* comenzó su divergencia hace ~14 millones de años, en el Mioceno. El grupo corona de la subsección *Ponderosa* se empezó a formar en el Plioceno, hace

~2.5 millones de años (Hernández-León et al. 2013; Ogg et al. 2016). Se sabe que durante el Pleistoceno ocurrieron glaciaciones que propiciaron la migración en dirección norte a sur en el norte del Continente Americano (Axelrod 1986; Perry et al. 1998; Mastretta-Yanes et al. 2015), lo cual posiblemente promovió la divergencia de las especies del complejo *Pseudostrobus*.

Conclusión basada en el criterio de aislamiento reproductivo

Entre especies de parentesco cercano puede existir aislamiento reproductivo incompleto. La evidencia existente (fenología y caracteres moleculares compartidos) sugiere que entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* existe flujo génico, posiblemente debido a que ambas especies pueden estar en simpatria (por ejemplo, en Jalisco y Michoacán), además de que su tiempo de polinización (febrero y marzo) es coincidente. Los haplotipos compartidos del ADNpl entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* podrían ser una señal indicadora de la falta de barreras en el aislamiento reproductivo entre ambas especies. Ejemplares de *P. maximinoi* en Jalisco presentaron los mismos haplotipos de *P. douglasiana* en el mismo estado. La evidencia obtenida con los caracteres mitocondriales no es concluyente, dado que el gen *nad1* está conservado. Es decir, el gen *nad1* no mostró la variación suficiente como para diferenciar especies y la estructura de la variación encontrada en dicho gen podría deberse a eventos ocurridos antes de la divergencia de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. No podemos decir categóricamente que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son especies crípticas (especies gemelas). Para que dos especies se consideren especies gemelas debe de existir aislamiento reproductivo entre ellas (Mayr 1996). La posible falta de aislamiento reproductivo no necesariamente significa que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* sean una misma especie. El aislamiento reproductivo entre especies de plantas a veces es incompleto (Grant 1971). Se piensa que muchas de las especies que forman híbridos en la naturaleza han logrado mantener su identidad taxonómica a través del tiempo (Van Valen 1976; Templeton 1989; Ellstrand 2014). Esto permite pensar en el concepto de agrupación genotípica (Mallet 1995), el cual dice que las especies se caracterizan por grupos específicos de genes que mantienen su propia organización y no se fusionan con los grupos de genes en otras especies, a pesar de la formación de híbridos y de introgresión. Estudios de hibridación artificial realizados en Estados Unidos han mostrado que las especies de pino de parentesco cercano pueden entrecruzarse (Duffield 1952, Keng y Little 1961, Critchfield 1986, Richardson 1998). Posiblemente varias especies mexicanas de pinos formen híbridos en la naturaleza (Farjon et al. 1997; Delgado et al. 2007).

Conclusión basada en la genealogía de genes

Las redes de haplotipos mostraron que la genealogía de *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. pseudostrobus* es incongruente con la variación morfológica y las preferencias climáticas de dichas especies. El mejor ejemplo son las poblaciones de *P. maximinoi* al Oeste de Jalisco, cerca de la localidad El Tuito. En esa área las poblaciones mostraron haplotipos de plasto y mitocondria compartidos con *P. douglasiana*, aunque tanto los patrones observados en el ADN de plasto y mitocondria podrían deberse a eventos pasados. En Oaxaca, por ejemplo, se identificaron ejemplares de *P. douglasiana* que poseen haplotipos emparentados directamente con los de *P. pseudostrobus*. Se esperaba que los individuos de *P. maximinoi* presentaran haplotipos propios que la definieran como especie o que presentara una mayor frecuencia en los haplotipos compartidos con *P. douglasiana*, es decir, que existiera una estructura génica que indicara la divergencia entre *P. maximinoi* y *P. douglasiana*. Esto último no ocurrió, en parte porque los marcadores usados no presentan la variación suficiente, aunque probablemente se deba a que existe retención del polimorfismo ancestral e introgresión.

Se observó un patrón norte-sur en la distribución de los haplotipos de plasto y mitocondria. Este patrón se distingue por la presencia de haplotipos posiblemente ancestrales en la Sierra Madre Occidental y el Eje Volcánico. Aunque se encontraron dichos haplotipos ancestrales en Oaxaca (Sierra Madre del Sur), su frecuencia fue menor. Además, en la Sierra Madre del Sur y este del Eje Volcánico se encontraron haplotipos diferentes, posiblemente más recientes. El patrón encontrado en la distribución de haplotipos puede deberse a la presencia de barreras geográficas que hacen que exista flujo génico restringido entre las poblaciones de la Sierra Madre Occidental y la mitad oeste del Eje Volcánico con respecto de las distribuidas en el extremo este del Eje Volcánico, la Sierra Madre del Sur y la Sierras en el Norte de Oaxaca. Dichas barreras geográficas podrían estar constituidas por la Depresión del Balsas y áreas con elevaciones mayores a los 2000 m en la mitad este del el Eje Volcánico (Ferrusquía-Villafranca 1993). En la mitad este del Eje Volcánico se observa, por ejemplo, la presencia de volcanes como el Nevado de Toluca, Popocatepetl y el Iztaccíhuatl. Sin embargo, las poblaciones en el oeste del Eje Volcánico podrían estar conectadas con las poblaciones de la Sierra Madre del Sur (en Guerrero y Oaxaca) por una zona de contacto en el sur de Michoacán y Jalisco.

El patrón de distribución de haplotipos es parcialmente congruente con los patrones morfológicos y climáticos de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Por ejemplo, *P. maximinoi*, adaptada a climas subtropicales, se distribuye en áreas del sur de México, llegando hasta Nicaragua, y por su parte *P. douglasiana* básicamente se distribuye en el noroeste y oeste de México (en la Sierra

Madre Occidental y el Eje Volcánico) en áreas de transición entre las regiones Neártica y Neotropical (Morrone 2005). Cabría esperar las poblaciones más al sur, en Chiapas y parte de América Central, también muestren diferencias en su estructura poblacional con base en marcadores más variables.

Conclusión basada en el criterio fenético y en el criterio morfológico (taxonómico)

Pinus yecorensis tiene una escasa representación en este trabajo, por lo que su estatus taxonómico sigue siendo controvertido. *Pinus yecorensis* se distribuye exclusivamente en el noroeste de México, en la Sierra Madre Occidental. La similitud morfológica de *P. yecorensis* con *P. aff. douglasiana*, también distribuida en la Sierra Madre Occidental, señala la necesidad de hacer un estudio más detallado para esclarecer su estatus taxonómico. Cabe la posibilidad de que *Pinus yecorensis* comenzara a diferenciarse antes que *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. En los análisis filogenéticos con ADNpl de Hernández-León et al. (2013), *P. yecorensis* se ubica como grupo hermano de las a su vez hermanas *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, lo cual indica que divergió antes que estas últimas dos especies. *Pinus yecorensis* parece estar adaptada a regímenes de sequía más extremos que *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Por su distribución, es posible que *P. yecorensis* tenga una mayor influencia de los climas propios de la región Neártica.

La evidencia molecular encontrada en las especies del complejo *Pseudostrobus* contribuyó a entender mejor la variación de las formas de las especies en el complejo. La evidencia molecular tiene consecuencias en cuanto a los límites morfológicos entre las especies del complejo. La evidencia de ADNpl indica que *P. pseudostrobus* es una especie que tiene más parentesco con especies como *P. montezumae* o *P. hartwegii* (Gernandt et al. 2009). En este trabajo, la mayoría de los haplotipos de ADNpl que se encontraron en *P. pseudostrobus* son idénticos a los encontrados por Gernandt et al. (2009) y que relacionan a esta especie con el clado Montezumae. Además, la presencia de haplotipos exclusivos tanto de ADNpl como ADNmt apoyan las diferencias morfológicas entre *P. pseudostrobus* con respecto de *P. maximinoi* y *P. douglasiana*. En el contexto del complejo *Pseudostrobus*, la presencia de un cono con pedúnculo caedizo sería un carácter diagnóstico para *P. pseudostrobus* (Stead y Styles 1984; Farjon y Styles 1997), a pesar de que algunos ejemplares de *P. pseudostrobus* parecen no tener pedúnculo. Los conos de los ejemplares de *P. pseudostrobus* con un pedúnculo inconspicuo se caen dejando algunas escamas infértiles en las ramas. Este carácter relaciona a *P. pseudostrobus* con otras especies de la subsección *Ponderosae* que presentan también conos con pedúnculo caedizo, por ejemplo, *P. montezumae* y *P. devoniana* (Farjon y Styles 1997). Por su parte, *P. maximinoi*, *P. douglasiana* y *P. yecorensis* presentan consistentemente un cono con pedúnculo persistente. Se ha reportado que *P. durangensis*

Martínez, también en la subsección *Ponderosae* (Gernandt et al. 2005), presenta conos con pedúnculos persistentes (Farjon y Styles 1997). Tal vez en trabajos futuros se deba considerar a *P. pseudostrobus* como parte del clado Montezumae, como lo indica la evidencia de ADNpl (Gernandt et al. 2009). Aunque también habría que considerar a *P. pseudostrobus* en trabajos de hibridación en los que se involucre a *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

Un carácter que ha confundido la distinción entre *P. pseudostrobus*, *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son las intrusiones de la hipodermis. Martínez (1948) considera que la histología de la hoja de *P. maximinoi* apoya su estatus de especie. En su trabajo sobre los pinos mexicanos, Shaw (1909) consideró los caracteres internos de las hojas para describir a *P. maximinoi*. En el trabajo de Shaw (1909), se muestran dibujos de secciones transversales de hoja del ejemplar 620 de Hartweg (*P. maximinoi*), en donde se observan intrusiones de la hipodermis en contacto con la endodermis. En *P. maximinoi* la intrusión de la hipodermis en contacto con la endodermis no representa un carácter constante (Stead 1983b; Stead y Styles 1984). En este trabajo los ejemplares de *P. maximinoi* sin intrusiones en contacto con la endodermis fueron identificados como *P. aff. maximinoi*. La falta de intrusiones no fue apoyada completamente por la evidencia molecular, ya que algunas secuencias de *P. aff. maximinoi* fueron idénticas a las típicas de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, pero otras se agruparon con *P. pseudostrobus*. Debido a la posible similitud entre *P. aff. maximinoi* y *P. pseudostrobus* es necesario considerar la presencia de conos con pedúnculos persistentes para distinguir a dichas taxa (Stead y Styles 1984). El cono con pedúnculo persistente también podría funcionar para diferenciar a *P. aff. douglasiana* de *P. pseudostrobus*, en caso de existir confusión en la identificación de ambas especies. En este trabajo se propone la hipótesis de que *P. aff. douglasiana* pertenece a *P. douglasiana*. Hay que recordar que *P. aff. douglasiana* no presenta intrusiones en contacto con la endodermis, pero sus conos tienen un pedúnculo persistente. La evidencia molecular apoya esta hipótesis. Los ejemplares de *P. aff. douglasiana* podría ser confundidos con los de *P. maximinoi* si no se toman en consideración las pequeñas diferencias, por ejemplo, la presencia de escamas rectas y rígidas en el cono de *P. aff. douglasiana*, comparadas con las escamas delgadas y curvas de *P. maximinoi*. Ya Martínez (1948) había descrito formas que coinciden con las características de *P. maximinoi*, pero sin intrusiones en contacto con la endodermis y con escamas gruesas y fuertes. De acuerdo con Martínez (1948), las formas afines a *P. maximinoi* relacionan a esta última con *P. douglasiana* y *P. pseudostrobus*. De las pocas secuencias de *P. aff. maximinoi* incluidas en este trabajo, algunas se agrupan con *P. maximinoi* y *P. douglasiana* y otras con *P. pseudostrobus*. Si aceptamos que *P. aff. maximinoi* es un grupo análogo a *P. aff. douglasiana*, es posible pensar en que *P. aff. maximinoi* posee predominantemente haplotipos típicos de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Esto último es factible si observamos que los

ejemplares de *P. aff. douglasiana* presentaron predominantemente haplotipos, tanto de mitocondria como de plasto, típicos de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Reconocer a *P. aff. douglasiana* podría ayudar a establecer límites más precisos entre *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana*. Sería interesante investigar si *P. aff. maximinoi* y *P. aff. douglasiana* se distribuyen en áreas al este del Eje Volcánico (Estado de México), Sierra Madre del Sur (Oaxaca y Guerrero) o Sierra de Juárez (Oaxaca), y si es así, con qué frecuencia se presentan. En todos los estudios futuros con relación a *P. douglasiana* y *P. maximinoi* sería aconsejable incluir a *P. aff. douglasiana*.

Conclusión basada en el criterio de divergencia ecológica

Parece que las especies del complejo *Pseudostrobus* presentan diferencias, aunque no tan marcadas y claras, en lo que respecta a sus diferencias climáticas. Dichas diferencias están asociadas a su vez a diferencias en los rangos de distribución en cuanto a latitud y elevación (López-Reyes et al. 2015). *Pinus maximinoi*, adaptada a condiciones subtropicales, se distribuye en áreas de menor elevación que *P. douglasiana* y *P. pseudostrobus*. Además *P. maximinoi* es sensible a las heladas (temperaturas menores a los -3° C) (Dvorak et al. 2000; Mitchell et al. 2013). Es muy probable que la temperatura ambiental asociada a la altitud sea un factor determinante en la distribución de *P. maximinoi*. Las diferencias climáticas parecen estar asociadas con las diferencias morfológicas entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Sin embargo, la falta de límites claros entre las formas de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* dificulta hacer un esquema preciso de su distribución. Estas diferencias no son congruentes con el patrón general encontrado en la estructura de la variación génica de plasto y el núcleo. Por su parte *P. pseudostrobus* parece estar mejor adaptada a climas templados en áreas de mayor altitud que *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Además, la variación morfológica de *P. pseudostrobus* indica que esta especie es influenciada en menor grado que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* por las condiciones climáticas. Tal vez, *P. pseudostrobus* está adaptada a intervalos climáticos más amplios que *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, porque surgió antes de que lo hicieran *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Parece que *P. yecorensis* está adaptada a condiciones de menor precipitación que *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, pero es necesario un estudio más detallado al respecto.

Especiación en *P. douglasiana* y *P. maximinoi*

Por su escasa divergencia, *P. douglasiana* y *P. maximinoi* podrían servir para estudiar los procesos de especiación en plantas. Con respecto a la especiación en pinos, se debe tomar en cuenta que muestran barreras incompletas al flujo génico y poblacionales con tamaños efectivos grandes, lo que implica considerar procesos como el sorteo incompleto de linajes y la introgresión

promovida por la hibridación. La especiación en pinos podría ser mucho más lenta que en otras especies vegetales. En las angiospermas la tasa de especiación se ve promovida por la influencia de agentes polinizadores, por ejemplo, insectos o aves (Crepet y Nixon 1998). En pinos la polinización ocurre solo con la ayuda del viento.

Se ha propuesto que la alopatría es la causa principal de la especiación en plantas (Coyne y Orr 1998; Hey et al. 2005; Hvala y Wood 2012). Los estudios poblacionales en pinos indican que el aislamiento geográfico es una de las principales causas de la divergencia en el ADN citoplásmico entre especies o poblaciones. En *Pinus*, se ha propuesto el modelo de especiación alopatrica seguida de contacto secundario (Wagner et al. 1987; Syring et al. 2007a; Wachowiak y Prus-Głowacki 2008; Moreno-Letelier et al. 2013; Wang y Wang 2014). En los ejemplos de especies de *Pinus* que surgieron mediante especiación alopatrica y después entraron en contacto secundario con sus especies hermanas, se han logrado identificar poblaciones bien diferenciadas correspondientes a cada especie, y una zona de contacto secundario formada por poblaciones híbridas en donde los individuos tiene formas intermedias o haplotipos de las especies parentales (Govindaraju et al. 1989; Wachowiak y Prus-Głowacki 2008; Ren et al. 2012). En la presente investigación no fue posible determinar la existencia inequívoca de zonas híbridas que indicaran especiación alopatrica, seguida de contacto secundario entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Sin embargo, posiblemente existe una zona de hibridación entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en el oeste del Eje Volcánico, donde se ha reportado que es difícil distinguir a *P. douglasiana* de *P. maximinoi* (Stead 1983b). Ante el escenario de una zona híbrida en el oeste del Eje Volcánico, es posible suponer que en algún momento *P. douglasiana* estuvo aislada de *P. maximinoi*, pero no el tiempo suficiente como para que se diferenciaron por completo. Posiblemente *P. douglasiana* se ha estado adaptando a las condiciones templadas en el noroeste y oeste de México, mientras que *P. maximinoi* se ha estado adaptando a los climas subtropicales prevalecientes en el sur de México. Es poco probable que haya ocurrido especiación parapátrica entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Para que ocurra especiación simpátrica o parapátrica debe haber selección disruptiva, diferencias fenológicas o la existencia de agentes que promuevan el aislamiento reproductivo. Por ejemplo, se sabe que la existencia de polinizadores puede promover la divergencia en muchas angiospermas (Hvala y Wood 2012; Veltsos y Ritchie 2011).

Conclusión final

Por la escasa divergencia entre *P. douglasiana* y *P. maximinoi* existe la posibilidad de que ambas sean especies incipientes. En algunos grupos la divergencia de algunos caracteres o genes puede ocurrir en ausencia de independencia evolutiva, por ejemplo, debido a la influencia de la selección

natural que actúa de manera diferente en dos poblaciones que continúan intercambiando genes (Hey y Pinho 2012). Farjon y Styles (1997) opinan que existen especies que poseen una amplia variación en sus formas, pero que dicha variación está asociada a su amplia distribución geográfica y no necesariamente se tienen que reconocer más especies. Existen estudios en donde se muestra que ciertos caracteres, por ejemplo, las dimensiones de los conos, se ven influenciados por el ambiente (Márquez-Ramírez et al. 2007). En general se ha encontrado que los pinos muestran una amplia respuesta fisiológica a las variaciones climáticas (Rundel y Yoder 1998). Shaw (1914) piensa que los caracteres que dependen del medio, como las dimensiones del cono y de las hojas, no son de gran importancia para reconocer especies. Al respecto Martínez (1948) opina que en la práctica es difícil discernir hasta qué punto ciertos caracteres muestran efectos transitorios motivados por el medio y hasta qué punto pueden considerarse como fijos y de valor taxonómico como para reconocer especies.

En ausencia de caracteres fijos y exclusivos en las especies de un complejo, con base en estudios poblacionales es muy difícil decidir qué tanta divergencia y qué clase de caracteres o genes deben ser considerados para tener un criterio objetivo en la diagnosis de especies (Hey y Pinho 2012). Con la evidencia mostrada en este trabajo no es posible afirmar contundentemente que *P. douglasiana* y *P. maximinoi* son dos especies diferentes. Tal vez, lo mejor es seguir una actitud conservadora y considerar a *P. douglasiana* y *P. maximinoi* especies incipientes. Tal vez sería conveniente realizar un estudio para averiguar qué efecto tiene el ambiente en la variación morfológica y fenológica de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.

LITERATURA CITADA

- Abdelaziz, M., Lorite J., Muñoz-Pajares, A. J., Herrador, M. B., Perfectti, F. y Gómez, J. M. (2011). Using complementary techniques to distinguish cryptic species: A new *Erysimum* (Brassicaceae) species from North Africa. *American Journal of Botany*, 98: 1049–1060.
- Amitani, Y. (2010). *The persistence question of the species problem*. Tesis doctoral. Vancouver, Universidad de Columbia Británica. Recuperado de <https://open.library.ubc.ca/cIRcle/collections/24/items/1.0071552> (Trabajo original publicado en 2010).
- Anacker, B. L. y Strauss, S. Y. (2014). The geography and ecology of plant speciation: Range overlap and niche divergence in sister species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 281: 1–8.
- Andersson, L. (1990). The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon*, 39: 375–382.
- Avise, J. C. y Ball, R. M. (1990). Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7: 45–67.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., ... y Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489–522.
- Axelrod, D. I. (1986). Cenozoic history of some western American pines. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 73: 565–641.
- Barracough, T. G. y Nee, S. (2001). Phylogenetics and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 391–399.
- Barrett, C. F. y Freudenstein, J. V. (2009). Patterns of morphological and plastid DNA variation in the *Corallorhiza striata* species complex (Orchidaceae). *Systematic Botany*, 34: 496–504.
- Barrett, C. F. y Freudenstein, J. V. (2011). An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology*, 20: 2771–2786.
- Baum, D. A. y Shaw, K. L. (1995). Genealogical perspectives on the species problem. En P. C. Hoch y A. C. Stephenson (Eds.), *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics* (pp. 289-303). San Louis, Estados Unidos de América: Missouri Botanical Garden.
- Birky, C. W. (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 11331–11338.
- Birky, C. W., Fuerst, P. y Maruyama, T. (1989). Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: Equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121: 613–627.
- Birky, C. W., Maruyama, T. y Fuerst, P. (1983). An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, 103: 513–527.
- Bonhomme, F., Rivals, E., Orth, A., Grant, G. R., Jeffreys, A. J. y Bois, P. R. (2007). Species-wide distribution of highly polymorphic minisatellite markers suggests past and present genetic exchanges among house mouse subspecies. *Genome Biology*, 8: 1–15.
- Burge, D. O. y Zhukovsky, K. (2013). Taxonomy of the *Ceanothus vestitus* Complex

- (Rhamnaceae). *Systematic Botany*, 38: 406–417.
- Burger, W. C. (1975). The species concept in *Quercus*. *Taxon*, 24: 45–50.
- Businský, R. (2004). A revision of the Asian *Pinus* subsection *Strobus* (Pinaceae). *Willdenowia*, 34: 209–257.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M. y Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22: 4369–4383.
- Carvajal, S. y McVaugh, R. (1992). *Pinus*. En R. McVaugh (Ed.), *Flora Novo-Galiciana 17, Gymnosperms and Pteridophytes* (pp. 32–100). Ann Arbor, Estados Unidos de América: University of Michigan Herbarium.
- CBOL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 12794–12797.
- Chifman, J. y Kubatko, L. (2014). Quartet inference from SNP data under the coalescent model. *Bioinformatics*, 30(23), 3317–3324.
- Clement, M., Posada, D. y Crandall, K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.
- CONABIO (1997). Provincias biogeográficas de México. Escala 1: 4 000 000. D. F., México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/> [acceso octubre de 2015]
- Coppée, A. (2010). *Bombus terrestris* (L. 1758): A complex species or a species complex? Intraspecific pheromonal and genetic variations of *Bombus terrestris* (L.), impacts on the speciation. Tesis doctoral. Université de Mons, Faculté des Sciences, Bélgica. Recuperado de http://www.atlashymenoptera.net/biblio/Coppee_Ph_D_complet.pdf
- Coyne, J. A. y Orr, H. A. (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 353: 287–305.
- Crandall, K. A. y Templeton, A. R. (1993). Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134: 959–969.
- Crepet, W. L. y Nixon, K. C. (1998). Fossil Clusiaceae from the Late Cretaceous (Turonian) of New Jersey and implications regarding the history of bee pollination. *American Journal of Botany*, 85: 1122–1133.
- Crisci, J. V. y López-Armengol, M. F. (1983). *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica* (Monografía N° 26). Washington, D. C., Estados Unidos de América: Secretaría General de la O. E. A, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Serie Biología.
- Critchfield, W. B. (1963). Hybridization of the southern pines in California. *Southern Forest Tree Improvement Commission Publication*, 22: 40–48.
- Critchfield, W. B. (1975). Interspecific hybridization in *Pinus*: A summary review. En D. P. Fowler y C. W. Yeatman (Eds.), *Symposium on interspecific and interprovenance hybridization in forest trees* (pp. 99–105). Fredericton, Canada: *Proceedings of the 14th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, Part 2*.
- Critchfield, W. B. (1986). Hybridization and classification of the white pines (*Pinus* section *Strobus*). *Taxon*, 35: 647–656.
- Critchfield, W. B. y Little, E. L. (1966). *Geographic distribution of the pines of the world*. Miscellaneous publication, No. 991. Washington, D. C., Estados Unidos de América: U. S.

Department of Agriculture, Forest Service.

- Cronquist, A. (1981). *An integral system of classification of flowering plants*. Nueva York, Estados Unidos de América: Columbia University Press.
- Davis, J. I. y Nixon, K. C. (1992). Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*, 41: 421–435.
- de Pinna, M. C. C. (1999). Species concepts and phylogenetics. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 353–373.
- de Queiroz, K. (1998). The general lineage concept of species, species criteria, and process of speciation. En D. J. Howard y S. H. Berlocher (Eds.), *Endless forms: Species and speciation* (pp. 57–67). New York, Estados Unidos de América: Oxford University Press.
- de Queiroz, K. (2005). Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 6600–6607.
- de Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56: 879–886.
- de Queiroz, K. y Donoghue, M. J. (1988). Phylogenetic systematics and the species problem. *Cladistics*, 4: 317–338.
- Debreczy, Z. y Rácz, I. (1995). New species and varieties of conifers from Mexico. *Phytologia*, 78: 217–243.
- Debreczy, Z. y Rácz, I. (2011). *Conifers around the world*. Volúmenes 1 y 2. Budapest, Hungría: DendroPress Ltd.
- Debreczy, Z., Musial, K. y Rácz, I. (2011). The “apulco ravine pine” –its morphology, taxonomy, and relationships. *Studia Botanica Hungarica*, 42: 77–101.
- Degnan, J. H. y Rosenberg, N. A. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology and Evolution*, 24: 332–340.
- Delgado, P., Salas-Lizana, R., Vázquez-Lobo, A., Wegier, A., Anzidei, M., Alvarez-Buylla, E. R., Vendramin, G. G. y Piñero, D. (2007). Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb. and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae): Morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences*, 168: 861–875.
- Demesure, B., Sodzi, N. y Petit, R. J. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4: 129–134.
- DeSalle, R., Egan, M. G. y Siddall, M. (2005). The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 360: 1905–1916.
- DeGiorgio, M., Syring, J., Eckert, A. J., Liston, A., Cronn, R., Neale, D. B., Rosenberg, N. A. (2014). An empirical evaluation of two-stage species tree inference strategies using a multilocus dataset from North American pines. *BMC Evolutionary Biology*, 14: 1–21.
- Dobzhansky, T., Ayala, F. J., Stebbins, G. L., y Valentine, J. W. (1977). *Evolution*. San Francisco, Estados Unidos de Norte América: W. H. Freeman and Company.
- Dombrovska, O. y Qiu, Y.-L. (2004). Distribution of introns in the mitochondrial gene *nad1* in land plants: Phylogenetic and molecular evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 246–263.
- Donnelly, P. y Tavaré, S. (1986). The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied*

- Probability*, 18: 1–19.
- Donnelly, P. y Tavaré, S. (1995). Coalescents and genealogical structure under neutrality. *Annual Review of Genetics*, 29: 401–421
- Dong, W., Xu, C., Li, C., Sun, J., Zuo, Y., Shi, S., ... y Zhou, S. (2015). *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific reports*, 5: 1–5.
- Donoghue, M. J. (1985). A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*, 88: 172–181.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- Duffield, J. W. (1952). Relationships and species hybridization in the genus *Pinus*. *Zeitschrift für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung*, 1: 93–100.
- Dvorak, W. S., Gutiérrez, E. A., Gapare, W. J., Hodge, G. R., Osorio, L. F., Bester C. y Kikuti, P. (2000). *Pinus maximinoi*. En CAMCORE Cooperative (Ed.), *Conservation and testing of tropical and subtropical forest tree species by the CAMCORE Cooperative* (pp. 106–127). Raleigh, Estados Unidos de América: College of Natural Resources, NCSU.
- Eckert, A. J. y Hall, B. D. (2006). Phylogeny, historical biogeography, and patterns of diversification for *Pinus* (Pinaceae): Phylogenetic tests of fossil-based hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 166–182.
- Edwards, D. L. y Knowles, L. L. (2014). Species detection and individual assignment in species delimitation: Can integrative data increase efficacy?. *Proceedings of the Royal Society B*, 281: 1–7.
- Egan, A. N., Schlueter, J. y Spooner, D. M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany*, 99: 175–185.
- Ellstrand, N. C. (2014). Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American Journal of Botany*, 101: 737–753.
- Engelmann, G. (1880). Revision of the genus *Pinus*, and description of *Pinus elliottii*. *Transactions of the Academy of Science of St. Louis*, 4: 161–198
- Ennos, R. (1994). Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72: 250–259.
- Ennos, R. A., Sinclair, W. T., Hu, X. -S. y Langdon, A. (1999). Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. En P. M. Hollingsworth, R. M. Bateman y R. J. Gornall (Eds.). *Molecular Systematics and Plant Evolution* (pp. 1-19). Londres, Inglaterra: Taylor & Francis.
- Ereshefsky, M. (2011). Mystery of mysteries: Darwin and the species problem. *Cladistics*, 27: 67–79.
- Escalante, T. (2009). Un ensayo sobre regionalización biogeográfica. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80: 551–560.
- Ettori, L. d. C., Sato, A. S. y Shimizu, J. Y. (2004). Variação genética em procedências e progênes mexicanas de *Pinus maximinoi*. *Revista do Instituto Florestal, São Paulo*, 16: 1–9.
- Excoffier, L. y Lischer, H. (2010). Arlequin ver 3.5.1.2: An integrated software package for population genetics data analysis (2010 user manual). Bern, Suiza: Computational and molecular population genetics lab (CMPG), Institute of Ecology and Evolution, University of Berne.

- Excoffier, L., Smouse, P. E. y Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
- Farjon, A. (1995). Typification of *Pinus apulcensis* Lindley (Pinaceae), a misinterpreted name for a Latin American pine. *Novon*, 5: 252–256.
- Farjon, A. (1996). Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: Speciation and palaeo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121: 365–384.
- Farjon, A. (2005). *Pines: Drawings and descriptions of the genus Pinus*. Segunda edición. Leiden, Holanda: Brill.
- Farjon, A. y Filer, D. (2013). *An Atlas of the world's conifers: An analysis of their distribution, biogeography, diversity and conservation status*. Leiden, Holanda: Brill.
- Farjon, A. y Styles, B. T. (1997). *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica, Monograph 75. Nueva York, Estados Unidos de América: The New York Botanical Garden.
- Farjon, A., Pérez-de la Rosa, J. A. y Styles, B. T. (1997). *A field guide to the pines of Mexico and Central America*. Richmond, Reino Unido: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Feng, X., Liu, J. y Gong, X. (2016). Species delimitation of the *Cycas segmentifida* complex (Cycadaceae) resolved by phylogenetic and distance analyses of molecular data. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1–11.
- Ferguson, G. M., Felger, R. S. y Johnson M. B. (2001). Conifers. En R. S. Felger, M. B. Johnson y M. F. Wilson (Eds.). *Tress of Sonora, Mexico* (pp. 35–58). Nueva York, Estados Unidos de América: Oxford University Press.
- Ferrusquía-Villafranca, I. (1993). Geology of Mexico: A synopsis. En T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Eds.). *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (pp. 3–107). Nueva York, Estados Unidos de América: Oxford University Press.
- Fisher, R. A. (1936). "The coefficient of racial likeness" and the future of craniometry. *The Journal of the Royal Anthropological Institute of Great Britain and Ireland*, 66: 57–63.
- Fitzpatrick, B. M., Fordyce, J. A. y Gavrillets, S. (2009). Pattern, process and geographic modes of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 22: 2342–2347.
- Flores-Rentería, L., Wegier, A., Ortega-Del Vecchyo D., Ortíz-Medrano, A., Piñero, D., Whipple, A. V., Molina-Freaner F. y Domínguez, C. A. (2013). Genetic, morphological, geographical and ecological approaches reveal phylogenetic relationships in complex groups, an example of recently diverged pinyon pine species (subsection *Cembroides*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69: 940–949.
- Folk, R. A., Mandel, J. R. y Freudenstein, J. V. (2016). Ancestral gene flow and parallel organellar genome capture result in extreme phylogenomic discord in a lineage of angiosperms. *Systematic Biology*, 101: 1–19.
- Friendly, M. y Fox, J. (2011). 'candisc': Generalized canonical discriminant analysis. R package version 0.5-21. <http://CRAN.R-project.org/package=candisc>
- Fujisawa, T., Aswad, A. y Barraclough, T. G. (2016). A rapid and scalable method for multilocus species delimitation using Bayesian model comparison and rooted triplets. *Systematic Biology*, 65: 759–771.
- Futuyma, D. J. (1983). *Science on trial: the case for evolution*. Nueva York, Estados Unidos de América: Pantheon.

- Gao, J., Wang, B., Mao, J. -F., Ingvarsson, P., Zeng, Q. -Y. y Wang, X. R. (2012). Demography and speciation history of the homoploid hybrid pine *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *Molecular Ecology*, 21: 4811–4827.
- García, E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. D. F., México: Instituto de Geografía, UNAM.
- García, E. y CONABIO (1998). '*Climas*' (*clasificación de Köppen, modificado por García*). Escala 1: 1000000. D. F., México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/> [acceso Abril 15 de 2016]
- Geada-López, G., Kamiya, K. y Harada, K. (2002). Phylogenetic relationships of diploxylon pines (subgenus *Pinus*) based on plastid sequence data. *International Journal of Plant Science*, 163: 737–747.
- Gernandt, D. S. y Pérez-de la Rosa, J. A. (2014). Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 126–133.
- Gernandt, D. S., Liston, A. y Piñero, D. (2003). Phylogenetics of *Pinus* subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* inferred from cpDNA sequences. *Systematic Botany*, 28: 657–673.
- Gernandt, D. S., Geada-López, G., Ortíz-García, S. y Liston, A. (2005). Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, 54: 29–42.
- Gernandt, D. S., Hernández-León, S., Salgado-Hernández, E. y Pérez de la Rosa, J. A. (2009). Phylogenetic relationships of *Pinus* subsection *Ponderosae* inferred from rapidly evolving cpDNA regions. *Systematic Botany*, 34: 481–491.
- Ghiselin, M. T. (1997). *Metaphysics and the origin of species*. Albany, Estados Unidos de América: State University of New York Press.
- Ghiselin, M. T. (2010). Species Concepts. En H. Kehler-Sawatzki (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–6). Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd.
- Godbout, J., Beaulieu, J. y Bousquet, J. (2010). Phylogeographic structure of jack pine (*Pinus banksiana*; Pinaceae) supports the existence of a coastal glacial refugium in northeastern North America. *American Journal of Botany*, 97: 1903–1912.
- Govindaraju, D. R., Dancik, B. P. y Wagner D. B. (1989). Novel chloroplast DNA polymorphism in a sympatric region of two pines. *Journal of Evolutionary Biology*, 2: 49–59.
- Grant, V. (1971). *Plant speciation*. Nueva York, Estados Unidos de América: Columbia University Press.
- Greguss, P. (1972). *Xylotomy of the living conifers*. Budapest, Hungría: Akadémiai Kiadó.
- Griffiths, R. C. (1980). Lines of descent in the diffusion approximation of neutral Wright-Fisher models. *Theoretical Population Biology*, 17: 37–50.
- Hall, T. A. (1999). Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.
- Hao, Z.-Z., Liu, Y.-Y., Nazaire, M., Wei, X.-X. y Wang, X.-Q. (2015). Molecular phylogenetics and evolutionary history of sect. *Quinquefoliae* (*Pinus*): Implications for northern hemisphere biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 87: 65–79.
- Harding, R. (1996). New phylogenies: An introductory look at the coalescent. En P. H. Harvey, J. A. Leigh-Brown, J. Maynard-Smith y S. Nee (Eds.). *New Uses for New Phylogenies* (pp. 15–22). Oxford, Inglaterra: Oxford University Press.

- Harrison, R. G. (1991). Molecular changes at speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 281–308.
- Harrison, R. G. y Larson, E. L. (2014). Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105: 795–809.
- Hebert, P. D. N. y Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54: 852–859.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. y deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270: 313–321.
- Henderson, A. (2005). The methods of herbarium taxonomy. *Systematic Botany*, 30: 456–469.
- Henderson, A. (2006). Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151: 103–111.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetic systematics*. Urbana, Estados Unidos de América: University of Illinois Press.
- Hernández-León, S., Gernandt, D. S., Pérez de la Rosa, J. A. y Jardón-Barbolla, L. (2013). Phylogenetic relationships and species delimitation in *Pinus* section *Trifoliae* inferred from plastid DNA. *PLoS one*, 8: 1–14.
- Hey, J. y Pinho, C. (2012). Population genetics and objectivity in species diagnosis. *Evolution*, 66: 1413–1429.
- Hey, J., Fitch, W. M. y Ayala, F. J. (2005). Systematics and the origin of species: An introduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 6515–6519.
- Hipkins, V. D., Krutovskii, K. V. y Strauss, S. H. (1994). Organelle genomes in conifers: Structure, evolution, and diversity. *Forest Genetics*, 1: 179–189.
- Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 19451–19452.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W. y Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS one*, 6: 1–13.
- Huang, D. I. y Friar, E. A. (2011). Relationships in the *Lupinus albifrons* species complex (Fabaceae) based on two highly variable chloroplast regions. *Systematic Botany*, 36: 362–370.
- Hudson, R. R. (1990). Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7: 1–44.
- Hvala, J. A. y Wood, T. E. (2012). Speciation: Introduction. En H. Kehrler-Sawatzki (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–10). Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd.
- Ickert-Bond, S. M. (2000). Cuticle micromorphology of *Pinus krempfii* Lecomte (Pinaceae) and additional species from Southeast Asia. *International Journal of Plant Sciences*, 161: 301–317.
- Jählig, M. (1962). Beiträge zur nadelanatomie und taxonomie der gattung *Pinus* L. *Willdenowia*, 3: 329–366.
- Jardón-Barbolla, L., Delgado-Valerio, P., Geada-López, G., Vázquez-Lobo, A. y Piñero, D. (2011). Phylogeography of *Pinus* subsection *Australes* in the Caribbean Basin. *Annals of Botany*, 107: 229–241.
- Johnson, L. A. y Cairns-Heath, H. (2010). Decrypting cryptic species: Morphological and molecular

- evidence for recognizing *Navarretia linearifolia* as distinct from *N. sinistra* (Polemoniaceae). *Systematic Botany*, 35: 618–628.
- Kawakami, T. y Butlin, R. K. (2012). Hybrid zones. En H. Kehrer-Sawatzki (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–12). Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001752.pub2eLS.
- Keng, H. y Little, E. L. Jr. (1961). Needle characteristics of hybrid pines. *Silvae Genetica*, 10: 131–146.
- Kikuchi, S., Bédard J, Hirano, M., Hirabayashi, Y., Oishi, M., Imai, M., ... y Nakai, M. (2013). Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science*, 339: 571–574.
- Kingman, J. F. C. (1982). The coalescent. *Stochastic Processes and Their Applications*, 13: 235–248.
- Kizirian, D. y Donnelly, M. A. (2004). The criterion of reciprocal monophyly and classification of nested diversity at the species level. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 1072–1076.
- Keng, H. y Little, E. L. (1961). Needle characteristics of hybrid pines. *Silvae Genetica*, 10: 131–146.
- Knowles, L. L. y Carstens, B. C. (2007). Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, 56: 887–895.
- Kolaczowski, B. y Thornton, J. W. (2004). Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature*, 431: 980–984.
- Köppen, W. (1936). *Das geographische system der klimate*. Berlín, Alemania: Verlag von Gebrüder Borntraeger.
- Kuhner, M. K. (2009). Coalescent genealogy samplers: Windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution*, 24: 86–93.
- Kynčlová, A., Škaloud, P. y Škaloudová, M. (2010). Unveiling hidden diversity in the *Synura petersenii* species complex (Synurophyceae, Heterokontophyta). *Nova Hedwigia*, 136: 283–298.
- Leavitt, S. D., Moreau, C. S. y Lumbsch, H. T. (2015). The dynamic discipline of species delimitation: Progress toward effectively recognizing species boundaries in natural populations. En D. K. Upreti, P. K. Divakar, V. Shukla, R. Bajpai (Eds.), *Recent advances in lichenology: Modern methods and approaches in lichen systematics and culture techniques*, volumen 2 (pp. 11–44). Nueva Delhi, India: Springer.
- Ledig, F. T. (1998). Genetic variation in *Pinus*. En D. M. Richardson (Ed.), *Ecology and biogeography of Pinus* (pp. 251–280). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F. López-Bautista, J. M., Zuccarello, G. C. y de Clerck, O. (2014). DNA-based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology*, 49: 179–196.
- Linneo C. (1753). *Species plantarum: Exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Holmiae: Impensis Laurentii Salvii. 2: 1001.*
<http://biodiversitylibrary.org/page/358581>
- Liston, A., Robinson, W. A., Piñero, D. y Alvarez-Buylla, E. R. (1999). Phylogenetics of *Pinus*

- (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11: 95–109.
- Liston, A., Gernandt, D. S., Vining, T. F., Campbell, C. S. y Piñero D. (2003). Molecular phylogeny of Pinaceae and *Pinus*. *Acta Horticulturae*, 615: 107–114.
- Liston, A., Parker-Defeniks, M., Syring, J. V., Willyard, A. y Cronn, R. (2007). Interspecific phylogenetic analysis enhances intraspecific phylogeographical inference: A case study in *Pinus lambertiana*. *Molecular Ecology*, 16: 3926–3937.
- Little, E. L. y Critchfield, W. B. (1969). *Subdivision of the genus Pinus (pines)*. Miscellaneous Publication No. 1144. Washington, D. C., Estados Unidos de América: U. S. Department of Agriculture.
- Lockwood, J. D., Aleksić, J. M., Zou, J., Wang, J., Liu, J. y Renner, S. S. (2013). A new phylogeny for the genus *Picea* from plastid, mitochondrial, and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69: 717–727.
- López-Reyes, A., Pérez de la Rosa, J., Ortiz, D. y Gernandt, D. S. (2015). Morphological, Molecular, and Ecological Divergence in *Pinus douglasiana* and *P. maximinoi*. *Systematic Botany* 40: 658–670.
- Luckow, M. (1995). Species concepts: Assumptions, methods, and applications. *Systematic Botany*, 20: 589–605.
- Maddison, W. P. (1997). Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46: 523–536.
- Maddison, D. R., Swofford, D. L. y Maddison, W. P. (1997). NEXUS: An extensible file format for systematic information. *Systematic Biology*, 46: 590–621.
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., y Hornik, K. (2012). 'cluster': Cluster analysis basics and extensions. R package version 1.14.2.
- Mallet, J. (1995). A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 10: 294–299.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 229–237.
- Mallet, J. (2007a). Species, Concepts of. En S. Levin et al. (Eds.), *Encyclopedia of biodiversity* (pp. 1–15). Oxford, Inglaterra: Academic Press, Elsevier. Recuperado de <http://www.ucl.ac.uk/taxome/jim/Sp/species.pdf>
- Mallet, J. (2007b). Subspecies, semispecies, superspecies. En S. Levin et al. (Eds.), *Encyclopedia of biodiversity* (pp. 1–5). Oxford, Inglaterra: Academic Press, Elsevier. Recuperado de www.ucl.ac.uk/taxome/jim/Sp/Sub-semi.pdf
- Manly, B. F. J. (1994). *Multivariate statistical methods: A primer*. Londres, Reino Unido: Shapman y Hall.
- Márquez-Ramírez, J., Rebolledo-Camacho, V. y Contreras y Zayas, J. L. (2007). Variación de conos de *Pinus oaxacana* Mirov en una población de los molinos, municipio de Perote, Veracruz. *Foresta Veracruzana*, 9: 45–50.
- Martínez, M. (1943). Una nueva especie de *Pinus* mexicano. *Madroño*, 7: 4–8.
- Martínez, M. (1945). Las pináceas mexicanas. *Anales del Instituto de Biología*, 16: 168–201.
- Martínez, M. (1948). *Los pinos mexicanos*. D. F., México: Ediciones Botas.
- Mastretta-Yanes, A., Moreno-Letelier, A., Piñero, D., Jorgensen, T. H. y Emerson, B. C. (2015).

- Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Journal of Biogeography*, 42: 1586–1600.
- Matos, J. A. y Schaal, B. A. (2000). Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A coalescent approach to hybridization. *Evolution*, 54: 1218–1233.
- Mayden R. L. (1997). A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. En M. F. Claridge, H. A. Dawah, y M. R. Wilson (Eds.). *Species: The units of biodiversity* (pp. 381–424). Londres, Inglaterra: Chapman and Hall.
- Mayr, E. (1987). The ontological status of species: Scientific progress and philosophical terminology. *Biology and Philosophy*, 2: 145–166.
- Mayr, E. (1996). What is a species, and what is not? *Philosophy of Science*, 63: 262–277.
- Mayr, E. (2000). The biological species concept. En Q. D. Wheeler y R. Meier (Eds.), *Species concepts and phylogenetic theory: A debate* (pp. 17–29). New York, Estados Unidos de América: Columbia University Press.
- McCormack, J. E., Hird, S. M., Zellmer, A. J., Carstens, B. C. y Brumfield, R. T. (2013). Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 526–538.
- McGarigal, K., Cushman, S. A. y Stafford, S. (2000). *Multivariate statistics for wildlife and ecology research*. Nueva York, Estados Unidos de América: Springer Verlag.
- Meier, R. y Willmann, R. (2000). The hennigian species concept. En Q. D. Wheeler y R. Meier (Eds.), *Species concepts and phylogenetic theory: A debate* (pp. 30–43). Nueva York, Estados Unidos de América: Columbia University Press.
- Mirarab, S. y Warnow, T. (2015). ASTRAL-II: coalescent-based species tree estimation with many hundreds of taxa and thousands of genes. *Bioinformatics*, 31: i44–i52.
- Mirov, N. T. (1958). *Pinus oaxacana*, a new species from Mexico. *Madroño*, 14: 145–150.
- Mirov, N. T. (1967). *The genus Pinus*. Nueva York, Estados Unidos de América: The Ronald Press Company.
- Mishler, B. D. (1985). The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. *Bryologist*, 88: 207–214.
- Mishler, B. D. y Theriot, E. C. (2000). The phylogenetic species concept (sensu Mishler and Theriot): Monophyly, apomorphy, and phylogenetic species concepts. En Q. D. Wheeler y R. Meier (Eds.), *Species concepts and phylogenetic theory, a debate* (pp. 44–54). Nueva York, Estados Unidos de América: Columbia University Press.
- Mitchell, R. G., Wingfield, M. J., Hodge, G. R., Dvorak, W. S. y Coutinho, T. A. (2013). Susceptibility of provenances and families of *Pinus maximinoi* and *Pinus tecunumanii* to frost in South Africa. *New Forest*, 44: 135–146.
- Mittak, W. L. y Perry, J. P. Jr. (1979). *Pinus maximinoi*: Its taxonomic status and distribution. *Journal of the Arnold Arboretum*, 60: 386–395.
- Mogensen, H. L. (1996). The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany*, 83: 383–404.
- Moore, H. E. (1966). Nomenclatural notes on cultivated conifers. *Baileya*, 14: 1–11.
- Moreno-Letelier, A., Ortíz-Medrano, A. y Piñero, D. (2013). Niche divergence versus neutral processes: Combined environmental and genetic analyses identify contrasting patterns of

- differentiation in recently diverged pine species. *PLoS one*, 8: 1–10.
- Morrone, J. J. (2005). Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 76: 207–252.
- Müller, K. (2005). SeqState. *Applied Bioinformatics*, 4: 65–69.
- Nagahama, N., Anton, A. M. y Norrmann, G. A. (2014). Taxon delimitation in the *Andropogon lateralis* Complex (Poaceae) in Southern South America based on morphometrical analyses. *Systematic Botany*, 39: 804–813.
- Nakai, M. (2015). The TIC complex uncovered: The alternative view on the molecular mechanism of protein translocation across the inner envelope membrane of chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847: 957–967.
- Narave-Flores, H. y Taylor, K. (1997). *Flora de Veracruz (Pinaceae)*. Xalapa, México: Instituto de Ecología, A.C.
- Neale, D. B. y Sederoff, R. R. (1989). Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 212–216.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321–3323.
- Neigel, J. E. y Avise, J. C. (1986). Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. En E. Nevo, S. Karlin (Eds.). *Evolutionary processes and theory* (pp. 515–534). Nueva York, Estados Unidos de América: Academic Press.
- Nelson, G. J. y Platnick, N. I. (1981). *Systematics and biogeography: Cladistics and vicariance*. Nueva York, Estados Unidos de América: Columbia University Press.
- Neves, L. G., Davis, J. M., Barbazuk, W. B. y Kirst, M. (2013). A high-density gene map of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) based on exome sequence capture genotyping. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 4: 29–37.
- Nixon, K. C. (2006). Global and Neotropical distribution and diversity of oak (genus *Quercus*) and oak forests. En M. Kappelle (Ed.), *Ecology and conservation of Neotropical montane oak forests*, Volumen 185 (Ecological Studies) (pp. 3–13). Heidelberg, Alemania: Springer–Verlag.
- Nixon, K. C. y Wheeler, Q. D. (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics*, 6: 211–223.
- Ogg, J. G., Ogg, G. M. y Gradstein, F. M. (2016). *A Concise Geologic Time Scale: 2016*. Amsterdam, Holanda: Elsevier.
- Olvera-Coronel, L. P. (1985). *Descripción anatómica de la madera de siete especies del género Pinus*. D. F. México: Instituto Nacional de Ecología.
- Okuyama, Y. y Kato, M. (2009). Unveiling cryptic species diversity of flowering plants: Successful biological species identification of Asian *Mitella* using nuclear ribosomal DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 1–16.
- Padial, J. M., Castroviejo–Fisher, S., Köhler, J., Vilà, C., Chaparro, J. C. y De la Riva, I. (2009). Deciphering the products of evolution at the species level: The need for an integrative taxonomy. *Zoologica Scripta*, 38: 431–447.
- Padial, J. M. y de la Riva, I. (2010). A response to recent proposals for integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101: 747–756.

- Pamilo, P. y Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 568–583.
- Parks, M., Cronn, R. y Liston, A. (2009). Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BioMed Central Biology* 7: 1–17.
- Pérez de la Rosa, J. A. (1998). Promoción de una variedad de pino serótino mexicano a nivel de especie. *Boletín del Instituto de Botánica*, 5: 127–135.
- Perry, J. P. (1991). *The pines of Mexico and Central America*. Portland, Estados Unidos de América: Timber Press.
- Perry, J. P., Graham, A. y Richardson, D. M. (1998). The history of pines in Mexico and Central America. En D. M. Richardson (Ed.). *Ecology and Biogeography of Pinus* (pp.137–149). Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Petit, R. J. y Excoffier, L. (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution*, 24: 386–393.
- Petit, R. J. y Hampe, A. (2006). Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37: 187–214.
- Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. y Vendramin, G. G. (2005). Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14: 689–701.
- Posada, D. y Crandall, K. A. (2001). Intraspecific gene genealogies: Trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 37–45.
- Potter, K. M., Hipkins, V. D., Mahalovich, M. F. y Means, R. E. (2013). Mitochondrial DNA haplotype distribution patterns in *Pinus ponderosa* (Pinaceae): Range-wide evolutionary history and implications for conservation. *American Journal of Botany*, 100: 1562–1579.
- Powell, W., Machray, G. C. y Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1: 215–222.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., McNicol, J. W., Machray, G. C., Doyle, J. J., Tingey, S. V. y Rafalski, J. A. (1995). Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 5: 1023–1029.
- Price, R. A., Liston, A. y Strauss, S. H. (1998). Phylogeny and systematics of *Pinus*. En D. M. Richardson (Ed.), *Ecology and biogeography of Pinus* (pp. 49–68). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Raxworthy, C. J., Ingram, C. M., Rabibisoa, N. y Pearson, R. G. (2007). Applications of ecological niche modeling for species delimitation: A review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology*, 56: 907–923.
- Ren, G.-R., Abbott, R. J., Zhou, Y.-F., Zhang, L.-R., Peng, Y.-L. y Liu J.-Q. (2012). Genetic divergence, range expansion and possible homoploid hybrid speciation among pine species in Northeast China. *Heredity*, 108: 552–562.
- Richards, A. R. (2010). *The species problem: A philosophical analysis*. Nueva York, Estados Unidos de América: Cambridge University Press.

- Richardson, D. M. (Ed.) (1998). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Ridley, M. (1989). The cladistic solution to the species problem. *Biology and Philosophy*, 4: 1–16.
- Rieppel, O. (2010). Species monophyly. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48: 1–8.
- Rieseberg, L. H. (1997). Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28: 359–389.
- Rieseberg, L. H. y Brouillet, L. (1994). Are many plant species paraphyletic? *Taxon*, 43: 21–32.
- Rieseberg, L. H. y Carney, S. E. (1998). Plant hybridization. *New Phytologist*, 140: 599–624.
- Rieseberg, L. H., Wood, T. E. y Baack, E. J. (2006). The nature of plant species. *Nature*, 440: 524–527.
- Roezl, B. (1857). *Catalogue de graines de Conifères Mexicaines, en vente chez B. Roezl et Cie.; à Naples, près Mexico. Pour automne 1857 et printemps 1858*. M. Murguia. Mexico City.
- Rosen, D. E. (1979). Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 162: 267–376.
- Rundel, P. W. y Yoder, B. J. (1998). Ecophysiology of *Pinus*. En D. M. Richardson (Ed.). *Ecology and biogeography of Pinus* (pp. 296–323). Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Ryberg, P. E., Rothwell, G. W., Stockey, R. A., Hilton, J., Mapes, G. y Riding, J. B. (2012). Reconsidering relationships among stem and crown group Pinaceae: Oldest record of the genus *Pinus* from the Early Cretaceous of Yorkshire, United Kingdom. *International Journal of Plant Sciences*, 173: 917–932.
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México*. Primera edición digital. D. F., México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Rzedowski, G. C. de, Acosta-Castellanos S., Aguilar-Rodríguez S., Aguilar-Santelices, R., Akcelrad-Lerner de Scheinvar, L., Andrade-Malfavon, J. A.,... y Zamudio-Ruiz S. (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México*, segunda edición, primera reimpresión. Michoacán, México: Instituto de Ecología, AC. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Saitou, N. y Nei, M. (1986). The number of nucleotides required to determine the branching order of three species, with special reference to the human–chimpanzee–gorilla divergence. *Journal of Molecular Evolution*, 24: 189–204.
- Salisbury, R. A. (1796). *Prodromus stirpium in horto ad Chapel Allerton virginium*. Londres, Inglaterra. <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.427>
- Sandoval-Zapotitla, E., Rojas, A., Guzman, C., Carmona, L., Ponce, R. M., León, C., Loyola, C., Vallejo, M. A. y Medina, A. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la Anatomía Vegetal*. Cuadernos del Instituto de Biología. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Scholes, M. C. y Nowicki, T. E. (1998). Effects of pines on soil properties and processes. En D. M. Richardson (Ed.). *Ecology and Biogeography of Pinus* (pp.341–353). Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Schuster, W. S., Alles, D. L. y Mitton, J. B. (1989). Gene flow in limber pine: Evidence from

- pollination phenology and genetic differentiation along an elevational transect. *American Journal of Botany*, 76: 1395–1403.
- Shaw, G. R. (1909). *The pines of Mexico*. Boston, Estados Unidos de América: Publication of the Arnold Arboretum, No. 1.
- Shaw, G. R. (1914). *The genus Pinus, publication of the Arnold Arboretum No 5*. Cambridge, Estados Unidos de América: Riverside Press.
- Shaw, K. L. (1998). Species and the diversity of natural groups. En: D. J. Howard y S. H. Berlocher (Eds.), *Endless forms: Species and speciation* (pp. 44–56). Nueva York, Estados Unidos de América: Oxford University Press.
- Simmons, M. P. y Ochoterena, H. (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 49: 369–381.
- Simpson, G. G. (1951). The species concept. *Evolution*, 5: 285–298.
- Sinclair, W. T., Morman, J. D. y Ennos, R. A. (1999). The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: Evidence from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 8: 83–88.
- Sites, J. W. y Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 462–470.
- Sites, J. W. y Marshall, J. C. (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35: 199–227.
- Slatkin, M. (1987). The average number of sites separating DNA sequences drawn from a subdivided population. *Theoretical Population Biology*, 32: 42–49.
- Sneath, P. H. A. (1995). Thirty years of numerical taxonomy. *Systematic Biology*, 44: 281–298.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy*. San Francisco, Estados Unidos de América: W. H. Freeman.
- Soltis, D. E., Gitzendanner, M. A., Stull, G., Chester, M., Chanderbali, A., Chamala, S.,... y Barbazuk, W. B. (2013). The potential of genomics in plant systematics. *Taxon*, 62: 886–898.
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F. y Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 13486–13491.
- Sokal, R. R. (1973). The species problem reconsidered. *Systematic Zoology*, 22: 360–374.
- Sokal R. R. y Sneath, P. H. A. (1961). *Principles of Numerical Taxonomy*. San Francisco, Estados Unidos de América: W. H. Freeman.
- Soranzo, N., Alia, R., Provan, J. y Powell, W. (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.
- Stamos, D. N. (2003). *The species problem: Biological species, ontology, and the metaphysics of biology*. Lanham, Estados Unidos de América: Lexington Books.
- Stamos, D. N. (2007). *Darwin and the nature of species*. Albany, Estados Unidos de América: State University of New York Press.
- Standley, P. C. (1920–26). *Trees and shrubs of Mexico*. Contributions from the United States National Herbarium, Volumen 23. Washington, Estados Unidos de América: U. S. Government Printing Office.

- Stead, J. W. (1983a). A study of variation and taxonomy of the *Pinus pseudostrobus* complex. *The Commonwealth Forestry Review*, 62: 25–35.
- Stead, J. W. (1983b). Studies of variation in Central American pines V: A numerical study of variation in the *Pseudostrobus* group. *Silvae Genetica*, 32: 101–115.
- Stead, J. W. y Styles, B. T. (1984). Studies of Central American pines: A revision of the 'Pseudostrobus' group (Pinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 89: 249–275.
- Strandby, U., Christensen, K. I. y Sørensen, M. (2009). A morphometric study of the *Abies religiosa–hickelii–guatemalensis* complex (Pinaceae) in Guatemala and Mexico. *Plant Systematics and Evolution*. 280: 59–76.
- Styles, B. I. 1993. Genus *Pinus*: A Mexican purview. En T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Eds.). *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (pp. 397-420). Nueva York, Estados Unidos de América: Oxford University Press.
- Syring, J., Willyard, A., Cronn, R. y Liston, A. (2005). Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci. *American Journal of Botany*, 92: 2086–2100.
- Syring J., del Castillo, R. F., Cronn, R. y Liston, A. (2007a). Multiple nuclear loci reveal the distinctiveness of the threatened neotropical *Pinus chiapensis*. *Systematic Botany* 32: 703–717.
- Syring, J., Farrell, K., Businsky, R., Cronn, R. y Liston, A. (2007b). Widespread genealogical nonmonophyly in species of *Pinus* subgenus *Strobus*. *Systematic Biology*, 56: 163–181.
- Takahata, N. y Nei, M. (1985). Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide differences. *Genetics*, 110: 325–344.
- Tattersall, I. (2007). Madagascar's lemurs: cryptic diversity or taxonomic inflation? *Evolutionary Anthropology*, 16: 12–23.
- Tavaré, S. (1984). Line-of-descent and genealogical processes, and their applications in population genetics models. *Theoretical population biology*, 26: 119–164.
- Templeton, A. R. (1989). The meaning of species and speciation: A genetic perspective. En D. Otte y J. A. Endler (Eds.), *Speciation and its consequences* (pp. 3–27). Sunderland, Estados Unidos de América: Sinauer Associates.
- Templeton, A. R. (1998a). Nested clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381–397.
- Templeton, A. R. (1998b). Species and speciation: Geography, population structure, ecology, and gene trees. En D. J. Howard y S. H. Berlocher (Eds.). *Endless forms: Species and speciation* (pp. 32–43). Nueva York, Estados Unidos de América: Oxford University Press.
- Templeton, A. R. (1999). Using gene trees to infer species from testable null hypothesis: Cohesion species in the *Spalax ehrenbergi* complex. En S. P. Wasser (Ed.). *Evolutionary theory and processes: Modern perspectives* (pp. 171–192). Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers.
- Templeton, A. R. (2001). Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10: 779–791.
- Templeton, A. R. (2004). Statistical phylogeography: Methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13: 789–809.
- Templeton, A. R. y Sing, C. F. (1993). A cladistic analysis of phenotypic associations with

- haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659–669.
- Templeton, A. R., Boerwinkle, E. y Sing, C. F. (1987). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117: 343–351.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A. y Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619–633.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). Clustal W. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.
- Tomlinson, P. B. y Takaso, T. (2002). Seed cone structure in conifers in relation to development and pollination: A biological approach. *Canadian Journal of Botany*, 80: 1250–1273.
- Tsutsui, K., Suwa, A., Sawada, K. I., Kato, T., Ohsawa, T. A. y Watano, Y. (2009). Incongruence among mitochondrial, chloroplast and nuclear gene trees in *Pinus* subgenus *Strobus* (Pinaceae). *Journal of Plant Research*, 122: 509–521.
- Valcárcel, V. y Vargas, P. (2010). Quantitative morphology and species delimitation under the general lineage concept: Optimization for *Hedera* (Araliaceae). *American Journal of Botany*, 97: 1555–1573.
- van Zonneveld, M., Jarvis, A., Dvorak, W., Lema, G., y Leibing, C. (2009). Climate change impact predictions on *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* populations in Mexico and Central America. *Forest Ecology and Management*, 257: 1566–1576.
- Vargas-Mendoza, C. F., Medina-Jaritz, N. B., Ibarra-Sánchez, C. L., Romero-Salas, E. A., Alcalde-Vázquez, R. y Rodríguez-Banderas A. (2011) Phylogenetic analysis of Mexican pine species based on three loci from different genomes (nuclear, mitochondrial, and chloroplast). En: Agboola J. (Ed.), *Relevant perspectives in global environmental change* (pp. 139–154). Rijeka, Croacia: InTech, Europe.
- Van Valen, L. (1976). Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, 25: 233–239.
- Veltsos, P. y Ritchie, M. G. (2011). Sympatric Speciation. En H. Kehrler-Sawatzki (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–8). Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd.
- Wachowiak, W. y Prus-Głowacki, W. (2008). Hybridisation processes in sympatric population of pines *Pinus sylvestris* L., *P. mugo* Turra and *P. uliginosa* Neumann. *Plant Systematics and Evolution* 271: 29–40.
- Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Marroof, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P. y Allard, R. W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84: 2097–2100.
- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T. y Sugiura, M. (1994). Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 9794–9798.
- Wang, B. y Wang, X.-R. (2014). Mitochondrial DNA capture and divergence in *Pinus* provide new insights into the evolution of the genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 80: 20–30.
- Wang, X.-R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K. y Szmidt, A. E. (1999). Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. *American Journal of Botany*, 86: 1742–1753.

- Wang, D. Y., Smith, D. R., Outred, H. A., Rowland, R. E. y Fountain, D. W. (2000). Male cone development and microsporogenesis in *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 30: 285–307.
- Watterson, G. A. y Guess, H. A. (1977). Is the most frequent allele the oldest? *Theoretical Population Biology*, 11: 141–160.
- Weir B. S. y Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. y Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: Principles, methods, and applications*. Segunda edición. Florida, Estados Unidos de América: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Whang, S. S., Pak, J. -H., Hill, R. S. y Kim, K. (2001). Cuticle micromorphology of leaves of *Pinus* (Pinaceae) from Mexico and Central America. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 135: 349–373.
- Wheeler, W. C. (2012). *Systematics: A course of lectures*. Oxford, Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Wheeler, Q. D. y Meier, R. (Eds.) (2000). *Species concepts and phylogenetic theory: A debate*. Nueva York, Estados Unidos de América: Columbia University Press.
- Wicke, S., Schneeweiss, G. M., Müller, K. F., y Quandt, D. (2011). The evolution of the plastid chromosome in land plants: Gene content, gene order, gene function. *Plant Molecular Biology*, 76: 273–297.
- Wiens, J. J. (2007). Species delimitation: New approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*, 56: 875–878.
- Wiens, J. J. y Servedio, M. R. (2000). Species delimitation in systematics: Inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 267: 631–636.
- Wiley E. O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*, 27: pp. 17–26.
- Wilkins, J. S. (2009). *Species: A history of the idea*. Los Angeles, Estados Unidos de América: University of California Press.
- Willmann, R. (1986). Reproductive isolation and the limits of the species in time. *Cladistics*, 2: 356–358.
- Willyard, A., Syring, J., Gernandt, D. S., Liston, A. y Cronn, R. (2007). Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 90-101.
- Willyard, A., Cronn, R. y Liston, A. (2009). Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52: 498–511.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323–354.
- Wu, J., Krutovskii, K. V. y Strauss, S. H. (1998). Abundant mitochondrial genome diversity, population differentiation and convergent evolution in pines. *Genetics*, 150: 1605–1614.
- Zamora-Serrano, C. (1993). *Ecología y producción de Pinus maximinoi H. E. Moore en el estado de Chiapas*. Chiapas, México: Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Secretaria de Agricultura y

Recursos Hidráulicos.

- Zapata, F. y Jiménez, I. (2012). Species delimitation: Inferring gaps in morphology across geography. *Systematic Biology*, 61: 179–194.
- Zar, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, Estados Unidos de América: Prentice-Hall.
- Zeng, Y. -F., Liao, W. -J., Petit, R. J. y Zhang, D. -Y. (2010). Exploring species limits in two closely related Chinese oaks. *PLoS ONE*, 5: 1–15.
- Zimin, A., Stevens, K. A., Crepeau, M. W., Holtz-Morris, A., Koriabine, M., Marçais, G., ... y Langley, C. H. (2014). Sequencing and assembly of the 22-Gb loblolly pine genome. *Genetics*, 196: 875–890.
- Zurawski, G. y Clegg, M. T. (1987). Evolution of higher-plant chloroplast DNA-encoded genes: Implications for structure-function and phylogenetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 391–418.

Anexo A

Morphological, Molecular, and Ecological Divergence in *Pinus douglasiana* and *P. maximinoi*

Alejandro López-Reyes,¹ Jorge Pérez de la Rosa,² Enrique Ortiz,¹ and David S. Gernandt^{1,3}

¹Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Código Postal 04510, Distrito Federal, México.

²Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara, Código Postal 45110, Zapopan, Jalisco, México.

³Author for correspondence (dgermandt@ib.unam.mx)

Communicating Editor: Michael J. Moore

Abstract—*Pinus douglasiana* and *P. maximinoi* (*Pinus* subsection *Ponderosae*) are closely-related New World pines with vague taxonomic boundaries where their natural ranges overlap in western Mexico. They are distinguished from each other by the width of their leaves and thickness of their cone scale apophyses. They are also sometimes confused with two other close relatives, *Pinus pseudostrobus* and *P. yecorensis*. We integrated morphological, molecular, and ecological data to clarify the taxonomic limits among these four species. Following previous studies, we evaluated 16 quantitative leaf and seed cone characters. *Pinus douglasiana*, *P. maximinoi*, and *P. pseudostrobus* formed non-discrete groups in multivariate space. The absence of leaf hypodermal intrusions, a persistent peduncle, and the shape of the seed cone are useful for differentiating *P. pseudostrobus* and *P. yecorensis* from *P. douglasiana* or *P. maximinoi*, and the latter two can usually be distinguished by needle width or cone scale apophysis thickness. Most individuals identified as *P. douglasiana*, and *P. maximinoi* shared haplotypes for a plastid *ycf1* fragment that is relatively variable for the genus, while *P. yecorensis* has a closely related, exclusive haplotype. A distinct haplogroup included all individuals of *P. pseudostrobus* and the remaining individuals of *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. Leaf width and cone scale thickness of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* are correlated with elevation. According to potential distribution models, *P. yecorensis* is distributed in drier areas than *P. douglasiana* or *P. maximinoi*, while *P. pseudostrobus* occurs in more temperate areas, commonly at higher elevations. *Pinus douglasiana* and *P. maximinoi* can be considered as incipient species undergoing divergent evolution characterized by incomplete morphological, molecular, and ecological divergence.

Keywords—Morphometry, species distribution modeling, pine, *Pinus pseudostrobus*, *Pinus yecorensis*, polymorphism.

Pinus L. (Pinaceae) is a monophyletic and conspicuous genus comprising ca. 119 species of large (up to 80 m in height), long-lived, monoecious, and perennial trees distributed almost exclusively in the Northern Hemisphere (Mirov 1967; Richardson and Rundel 1998; Farjon 2010). Pines possess distinctive secondary needle-like leaves arranged singly or in fascicles (Farjon 2005, 2010). Leaf and seed cone characters are usually used to recognize pine species because they are more variable than other structures (Farjon and Styles 1997). Despite often being of great economic and ecological importance, uncertainty still exists on the geographic limits of natural ranges for some pine species, especially in Mexico (Shaw 1909; Critchfield and Little 1966; Perry 1991; Eckenwalder 2009; Farjon 2010; Debreczy and Rácz 2011). Clearer interspecific limits would substantially improve the use, management, and conservation of pines (Mirov 1967; Challenger and Soberón 2008).

Pinus subsection *Ponderosae* Loudon includes between approximately 14 and 16 species distributed from western Canada and the U. S. A. to Mexico and Central America (Little and Critchfield 1969; Gernandt et al. 2005; Eckenwalder 2009; Farjon 2010; Hernández-León et al. 2013). Divergent opinions surround the circumscription of species in this group (e.g. Price et al. 1998; Eckenwalder 2009; Farjon 2010; Debreczy and Rácz 2011). Morphometric studies have been carried out to better define the specific limits of variable taxa such as *P. ponderosa* P. Lawson & C. Lawson (Callaham 2013), *P. hartwegii* Lindl. (Matos 1995), and *P. douglasiana* Martínez and *P. maximinoi* H. E. Moore (Stead 1983a). Studies that integrate more diverse sources of data are needed for these and other pines, as are objective criteria for deciding whether or not to recognize taxa.

Pinus tenuifolia Benth. was described from material collected near Guatemala City, Guatemala (Benthams 1842); the name is a later homonym of *P. tenuifolia* Salisb. (1796), which in turn is considered a synonym of *P. strobus* L. (Farjon and Styles 1997). Shaw (1909) treated this taxon as a variety of *P. pseudostrobus* Lindl. (*P. pseudostrobus* var. *tenuifolia* Shaw),

and described its distribution as from northwestern and central Mexico to Nicaragua. Martínez (1943) segregated *P. douglasiana* from *P. maximinoi* based on populations occurring in central and western Mexico with thicker, stiffer needles and thicker seed cone scale apophyses. Leaf and cone characters of *P. maximinoi* and *P. douglasiana* were included by Stead (1983a) in subsequent principal components and canonical discriminant analyses that illustrated the differences in leaf and cone size between these taxa. He concluded that they were legitimate species (Stead 1983a, 1983b). According to Farjon and Styles (1997), no other consistent differences have been identified between *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. Although Martínez (1948) and Mittak and Perry (1979) stated that *P. douglasiana* and *P. maximinoi* can be distinguished by rough versus smooth branchlet surfaces, others such as Perry (1991) and Farjon and Styles (1997) have concluded that this character is inconsistent. Notwithstanding the morphological differences in size, Silba (1990) demoted *P. maximinoi* to a variety of *P. douglasiana* (*P. douglasiana* var. *maximinoi* [H. E. Moore] Silba).

Some pine species may be in a formative stage (Farjon and Styles 1997; Perry et al. 1998). Molecular studies suggest that Mexican and Central American taxa of *Pinus* subsection *Ponderosae* diversified relatively recently. A plastid DNA study of the group found only minor differences between *P. douglasiana* and *P. maximinoi*, with some *P. maximinoi* individuals also sharing haplotypes with *P. pseudostrobus* Lindl., demonstrating the lack of genealogical monophyly in *P. maximinoi* (Gernandt et al. 2009). Plastid sequences typical of *P. pseudostrobus* are more closely related to two other Mexican and Central American species of the 'Montezumae Group', *P. montezumae* Lamb. and *P. hartwegii* (Gernandt et al. 2009). Hybridization, introgression, or incomplete lineage sorting could explain the sharing of plastid haplotypes among pine species (Delgado et al. 2007; Syring et al. 2007; Willyard et al. 2009). A subsequent molecular clock-based estimate based on plastid DNA indicated that *P. douglasiana*

and *P. maximinoi* shared a common ancestor in the Pleistocene (Hernández-León et al. 2013).

Pinus douglasiana and *P. maximinoi* are also difficult to distinguish in the field and herbarium from two closely related species in subsection *Ponderosae*, *P. pseudostrobus* and *P. yecorensis* Debreczy and Rácz. These four taxa differ in leaf and cone characters (Table 1). Farjon and Styles (1997) recognized two varieties of *P. pseudostrobus* (var. *pseudostrobus* and var. *apulcensis*). *Pinus pseudostrobus* var. *pseudostrobus* is the most similar in appearance to *P. douglasiana* and *P. maximinoi* (Table 1). *Pinus yecorensis* was described more recently (Debreczy and Rácz 1995). It was treated as a doubtful name, possibly a variety of *P. pseudostrobus* by Farjon and Styles (1997), but recognized as a legitimate species in a recent treatment of the trees of Sonora (Felger et al. 2001). Individuals from the type locality have sequences that belong to the same haplogroup as *P. douglasiana* and *P. maximinoi*, but with unique substitutions, which may support the species status of *P. yecorensis* (Gernandt et al. 2009).

Pinus douglasiana is confined to Mexico while *P. maximinoi* has a natural distribution that extends from northwest Mexico to Guatemala, Honduras, El Salvador, and Nicaragua (Martínez 1948; Mittak and Perry 1979; Stead and Styles 1984; Perry 1991; Farjon and Styles 1997; Gapare et al. 2001). *Pinus douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus*, and *P. yecorensis* sometimes occur in sympatry (Stead and Styles 1984; Perry 1991, Farjon and Styles 1997; Felger et al. 2001). However, disagreements exist whether certain populations in northwestern and central Mexico correspond to *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, or *P. pseudostrobus* (Stead and Styles 1984; Perry 1991; Farjon and Styles 1997).

Studies of the climatic factors associated with the distribution of pines could help to understand their taxonomy and variation. The species considered here occur across the complex topography and diverse vegetation types of Mexico, Guatemala, Honduras, El Salvador, and Nicaragua. *Pinus douglasiana* grows in warm to temperate climatic zones at elevations between 1,400 and 2,500 m (Stead and Styles 1984; Perry 1991, Farjon and Styles 1997). *Pinus maximinoi* occurs principally in climates that favor cloud forests and wet subtropical forest at lower elevations, primarily between 900 and 1,800 m (Mittak and Perry 1979; Farjon and Styles 1997; Dvorak et al. 2000). *Pinus pseudostrobus* thrives in warm-temperate to cold-temperate climates, commonly at elevations between 1,900 and 3,000 m (Farjon and Styles 1997). *Pinus yecorensis* occurs on dry, hot, and rocky slopes between approximately 1,300 and 1,600 m (Debreczy and Rácz 1995, 2011). Modeling potential distributions can help determine whether differences in climatic requirements exist between taxa. Depicted potential distribution areas show

zones where suitable climatic conditions prevail in order to determine where species occur (Raxworthy et al. 2007; Soberón and Nakamura, 2009).

Pines, like many trees, have high intraspecific variation and low mutation rates per unit time (Petit and Hampe 2006). Pines are further characterized by high outcrossing rates, huge effective population sizes, and weak barriers to gene flow, all of which obscure their interspecific limits (Ledig 1998; Delgado et al. 2007; Willyard et al. 2007). Reproductive isolation, monophyly, diagnosability, and ecological differences are contingent attributes, not an unavoidable result of speciation processes; however, the presence of these attributes often helps differentiate species (de Queiroz 1998; Sites and Marshall 2004).

Our main objective is to integrate three different lines of evidence that could help understand the process of speciation and divergence in recently formed sister taxa; morphology, molecules, and climate. Synthesis of this information is needed to understand complex morphological variation in *Pinus*. Given the deficiency of fixed qualitative differences for this group, we quantify morphological variation and evaluate it using statistical techniques.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material—Field work was conducted from 2010–2013. To capture the greatest possible morphological variation, field collections were made from representative sites throughout the natural range of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* in Mexico. Branches and seed cones of the study species were collected from the bottom of the crown. Material was pressed, dried, and deposited in the National Herbarium of Mexico (MEXU). Herbarium specimens from Guatemala, Honduras, and Nicaragua was examined, but no fieldwork was conducted in these countries. A total of 287 individuals were included (Appendix 1). Our sampling for *P. yecorensis* was limited, but we included it in comparisons whenever possible given its presumed close relationship with *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. Locality data for 16 collections of *P. yecorensis* and three collections of *P. pseudostrobus* were taken from online databases (Appendix 1).

For the molecular study two or three fresh leaves were conserved in a freezer at -20°C. To obtain anatomical data, ~1.0 cm segments from the medial part of fresh leaf samples were preserved in a FAA solution. For herbarium material, ~1.0 cm segments from the medial part of a leaf were rehydrated in boiling water and then emersed ~24 hrs in FAA. Transverse sections were made manually. The sections were cleared in 50% sodium hypochlorite for 2 min, rinsed several times with distilled water, dehydrated in a series of alcohol rinses (50, 75, 96, and 100%), stained with fast green in 100% alcohol, and mounted on a slide with resin. Because the data set was incomplete, not all collections were included in all analyses. The number and details of the individuals included in each analysis are specified below.

Preliminary Taxonomic Identification—A preliminary identification was made of each individual based upon field observations and microscopic examination of the leaves (Table 1). The persistence of the cone peduncle and presence of hypodermal intrusions in the leaf were the

TABLE 1. Main diagnosable characters for *Pinus douglasiana*, *P. maximinoi*, and closely related taxa. Information based on Stead and Styles (1984), Farjon and Styles (1997), Debreczy and Rácz (1995), and Gernandt et al. (2009). ^a In this work only hypodermal intrusions that come in contact with the endodermis are referred to as such. *Pinus maximinoi* can lack hypodermal intrusions at its southernmost distribution. ^b Persistent peduncles are those that remain on the branch after the mature cone falls from the tree.

Species	Needle characters			Seed cone characters	
	Hypodermal intrusions	Needle length (cm)	Needle width (mm)	Apophysis form	Persistent peduncle ^b
<i>Pinus maximinoi</i>	Usually present ^a	20–35	0.6–1(–1.1)	Nearly flat or slightly raised	Absent
<i>P. douglasiana</i>	Present	22–35	0.7–1.2	Flattened or slightly raised	Absent
<i>P. pseudostrobus</i> var. <i>pseudostrobus</i>	Absent	(18–)20–30(–35)	0.8–1.3	Nearly flat to prominently raised	Present
<i>P. pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i>	Absent	(18–)20–30(–35)	0.8–1.3	Prominently raised and partially elongated	Present
<i>P. yecorensis</i>	Absent	28–35	Unreported	Flat or raised	Unreported

principal characters used to distinguish *P. pseudostrobus* from *P. douglasiana* or *P. maximinoi* (Martínez 1948; Mittak and Perry 1979; Stead and Styles 1984; Perry 1991; Farjon and Styles 1997). Length and thickness of the cone peduncle in *P. pseudostrobus* are variable. Forty-five new collections from northwestern Mexico, principally the western extreme of the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB; Jalisco and Michoacán) and the Sierra Madre Occidental (SMOC; Sinaloa, Sonora, and Chihuahua) have heterogeneous seed cone morphology, deciduous cone peduncles typical of *P. douglasiana* and *P. maximinoi*, and predominantly lack leaf hypodermal intrusions. We refer to them here as *Pinus aff. douglasiana*. Some individuals identified as *P. pseudostrobus* lack leaf hypodermal intrusions, but have both persistent and deciduous peduncles and have flat cone apophyses that are similar to *P. maximinoi*. Collections of *P. yecorensis* lack hypodermal intrusions; this taxon has subtle differences from *P. douglasiana* such as stout branches and short and more spherical cones with stout peduncles (Gernandt et al. 2009).

Analysis of Quantitative Variation—A total of 219 individual collections were included in the morphological analyses. Only collections with leaves that were mature in size and appearance were measured; similarly, only collections with open seed cones were measured. Data were obtained for herbarium specimens (mainly from Guatemala, Honduras, and Nicaragua) although it was not always possible to obtain all measurements. The herbarium specimens were included in the analyses given the desirability of evaluating their variation.

MORPHOLOGICAL DATA SET—Fourteen continuous or meristic characters of the leaf and cone identified as informative by Stead (1983a) and an additional three characters proposed here (characters three, five, and sixteen) were evaluated (Fig. 1): 1) LON: length of needle (cm), based on the mean of five leaves, except for herbarium material which was based on two or three; 2) LOS: Length of sheath (cm), based on the mean of five fascicles, except for herbarium material which was based on two or three; 3) TOS: Thickness of sheath (mm), based on the mean of five sheaths, except for herbarium material which was based on two or three; 4) WON: Width of needle (μm), based on one observation per individual; 5) TON: Thickness of needle (μm), based on one observation per individual; 6) Ncan: Number of resin canals, based on one observation per individual; 7) Int: Number of hypodermal intrusions, based on one observation per individual; 8) NEC: Number of endodermal cells in the leaf, based on one observation per individual; 9) NSLD: Number of stomatal lines on the leaf dorsal surface, based on one observation per individual; 10) NSLV: Number of stomatal lines on the leaf ventral surface, based on one observation per individual; 11) LOC: Length of the (seed) cone (mm), based on one observation per individual; 12) WOC: Width of (seed) cone at the widest point (mm), based on one observation per individual from the largest cone available; 13) WOA: Width of (seed scale) apophysis (mm), based on the mean of five cone scales evenly spaced around the widest point of a single cone, except for herbarium material which was based on two to five scales; 14) HOA: Height of apophysis (mm), based on the mean of five cone scales evenly spaced around the widest point of a single cone, except for herbarium material, which was based on two to five scales; 15) TOAU: Thickness of (seed cone scale) apophysis and umbo together (mm), based on the mean of five scales evenly spaced around the widest point of a single cone, except for herbarium material which was based on two to five scales; 16) LOCS: Length of cone scale (mm), based on the mean of five scales evenly spaced around the widest point of a single cone; 17) PPED: Persistence of the peduncle. This character was coded as absence (0) or presence (1). The morphological data are available from the Dryad Digital Repository: <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.931h7>.

After preliminary examinations, we concluded that the smoothness of the branchlet surface was not consistent and decided not to consider the character. Measurements of leaves and cones were obtained from dried and pressed material using a ruler calibrated to 0.1 cm and a Vernier caliper (Mitutoyo digimatic plastic caliper) with a resolution of 0.1 mm and an instrumental error of ± 0.2 mm. For the WON and TON variables, measurements were made with a light microscope using a 10 \times (occasionally 5 \times) objective lens and an ocular with a micrometric ruler.

ONE-WAY ANOVA—All statistical analyses were carried out with R 2.14.2 (R Development Core Team 2011). Individuals with leaf hypodermal intrusions and deciduous cone peduncles from Michoacán and the State of Mexico in the central TMVB were intermediate between *P. douglasiana* and *P. maximinoi* with respect to leaf width and cone scale apophysis thickness. To clarify their identity three groups were compared using the WON and TOAU variables: individuals clearly identified as *P. douglasiana* ($n = 55$) from Jalisco and Sinaloa, individuals identified as *P. maximinoi* ($n = 69$) from Chiapas, Guerrero, and Oaxaca, and the undetermined individuals from the TMVB ($n = 21$). An analysis of variance (ANOVA) was performed for this comparison. Levene's test (Fox

and Weisberg 2011) and Bartlett's test were used to corroborate the supposition of homogeneity of variance (homoscedasticity). A Tukey test was performed when significant differences were found. Non-parametric tests were used when the data did not fulfill the assumptions of the model. In such cases the Kruskal-Wallis test was used to test for differences and the Wilcoxon rank sum test was used for multiple comparisons. Based on this comparison (see results) these individuals were tentatively classified as *P. douglasiana*.

MULTIVARIATE ANALYSES—We used principal components analysis (PCA) to explore the formation of groups that indicates the existence of taxa (Stead 1983a; Manly 1994). Only individuals with complete data for leaves and mature cones were included. Sixteen quantitative variables were scaled to standardize them. The PPED was excluded because it is a categorical variable. The results from two analyses are reported. The first (PCA-1; $n = 145$) included *P. douglasiana* ($n = 76$) and *P. maximinoi* ($n = 69$), including seven specimens of *P. maximinoi* from Central America that lacked hypodermal intrusions. The second (PCA-2; $n = 214$) included *P. douglasiana* ($n = 76$), *P. maximinoi* ($n = 69$), *P. aff. douglasiana* (individuals from Michoacán and Jalisco that were morphologically intermediate between *P. douglasiana* and *P. maximinoi*, but more similar to *P. douglasiana*; $n = 41$), *P. pseudostrobus* ($n = 24$), and *P. yecorensis* ($n = 4$). A correlation matrix was used to perform the analyses. For *P. douglasiana* and *P. maximinoi*, we statistically evaluated the existence of gaps in multivariate space to determine whether discrete groups could be identified (Zapata and Jiménez 2012). The analysis was performed using a γ of 0.95 and β of 0.90 for the overlap in the ellipsoidal region of tolerance. The same number of collections was used as in PCA-1.

Clustering methods were also used to explore the formation of groups using the data from the 16 continuous variables and the categorical variable (PPED). The k-means method (MacQueen 1967) was used to form groups. For all these analysis the variable data were standardized and the algorithm of Hartigan and Wong (1979) was used. Two analysis that included all the taxa (*P. aff. douglasiana*, *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, and *P. pseudostrobus*) were conducted. The same collections were used as in the PCA-2 analysis. These analyses were performed including and excluding the variable PPED. For these two analyses a table was constructed to compare the prior classification based on morphology, with the groups obtained with the k-means method.

LINEAR MODEL ANALYSIS—Linear regression was used to evaluate the relationship between elevation and morphological variation as represented by the PC1 data from the PCA-1 analysis (*P. douglasiana* and *P. maximinoi*). To test the validity of the regression, the normality of the residuals was evaluated with the Shapiro-Wilk normality test; alternatively, homogeneity of variance was inspected visually using diagnostic graphics.

Molecular Study—Because the *ycf1* gene (~5,100 bp) represents one of the most variable regions of plastid DNA in pines (Gernandt et al. 2009; Parks et al. 2009), an ~800 bp fragment of *ycf1*, corresponding to amplicon B of Gernandt et al. (2009), was amplified and sequenced. Sequences of this *ycf1* fragment were identical for five of eight *P. douglasiana* and *P. maximinoi* individuals in a previous study (Gernandt et al. 2009). However, the fragment is variable enough to distinguish a *P. douglasiana*-*P. maximinoi*-*P. yecorensis* haplogroup from another corresponding to *P. pseudostrobus*. We also chose it for further characterization with the expectation that greater sampling would reveal additional variation in the study taxa.

DNA ISOLATION AND AMPLIFICATION—DNA was isolated from 40–60 mg of ground, frozen needle tissue using the CTAB method (Doyle and Doyle 1987). The *ycf1* fragment was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) technique using primers reported by Gernandt et al. (2009), P198232F and P199121R. The following concentrations were used for PCR: 1 \times buffer, 1.25 mM MgCl₂, 0.4 μM primer, 0.2 μM of each dNTP, and 0.6–1 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California). Approximately 5–50 ng genomic DNA was added to each reaction. The amplification conditions were as follows: initial denaturalization at 94°C (3 min); 30 cycles of denaturation (94°C for 1 min), annealing (50°C for 50 sec), and extension (72°C for 80 sec); and a final extension at 72°C (5 min).

DNA SEQUENCING, EDITION, AND ANALYSIS—The PCR products were sent to the University of Washington High Throughput Genomics Center (Seattle, Washington) for purification and sequencing. Forward and reverse sequence reads were assembled and edited with Sequencher 4.8. (Gene Codes, Inc. Ann Arbor, Michigan). Assembled sequences were aligned with Clustal W (Thompson et al. 1994), as implemented in BioEdit 7.0.5 (Hall 1999) using default parameters and adjusted by eye. Ninety-five new sequences from *P. maximinoi*, *P. douglasiana*, *P. pseudostrobus*, and *P. yecorensis* were obtained and analyzed. These were aligned with 12 sequences downloaded from GenBank (Appendix 1). The alignments were trimmed at the extremes adjacent to the primers to avoid sites with

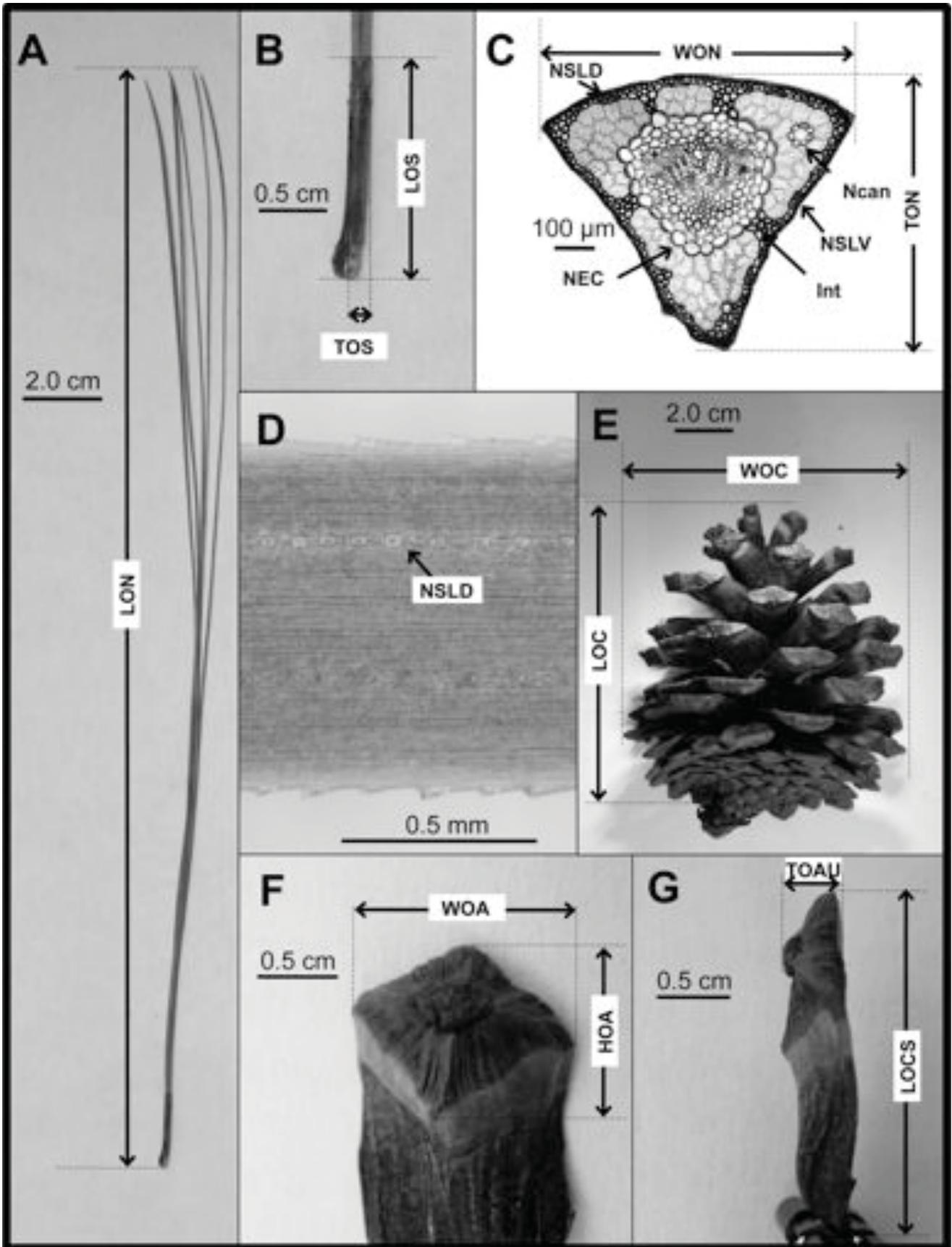


FIG. 1. Cone and leaf variables. A. Fascicle. B. Fascicle sheath. C. Cross sectional anatomy of a secondary leaf. D. Stomatal lines on the dorsal face of a leaf. E. Cone. F. Cone scale. G. Lateral view of a cone scale (See methods for an explanation of abbreviations).

missing or low quality base calls. Sequences were used to assemble a matrix 803 bp in length, without indels and without missing data. The haplotype of each individual is available from the Dryad Digital Repository: <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.931h7>. A haplotype network was built to estimate gene genealogies with the statistical parsimony method implemented in TCS 1.21 (Templeton et al. 1992; Clement et al. 2000).

Species Distribution Modeling—The potential distributions of *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*, and *P. yecorensis* were modeled using MaxEnt 3.1 (Phillips et al. 2006) with the default settings. Climatic and elevational variables, with a spatial resolution of about ~ 1 km², were used for the respective distribution modeling. Bioclimatic data for Mexico, Belize, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, and Panama were obtained from WorldClim 1.4 (Hijmans et al. 2005). A predictive model based on presence-only data was generated using geographic coordinates of collections from the natural distribution of the study taxa. Only one occurrence record per species per grid cell (~ 1 km²) was included.

Records with locality descriptions but lacking coordinates were georeferenced using Google Earth 5.1.3509.4636 (beta) and the Mexican website of the Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI 2014). For *P. douglasiana* and *P. maximinoi* records, 17 and 39 points, respectively (Appendix 1) correspond to individuals that we identified with multivariate analyses or herbarium collections. The type locality of *P. douglasiana* in Cerro Juanacata near the town of Jala in Nayarit, Mexico (Martínez 1943, 1948) was not included in the modeling of *P. douglasiana* because we failed to locate the species when we visited this area. In agreement with the conclusions of Stead and Styles (1984), we did not find the typical form of *P. maximinoi* in Sonora and Sinaloa. Points for *P. maximinoi* from cold and high altitude localities in the eastern TMVB (Vigas-Xalapa, Veracruz and Nevado de Toluca, State of Mexico) were not included because the collections that we examined from these sites lack leaf hypodermal intrusions and were thus redetermined as *P. pseudostrobus*. Three additional georeferenced points for *P. pseudostrobus* were obtained from the online botanical database, Tropicos (Missouri Botanical Garden 2015). Locality data were obtained for *P. yecorensis* from six MEXU specimens, 16 records from the website of the Consortium of Intermountain Herbaria (2014), and one locality from the original species description (Debreczy and Rácz 1995). According to our statistical analyses, the distribution points of *P. maximinoi* and *P. douglasiana* included for modeling do not include sites where the two species are in sympatry. To visualize zones of sympatry, the potential distribution of these species was displayed on the same map. To test each resulting model, a partition of the occurrence localities was made setting the random test option in MaxEnt at 25%. Likewise, the scores of the area under the receiver operating curve (AUC) for the training data were considered as statistical tests to evaluate the performance of maximum entropy modeling. It has been reported that scores greater than 0.90 are indicative of a good performance (Phillips et al. 2006; Baldwin 2009). The inferred potential distribution was trimmed considering the logistic threshold value associated with maximum training sensitivity plus specificity value and the resulting models were displayed graphically in ArcMap 10.0 (Environmental Systems Research Institute, Inc., Redlands, California).

To evaluate the relationship between climate and morphological variation we used k-means to compare the groups formed with the climatic variables, the morphological variables, and the preliminary clustering criteria. The same 19 climatic variables used for modeling and the 16 quantitative morphological variables were standardized for the analysis. One collection per site was included. Sites lacking morphological information were excluded. The morphological data correspond to individual collections identified as *P. aff. douglasiana* (n = 9), *P. douglasiana* (n = 12), *P. maximinoi* (n = 20), *P. pseudostrobus* (n = 7), and *P. yecorensis* (n = 2). The corresponding information for each of the climatic variables (layers with a resolution of 0.5 sec) and the sites included in the modeling were extracted using the raster package (Hijmans and van Etten 2012). A table was constructed to compare the resulting classifications.

RESULTS

Comparison of Quantitative Character Means—The comparison of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* in western and southern Mexico, respectively, with individuals from Michoacán and the State of Mexico in the TMVB indicated that this group is statistically different from typical *P. douglasiana* or *P. maximinoi* from other localities. Variances

among groups in the TOAU character after transforming the data were statistically different (Levene test $F_{2, 142} = 4.75$; $p = 0.010$). A non-parametric test (Kruskal-Wallis test) showed significant differences among groups ($\chi^2 = 103.5887$; $df = 2$; $p < 0.01$; see Fig. 2A). Although statistically different, the mean value of TOAU from the Michoacán and State of Mexico collections was closer to the value of *P. douglasiana* than to *P. maximinoi* from Chiapas, Guerrero, and Oaxaca (3.72, 4.45, and 2.29 mm, respectively). For WON, collections from Michoacán and the State of Mexico had needles that were wider on average than *P. maximinoi* from Chiapas, Guerrero, and Oaxaca but thinner than *P. douglasiana* from Jalisco and Sinaloa (Fig. 2B). The group variances were not statistically different (Levene test; $F_{2, 142} = 2.82$; $p = 0.063$) but the residuals were not distributed normally (Shapiro-Wilk normality test, $W = 0.97$, $p = 0.0060$). A non-parametric test (Kruskal-Wallis test) showed significant differences among groups ($\chi^2 = 83.3541$; $df = 2$; $p < 0.01$), and a nonparametric pairwise comparisons (Wilcoxon rank sum test) showed that all groups were different ($p < 0.01$). In this comparison of the WON variable, unidentified individuals from Michoacán and the State of Mexico were more similar to *P. maximinoi* (Fig. 2B). However, based on the high similarity of TOAU with *P. douglasiana* we decided to treat tentatively these individuals as this species.

Multivariate Data—The PCA-1 and PCA-2 did not result in discrete groups in multivariate space among species. For the PCA-1 (inclusion of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* only), the sum of variation explained by the first and second principal components (PC1 and PC2) was less than 66% (Table 2). According to the analysis to distinguish gaps in multivariate space, the overlap in the ellipsoidal region of tolerance at a γ of 0.95 and β of 0.90 is such that no gaps were detected and therefore no discrete groups were found (Fig. 2E). All coefficients of PC1 (PCA-1) had negative values (Table 2), indicating that differences between individuals of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* explained by PC1 were mostly in size and not form. Most variables, but mainly NEC, TOAU, and TOS, contributed to this size difference (Table 2). In the dispersion graph (Fig. 2C), collections from Michoacán and the State of México grouped with individuals from Jalisco and Sinaloa, which supported their identity as *P. douglasiana*. For PCA-2 (Fig. 2D), the sum of variation explained by PC1 and PC2 was less than 61% (Table 3). With the exception of number

TABLE 2. Coefficients of the first and second component (PC1 and PC2) of the first principal component analysis (PCA-1).

Variable	PC1 (50.04%)	PC2 (14.98%)
HOA	-0.284	-0.150
Int	-0.089	0.220
LOC	-0.202	-0.396
LOCS	-0.226	-0.431
LON	-0.239	-0.014
LOS	-0.282	-0.015
Ncan	-0.237	0.066
NEC	-0.284	0.224
NSLD	-0.128	0.160
NSLV	-0.278	0.209
TOAU	-0.294	0.013
TON	-0.271	0.271
TOS	-0.297	0.219
WOA	-0.277	-0.266
WOC	-0.228	-0.432
WON	-0.274	0.289

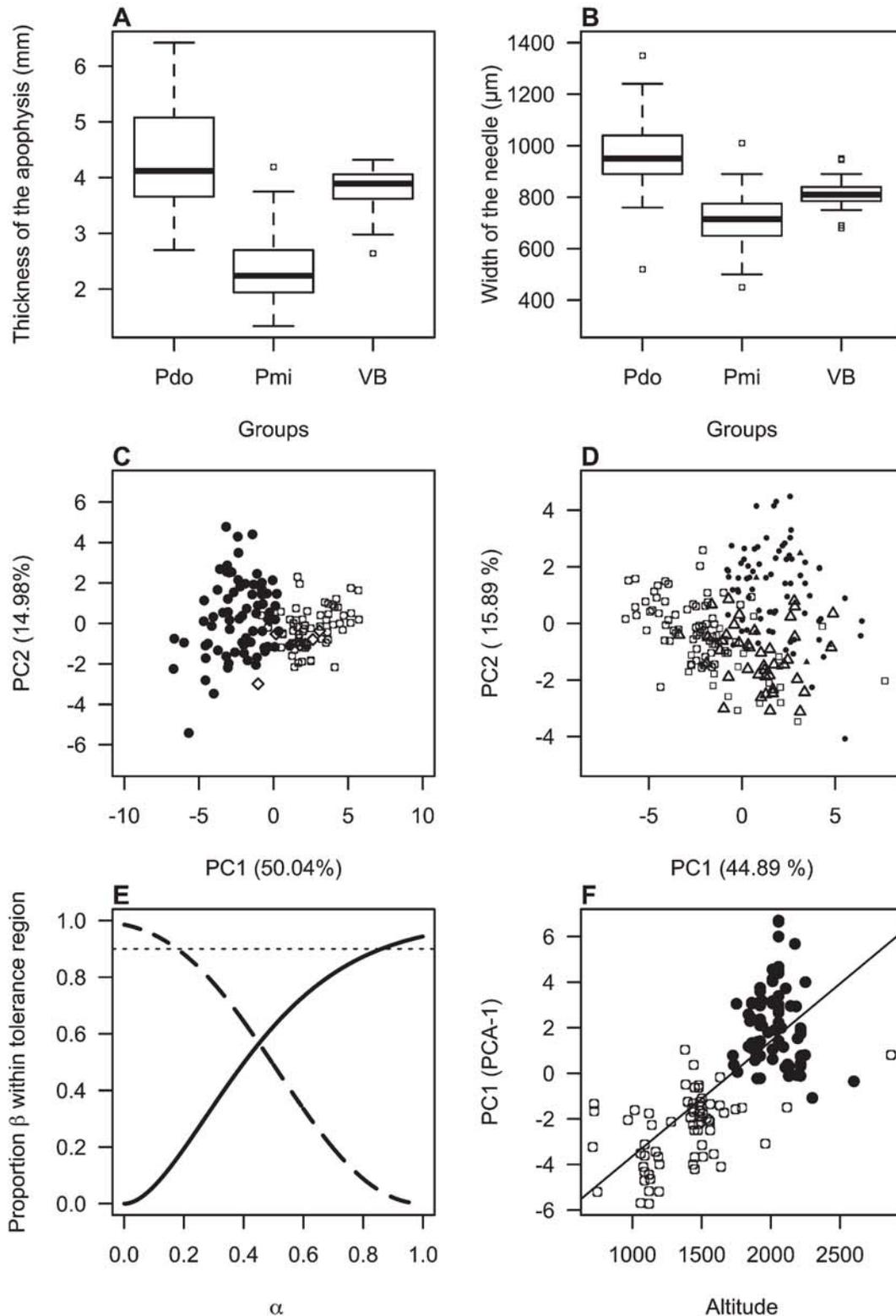


FIG. 2. Statistical comparisons of morphometric variables. A. Comparison of TOAU for individuals from the TMVB (VB; $n = 21$; mean = 3.78; $sd = 0.45$), *P. douglasiana* (Pdo; $n = 55$; mean = 4.32; $sd = 0.93$), and *P. maximinoi* (Pmi; $n = 69$; mean = 2.3; $sd = 0.55$) from other localities; the three groups were significantly different ($p_{2, 142} < 0.01$). B. Comparison of WON among individuals from the TMVB (VB; $n = 21$; mean = 815.2; $sd = 68.6$), *P. douglasiana* (Pdo; $n = 55$; mean = 959.8; $sd = 127.9$), and *P. maximinoi* (Pmi; $n = 69$; mean = 715.4; $sd = 103.4$) from other localities; the three groups showed significant differences from each other ($p_2 < 0.05$). C. Scatter plot of PCA-1, *P. douglasiana* (black circles; $n = 76$); *P. maximinoi* (open circles; $n = 62$); Specimens of *P. maximinoi* without intrusions (rhombs $n = 7$). D. Scatter plot of PCA2; *P. aff. douglasiana* (open triangles; $n = 24$), *P. douglasiana* (black circles; $n = 76$), *P. maximinoi* (open squares; $n = 62$), *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* (open squares; $n = 24$), *P. yecorensis* (black triangles, $n = 4$). E. The proportion of individuals (β) of *P. douglasiana* (dashed line) and *P. maximinoi* (solid line) at different values of α (which define tolerance regions) and a constant confidence level (γ) of 0.95. The graph shows that at a given (α) there never exists the possibility of finding tolerance regions that include at least 90% of the individuals for each species. The dashed line shows the limit for $\beta = 0.90$. F. Linear regression showing the relationship between morphology and elevation *P. douglasiana* (black circles); *P. maximinoi* (open circles).

TABLE 3. Coefficients of the first and second component (PC1 and PC2) of the second principal component analysis (PCA-2).

Variable	PC1 (44.89%)	PC2 (15.89%)
HOA	0.295	-0.172
Int	-0.016	0.402
LOC	0.234	-0.373
LOCS	0.249	-0.308
LON	0.225	0.136
LOS	0.271	0.066
Ncan	0.223	-0.049
NEC	0.282	0.244
NSLD	0.169	-0.111
NSLV	0.255	0.095
TOAU	0.287	0.038
TON	0.276	0.298
TOS	0.269	0.332
WOA	0.293	-0.246
WOC	0.255	-0.330
WON	0.261	0.316

of leaf intrusions, the positive values of the PC1 variables indicated that there were differences in size among taxa (Table 3). The variables HOA, NEC, and TOAU contributed most to this size difference. The negative and positive coefficient values for PC2 indicated that there were differences in form among individuals, principally between *P. pseudostrobus* and *P. douglasiana* and *P. maximinoi* (Table 3). These differences indicated an inverse relationship among the cone variables and leaf variables, mainly the number of leaf hypodermal intrusions.

The results of the k-means clustering analysis (with $k = 3$) for the 16 quantitative morphological variables demonstrated a notable similarity between the individuals from the TMVB with those of *P. douglasiana* in Jalisco and Sinaloa (19 of 21 of these individuals grouped with *P. douglasiana*). The results for $k = 4$ (Table 4) considering all the individuals (*P. aff. douglasiana*, *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus*, and *P. yecorensis*) and excluding the variable PPED demonstrated that all groups were similar, although there was a notable distinction for *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. The most distinct taxon was *P. maximinoi*, with 41% of its individuals separated in a completely exclusive group. Including the variable PPED increased the congruence with the groups formed with the preliminary identifications. In general, there was a high similarity between the *P. aff. douglasiana* individuals and those of *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, and *P. pseudostrobus*. Unfortunately the results from analyses that include PPED must be treated with caution because it was coded as a binary (presence or absence) variable.

Elevation and needle and cone size were positively correlated in the regression analysis ($R^2 = 0.5275$; $F_{1, 141} = 159.52$; $p < 0.01$). Residuals showed a normal distribution according

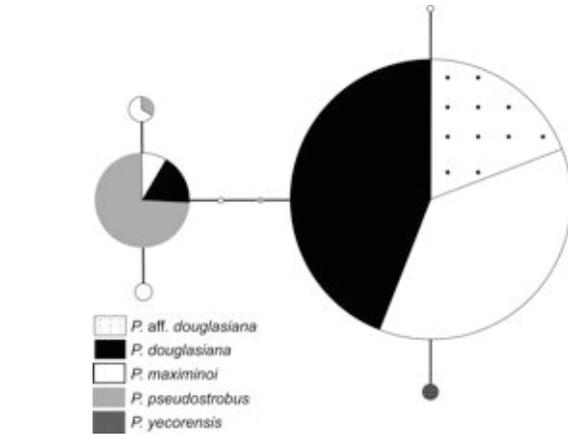


FIG. 3. Haplotype network of *ycf1* fragment for 107 individuals. The size of the pie graphs is proportional to the number of individuals.

to the Shapiro-Wilk normality test ($W = 0.9942$, $p = 0.84$). *Pinus douglasiana*, with needles and cone scale apophysis that are thicker than *P. maximinoi*, is distributed at higher elevations (Fig. 2F).

Molecular Variation—Eight haplotypes were found. In the haplotype network (Fig. 3), 88% of the individuals identified as *P. douglasiana* had the same haplotype, which was also shared by 72% of the individuals identified as *P. maximinoi*. All individuals classified as *P. aff. douglasiana* had the typical haplotype of *P. maximinoi* and *P. douglasiana*. No *P. pseudostrobus* individuals had the haplotype typical of *P. douglasiana* or *P. maximinoi*. Exclusive haplotypes of *P. yecorensis* connected to the typical haplotype of *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. One individual identified as *P. maximinoi* from Oaxaca and another from Guatemala (Guatemala), had haplotypes typical of *P. pseudostrobus*. The latter individual from Guatemala lacked leaf hypodermal intrusions.

Potential Distribution—Scores of the area under the receiver operating curve (AUC) for the training data were greater than 0.90 in all models. The AUC score was 0.990 for *P. douglasiana*, 0.980 for *P. maximinoi*, 0.977 for *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus*, and 0.989 for *P. yecorensis*. These high scores indicated that model performance was good (Phillips et al. 2006). The training omission rate and test omission associated with the logistic threshold had a value of 0.0 for all models.

The potential distribution for *P. douglasiana* was mainly confined to central and western Mexico (Fig. 4A). The results indicated that the major discontinuities in its distribution corresponded to areas of disruption between the SMOC and mountain ranges of the TMVB, but in general, its distribution

TABLE 4. Comparison between clustering criteria. Clustering with the k-means criterion with $k = 4$, with and without the variable describing the persistence of the cone peduncle (PPED), and the initial classification. Based on 16 continuous leaf and cone variables and PPED. * Individuals lacking leaf hypodermal intrusions.

species	Groups formed with the variable PPED				Groups formed without the variable PPED			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>P. douglasiana</i>	3	54	19	0	0	17	54	5
<i>P. maximinoi</i>	60	2	0	0	26	0	2	34
<i>P. aff. douglasiana</i>	11	3	27	0	0	24	1	16
<i>P. pseudostrobus</i>	1	0	2	21	0	9	0	15
<i>P. maximinoi</i> *	5	1	1	0	0	1	0	6
<i>P. yecorensis</i>	0	2	2	0	0	2	2	0

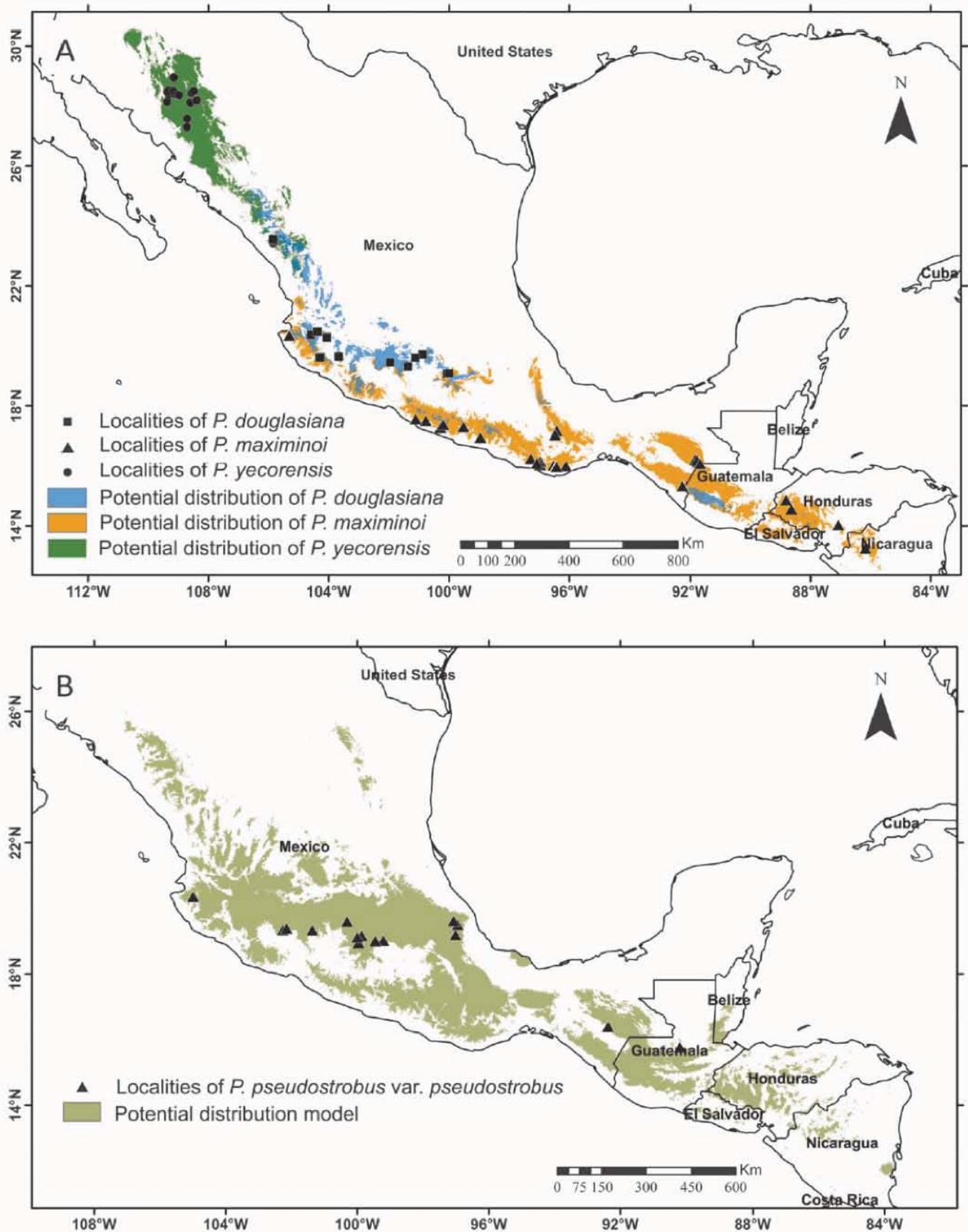


FIG. 4. Real and potential distributions for the study group. A. *Pinus douglasiana* (n = 24), *P. maximinoi* (n = 41), and *P. yecorensis* (n = 20). B. *Pinus pseudostrobus* var. *pseudostrobus* (n = 16).

was fragmented. Its potential distribution also included areas of sympatry in northern Mexico with *P. yecorensis* and western Mexico with *P. maximinoi*. The results also indicated some small areas with favorable conditions for *P. douglasiana* scattered in the mountain ranges of southern Mexico, namely the Sierra Madre del Sur, Sierra Norte de Oaxaca, and Sierra Madre de Chiapas. Throughout these areas it could occur in sympatry with *P. maximinoi* or *P. pseudostrobus* (Fig. 4A). Variables that contributed most to distribution modeling of *P. douglasiana* were elevation (24.6%) and temperature seasonality (23%). Considered alone, the mean temperature of the warmest quarter (19.0°C on average) was the most useful for explaining the distribution.

The potential distribution of *P. maximinoi* was located principally along the coastal slopes that extend to the Pacific Ocean in Mexico (Fig. 4A). In Central America, areas of distribution of *P. maximinoi* were predicted in small mountain ranges. Areas of potential distribution of *P. maximinoi* were fragmented and disrupted mainly among the mountain ranges of western and southern Mexico (Fig. 4A). Elevation contributed most to the distribution model (31.5%), followed by annual precipitation (22.9%). Considered alone, temperature seasonality was the most useful for explaining the distribution, contributing 11.9% to the model.

The potential distribution of *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* was wide and occurred mainly in cold-temperate to warm-temperate zones (Fig. 4B). Its potential distribution occurred throughout the major mountain ranges, from northern Mexico to northern Nicaragua. The variables that most contributed to model performance were temperature seasonality (36%), elevation (27.1%), and mean temperature of the warmest quarter (17.7°C; 16.2%). Considered alone, the maximum temperature of the warmest month (25.6°C on average) was the most useful for explaining the potential distribution of this taxon.

The potential distribution of *P. yecorensis* was in the north-eastern SMOC, where dry climates prevail (Fig. 4A). Precipitation seasonality contributed most to the distribution model for this species (31%), followed by precipitation of the warmest quarter (478.26 mm on average; 23.8%), and elevation (19.6%). Temperature seasonality and mean temperature of the driest quarter, each considered alone, were the most useful for explaining its potential distribution.

For the k-means analysis, taking into account the climatic variables we found a 100% correspondence between the groups formed with those based on the same method and morphology (without including the variable PPED; Table 5). Groups formed with the k-means analysis and morphology alone were not congruent with groups formed based on our a priori determinations.

DISCUSSION

Taxonomic Limits—Despite their morphological similarities, *Pinus douglasiana* and *P. maximinoi* have been considered distinct species in most recent taxonomic treatments (e.g. Price et al. 1998; Eckenwalder 2009; Farjon 2010; Debreczy and Rácz 2011). An exception is the demotion of *P. maximinoi* to *P. douglasiana* var. *maximinoi* by Silba (1990). The quantitative characters helped to differentiate partially *P. douglasiana* and *P. maximinoi*, but the two taxa share many characters and we were unable to identify any that were consistently diagnostic. The individuals from the TMVB with intermediate leaf width and cone scale apophysis thickness were more similar to *P. douglasiana*, but our decision to classify them as this taxon could be considered subjective due to the overlapping range of morphological variation with respect to typical individuals of *P. maximinoi*.

Overlapping variation in continuous characters has been observed previously in *Pinus* subsection *Ponderosae* (Matos 1995). Many species in the subsection may be of recent origin (Hernández-León et al. 2013), and many are partially sympatric (Farjon and Styles 1997), which may have delayed their divergence (Matos and Schaal 2000; Delgado et al. 2007; Willyard et al. 2009). Stead (1983a), sampling fewer populations in western Mexico, found groups that were better defined than the groups found in this study (Fig. 2D). Although our results are partially congruent with his, our PCA results are not completely comparable. In this study we did not sample as intensively within populations; we usually sampled fewer than 25 individuals at each locality, and did not always obtain mature cones. We also only considered continuous variables in our analyses. In contrast, Stead (1983a) sampled as many as 25 individuals per population, and coded the presence of a peduncle and the roughness of the branchlets as qualitative characters. There are other notable aspects that highlight the differences between our results and those of Stead (1983a, 1983b). These are related with the fortunate fact that current techniques allow the consideration of molecular characters. For example, we identified individuals as *P. aff. douglasiana* that aside from having an external morphology similar to *P. douglasiana* and occasionally to *P. maximinoi*, had the typical haplotype of these two species. Individuals of *P. aff. douglasiana* are similar to *P. yecorensis* in lacking leaf hypodermal intrusions and a persistent peduncle. Their morphological variation is heterogeneous, but at present we treat them as *P. douglasiana*. In this respect we differ from Stead (1983a; 1983b) in interpreting the presence of leaf hypodermal intrusions as an inconsistent character for diagnosing *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. Furthermore, the individuals treated as *P. aff. douglasiana* may be hybrids formed between *P. douglasiana* and *P. pseudostrobus*. These were collected from

TABLE 5. Comparison of the classification taking into account the climatic variables and the k-means method versus the classification of groups that takes into account morphological variables, k-means, and the initial classification.

climatic	Considering morphology								
	k-means				Initial classification				
	1	2	3	4	<i>P. aff. douglasiana</i>	<i>P. douglasiana</i>	<i>P. maximinoi</i>	<i>P. pseudostrobus</i>	<i>P. yecorensis</i>
1	0	6	0	0	2	2	0	1	1
2	0	0	20	0	0	1	19	0	0
3	13	0	0	0	1	6	0	6	0
4	0	0	0	11	6	3	1	0	1

the TMVB and SMOC in areas between 1,400 and 2,400 m elevation where *P. douglasiana* and *P. pseudostrobus* may be in contact. Although *P. aff. douglasiana* included forms that were morphologically intermediate, hybrids do not always take intermediate forms (Rieseberg 1995). Detailed studies are needed to explore the relationship between *P. aff. douglasiana* and other closely related species such as *P. devoniana* or *P. pseudostrobus*.

Whang and Pak (2001) reported that the stomatal apparatus of leaf cuticles are rectangular in *P. maximinoi* but elliptic in *P. douglasiana*, epidermal cells of *P. douglasiana* have vertical end walls while those of *P. maximinoi* are vertical and oblique, that the shape of the anticlinal walls in *P. douglasiana* are straight and sinuous while those of *P. maximinoi* are mainly straight, and that *P. douglasiana* has 7–9 epidermal cell rows between stomatal rows while *P. maximinoi* has 12–14. These characters and others merit further study.

Interspecific Gene Flow—Most individuals of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* that we included have the same haplotype, and the same occurs with *P. pseudostrobus*. The typical haplotype of *P. pseudostrobus* is most closely related to haplotypes of *P. montezumae* and *P. hartwegii*, while the typical haplotype of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* are more closely related to *P. devoniana* and other species in the Devoniana clade (Germandt et al. 2009). Hybridization, introgression or incomplete lineage sorting could explain why other individuals of *P. maximinoi* and *P. douglasiana* share plastid haplotypes with *P. pseudostrobus*. Hybridization and introgression are well documented in closely related species of *Pinus* (reviewed by Ledig 1998; recent examples in North American pines include Matos and Schaal 2000; Delgado et al. 2007; Liston et al. 2007). A molecular study of multiple unlinked loci would be helpful for determining whether these patterns are due to hybridization and introgression or incomplete lineage sorting in these taxa.

Geographic Distribution—The modeling of potential distribution of *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus*, and *P. yecorensis* was satisfactory, but we should treat these results with caution given that the optimal conditions were not completely fulfilled in the performance of the modeling (Elith et al. 2011). Ecological niche models offer great promise for the development of hypotheses regarding the distribution of species, but they are subject to a series of limitations (Baldwin 2009; Soberón and Nakamura 2009). Models such as those used here only correlate known presence points with a subset of climate variables. Species distributions can also be determined by their biotic interactions with other species and the capacity that they have for dispersing to other regions (Soberón and Peterson 2005). In our case the sampling of collection sites included in the modeling cannot be considered a completely random sample given that, as usually happens, sites with difficult access are poorly represented. We conclude that the species considered here have a fragmented distribution and that this distribution is not well enough known to design a completely random sample. Another disadvantage in the number of sites used for modeling is that the sample size was small for all taxa except *P. maximinoi*. In this case we can feel somewhat confident because Maxent has been demonstrated to perform satisfactorily with small samples (Phillips et al. 2006; Baldwin 2009). A more accurate potential distribution may be established as we gain a clearer criterion for delimiting *P. maximinoi* and *P. douglasiana*. In this sense a completely reliable distribution can only be proposed when consistent diagnostic characters are found. We believe that

the morphological differences between *P. douglasiana* and *P. maximinoi*, principally in the dimensions of the leaves and cones, are correlated with the environment where they prosper, and as a result we cannot reject the results of the potential distributions. In this case there is a notable similarity in the potential distribution of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* with the areas of distribution of conifer forests, principally pines, in Mexico (Rzedowski 1990; INEGI 2014).

Disagreements exist regarding the distribution of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* in central Mexico. Stead and Styles (1984) stated that *P. douglasiana* and *P. maximinoi* can occur in sympatry in southern Michoacán, but that only *P. douglasiana* occurs in central Mexico, which contradicts statements by Martínez (1948), Mittak and Perry (1979), and Perry (1991). This confusion can be due to the difficulty in distinguishing between *P. douglasiana* and *P. maximinoi* in Michoacán and the State of Mexico; the individuals from these states tend to be intermediate with respect to the typical individuals of *P. douglasiana* and *P. maximinoi* in the width of their needles (WON) and thickness of their cone scales (TOAU). The results of the potential distribution modeling showed that the predominant taxon in central Mexico is *P. douglasiana*, although *P. maximinoi* can occur in sympatry with *P. douglasiana* in southern Michoacán and dispersed throughout the State of Mexico (possibly at low elevations with hot and humid climates). *Pinus maximinoi* is susceptible to frost (Mitchell et al. 2013), which makes it unlikely that it could be distributed at higher elevations throughout the mountains of Central Mexico. Competition with species better adapted to tropical conditions may limit the southward distribution of *P. douglasiana*.

At present, the lack of qualitative diagnostic characters and the overlap of morphological quantitative characters between *P. douglasiana* and *P. maximinoi* prevent a clear taxonomic delimitation between the two. Differences in leaf and cone size could be the result of environmental influence on the morphology of these species. For example, these differences in size could be correlated with temperature. Temperature seasonality has an important influence on the distribution of the four species. It contributes substantially in the distributional modeling since the AUC values decrease when the model is re-evaluated with the permuted values on training presence and background data for this variable. Furthermore, in Central America *P. maximinoi* shows a clinal decrease in the number of hypodermal intrusions and a reduction of its genetic diversity and seed size from north to south (Stead 1983a; Dvorak et al. 2002).

Speciation and Selection in a Topographically Complex Landscape—Throughout the ranges of *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus*, and *P. yecorensis*, geological events have given rise to a complex topography and complex climatic patterns that permit secondary contact, hybridization, and introgression (Ferrusquía-Villafranca 1993; Perry et al. 1998). Furthermore, pines in Mexico follow a distributional pattern determined by elevation and climate (Perry et al. 1998), and phenotypic plasticity in species could be an expression of plant tolerance to climatic changes. Leaf longevity could be strongly related with habitat water- and nutrient relation or stress (Richardson and Rundel 1998). Size differences between *P. douglasiana* and *P. maximinoi* could have originated by climatic changes correlated with differences in elevation and latitude. This same phenomenon could explain the emergence of *P. yecorensis* in northwestern Mexico. *Pinus yecorensis* has unique plastid haplotypes and

although its distribution remains poorly understood, some ecological differences with respect to *P. douglasiana* and *P. maximinoi* have been identified, such as inhabiting a drier climate. Only *P. yecorensis* has both exclusive plastid haplotypes and a distinct combination of leaf and seed cone characters. It might occur in parapatry with *P. douglasiana* so it is possible to expect limited gene flow between the two. Detailed population studies of morphological and molecular variation in *P. yecorensis* are needed to determine its taxonomic status more conclusively.

If *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, and *P. pseudostrobus* have achieved reproductive isolation, monophyly, or diagnosability, we have been unable to demonstrate it. Most individuals collected across a wide distribution range and identified as *P. maximinoi* or *P. douglasiana* share a haplotype (Fig. 3), and studies to date have concluded that variation in peduncle persistence, presence of leaf hypodermal intrusions, and the number and position of resin canals seem to unite more than separate *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. We advocate treating *P. maximinoi* and *P. douglasiana* as separate species, as our data suggest that they are in the early stages of ecological and morphological divergence. Further study of these taxa using a wider diversity of morphological and molecular markers may help us to understand early patterns and processes of speciation in recently diverged conifers.

ACKNOWLEDGMENTS. This work is in partial fulfillment of the requirements of the Posgrado en Ciencias Biológica, UNAM, whose support of the first author is gratefully acknowledged. The first author also thanks CONACyT for providing a graduate scholarship. Funding for field and laboratory work was provided by UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN228209). The authors thank Mark Olson, Martín García, other colleagues of the Instituto de Biología, UNAM, and Victoria Sosa for feedback in the design of the study and for their support. We also thank Ann Willyard, James Smith, Michael Moore, and two anonymous reviewers for their valuable comments on a previous version of this manuscript.

LITERATURE CITED

- Baldwin, R. A. 2009. Use of maximum entropy modeling in wildlife research. *Entropy (Basel, Switzerland)* 11: 854–866.
- Bentham, G. 1842. *Plantae Hartwegianae*. London: W. Pamplin.
- Callahan, R. Z. 2013. *Pinus ponderosa*: Geographic races and subspecies based on morphological variation. Research Paper PSW-RP-265. Albany, California: USDA Forest Service, Pacific Southwest Research Station.
- Challenger, A. and J. Soberón. 2008. Los ecosistemas terrestres. Pp. 87–108 in *Capital natural de México: Conocimiento actual de la biodiversidad*, vol. I. D. F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Clement, M., D. Posada, and K. A. Crandall. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660.
- Consortium of Intermountain Herbaria. 2014. <http://intermountainbiota.org/portal/index.php> [accessed 31 May 2014].
- Critchfield, W. B. and E. L. Little Jr. 1966. *Geographic distribution of pines of the world (No. 991)*. Washington, D. C.: United States Department of Agriculture, Forest Service.
- de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and process of speciation. Pp. 57–67 in *Endless forms: Species and speciation*, eds. D. J. Howard and S. H. Berlocher. New York: Oxford University Press.
- Debreczy, Z. and I. Rácz. 1995. New species of conifers from Mexico. *Phytologia* 78: 217–243.
- Debreczy, Z. and I. Rácz. 2011. Conifers around the world: Conifers of the temperate zones and adjacent regions. Volume 2. Budapest: DendroPress.
- Delgado, P., R. Salas-Lizana, A. Vázquez-Lobo, A. Wegier, M. Anzidei, E. R. Alvarez-Buylla, G. G. Vendramin, and D. Piñero. 2007. Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb. and *Pinus pseudostrobus* Lind. (Pinaceae): Morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences* 168: 861–875.
- Doyle, J. J. and J. J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Dvorak, W. S., J. L. Hamrick, B. J. Furman, G. R. Hodge, and A. P. Jordan. 2002. Conservation strategies for *Pinus maximinoi* based on provenance, RAPD, and allozyme information. *Forest Genetics* 9: 267–278.
- Dvorak, W. S., E. A. Gutiérrez, W. J. Gapare, G. R. Hodge, L. F. Osorio, C. Bester, and P. Kikuti. 2000. *Pinus maximinoi*. Pp. 106–127 in *Conservation and testing of tropical and subtropical forest tree species by the CAMCORE Cooperative*. Raleigh: Central America and Mexico Coniferous Resources Cooperative.
- Eckenwalder, J. E. 2009. *Conifers of the world: The complete reference*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Elith, J., S. J. Phillips, T. Hastie, M. Dudík, Y. E. Chee, and C. J. Yates. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity & Distributions* 17: 43–57.
- Farjon, A. 2005. *Pines: Drawings and descriptions of the genus Pinus*. Boston, Massachusetts: Brill Academic Publishers.
- Farjon, A. 2010. *A handbook of the world's conifers*. Volume two. Leiden, Netherlands: Brill Academic Publishers.
- Farjon, A. and B. T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica. Monograph* 75. New York: New York Botanical Garden.
- Felger, R. S., M. B. Johnson, and M. F. Wilson. 2001. *The trees of Sonora*. New York: Oxford University Press.
- Ferrusquía-Villafranca, I. 1993. Geology of Mexico: A synopsis. Pp. 3–107 in *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution*, eds. T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lott, and J. Fa. New York: Oxford University Press.
- Fox, J. and S. Weisberg. 2011. *An {R} companion to applied regression, second edition*. Thousand Oaks, California: Sage. Website: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/~jfox/Books/Companion>.
- Gapare, W. J., G. R. Hodge, and W. S. Dvorak. 2001. Genetic parameters and provenance variation of *Pinus maximinoi* in Brazil, Colombia and South Africa. *Forest Genetics* 8: 159–170.
- Germadt, D. S., G. Gaeda-López, S. Ortíz-García, and A. Liston. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54: 29–42.
- Germadt, D. S., S. Hernández-León, E. Salgado-Hernández, and J. A. Pérez de la Rosa. 2009. Phylogenetic relationships of *Pinus* subsection *Ponderosae* inferred from rapidly evolving cpDNA regions. *Systematic Botany* 34: 481–491.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hartigan, J. A. and M. A. Wong. 1979. A k-means clustering algorithm. *Applied Statistics* 28: 100–108.
- Hernández-León, S., D. S. Germadt, J. A. Pérez de la Rosa, and L. Jardón-Barbolla. 2013. Phylogenetic relationships and species delimitation in *Pinus* section *Trifoliae* inferred from plastid DNA. *PLoS One* 8: e70501.
- Hijmans, R. J. and J. van Etten. 2012. Raster: Geographic analysis and modeling with raster data. R package version 1.9-92. <http://CRAN.R-project.org/package=raster>.
- Hijmans, R. J., S. E. Cameron, J. L. Parra, P. G. Jones, and A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- INEGI. 2014. Mapa digital de México V6.0. Instituto Nacional de Geografía y Estadística, Mexico City, Mexico [online]. Websites: <http://gaia.inegi.org.mx/mdm5/viewer.html>; <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?S=geo&c=910> [accessed 31 May 2014].
- Ledig, F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. Pp. 251–280 in *Ecology and biogeography of Pinus*, ed. D. M. Richardson. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press.
- Liston, A., M. Parker-Defeniks, J. V. Syring, A. Willyard, and R. Cronn. 2007. Interspecific phylogenetic analysis enhances intraspecific phylogeographical inference: A case study in *Pinus lambertiana*. *Molecular Ecology* 16: 3926–3937.
- Little, E. L. Jr. and W. B. Critchfield. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (pines) (No. 1144). Washington, D. C.: United States Department of Agriculture, Forest Service.
- MacQueen, J. 1967. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. Pp. 281–297 in *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*, eds. L. M. Le Cam and J. Neyman. Berkeley: University of California Press.
- Manly, B. F. 1994. *Multivariate statistical methods, a primer*. London: Chapman and Hall.
- Martínez, M. 1943. Una nueva especie de *Pinus* mexicano. *Madroño* 7: 4–8.

- Martínez, M. 1948. *Los pinos mexicanos*. Ed. 3. Mexico City: Librería y Ediciones Botas, S. A. de C. V.
- Matos, J. A. 1995. *Pinus hartwegii* and *P. rudis*: A critical assessment. *Systematic Botany* 20: 6–21.
- Matos, J. A. and B. A. Schaal. 2000. Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A coalescent approach to hybridization. *Evolution* 54: 1218–1233.
- Mirov, N. T. 1967. *The genus Pinus*. New York: The Ronald Press Company.
- Missouri Botanical Garden. 2015. Tropicos.org. <<http://www.tropicos.org/Name/224900643>> [accessed 08 May 2015].
- Mitchell, R. G., M. G. Wingfield, G. R. Hodge, W. S. Dvorak, and T. A. Coutinho. 2013. Susceptibility of provenances and families of *Pinus maximinoi* and *Pinus tecunumanii* to frost in South Africa. *New Forests* 44: 135–146.
- Mittak, W. L. and J. P. Perry Jr. 1979. *Pinus maximinoi*: Its taxonomic status and distribution. *Journal of the Arnold Arboretum* 60: 386–395.
- Parks, M., R. Cronn, and A. Liston. 2009. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC Biology* 7: 84.
- Perry, J. P. Jr. 1991. *The pines of Mexico and Central America*. Portland, Oregon: Timber Press Inc.
- Perry, J. P. Jr., A. Graham, and D. M. Richardson. 1998. The history of pines in Mexico and Central America. Pp. 137–147 in *Ecology and biogeography of Pinus*, ed. D. M. Richardson. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press.
- Petit, R. J. and A. Hampe. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 37: 187–214.
- Phillips, S. J., R. P. Anderson, and R. E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Price, R. A., A. Liston, and S. H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. Pp. 49–68 in *Ecology and biogeography of Pinus*, ed. D. M. Richardson. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press.
- R Development Core Team. 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0, Website <http://www.r-project.org/>.
- Raxworthy, C. J., C. M. Ingram, and R. G. Pearson. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: A review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology* 56: 907–923.
- Richardson, D. M. and P. W. Rundel. 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*: An introduction. Pp. 3–40 in *Ecology and biogeography of Pinus*, ed. D. M. Richardson. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press.
- Rieseberg, L. H. 1995. The role of hybridization in evolution: Old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82: 944–953.
- Rzedowski, J. 1990. *Vegetación Potencial*. IV. 8. 2. Atlas Nacional de México. Vol II. Escala 1:4000000. Instituto de Geografía, UNAM. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Website: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/> [accessed 31 May 2014].
- Shaw, G. R. 1909. The pines of Mexico. Publication of the Arnold Arboretum, no. 1. Boston, Massachusetts: Arnold Arboretum.
- Silba, J. 1990. A supplement to the international census of the *Coniferae*, II. *Phytologia* 68: 7–78.
- Sites Jr., J. W. and J. C. Marshall. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 199–227.
- Soberón, J. and A. T. Peterson. 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics* 2: 1–10.
- Soberón, J. and M. Nakamura. 2009. Niches and distribution areas: Concepts, methods, and assumptions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 19644–19650.
- Stead, J. W. 1983a. Studies of variation in Central American pines V: A numerical study of variation in the *Pseudostrobus* group. *Silvae Genetica* 32: 101–115.
- Stead, J. W. 1983b. A study of variation and taxonomy of the *Pinus pseudostrobus* complex. *Commonwealth Forestry Review* 62: 25–35.
- Stead, J. W. and B. T. Styles. 1984. Studies of Central American pines: A revision of the 'pseudostrobus' group (Pinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 249–275.
- Syring, J., K. Farrell, R. Businsky, R. Cronn, and A. Liston. 2007. Widespread genealogical nonmonophyly in species of *Pinus* subgenus *Strobus*. *Systematic Biology* 56: 163–181.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall, and C. F. Sing. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. ClustalW. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Whang, S. S. and J.-H. Pak. 2001. Cuticle micromorphology of leaves of *Pinus* (Pinaceae) from Mexico and Central America. *Botanical Journal of the Linnean Society* 135: 349–373.
- Willyard, A., R. Cronn, and A. Liston. 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 498–511.
- Willyard, A., J. Syring, D. S. Gernandt, A. Liston, and R. Cronn. 2007. Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Molecular Biology and Evolution* 24: 90–101.
- Zapata, F. and I. Jiménez. 2012. Species delimitation: Inferring gaps in morphology across geography. *Systematic Biology* 61: 179–194.

APPENDIX 1. Material included in this study. Collections in bold had sequences that were submitted to GenBank. Species, country, state, municipality, locality, collector surname, collection number, herbarium, GenBank accession number, longitude, latitude. Sequences obtained from GenBank (Gernandt et al. 2009). Data from ARIZ, were obtained from the website of the Consortium of Intermountain Herbaria (2014). Missing information is indicated with hyphens.

Pinus aff. douglasiana. MÉXICO. Chihuahua: Urique, Below Mirador Cerro Gallego, near km 445, Gernandt 1076 (MEXU), -, -, -. Durango: San Dimas, Sierra El Espinazo del Diablo. Border between Sinaloa and Durango, López 188 (MEXU), -, -, -. Durango: San Dimas, Sierra El Espinazo del Diablo, Border between Sinaloa and Durango, López 189 (MEXU), -, -, -. Guerrero: San Miguel Totolapan, Al norte de San Miguel Totolapan, Calvillo 71129-3-11 (MEXU), -, -, -. Jalisco: Atenguillo, La Campana, Gernandt 1168 (MEXU), -, -, -. Jalisco: San Gabriel, Al Sur de las Luchas, Nevado de Colima, López 229, 230, 231, 232 (MEXU), -, -, -; San Gabriel, Palos Verdes, Nevado de Colima, López 236 (MEXU), -, -, -; Jalisco: San Gabriel, Palos Verdes, Nevado de Colima, López 237 (MEXU), -, -, -; San Gabriel, Palos Verdes, Nevado de Colima, López 239, 242, 243, 248, 249, 254, 255 (MEXU), -, -, -. Michoacán: Tacántaro, El Fresnito, López 152, 153 (MEXU), -, -, -; Tacántaro, Cerca a el Tepamo, López 154 (MEXU), -, -, -; Sinaloa: Concordia, 3.5 Km al Noreste del Palmito, López 190, 191, 193, 195, 196, 197 (MEXU), -, -, -; Concordia, 1.5 Km al Noroeste del Palmito, López 198, 199, 201, 202, 203 (MEXU), -, -, -; Concordia, Puente El Carrizo, López 220, 221, 222, 223, 225, 226, 228 (MEXU), -, -, -. Sonora: Yecora, Northeast El Pedregoso, Gernandt 1046 (MEXU), -, -, -. Sonora: Yecora, Southwest El Pedregoso, Gernandt 1047 (MEXU), -, -, -. Sonora: Yecora, Northwest La Palmita, Gernandt 1055, 1056, 1061 (MEXU), -, -, -.

P. douglasiana Martínez, MÉXICO. State of Mexico: Temascaltepec, Cerca de San Sebastian Carboneras, López 139, 140 (MEXU), -, - 100.0023889, 19.07947222; Temascaltepec, Albarradas, López 141 (MEXU), KJ152831, -100.0687778, 19.06775; Temascaltepec, Albarradas, López 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 (MEXU), -, -, -; Valle de Bravo, Al Norte de la Laguna de Avandaro, Sousa 2602 (MEXU), -, -, -. Jalisco: Autlan de Navarro, Primera colina al SE de Corralitos, Cochrane 12606 (MEXU), -, -104.3025, 19.60777778; Mixtlán, Along highway between Ameca and Mixtlán, Gernandt 1165 (MEXU), -, -104.37915, 20.47221667; Atenguillo, Cerro de la Campana, Gernandt 1172 (MEXU), -, -, -; Atenguillo, Cerro de la Campana, López 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 24, 25, 26 (MEXU), -, -104.5903611, 20.371975; Atenguillo, Las Cruces, López 28, 29, 30, 32 (MEXU), -, -, -; Tecolotlán, Sierra de Quila, López 173, 174, 175, 176 (MEXU), -, -104.0800333, 20.31754167. Jalisco: Tecolotlán, Sierra de Quila, López 178, 179, 180, 181 (MEXU), -, -104.061225, 20.29802778; Tecolotlán, Sierra de Quila, López 183, 185, 186 (MEXU), -, -104.0612361, 20.27448611; San Gabriel, Road from Tonaya to Ciudad Guzman, Farjon 344 (MEXU), -, -103.674375, 19.64146111; Autlán de Navarro, Corralitos de la Yerbabuena, Cuevas 3-1991 (MEXU), -, -104.2705556, 19.63166667. Michoacán: Coalcoman, Dos Aguas, Gernandt 643 (MEXU), FJ580199, -, -; Ziracuaretiro, Near Caltzonzin, Gernandt 798 (MEXU), FJ580200, -101.9616667, 19.4525; Nuevo Parangaricutiro, Cerca de Rancho Nuevo, López 155 (MEXU), -, -, -; Uruapan, Vivero el Potrerito, López 158, 159 (MEXU), -, -, -; Uruapan, Suroeste de San Andres Coru, López 161 (MEXU), -, -, -; Ziracuaretiro, San Andres Coru, López 162 (MEXU), -, -, -; Tacámbaro, Cerca de los Sauces, López 163 (MEXU), -, -101.3684167, 19.30944444; Tacámbaro, Al Suroeste de Acaten, López 164, (MEXU), -, -, -;

Queréndaro, Cerro Zacatón, Cerca de Milpillás, Santos 1341 (MEXU), -, -100.88, 19.7169444; Morelia, Cerca de Agua Zarca, Santos 1371 (MEXU), -, -101.12, 19.6052861. **Oaxaca:** Ixtlán de Juárez, Southwest of border of Rancho Teja, *Debreczy 37636a* (MEXU), -, -, -; Santa Catarina Juquila, El Pedimento, *López 81, 82* (MEXU), -, -, -; San Juan Lachao, Al sur de Lachao, *López 90* (MEXU), KJ152826, -, -. Oaxaca: San Juan Lachao, Al sur de Lachao, *López, 91* (MEXU), -, -, -. Oaxaca: San Jerónimo Coatlán, Predio Cerro Anole, *Rodríguez 76716-3-26, 76716-1-22, 76716-1-34, 76716-2-1, 76716-4-13, 76716-2-21, 76716-4-1* (MEXU), -, -, -; Santa Catarina Ixtepeji, Al Noreste de Yuvila, *Yescas 72698-2-9* (MEXU), -, -, -. **Sinaloa:** Concordia, La Llantera, *López 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 219* (MEXU), -, -105.8517778, 23.56588889; Concordia, Puente el Carrizo, *López 224* (MEXU), -, -, -. Sinaloa: Concordia, El Carrizo, *CBTF1 3A* (MEXU), -, -105.8286111, 23.5275; Concordia, 2 Km al este de la Lobera, *CBTF1 6* (MEXU), -, -105.8380556, 23.48.

P. maximinoi H. E. Moore, GUATEMALA. Guatemala: San Juan Sacatepequez, Alrededores de la granja avícola, *Armas 8* (MEXU), -, -, -. El progreso: Morazan, Finca Bucaral, *Stead 326* (MEXU), -, -, -. **San Marcos:** Tajumulco, Aldea Tola, *Gerrald 734* (MEXU), -, -, -. HONDURAS. **Cortez:** San Pedro Sula, Road from cofradía to Buenos Aires, *Stead 254* (MEXU), -, -, -. **Francisco Morazán:** Valle de los Angeles, Chalet Cabot, *Linares 5239* (MEXU), -, -87.08333333, 14.03333333; Valle de los Angeles, Valle de los Angeles, 20 Km de Tegucigalpa, *Perry sn* (MEXU), -, -, -. **Lampira:** Gracias, Parque Nacional Celaque, *Mejía 113* (MEXU), -, -88.64625833, 14.56011111. **Santa Bárbara:** Nueva Frontera, La fortuna, *Chaplin C161* (MEXU), -, -, -. **Santa Rosa de Copán:** Dulce Nombre, Dulce Nombre, *Chaplin c346* (MEXU), -, -88.81666667, 14.86666667. MÉXICO. **Chiapas:** Villa Flores, Zona núcleo Tres Picos, *Alvarado c1045* (MEXU), -, -, -; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 107* (MEXU), KJ152825, -, -; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 108, 109, 110, 111* (MEXU), -, -91.74766667, 16.09936111; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 112, 113* (MEXU), -, -91.7326944, 16.1104722; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 114* (MEXU), KJ152824, -, -; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 115, 116* (MEXU), -, -91.72646389, 16.13181389; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 117, 118, 119* (MEXU), -, -91.73463889, 16.10366667; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 120, 121* (MEXU), -, -91.85188889, 16.21566667; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 122* (MEXU), -, -91.78808333, 16.19433333; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 123, 124* (MEXU), -, -91.76566667, 16.16681667; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 125* (MEXU), -, -91.72790833, 16.12224722; La Trinitaria, Lagunas de Monte Bello, *López 126* (MEXU), -, -91.68016667, 16.07516667; Motozintla, Alrededores de Motozintla, *López 128, 129, 130, 131, 132* (MEXU), -, -92.25816667, 15.3425; Motozintla, Jiquilpan, *López 133, 134, 135* (MEXU), -, -92.26636111, 15.33425. **State of Mexico:** Valle de Bravo, N of Temascaltepec along hwy to Valle de Bravo, *Gernandt 446* (MEXU), FJ580208, -, -. **Guerrero:** Tecpan de Galeana, Al sur de La Laguna, *Bautista 371545-1-3* (MEXU), -, -100.7816667, 17.51691667; Ayutla de los Libres, Predio Rancho Ocapa, *Bautista 74110-1-1, 74110-1-2, 74110-4-22* (MEXU), -, -98.95813889, 16.949; Petatlán, La Soledad de los Eranos, *Calvillo 71324-1-2, 71324-1-21, 71324-3-4, 71324-3-8, 71324-3-16* (MEXU), -, -101.1107778, 17.56425; Atoyac de Alvarez, Gravel road S. of San Vicente de Benitez, *Gernandt 742* (MEXU), FJ580209, -100.2952778, 17.27694444; Atoyac de Alvarez, gravel road near Paraiso, *Gernandt 743* (MEXU), -, -100.1988889, 17.38305556; Chilpancingo, Noroeste del Ocotito, *Kruse 2409* (MEXU), -, -99.525, 17.30513333. **Jalisco:** Cabo Corrientes, 7 Km al norte de poblado Provincia, *Castillo 10314* (MEXU), -, -105.25, 20.39166667; Cabo Corrientes, Carretera hacia el Tuito, *López 43, 44, 45, 46* (MEXU), -, -105.3045833, 20.41008333; Cabo Corrientes, Road to El Tuito, *López 47* (MEXU), KJ152829, -, -; Cabo Corrientes, Carretera hacia el Tuito, *López 52, 56* (MEXU), -, -105.3073333, 20.40213889; Cabo Corrientes, Carretera hacia el Tuito, *López 58* (MEXU), -, -105.3109722, 20.39061111; Cabo Corrientes, Carretera hacia el Tuito, *López 60* (MEXU), -, -105.3165278, 20.35455556; **Oaxaca:** San Jerónimo Coatlán, 38.6 Km al sur de San Jerónimo C. brecha a Piedra larga, *Campos 3477* (MEXU), -, -96.9666667, 16.15; San Mateo Piñas, San Mateo Piñas, *López 69, 70* (MEXU), -, -96.44752222, 15.96969444; San Mateo Piñas, San Mateo Piñas, *López 72, 73, 75* (MEXU), -, -96.43713889, 15.97286111; San Mateo Piñas, San Mateo Piñas, *López 77, 78, 79, 80* (MEXU), -, -96.42388056, 15.97737222; Santa Catarina Juquila, Juquila, *López 83* (MEXU), -, -97.286, 16.24075; Santa Catarina Juquila, Juquila, *López 84, 85, 86, 87, 88, 89* (MEXU), -, -, -; San Gabriel Mixtepec, Alrededores de San Gabriel Mixtepec, *López 92, 93, 94* (MEXU), -, -97.08038889, 16.08511111; San Gabriel Mixtepec, Al sur de las Acasias, *Yescas 77162-1-29* (MEXU), -, -, -.

San Mateo Piñas, Camino a San Mateo Piñas, *López 95, 96, 97* (MEXU), -, -96.45747222, 15.97369444; San Mateo Piñas, Camino a San Mateo Piñas, *López 98, 99, 100* (MEXU), -, -96.45905833, 15.96389444; San Mateo Piñas, Camino a San Mateo Piñas, *López 101, 102* (MEXU), -, -96.53013889, 16.0185; San Miguel del Puerto, El Faro, *Salas 2769* (MEXU), -, -96.11472222, 15.99583333; Santa Ana del Valle, Al este de Teotitlán del Valle, *Salas 4367* (MEXU), -, -96.47222222, 17.03888889; San Carlos Yautepec, 3.6 Km N of San Miguel Chongo on Road to San Pedro Sosoltepec, *Saynes 2383* (MEXU), -, -96.97694444, 16.03688889; Santa María Yavesía, Al norte del Cerro Yatin, *Trejo 3059* (MEXU), -, -96.41853889, 17.18510278. NICARAGUA. Jinotega: Jinotega, Road Metagalpa to Jinotega, *Stead 5129* (MEXU), -, -, -; Municipio not stated, N slope of volcan Yali, Douglas, 15073 (MEXU), -, -86.1666667, 13.25.

Pinus pseudostrobus Lindley, GUATEMALA. Alta Verapaz: Chisec, Suereste de Chisec, *Stead 338* (MO), -, -90.225, 15.775. MÉXICO. **Chiapas:** Teopisca, 3 km al sur de Teopisca, *López 106* (MEXU), -, -, -; Huixtlan, Rancho Merced Bazon, *Martínez 27* (MEXU), -, -, -; Las Rosas, Al Norte del poblado Las Rosas, *Higman 14* (MO), -, -92.38, 16.4. **State of Mexico:** Ocuilan, Picacho, *Gernandt 769* (MEXU), FJ580236, -99.45305556, 19.01166667; Sultepec, México on road to Las Banderas electrical station, *Gernandt 434* (MEXU), FJ580198, -, -; Temascaltepec, Cerca de Meson Viejo, *López 136* (MEXU), -, -99.87041667, 19.17625; Texcaltitlán, Cerca del Poblado el Chapaneal, *López 138* (MEXU), -, -99.96252778, 18.95247222; Temascaltepec, Albarradas, *López 150* (MEXU), -, -99.998, 19.12388889. **Guerrero:** Tlacotepec, El Iris, *Gernandt 752* (MEXU), -, -, -. **Hidalgo:** Metepec, Along rd. beyond Apulco, *Gernandt 411* (MEXU), FJ580234, -, -; Municipio Desconocido, Maguay Verde, *Gernandt 631* (MEXU), -, -, -. **Jalisco:** Talpa de Allende, 17.3 Km al oeste de Talpa de Allende, *López 33* (MEXU), -, -104.9937778, 20.36330556; Talpa de Allende, Sierra del Cuale, *López 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41* (MEXU), -, -, -; Talpa de Allende, Sierra del Cuale, *López 36* (MEXU), -, -, -. **Michoacán:** Angangueo, W of Angangueo, *Gernandt 815* (MEXU), FJ580238, -100.3125, 19.61083333; Nuevo Parangaricutiro, El Mudo, *López 156* (MEXU), -, -102.1508611, 19.39905556; Tacámbaro, Al Suroeste de Acatan, *López 165, 166, 167, 169* (MEXU), -, -101.3661389, 19.34080556; Tacántaro, El Tepamo, *López 151* (MEXU), -, -102.2653611, 19.34980556; **Morelos:** Huitzilac, Tres Marías, *Gernandt 822* (MEXU), -, -99.21, 19.027222. **Oaxaca:** Santa Catarina Ixtepeji, Along Hwy 175, 4.5 Km N of La Cumbre, *Gernandt 531* (MEXU), -, -, -; San Juan Mixtepec, Cienega de la Ardilla, *Reyes 6482C* (MEXU), -, -, -; Santa María Yavesía, Al norte del Cerro Yatin, *Trejo 3077* (MEXU), -, -96.38645, 17.20516667; **Veracruz:** Las Vigas, East of Las Vigas in malpais, *Gernandt 1178, 1179* (MEXU), KJ152827, -97.07244444, 19.62602778; Coatepec, Antigua Carretera Xalapa-Coatepec, *Gernandt 1180* (MEXU), -, -96.94722222, 19.50408333; Acajete, Gravel road between Cinco Palos and Las Vigas, *Gernandt 1181* (MEXU), -, -, -. Veracruz, Las Vigas, East of Las Vigas along highway to Xalapa, *Gernandt, 1185* (MEXU), KJ152828, -, -; Las Vigas, East of Las Vigas along highway to Xalapa, *Gernandt 1186* (MEXU), -, -, -; Huatusco, Al norte del poblado Huatusco, *Nee 28907* (MO), -, -97.01, 19.2. U.S.A. California, Placer, Institute of Forest Genetics, *Gernandt 681* (MEXU), -, -, -.

P. yecorensis Debreczy & Rác. MÉXICO. Chihuahua: Temosachic, Temosachi-Nabogame, *La Ferriere sn* (ARIZ), -, -108.5, 28.5; **Chihuahua:** Ocampo, Arroyo Balloreca, *Martin sn* (ARIZ), -, -108.3833, 28.2. Moris, El Pilar Mayo, *Martin sn* (ARIZ), -, -108.605, 28.105; Ocampo, Ocampo-Moris, *Martin sn* (ARIZ), -, -108.4, 28.18333. **Sinaloa:** Concordia, Capilla textla, *Debreczy 39896* (MEXU), -, -105.858226, 23.422677. **Sonora:** Yecora, west of Yecora, *Gernandt 1049* (MEXU), -, -, -; Yecora, Yecora, *Gernandt 1052* (MEXU), -, -108.9825694, 28.3635; Yecora, west of Puerto la Cruz, *Gernandt 1054* (MEXU), KJ152830, -109.0425, 28.37993889; Yecora, Yecora, *Gernandt 1063* (MEXU), -, -, -; Yecora, Yecora-Cienega de Camilo, *Reina 96-279* (MEXU), -, -108.5666667, 28.43333; Yecora, Yecora-El Aguajito, *Reina G97-185-A* (MEXU), -, -109.0483, 28.37167; Yecora, NA, *Ferguson 2422* (OSC), FJ580201, -, -; Yecora, Tepoca, *Reina 98-561-A* (ARIZ), -, -109.3397222, 28.46694444; Rosario, Yecora-Agua Amarilla, *Reina 95-239* (ASU), -, -109.375, 28.13888889; Yecora, Rio Yaqui, *Rea sn* (ARIZ), -, -109.1833, 28.41667; Soyopa, Rio Yaqui, *Yatskievych sn* (ARIZ), -, -109.3333, 28.53333; Yecora, San Nicolas, *Martin sn* (ARIZ), -, -109.14167, 28.4; Chinipas, El Territo, *Martin sn* (ARIZ), -, -108.7083, 27.575; Yecora, Agua Amarilla, *Martin sn* (ARIZ), -, -109.3417, 28.45833; Alamos, Chiribo, *Martin sn* (ARIZ), -, -108.7117, 27.3; Yecora, Rancho La Mantequilla, *Van Devender sn* (ARIZ), -, -109.1608, 28.49528; Yecora, Rancho Yerbaniz, *Van Devender sn* (ARIZ), -, -109.165278, 28.499167; Yecora, Santa Ana, *Goldberg sn* (ARIZ), -, -109.3167, 28.38333.

Anexo B

Glosario

Alopatría. Situación en la cual dos o más especies se encuentran distribuidas en áreas diferentes.

Filogenia. Relación genealógica, es decir relaciones históricas, entre un conjunto de taxones. En ocasiones se hace referencia a las relaciones históricas entre linajes o sus partes, por ejemplo, genes.

Introgresión. Infiltración o difusión de genes, de una especie a otra especie, que se mantiene generaciones después de que ocurrió la hibridación entre tales especies. Puede suceder cuando las poblaciones forman híbridos bajo condiciones que se favorecen recíprocamente; los híbridos y su descendencia se vuelven a cruzar (retrocruza) con la especie favorecida.

Árbol filogenético. Diagrama en el cual se representa mediante ramas las relaciones genealógicas entre taxa. En ocasiones los árboles representan las relaciones de los ancestros y sus descendientes o patrones de especiación (después de Nelson).

Bráctea. Hoja reducida o estructura en forma de hoja en la base de una flor o inflorescencia; en las coníferas es una estructura que nace del eje del cono ovulífero.

Catáfilo. Estructura en forma de escama, de color pardo o incolora, que se cree es una hoja modificada.

Coalescencia. Patrón observado, una visión retrospectiva, del momento en que dos linajes (de genes, especies o poblaciones) convergen en ancestro común.

Diagnosis. En sistemática es la práctica de señalar de forma resumida el conjunto de atributos que permiten reconocer a un taxón y diferenciarlo de otros taxones.

Entropía. Término usado para expresar el grado de desorden de un sistema.

Especiación. Proceso mediante el cual se forma una especie.

Filogenia. Patrón de relaciones genealógicas entre taxa en un contexto histórico amplio.

Hibridación. Formación de individuos que son el resultado de la cruce de dos especies diferentes o en su sentido más amplio la cruce entre individuos genéticamente diferentes (individuos de linajes diferentes).

Modelo. Es una abstracción idealizada de un objeto o un evento en estudio. Construir modelos es una de las tareas primordiales del científico; Los científicos elaboran modelos porque dado un evento natural y complejo, no es posible estudiarlo en todos sus aspectos para comprenderlo, por ello es necesario simplificarlo e idealizarlo para su análisis.

Plasticidad fenotípica. Es la propiedad que tiene el genotipo de un individuo cualquiera de producir diferentes fenotipos cuando se exponen a diferentes condiciones ambientales.

Tocogenia. Se refiere a las relaciones de parentesco que tienen una forma reticular. Hennig (1966) llamó "relaciones tocogenéticas" a las relaciones genealógicas (reticulares) que existen entre individuos de una especie y relaciones filogenéticas (jerárquicas) a las existentes entre especies diferentes.

Monofilia. Patrón evolutivo de relaciones filogenéticas en el que se muestra a un grupo de taxa y su ancestro común más reciente. Monofilia recíproca.

Polifilia. Es un patrón evolutivo de relaciones filogenéticas en el cual se observa que uno o más de los taxa de un grupo preestablecido tuvieron diferentes orígenes en virtud de que los taxa de dicho grupo taxonómico están incluidos en diferentes grupos monofiléticos (estos incluidos a su vez en un esquema más amplio de relaciones taxonómicas).

Retención del polimorfismo ancestral. Fenómeno en el cual las especies conservan caracteres presentes en la especie de la cual se originaron (especie ancestral).

Sinapomorfia. Es un carácter derivado (no ancestral) que define a un grupo taxonómico en virtud de que todos los taxa de dicho grupo lo poseen.

Simpatría. Término empleado para indicar que dos o más grupos taxonómicos se encuentran en una misma área.