



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

Distribución y Variación Genética de *Pinus greggii*  
Engelm.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

**P R E S E N T A**

MARÍA DEL CARMEN DOMÍNGUEZ BAUTISTA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ALEJANDRA CITLALLI MORENO-LETELIER



LOS REYES IZTACALA TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO, 2018.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A MAMÁ

Ma. Magdalena Bautista Pérez.

# Agradecimientos

Mi más profundo agradecimiento a mi mamá Ma. Magdalena Bautista Pérez, me enseñaste lo maravilloso que es la vida y el amor, a pesar de todas las adversidades siempre estuviste al pendiente de todas mis necesidades y siempre me impulsaste para cumplir mis metas. Aunque ya no te encuentras físicamente a mi lado, siempre te llevo en mis pensamientos y corazón y sé que cuidas de mí en todo momento. Gracias mamá por tu comprensión incondicional, gracias por guiarme y acompañarme en todo momento. Gracias por compartirme tu sabiduría, nobleza y amor. ¡Siempre serás mi número 1!

Quiero agradecer a la Dra. Alejandra Moreno-Letelier por darme la oportunidad de ser parte de este maravilloso proyecto, gracias por brindarme tu confianza y apoyo, enseñanza y paciencia que me ayudaron a desarrollar este trabajo, gracias por tu amistad.

Al Dr. David Gernandt por compartir su conocimiento del mundo de las coníferas e invitarme al campo para mostrarme lo fascinante que son los pinos, gracias por su amistad. A la Dra. Xitlalli Aguirre por su enseñanza y gran paciencia que me ayudaron a superar la novatada en el trabajo de datos de secuenciación de nueva generación. A la Dra. Niza Gámez por compartir sus conocimientos de programación en R y que fueron esenciales para la culminación de este trabajo. A todas las personas que forman parte de este equipo de trabajo y que sin su apoyo esta tesis hubiese sido difícil desarrollar.

Gracias Dante y Rubén!! por compartirme datos interesantes de las gimnospermas y ayudarme a afinar el ojo para identificar especies.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Genética de la Conservación por su amistad y hacer mis días divertidos con sus pláticas y ocurrencias: Mel, Erick, Néstor, Rebeca, Santiago, Valeria y Cris, y gracias también a la Dra. Ana Wegier por invitarme a los seminarios que organiza y compartir su conocimiento en materia de conservación.

Ahora, quiero hacer mención a mis abuelos: Simona y Epifanio, porque son mis viejitos que desde siempre están al pendiente y cuidan de mí. A mis tías y tíos: Regina, Antonia, Angélica, Guadalupe, Juan, Francisco y Gerardo por subirse al barco que navego y apoyarme para alcanzar mis metas. A mis primos Manuel, Nancy, Aline, Armando y Gabriel que son como hermanos y que el tiempo a su lado es pura diversión, gracias por todo su cariño.

A mis amigos Carlos, Lulú, Jaime y Daniel por tantos años de amistad y los buenos momentos a su lado, ustedes son maravillosas personas, ¡Los quiero!! Gracias por todo!

A mis amigos de la carrera que han estado en las buenas y malas en todo momento: Michelle, Carolina, Marisol, Dianis, Toño, Jesse y Chaniz por hacer las clases aún más

interesantes y divertidas. A mis roomies que son familia y juntos hemos creado una red de seguridad: Angie, Tania, Lulú, Xoch, Hilary, Alicia, Nohemi, Elizabeth y Daniel, hacen que el compartir un espacio sea realmente compartir un hogar, gracias por enseñarme tanto.

En especial quiero agradecerle Angie, porque tu cariño y compañía fue esencial para que pudiera mantenerme en pie en momentos realmente difíciles, gracias por tu apoyo y no dejarme sola, gracias por cuidar de mí en todo momento.

¡Gracias profe! Dr. Hugo Perales Vela por el gran cariño y amistad, gracias por estar presente en mi vida y ser un ejemplo a seguir, gracias por creer en mí y compartirme pláticas de mucha sabiduría que me han ayudado a seguir adelante.

Gracias a todas las personas que he encontrado en mi camino y forman parte de mi vida, porque me dan datos valiosas enseñanzas y de alguna manera contribuyeron a la culminación de esta tesis.

Agradezco a mi casa de estudios, la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y Universidad Nacional Autónoma de México por darme tanto: experiencias, sabiduría, amigos, profesores, ciencia y arte. Gracias a toda la comunidad UNAM.

El financiamiento para realización de este trabajo provino del proyecto CB-2013/221694 "Herramientas genómicas para el estudio de la diversificación del género *Pinus*" otorgado al Dr. David Gernandt y agradezco al CONACyT por el apoyo financiero para este trabajo, número de becario 23963.

# Índice General

Resumen	7
<b>1 Introducción</b>	<b>8</b>
1.1 El género <i>Pinus</i> en México y <i>Pinus greggii</i> .....	8
1.1.1 El género <i>Pinus</i> en México y <i>Pinus greggii</i> .....	9
1.1.2 Importancia ecológica y económica .....	11
1.2 Estudio de parámetros poblacionales en las especies .....	12
1.2.1 Diversidad y estructura genética .....	12
1.2.2 Flujo génico .....	13
1.2.3 Sistema de apareamiento en pinos y efectos de la endogamia .....	14
1.3 Métodos para estimar la diversidad genética .....	16
1.3.1 Pruebas de neutralidad .....	18
1.3.2 Métodos para evaluar la estructura genética .....	19
1.3.3 Estimación de la endogamia .....	21
1.4 Estudios genéticos en pinos .....	22
1.5 Uso de secuenciación de nueva generación (NGS) para estudio de la diversidad genética .....	23
1.6 Modelación de la distribución potencial como herramienta para la conservación.....	24
1.7 Justificación .....	27
1.8 Hipótesis .....	28
1.9 Objetivos .....	29
1.9.1 Objetivo general .....	29
1.9.2 Objetivos particulares.....	29

<b>2</b>	<b>Materiales y métodos</b>	30
2.1	Muestreo en campo y extracción de ADN .....	30
2.2	Método de secuenciación Hyb-Seq .....	31
2.2.1	Preparación de bibliotecas enriquecidas por genes de interés y secuenciación paralela .....	32
2.2.2	Procesamiento de lecturas tipo <i>paired end</i> .....	33
2.3	Análisis de parámetros poblacionales .....	34
2.3.1	Diversidad genética y pruebas de neutralidad .....	34
2.3.2	Diversidad genética y endogamia .....	35
2.4	Análisis de información geográfica .....	37
2.4.1	Distribución potencial de <i>Pinus greggii</i> de la actualidad y proyecciones a futuro.....	37
<b>3</b>	<b>Resultados</b>	39
3.1	Diversidad genética y pruebas de neutralidad .....	39
3.2	Endogamia y estructura genética .....	41
3.3	Modelo de distribución potencial de la actualidad y a futuro CCSM-rcp45 (año 2050 y 20170) .....	46
<b>4</b>	<b>Discusión</b>	49
4.1	Diversidad y análisis de las pruebas de neutralidad .....	49
4.2	Estructura genética .....	50
4.3	Endogamia .....	52
4.4	Distribución potencial de <i>Pinus greggii</i> en la actualidad y a futuro (año 2050 y 2070) .....	56
4.5	Conservación de <i>Pinus greggii</i> .....	58
<b>5</b>	<b>Conclusiones</b>	60
<b>6</b>	<b>Glosario</b> .....	61
<b>7</b>	<b>Anexos</b> .....	62
<b>8</b>	<b>Literatura citada</b> .....	66

# Resumen

Mediante estudios de diversidad y estructura genética poblacional, es posible determinar la riqueza genética de una especie e inferir su potencial evolutivo en respuesta a los cambios ambientales naturales y/o provocados por las actividades humanas. Su conocimiento y comprensión permite desarrollar estrategias de conservación para poblaciones, especies y recursos genéticos. *Pinus greggii* Engelm. es una especie endémica de México que presenta una distribución aislada en dos regiones geográficas y la IUCN la considera en categoría de vulnerabilidad. Para esta especie únicamente se han realizado dos estudios de variación isoenzimática y se ha documentado alta diversidad genética, pero en los últimos años su distribución ha tenido una severa fragmentación debido a factores antropogénicos, lo que puede provocar pérdida de su diversidad genética.

Los resultados del presente estudio muestran que *P. greggii* posee una moderada estructura genética  $F_{st} = 0.0673$  y un alto nivel de diversidad genética, el valor estimado de diversidad haplotípica fue  $H_d = 0.8315$  y el número promedio de alelos por locus fue  $A = 11.3$ , esta alta diversidad genética es similar a lo reportado en pinos de zonas templadas pero no de pinos de distribución subtropical y restringida, lo que en principio esta condición le confiere la habilidad para evolucionar en respuesta a cambios ambientales. Los análisis también muestran que hay mayor contribución de flujo génico de la población de *P. greggii* var. *greggii* a la población de *P. greggii* var. *australis*. Sin embargo se encontró que *P. greggii* posee un alto coeficiente de endogamia  $F_{is} = 0.6625$  debido al alto grado de autofertilización, y estos datos sugieren un posible purgamiento genético y en consecuencia es posible que el sistema de apareamiento ha cambiado de ser un sistema cruzado a ser un sistema de apareamiento intermedio. En este estudio también se modeló la distribución geográfica de la actualidad de las poblaciones de *P. greggii* y a futuro bajo escenario de cambio climático. Los resultados de los modelos muestran que a futuro para los años 2050 y 2070 ocurre desplazamiento de la distribución de sus poblaciones hacia el norte de la Sierra Madre Oriental, quedando en contacto sus poblaciones, que en la actualidad se encuentran aisladas.



# 1 Introducción

## 1.1 El género *Pinus* en México y *Pinus greggii*

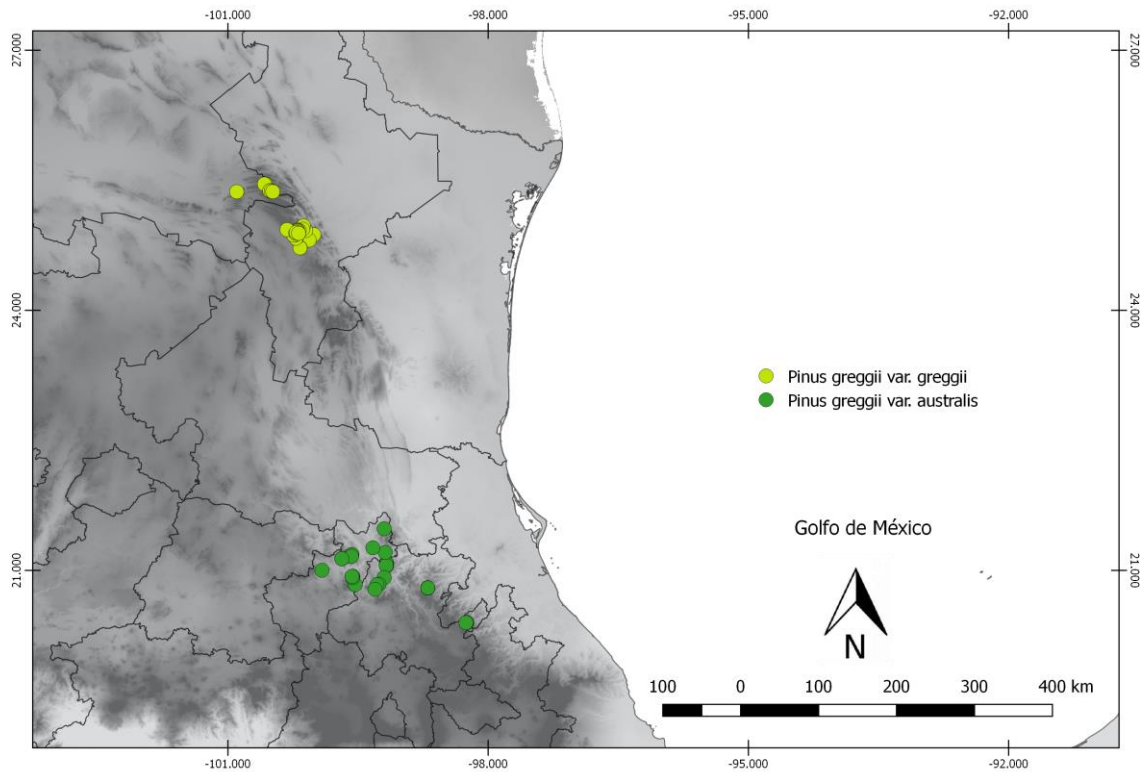
El género *Pinus* de la familia Pinaceae representa a los árboles de mayor importancia ecológica y económica de las zonas templadas del mundo (Richardson y Rundell, 1998). México es el país con el mayor número de especies de este género, ya que en el país se distribuyen aproximadamente 50 de las 115 especies reconocidas (Farjon y Styles, 1997; Farjon, 2010; Gernadt y Pérez de la Rosa 2013).

Esta gran diversidad de especies en México, se ha interpretado por la ubicación del territorio que se encuentra en la zona de transición entre las provincias biogeográficas neárticas y neotropicales (Rzedowski, 2005), resultado de diferentes eventos geológicos, climáticos y ecológicos (Moreno-Letelier, 2009).

*Pinus greggii* Engelm. se distribuye en la Sierra Madre Oriental y es una especie endémica de México (Donahue y López-Upton, 1999; Parraguirre *et al.*, 2002). Esta especie forma parte del grupo de pinos de la sección *Trifoliae*, subsección *Australes* de la familia Pinaceae (Gernandt *et al.*, 2005). Su distribución se reporta en dos regiones geográficas en la Sierra Madre Oriental, aisladas por aproximadamente 360 km. Al norte de su distribución, *P. greggii* se encuentra en los estados de Coahuila y Nuevo León, y al sur en los estados de San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla. Así mismo, se ha reportado que estas dos regiones geográficas presentan diferentes condiciones climáticas (Donahue y López-Upton, 1999; Parraguirre *et al.*, 2002; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005).

Debido al aislamiento geográfico y las diferencias climáticas entre ambas regiones, se ha planteado que existe poco flujo génico entre las poblaciones de *P. greggii* y por tanto marcada diferenciación genética (Parraguirre *et al.*, 2002). Estudios de variación morfológica realizados por Donahue y López-Upton (1999) describen dos variedades taxonómicas de esta especie: *Pinus greggii* var. *greggii* que habita la región norte y *Pinus greggii* var. *australis* que habita la región sur (figura 1). En su hábitat natural, *P. greggii* se encuentra asociado a otras especies

de pinos como: *Pinus leiophylla*, *Pinus teocote*, *Pinus montezumae*, *Pinus arizonica*, *Pinus pseudostrobus* y *Pinus patula*, así como *Juniperus*, *Liquidambar* y *Alnus* (Farjon, 2005; Ramírez-Herrera et al, 2005).



**Figura 1.** Localización geográfica de las variedades taxonómicas de *Pinus greggii* Engelm.

### 1.1.1 Descripción morfológica

Los árboles adultos de *P. greggii* alcanzan una altura de 25 metros de altura y hasta 40 cm de diámetro, por lo general poseen un solo tronco recto (Eguiluz-Piedra, 1978). Su corteza es color café grisácea, áspera y dividida por profundas fisuras verticales. Presenta hojas de forma acicular de color verde brillante, la copa del árbol es abierta de follaje denso y redondeada con la edad, sus ramas son ascendentes largas y delgadas que se extienden de manera horizontal al tronco.

Los estróbilos son subterminales pedunculados, solitarios o agregados, con escamas armadas por una pequeña espina comúnmente caediza. Presenta semillas aladas que se encuentran dentro los conos que son serótinios, oblongo-cónicos, lustrosos de color ocre amarillento, son oblicuos ligeramente curvados y se presentan en grupos de tres a seis y en ocasiones de hasta ocho formando racimos nodales (Eguiluz-Piedra, 1978; Farjon y Styles, 1997; Musalém y Martínez, 2003).

Dohanue y López-Upton (1999) describen a *Pinus greggii* var. *australis* con acículas significativamente más grandes, con mayor número de estomas por unidad de longitud de hoja, semillas más ligeras y cinco veces más frecuentes los canales de resina internos que en *Pinus greggii* var. *greggii*. Las diferencias morfológicas que indican la existencia de dos variedades de la especie son los siguientes:

La variedad *australis* presenta hojas en fascículos de 3, que miden de 10-15 cm de largo, estas son ásperas, erectas, de color verde claro brillante, anchamente triangulares de 1.0-1.3 mm y presentan de 36-41 estomas por 3 mm de longitud de hoja. Los canales de resina son en número de 3-4 predominantemente medios y 1.2 interno. La longitud del cono es de 8-13 cm y de ancho 3-5 cm. Las semillas miden 5-7 mm de longitud y 3-4 mm de ancho, la longitud del ala de la semilla es de 11-16 mm, y de ancho 6-8 mm.

La variedad *greggii* presenta hojas también en fascículos de 3, que miden de 7-12 cm de largo y 1.2-1.4 mm de ancho, presentan de 34-37 estomas por 3mm de longitud de hoja. Los canales de resina son de 2-4 medios. La longitud del cono es de 8-12 cm y de ancho miden de 3-5 cm. Las semillas miden de 5-8 mm de longitud y 3-4 mm de ancho, la longitud del ala de la semilla es de 13-16 mm y 5-7 mm de ancho (Dohanue y López Upton, 1996; 1999).

## 1.1.2 Importancia económica y ecológica

Para las poblaciones humanas que habitan en las zonas aledañas de la distribución de *P. greggii*, los árboles representan gran valor económico. Localmente se utilizan como leña combustible y como postes para cercas, además se aprovechan para obtención de madera en la industria de la celulosa y aserrío (Ramírez-Herrera *et al.*, 2005).

En México, *P. greggii* es la cuarta especie de pino en términos de importancia en plantaciones del Programa Nacional de Reforestación (Ramírez-Herrera *et al.*, 2005), debido a que ha mostrado gran capacidad de supervivencia y desarrollo en condiciones de humedad limitada, así como altas tasas de crecimiento en altura y diámetro en ensayos de plantaciones (López-Upton *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 1999; Azamar *et al.*, 2000; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005). Por esto último, el interés de forestales extranjeros ha ido en aumento debido su capacidad de supervivencia en localidades con baja precipitación, y se ha implementado para producción forestal en países como India, Sudáfrica, Zimbabwe, Argentina y Brasil (Farjon, 2010). Sin embargo en las poblaciones naturales de *P. greggii* recientemente se ha demostrado una severa fragmentación por diferentes causas antropogénicas, como la sobreexplotación del bosque de pino del que forma parte, especialmente la variedad *australis*, por lo que la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) la considera en categoría de vulnerabilidad (Farjon, 2013; IUCN, 2017).

El proceso de fragmentación conlleva la pérdida de hábitat y en consecuencia inmediata la reducción del tamaño efectivo de la población y de esta manera se reduce la diversidad genética (Terborgh, 1992), ya que las poblaciones que permanecen en fragmentos tienen un número menor de individuos que la población original y constituyen muestras que no representan el total de la diversidad genética de la especie (Terborgh, 1992; Núñez y Tapia, 2010; Arzate *et al.*, 2016). Conocer el nivel de diversidad genética presente en una especie, así como su distribución dentro y entre las poblaciones es muy importante ya que permite implementar

estrategias de conservación para mantener la viabilidad de las poblaciones, ya que la diversidad genética es la materia prima para la evolución (Frakham *et al.*, 2002; Rocha y Gasca, 2007).

## **1.2 Estudio de parámetros poblacionales en las especies**

La diversidad genética es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de procesos evolutivos que operan sobre estas variaciones (Piñero *et al.*, 2008; Futuyma, 2009).

La genética de poblaciones es una disciplina que nos permite explorar la variación genética dentro y entre poblaciones de las especies. Su objetivo es explicar los patrones de variación y estructura genética en términos de las fuerzas evolutivas a una escala ecológica, es decir cambios a corto plazo (Hedrick, 2011; Eguiarte *et al.*, 2013). Para ello utiliza modelos matemáticos que permiten determinar la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones en el proceso evolutivo (Hedrick, 2011).

### **1.2.1 Diversidad y estructura genética**

La estructura y diversidad genética actual de las especies son en gran medida consecuencia de procesos demográficos históricos, como expansiones-contracciones poblacionales dependientes de los cambios climáticos del pasado (Hewitt, 1989; Comes y Kadereit, 1998; Moreno-Letelier, 2009), así como de la estructura espacial que los individuos presentan en la actualidad, de la interacción de la biología reproductiva y del movimiento de flujo de genes (Terborgh, 1992; De Lucas, 2009). El tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ), es también uno de los factores que explican los niveles de diversidad genética encontrados en las especies, este

se asocia al tamaño poblacional que es relevante en términos evolutivos (es decir el número de individuos reproductivos) que contribuyen a las siguientes generaciones en términos genéticos y demográficos (Wright, 1930; Hedrick, 2011). Si las poblaciones poseen alta diversidad genética, esto implica que el tamaño efectivo poblacional es (o ha) sido muy grande, y/o que existe gran cantidad de flujo génico entre las poblaciones. Si al contrario las poblaciones que forman una especie son muy diferentes entre sí es posible que el tamaño efectivo poblacional sea pequeño o que exista bajo flujo génico entre ellas (Hedrick, 2011; Eguiarte *et al.*, 2013).

Estudios comparativos basados en marcadores moleculares, han encontrado que los árboles (como las coníferas) poseen alta diversidad genética y poca diferenciación entre sus poblaciones, a diferencia de plantas herbáceas y arbustos (Hamrick y Godt, 1996; Nybom, 2004; Petit y Hampe, 2006). Esta alta diversidad genética en las coníferas se ha interpretado como resultado de la longevidad que caracteriza a este grupo, permitiéndoles preservar la diversidad genética durante largos periodos de tiempo (Petit y Hampe, 2006; Piñero *et al.*, 2008), así como de su sistema genético y reproductivo que se considera exclusivamente sexual (ya que son pocos los casos de reproducción clonal dentro de este género), su sistema de apareamiento cruzado y de los diferentes procesos demográficos a los que ha estado sujeto este grupo (Ledig, 1998; Moreno-Letelier, 2002; Moreno-Letelier, 2009).

## **1.2.2 Flujo génico**

El flujo génico es un término colectivo que incluye todos los mecanismos que dan como resultado el movimiento de genes de una población a otra (Wright, 1943; Slatkin, 1985) y puede ser en mayor o menor grado, modificando las frecuencias alélicas en las poblaciones. Los genes pueden ser transportados por el movimiento de gametos como el polen, o por semillas. Cabe mencionar que los migrantes que tienen éxito en reproducirse y dejan descendencia a las siguientes generaciones

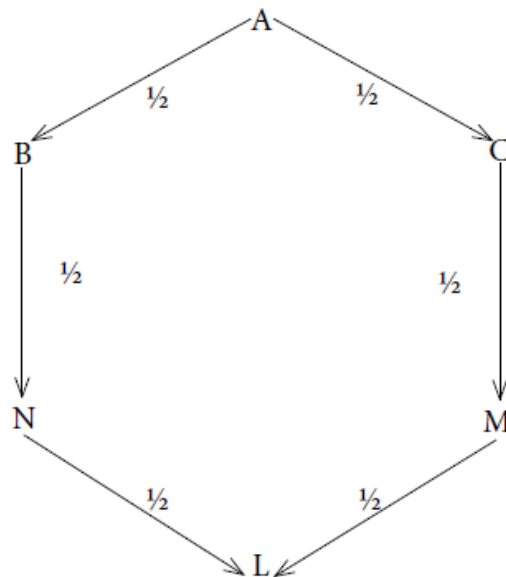
son quienes contribuyen al flujo génico (Slatkin, 1985; Hedrick, 2011). Este proceso es uno de los factores determinantes de la estructura genética en las poblaciones de una especie, ya que si existe gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales todas ellas evolucionan de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva génica), pero si el flujo génico es bajo entre las poblaciones, cada población evoluciona en forma casi independiente (Wright, 1943; Slatkin, 1985; 1987; Hedrick, 2011).

En los pinos el flujo génico ocurre por la dispersión de polen y en muchos casos de las semillas por acción del viento, permitiendo flujo génico a grandes distancias y la fundación de nuevas poblaciones (Aguirre-Planter, 2007). Pero en otros casos de pinos, las semillas se dispersan por la acción de animales promoviendo que parientes se encuentren agrupados y pueda haber endogamia en las poblaciones (Vander Wall, 1992; Farjon y Styles, 1997; Ledig, 1998; Moreno-Letelier, 2002).

### **1.2.3 Sistema de apareamiento en pinos y efecto de la endogamia**

El sistema de apareamiento es el conjunto de estrategias e interacciones que ocurren entre los individuos de una población y determinan el patrón de apareamiento en las especies (Clegg, 1980; Vogler y Kalisz, 2001), es decir que individuos se aparean con los demás y como sucede el apareamiento. En cambio, el sistema reproductivo incluye en sentido amplio los aspectos de la expresión sexual en las especies y hace referencia a la forma en que se encuentran disponibles las estructuras reproductoras masculinas y femeninas en los individuos (Darwin, 1887; Dafni 1992; Abarca y López, 2007). Los pinos son especies monoicas y en general tienen sistema de apareamiento cruzado, que se refiere a los apareamientos con distintos individuos no emparentados y que ocurren al azar (panmixia) (Vogl *et al.*, 2002; Moreno-Letelier, 2002).

La endogamia es un proceso generado por el apareamiento entre parientes y como consecuencia aumenta la homocigosis en las poblaciones sin alterar las frecuencias alélicas (Futuyma, 2009; Hedrick, 2011). Este proceso puede ser estimado directamente por medio de una genealogía (figura 2), particularmente cuando se tiene información de los miembros fundadores de una población y de su descendencia. Pero debido a que generalmente no tenemos la genealogía de los individuos y no sabemos si ha ocurrido apareamiento entre parientes en generaciones anteriores, la endogamia también puede estimarse por medio de un marcador morfológico o molecular (Eguiarte y Piñero, 1990; Abarca y López, 2007).



**Figura 2.** Genealogía de un individuo endogámico L, producto del apareamiento de dos primos hermanos N y M con un ancestro A heterócigo.  $\frac{1}{2}$  se refiere a heredar un alelo idéntico por descendencia. Tomado de Abarca y López (2007).

La endogamia tiene diferentes efectos sobre las poblaciones: 1) redistribución de genes del estado heterócigo al estado homócigo sin alterar las frecuencias alélicas; 2) aumento de la probabilidad de expresión de alelos deletéreos; y 3) disminución del tamaño efectivo poblacional (Kelly y Sork, 2002; Hedrick, 2011). Aunado a esto, en el proceso de deriva génica, los alelos presentes en un momento dado en una población de individuos diploides, son solo una



muestra de los alelos presentes en la generación previa, ya que algunos de ellos no fueron transmitidos a la siguiente generación únicamente por azar, y así sucesivamente (Futuyma, 2009). Con el paso del tiempo las siguientes generaciones presentan cada vez menos copias de los alelos originales y cada vez los individuos se vuelven más homocigos (Hedrick, 2011). Por lo que si además en las poblaciones existe una alta tasa de cruzamientos entre parientes, aumenta la probabilidad de que alelos deletéreos en homocigosis puedan expresarse y conducir a la depresión por endogamia, que es la reducción de los valores promedio de adecuación en la progenie (Frankel y Soulé 1981; Barrett y Charlesworth, 1991; Terborgh 1992; Hedrick 2011). El tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ), también puede ser reducido por acción de la endogamia y deriva génica. Como se ha mencionado anteriormente, en ambos procesos las poblaciones cada vez presentan menos copias de los alelos originales y ocurre el decaimiento de la heterocigosis, donde el número de heterocigotos en una población disminuye a una tasa de  $(1/2N)$ . Este decaimiento que tiene mayor significancia en poblaciones pequeñas, puesto que la pérdida o fijación alelos ocurre más rápido que en poblaciones grandes (Wright, 1930; Hedrick, 2011).

### **1.3 Métodos para estimar la diversidad genética**

Existen varios métodos para estimar la diversidad y estructura genética en las poblaciones, pero es importante recalcar que todos los diferentes métodos se relacionan entre sí y se basan en el análisis de las diferencias en las frecuencias alélicas (Eguiarte *et al.*, 2010).

La medida de variación genética más extendida en las poblaciones de una especie es el nivel de heterocigosidad, dado que los individuos diploides son heterocigos u homocigotos en un locus dado y esta medida es biológicamente útil (Hedrick, 2011). Esta medida representa la frecuencia media de los individuos heterocigos esperados en condiciones de apareamiento aleatorio y es una medida que también nos permite evaluar la estructura genética de las poblaciones a partir de la comparación entre la heterocigosis observada ( $H_o$ ) y heterocigosis esperada

( $H_e$ ) (Nei, 1987). La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) bajo equilibrio Hardy-Weinberg en una población para un locus particular con  $n$  alelos se estima con la siguiente expresión:  $H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$  y la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) como:  $H_o = \sum_i x_i H_i$  (Hedrick, 2011).

Otras medidas que se emplean para cuantificar la variación genética, y sirven de manera complementaria son; la riqueza alélica ( $A$ ), y el porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ; Hedrick, 2011). La riqueza alélica ( $A$ ) es el número medio de alelos por locus y cuantifica el número total de alelos diferentes detectados en los loci de una población. Esta medida basa su utilidad en la medición de la reducción de la variación genética y en la detección del efecto producido por deriva génica. La expresión matemática para riqueza alélica es:  $A = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L a_l$   $1 \leq A \leq \max a_l$  donde  $L$  es el número total de loci analizados en la población, y  $a_l$  es el número de alelos detectados en el locus  $l$ . El porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ) es la presencia en una misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con frecuencia apreciable, es decir el número de loci variables en una población y se calcula dividiendo el número de loci polimórficos de la población entre el número total de loci analizados;  $P = \frac{x}{m}$  donde  $x$  es el número de loci polimórficos y  $m$  es el número total de loci (Hedrick, 2011).

Para el estudio del polimorfismo a nivel de secuencias de ADN, se utiliza el parámetro de diversidad genética, que es descrito por los estimadores  $\pi$  ( $\pi$ ) y  $\theta$  ( $\theta$ ) (Kimura, 1968).  $\pi$  ( $\pi$ ), hace referencia a la diversidad nucleotídica, que es el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar (Nei y Li, 1979) y se calcula con la siguiente expresión;  $\pi = \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$ , donde ( $p_i$ ) es la frecuencia de la secuencia  $i$ , ( $p_j$ ) es la frecuencia de la secuencia  $j$ , y ( $\pi_{ij}$ ) es la proporción de las diferencias nucleotídicas entre la secuencia  $i$  y la secuencia  $j$  (Hedrick, 2011).  $\theta$  ( $\theta$ ) hace referencia a la diversidad haplotípica y se calcula a partir de la expresión  $\theta = 4N_e\mu$  (Kimura, 1968), sin embargo es difícil tener la determinación exacta de los parámetros de  $N_e$  (tamaño efectivo poblacional) y  $\mu$  (tasa de mutación), por lo que de manera indirecta,  $\theta$  ( $\theta$ ) se estima utilizando el número total de sitios segregantes en un grupo de secuencias;  $\theta = k/a$  donde  $k$  es

igual al número total de sitios segregantes en una muestra de secuencias dada, y  $a = 1 + 1/2 + \dots + 1/n - 1$  ( $n =$  número de secuencias de la muestra; Watterson, 1975; Tajima 1983; Hedrick, 2011). Se deduce de estas expresiones que  $\pi$  ( $\pi$ ) se ve afectado mayormente por alelos que poseen mayor frecuencia y es independiente del tamaño de muestra, mientras que  $\theta$  ( $\theta$ ) si se ve afectada por el tamaño de muestra y por deriva génica (Tajima 1983).

### 1.3.1 Pruebas de neutralidad

La relación que existe entre los estimadores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y diversidad haplotípica ( $\theta$ ), permite analizar si las secuencias evolucionan bajo el modelo neutral o si se desvían del mismo. Si ambos estimadores dan el mismo resultado en cuanto a variación genética, indican que el polimorfismo observado es neutro. En cambio, sí existen diferencias entre ambos, indican que la selección afecta a alguno de ellos promoviendo su incremento o decremento: si existe selección positiva, esta incrementara las frecuencias alélicas y se reflejaría en el incremento de  $\pi$  ( $\pi$ ), pero si existe un mayor número alelos raros o sitios segregantes,  $\theta$  ( $\theta$ ) se verá incrementada (Watterson, 1975; Tajima, 1983, 1989).

La prueba de Tajima y el método de Fu-Li (que es una modificación de la prueba de Tajima) son algunos de los estadísticos que permiten el estudio de la neutralidad en las secuencias (Tajima, 1989; Fu y Li, 1993; Castillo, 2007). La prueba de Tajima, se basa en la detección de las diferencias entre los estimadores  $\pi$  ( $\pi$ ) y  $\theta$  ( $\theta$ ) con la determinación de la  $D$  Tajima, calculada a partir de la siguiente expresión:  $D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$

Si la  $D$  de Tajima resulta negativa indica exceso de alelos raros en la población lo cual es señal de selección purificadora o expansión demográfica. En cambio, sí  $D$  resulta positiva indica procesos de selección balanceadora o reducción del tamaño poblacional (cuello de botella). Si  $D$  resulta igual a cero indica que las frecuencias génicas se encuentran en equilibrio neutral y hay estabilidad poblacional (Tajima, 1989; Perfectti *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Métodos para evaluar la estructura genética

La estructura genética mide la variación de las frecuencias alélicas entre las poblaciones y por tanto la diferenciación genética entre ellas. Para estimación de la estructura genética Sewall Wright (1951) desarrollo los estadísticos de F que parten del coeficiente de endogamia en una población subdividida ( $F_{it}$ ), entre el componente debido a los apareamientos no aleatorios dentro las poblaciones ( $F_{is}$ ) y la subdivisión entre poblaciones ( $F_{st}$ ). La estructura genética puede ser estimada con la siguiente expresión:  $F_{st} = \frac{F_{it} - F_{is}}{1 - F_{is}}$

La estimación de  $F_{st}$  es más fácil visualizar siguiendo la definición de Nei (1973):  $F_{st} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$  donde  $H_T$  es el promedio de la heterocigosis esperada en la población total para todos los loci, y  $H_S$  es el promedio de le heterocigosis esperada para dentro de subpoblaciones para todos los loci (Hedrick, 2011).

La interpretación del estimador de estructura genética ( $F_{st}$ ) va en escala de 0 a 1, si la  $F_{st} = 0$  indica que las frecuencias alélicas son idénticas con nulas o muy pocas diferencias entre las poblaciones de una especie, por lo que existe poca estructura genética. Por el contrario si la  $F_{st} = 1$ , indica que las frecuencias alélicas son muy diferentes en las poblaciones y por lo tanto existe alta estructura genética (Hedrick, 2011; Eguiarte *et al.*, 2010; 2013).

El estimador de estructura genética ( $F_{st}$ ) tiene la ventaja adicional de que pueden dar el estimado de la importancia relativa de deriva génica y flujo génico: la tasa a la que un alelo se fija en una población es inversamente proporcional al tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) (Wright, 1969), y esta tasa de fijación puede ser contrarrestada por el flujo génico que llega de otras poblaciones a una tasa  $m$ .

Para estimar el flujo génico cuando  $F_{st}$  llega al equilibrio entre deriva génica y migración se utiliza la siguiente expresión:

$$F_{st} \approx 1 / (4 Nm + 1) \text{ para genomas diploides}$$

$F_{st} \approx 1 / (2 Nm + 1)$  para genomas haploides

El flujo génico

$Nm \approx 1/4 (1/ F_{st} - 1)$  para organismos diploides

$Nm \approx 1/2(1/ F_{st} - 1)$  para organismos haploides

Bajo este modelo una tasa de migración  $>1$  en cada generación es suficiente para contrarrestar la diferenciación genética en las poblaciones por acción de deriva génica (Wright, 1969).

Para evaluar el efecto de los factores que determinan la estructura génica se utilizan diferentes métodos estadísticos, tales como el “modelo de aislamiento por distancia” que examina la relación de flujo génico entre pares de poblaciones con la distancia geográfica entre ellas (Wright, 1943). Este modelo permite explicar posibles formas de dispersión y por lo tanto aspectos teóricos de las poblaciones naturales (Slatkin, 1994). Uno de los métodos clásicos para evaluar el aislamiento por distancia es la prueba de Mantel, que estima la relación entre matrices de distancia genética y distancia geográfica (Hedrick, 2011; Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013).

Hoy en día el desarrollo de nuevas herramientas y métodos informáticos han permitido hacer aún más explícita la variación genética en las poblaciones. El análisis de componentes principales (ACP) es un buen método que permite explorar los datos y visualizar el patrón de estructura génica basado en las frecuencias alélicas (Manel *et al.*, 2003). Sin embargo, el (ACP) no define grupos específicos, por lo que no es posible obtener análisis de patrones espaciales (Jombart *et al.*, 2010). Considerando esta limitante Jombart y colaboradores (2008) propusieron un nuevo método; el análisis de componentes principales espaciales (ACPs) para evaluar los patrones espaciales de variabilidad genética y para ello incorpora la variable de georreferenciación de cada genotipo (Jombart *et al.*, 2008; Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013).

Los análisis de agrupamiento como el implementado por STRUCTURE (software libre; Pritchard *et al.*, 2000) para el uso de datos multi-locus permite investigar la estructura genética poblacional a través de métodos de asignación bayesiana, e infiere la presencia de estructura genética a través de asignación de los individuos a un número específico ( $K$ ) de poblaciones distintas. Con este método también se puede realizar el estudio de zonas híbridas, la identificación de migrantes y de individuos mezclados, así como la estimación de frecuencias alélicas por medio de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) (Pritchard *et al.*, 2000), por lo que se considera un programa adecuado para evaluar estructura génica y presencia de migrantes.

### 1.3.3 Estimación de la endogamia

Asociado a la estructura genética poblacional, en el proceso de endogamia ( $F_{is}$ ) aumenta la frecuencia de homocigotos en las poblaciones sin alterar las frecuencias alélicas, generado por el apareamiento entre parientes de una población (Futuyma, 2009; Hedrick, 2011). Para la estimación de este proceso, Sewall Wright en 1951 desarrollo del coeficiente de endogamia ( $F$ ) que supone que en una población ancestral todos los alelos eran únicos, es decir no había endogamia en esa población (Futuyma, 2009).

La endogamia se denomina como la probabilidad de que un individuo tomado al azar de una población sea autóctigo, es decir que los dos alelos homólogos heredados a la progenie sean idénticos por descendencia de un ancestro. Se puede estimar a partir de la siguiente expresión:  $F_{is} = 1 - \frac{H_o}{H_e}$  donde  $H_o$  corresponde a la heterocigosis observada y  $H_e$  es la heterocigosis esperada cuando los apareamientos ocurren al azar (Hedrick, 2011). Si la  $F_{is}$  tiene valor de 0, indica que las poblaciones se encuentran en las proporciones esperadas si los apareamientos fueran estrictamente al azar, el valor de  $F_{is}$  puede llegar hasta 1 si sólo se encuentran individuos homocigotos en la población, lo cual generalmente es consecuencia de la endogamia extrema (autofertilización), pero si la  $F_{is}$  resulta

negativa indica que hay un exceso de heterocigos en la población (Wright, 1969; Hedrick, 2011).

## 1.4 Estudios genéticos en pinos

Estudios realizados para conocer la diversidad y estructura genética en poblaciones de especies forestales han demostrado que las coníferas se caracterizan por poseer alta diversidad genética y poca estructura poblacional al estar poco diferenciadas genéticamente (Ledig et al., 2000; Petit y Hampe, 2006). Utilizando marcadores isoenzimáticos en *Pinus* se ha estimado en promedio un valor de heterocigosidad bajo  $H_e = 0.251$  al igual que utilizando microsatélites  $H_e = 0.296$ , en *Picea* el valor promedio de la heterocigosidad reportado es  $H_e = 0.110$ , y en *Abies*  $H_e = 0.0975$  este valor es aún menor. En cuanto a la estructura genética en *Pinus* y *Abies* los valores promedio estimados son  $F_{st} = 0.158$  y  $F_{st} = 0.179$  ligeramente mayores que en *Picea*  $F_{st} = 0.117$  (Piñero et al., 2008).

Para *P. greggii* se han realizado dos estudios sobre su diversidad genética y estructura poblacional. El primer estudio realizado por Ramírez-Herrera y colaboradores (1997), analizan la variación isoenzimática de diez poblaciones de *Pinus greggii* y reportan un alto nivel de diversidad genética en la especie. El segundo estudio realizado por Parraguirre y colaboradores (2002), empleando también marcadores isoenzimáticos (seis sistemas isoenzimáticos encontrando 15 loci), y utilizando tejido del megagametófito de las semillas, reportan que existe gran diversidad genética en la especie (93% de loci polimórficos, 3.5 alelos por locus) y alta diferenciación entre sus poblaciones ( $F_{st} = 0.379$ ), pero encuentran que esta diferenciación no se asocia a las regiones geográficas donde se distribuye la especie. Algunos autores reportan que las poblaciones de coníferas en México y América Central muestran niveles más elevados de diferenciación en relación con lo encontrado para poblaciones de latitudes mayores (Delgado et al., 1999; Ledig et al., 2000; Aguirre-Planter et al., 2000). Esto puede deberse a que las especies de coníferas en México tienen distribuciones fragmentadas, lo cual ha ocasionado la diferenciación entre poblaciones por poco intercambio genético y acción de la deriva génica (Ledig et al., 2000).

## 1.5 Uso de secuenciación de nueva generación para estudio de la diversidad genética

Para la determinación de la variación genética en especies forestales primero se utilizaron marcadores isoenzimáticos (Piñero, 2008), sin embargo estos marcadores presentan algunas desventajas como: bajo polimorfismo, requerimiento de grandes tamaños muestrales y que solo es posible analizar una decena de *loci* con este método (Lian et al., 2001; Rentería, 2007; Eguiarte *et al.*, 2013). Análisis más detallados de diferenciación genética pueden obtenerse secuenciando regiones de interés para diferentes individuos, pero hasta hace poco tiempo el uso extenso de secuencias de ADN para estudios de poblaciones no había sido práctico, porque los fragmentos de ADN para cada individuo tenían que ser aislados para librerías de ADN subgenómico después de haber sido identificados por “southern blotting” e hibridización. Sin embargo, actualmente el uso de secuencias es muy común y se han aplicado en análisis de genética de poblaciones (Rentería, 2007; Eguiarte *et al.*, 2013).

La tecnología de secuenciación de nueva generación (“next generation sequencing”, NGS) también conocida como secuenciación masiva paralela “massive parallel sequencing”, ha permitido obtener datos de grandes secciones del genoma o incluso genomas enteros de diferentes especies sin que sea un requisito conocer marcadores previos (Beck y Semple, 2015) y es posible secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela a un precio mucho más bajo en contraste con métodos de secuenciación Sanger (Zhang *et al.*, 2011; Escalante *et al.*, 2014). Los estudios moleculares con datos de secuenciación de nueva generación permiten la determinación de secuencias de regiones en el genoma o la determinación del genoma completo de la especie en cuestión (Turner y Hahn, 2007; Michel *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2010) y permiten establecer estudios sobre la relación genética y estructura entre individuos, poblaciones y especies. Estos estudios se pueden también complementar con análisis ecológicos como los



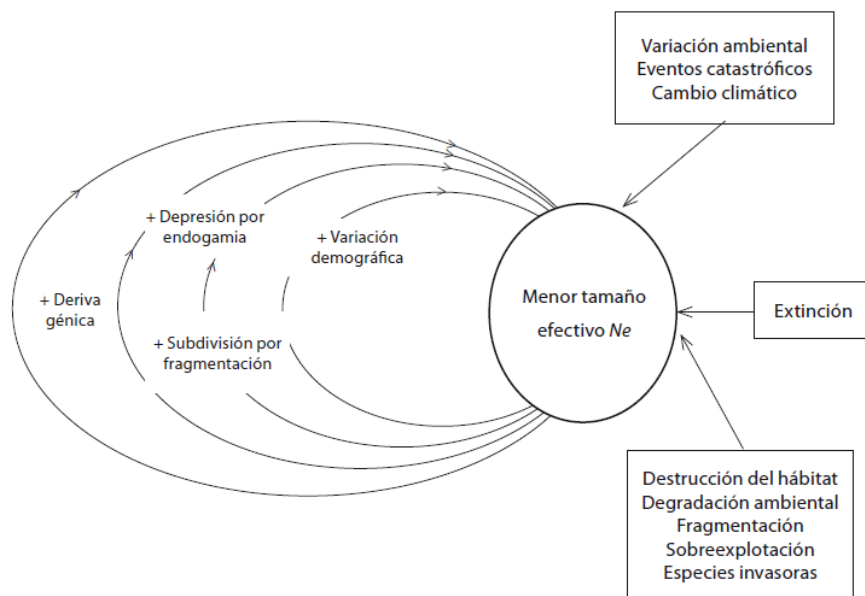
modelos de distribución geográfica, para comprender como la heterogeneidad ambiental afecta los niveles de variación genética y por lo tanto informar decisiones sobre el manejo de la biodiversidad y su conservación (Eguiarte *et al.*, 2013).

## **1.6 Modelación de la distribución potencial como herramienta para la conservación**

La conservación de la diversidad biológica y los procesos evolutivos que la mantienen, son los principales objetivos de la genética de la conservación, así como la comprensión y disminución de los problemas genéticos que enfrentan las poblaciones pequeñas (Moritz, 2002). Esto último se logra al minimizar las extinciones, evitando los problemas relacionados con tamaños efectivos pequeños, como el efecto deletéreo de la endogamia, pérdida de diversidad y la habilidad para evolucionar en respuesta a cambios ambientales (Frankham *et al.*, 2002; Rocha y Gasca, 2007; Wegier, 2013).

Los sistemas de información geográfica (SIG) se han sumado como una herramienta para la conservación (Manel y Holderegger, 2013), puesto que es posible hacer uso de datos poblacionales georreferenciados y realizar análisis espaciales de los procesos ecológicos y los factores estocásticos que modifican la distribución espacial de los individuos en las poblaciones y que potencialmente afectan la distribución de la diversidad genética en las especies (Etherington, 2011). Además, es posible realizar modelos que permiten predecir la distribución potencial de las especies bajo diferentes escenarios de cambio climático (Manel y Holderegger, 2013). Los modelos de circulación global son algoritmos matemáticos que simulan el sistema de circulación atmosférica bajo distintos escenarios de cambio climático y disponen de variables bioclimáticas del pasado, presente y futuro (UCAR, 2016; WorldClim, 2017), con las cuales es posible realizar análisis del impacto de cambio climático en la distribución de las especies.

El proceso de cambio climático presenta un efecto negativo sobre la biodiversidad en diferentes escalas sobre: a) variaciones en los rangos de distribución de las especies y en la composición de las comunidades; b) desplazamientos altitudinales de comunidades vegetales; c) cambios en el funcionamiento de los ecosistemas (Peterson, 2001; Thuiller *et al.*, 2005). Uno de los problemas que enfrentan las poblaciones pequeñas es que son más propensas a la extinción, debido a factores estocásticos (tanto genéticos como demográficos, ambientales y catastróficos) que aceleran su decline y las llevan a los llamados vórtices de extinción (Figura 3; Primack *et al.*, 2001; Frankham *et al.*, 2002; Rocha y Gasca, 2007).



**Figura 3.** Cuando una población es muy pequeña, los fenómenos estocásticos incrementan el efecto de los problemas genéticos, y la población sufre un vórtice de extinción. Tomado de Rocha y Gasca (2007).

Los análisis genéticos en las poblaciones, la integración de acciones políticas y programas existentes para protección de la biodiversidad, así como la incorporación de la información que brindan los modelos de predicción sobre el impacto de cambio climático en las especies, son muy importantes para la realización de futuros programas de conservación que sean exitosos y aseguren la permanencia de las especies y de los procesos evolutivos (Moritz, 2002; FAO, 2007;

Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009; Heller y Zavaleta, 2009), ya que esta información es especialmente útil para identificar lugares en los que pueden llevarse a cabo programas de conservación.

## 1.7 Justificación

En las poblaciones naturales de *Pinus greggii* se ha documentado una severa fragmentación debido a factores antropogénicos como la sobreexplotación de la especie por parte de la industria maderera y al cambio de uso de suelo en el bosque de pino del que forma parte (Ramírez-Herrera *et al.*, 2005; González-Tagle, 2007; Farjon, 2013). El proceso de fragmentación ha afectado especialmente a la variedad *Pinus greggii* var. *australis* por lo que la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) la considera en categoría de vulnerabilidad (Farjon, 2013; IUCN, 2017) basándose en tres criterios principales: 1) la disminución de las poblaciones, refiriéndose a la reducción del tamaño en un 50% durante los últimos 10 años o las últimas 3 generaciones, 2) al área de ocupación por la especie no mayor de 2000 km<sup>2</sup> y 3) al tamaño poblacional (10,000 árboles) que se mide en número de individuos maduros (IUCN, 2001).

Los análisis genéticos permiten conocer cuáles son los procesos que determinan la diversidad y estructura genética presente en las poblaciones de una especie (Hedrick, 2011). Así como permiten evaluar el efecto de la fragmentación, que en términos genéticos conlleva a la pérdida de la diversidad genética (Terborgh, 1992; Rocha y Gasca, 2007), y en consecuencia pérdida de la habilidad para responder a cambios ambientales (Frankham *et al.*, 2002).

El presente trabajo intenta vincular los datos de diversidad y estructura genética presente en *P. greggii* utilizando secuencias de loci nucleares obtenidos con secuenciación de nueva generación con el objetivo de obtener información sobre el estado genético actual de las poblaciones de *P. greggii*. El segundo objetivo es generar información sobre el impacto de cambio climático en su distribución, ya que se ha observado que a nivel de especie puede ocurrir desplazamiento de las poblaciones, adaptación o extinción local, y que existe una probabilidad mayor de extinciones locales para especies que tienen distribución restringida (endémicas), tal es el caso de *P. greggii*. El conjunto de análisis sobre su estado genético actual

y la realización de modelos de predicción sobre el impacto de cambio climático en su distribución será útil para desarrollar el trabajo futuro necesario para conservación de la especie.

## 1.8 Hipótesis

1. Debido que las poblaciones de *Pinus greggii* se encuentran aisladas en dos regiones geográficas en la Sierra Madre Oriental y han presentado el proceso de fragmentación por diferentes causas antropogénicas, se espera encontrar baja diversidad genética, así como bajo flujo génico entre las poblaciones y posiblemente este se ajusta al modelo de aislamiento por distancia.

2. Si existe poco flujo de genes entre las poblaciones, en consecuencia se espera encontrar un coeficiente alto de diferenciación genética indicando alta estructura poblacional.

3. De acuerdo a las características de distribución espacial que tienen los individuos de *Pinus greggii* en el sistema de bosque del que forma parte, donde los individuos se encuentran aislados y en menor densidad de otras especies de pino y al proceso de fragmentación en sus poblaciones, se espera encontrar coeficientes altos de endogamia.

4. Bajo escenario de cambio climático se espera que en la distribución de las poblaciones de *Pinus greggii* ocurra el desplazamiento hacia latitudes mayores y que el área de su distribución pueda verse reducida, ya que anteriormente se ha propuesto que los árboles pueden tener problemas para adaptarse a temperaturas más extremas comparados con otras plantas debido a sus largos ciclos de vida y poca movilidad.

## 1.9 Objetivos

### 1.9.1 Objetivos generales

1. Inferir cuáles son los factores que han determinado los niveles de diversidad y estructura genética en las poblaciones de *Pinus greggii* para establecer el grado de flujo génico de las poblaciones y su sistema de apareamiento.
2. Modelar la distribución geográfica actual y a futuro en un escenario de cambio climático de *Pinus greggii*, con la finalidad de predecir el impacto de cambio climático sobre su distribución y conectividad para el año 2050 y 2070.

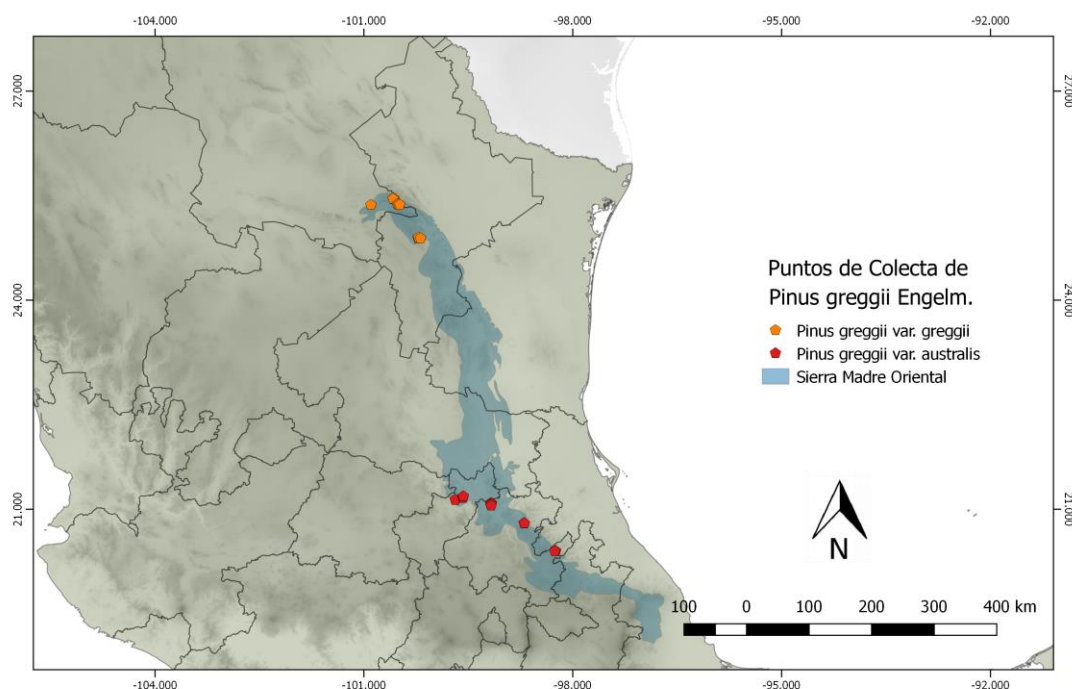
### 1.9.2 Objetivos particulares

1. Estimar la diversidad genética de *Pinus greggii*, como: (diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), diversidad haplotípica ( $\Theta$ ), riqueza alélica ( $A$ ) y polimorfismo genético ( $P$ )), para inferir su potencial evolutivo.
2. Determinar si los loci empleados en este estudio son neutrales o si se desvían del modelo neutral, para conocer los cambios demográficos o selectivos ocurridos en las poblaciones de *Pinus greggii*.
3. Estimar la estructura genética poblacional ( $F_{st}$ ) y coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) de *Pinus greggii* e inferir los posibles procesos y factores que la determinan.
4. Modelar la distribución actual de *Pinus greggii* para analizar sus cambios en los próximos años (2050, 2070) en un escenario de cambio climático.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Muestreo en campo y extracción de ADN

El muestreo en campo para la colecta de material biológico (ramas, hojas y conos con semilla) se realizó en los estados de Nuevo León y Coahuila para *Pinus greggii* var. *greggii* y en los estados de Querétaro e Hidalgo para *Pinus greggii* var. *australis* (figura 4), se colectó material biológico de 19 individuos de la variedad *greggii* y 20 individuos de la variedad *australis* y se realizó el registro de las coordenadas geográficas en grados decimales para cada individuo (anexo 1), esta información geográfica forma parte del registro de colección del Dr. David S. Gernandt, jefe del Herbario Nacional de México (MEXU).



**Figura 4.** Registro de los sitios de colecta para *Pinus greggii* var. *greggii* y *Pinus greggii* var. *australis*.

Para la extracción de ADN de los individuos de *P. greggii* se utilizó tejido de hoja (haploide) y del megagametófito (tejido haploide de origen materno) encontrado en la semilla (anexo 1). Para la extracción de ADN a partir de tejido del megagametófito se utilizó el protocolo del kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification (Promega) (anexo 2) y para la extracción de ADN a partir de hoja se empleó el método “Mini-Prep” protocolo modificado por Vázquez Lobo (1996), el cual consiste en la trituración de las hojas con buffer de extracción CTAB2x que permite el rompimiento de paredes celulares y la extracción de ADN (anexo 3). Para cuantificación del ADN se empleó el fluorómetro (Qubit Life Technologies) con un kit de ensayo Qubit dsDNA BR, y para evaluación de la calidad del ADN se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Las muestras de ADN se mantuvieron en refrigeración a -20°C hasta su posterior secuenciación. Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio sobre la genómica de *Pinus*, y para la secuenciación de las muestras de ADN (se empleó tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) con el método Hyb-Seq que permite la secuenciación de loci de interés, la secuenciación se realizó en la plataforma de Illumina Hi-Seq.

## **2.2 Método de secuenciación Hyb-Seq**

El método Hyb-Seq representa un avance reciente para el desarrollo de captura de secuencias de interés, basándose en técnicas de hibridación de ARN y secuenciación paralela. Este método se desarrolló originalmente para la captura de secuencias de interés en humanos (Gnirke *et al.*, 2009) y adoptado posteriormente para identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el genoma del maíz (Fu *et al.*, 2009). El método Hyb-Seq es un protocolo que combina el objetivo de enriquecimiento de bibliotecas de genes nucleares de baja copia y el uso de secuencias de baja cobertura para reunir objetivos genómicos de alta copia, utilizando el genoma y transcriptoma de una especie para el diseño de sondas (Weitemier *et al.*, 2014).



En este método el ADN de la especie en interés, es fragmentado en segmentos con un sonificador (BioRuptor Sonificador, Diagenode, Inc.). Se realizan reacciones de ligación entre los fragmentos y adaptadores indexados, y a continuación se lleva a cabo enriquecimiento mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las sondas de ARN, son etiquetadas con biotina y agregadas a cada preparación de ADN, la captura de loci genómicos de interés se realiza con cuentas (tipo esferas) cubiertas de estreptavidina. Las muestras resultantes se secuencian en un equipo de secuenciación de nueva generación (Gnirke *et al.*, 2009).

Las secuencias cortas producidas a partir de los extremos de ADN con los adaptadores se denominan lecturas o *reads*, el secuenciador genera lecturas a partir de cada uno de los extremos del fragmento de ADN (el inserto) dando lugar a lecturas pareadas y se hace a partir de la estrategia “*paired end*”, estas se generan mediante la fragmentación del ADN en pequeños segmentos (<300 pb) de los cuales se secuencia el final de ambos extremos.

### **2.2.1 Preparación de bibliotecas enriquecidas por genes de interés y secuenciación paralela.**

Para la preparación de bibliotecas enriquecidas por genes de interés, previamente se seleccionaron 1000 regiones codificantes, resultando de los ensamblajes más largos (>850 pb) del transcriptoma de *Pinus taeda* (Neves *et al.*, 2013). Con base a estas secuencias se prepararon las bibliotecas genómicas para secuenciación paralela con el método Hyb-Seq.

Las bibliotecas genómicas se diseñaron con 800-2000 ng de ADN genómico de *P. greggii*, que fue cortado en fragmentos de 500 pb usando un sonificador (BioRuptor Sonificador, Diagenode, Inc.). Posteriormente, se ligaron adaptadores de códigos de barras indexados de doble índice (8 + 8 pb) de tipo TruSeq para secuenciar oligos en la plataforma Illumina Hi-Seq. Como parte de un proyecto más amplio sobre la genómica de *Pinus*, esta muestra se enriqueció para 713 loci

nucleares y dos loci de plastoma (UMt-6920, 729 pb entre *cemA* y *ycf4*, 0-8850, 687 pb en la porción río arriba de *psaB*) con ARN 120bp sondas basadas en el transcriptoma de *Pinus taeda* (Neves *et al.*, 2013). Las sondas de ARN fueron etiquetadas con biotina y agregadas a cada preparación de ADN. La captura de los genes de interés se realizó con cuentas (tipo esferas) cubiertas de estreptavidina. Las bibliotecas enriquecidas fueron purificadas, eluidas y sujetas a enriquecimiento mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se secuenció una mezcla de biblioteca enriquecida y no enriquecida (50/50) en un carril de un Illumina Hi-Seq con extremos pareados de 100 pb

## 2.2.2 Procesamiento de lecturas tipo *paired end*

Con el método de secuenciación Hyb-Seq se obtuvo lecturas tipo “*paired end*”, y como primer paso se realizó un análisis de calidad de las lecturas. La calidad se determina por el número de veces que cada base del genoma está presente en las lecturas de secuenciación y se denomina como profundidad de cobertura, para ello se implementó el software FastQC (Andrews, 2010) que permite observar si las lecturas se ajustan a una buena secuenciación y verifica su calidad. Posteriormente se realizó el “pareamiento” de las lecturas de secuenciación utilizando el software Geneious 9.1.3. (Kearse *et al.*, 2012) y la eliminación de lecturas duplicadas, ya que en el momento de la captura de genes de interés y enriquecimiento por PCR, las lecturas pueden encontrarse duplicadas en la secuenciación. También como control de calidad se realizó una filtración de las lecturas y se eliminaron aquellas que no presentaron un tamaño mayor a 50 pb.

Para la construcción de las secuencias de *P. greggii* se realizó el ensamblaje de una secuencia de *P. greggii* usando como referencia 20 genes nucleares (anexo 4), estos genes fueron seleccionados tomando el criterio de buena cobertura de ensamblaje y de no pertenencia al grupo de genes paralogos. Para cada uno de los genes se generó su secuencia y se marcó la presencia de intrones en la secuencia. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de los genes y las lecturas pertenecientes de los individuos de *P. greggii* var. *australis* y *P. greggii*

var. *greggii* respectivamente (utilizando la opción Muscle en Geneious) y como último paso se realizó la búsqueda de los sitios variables en las secuencias.

Debido que el origen de unas de las secuencias provienen de muestra haploide (megagametófito) y otras son de muestra diploide (hoja), se procedió a determinar las dos secuencias de nucleótidos para el caso de las secuencias provenientes de tejido diploide (6 pertenecientes para *Pinus greggii* var. *australis* y 6 para *Pinus greggii* var. *greggii*, ver anexo1), para ello se utilizó los programas SeqPHASE y PHASE 2.1 (Stephens *et al.*, 2001). De esta manera se obtuvo un conjunto de 51 secuencias para cada gen (25 secuencias correspondientes a *Pinus greggii* var. *greggii* y 26 secuencias correspondientes a *Pinus greggii* var. *australis*). Dado que se obtuvo diferentes tamaños (pb) de cada secuencia, se implementó el software Aliview 1.18 (Larsson A., 2014) para el alineamiento de las secuencias y eliminación del “ruido” en los extremos de cada una, así las secuencias de cada variedad de *P. greggii* que corresponden a cada locus, presentan el mismo tamaño (pb).

## **2.3 Análisis de parámetros poblacionales**

### **2.3.1 Diversidad genética y pruebas de neutralidad**

El análisis de polimorfismo se realizó para cada locus con el programa DNAsp Ver. 5.10.01 (Rozas y Rozas, 1999), se obtuvo estimación de número de alelos por locus ( $A$ ), número de sitios segregantes ( $S$ ), diversidad haplotípica ( $\Theta$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). De la relación entre los estimadores  $\pi$  ( $\pi$ ) y  $\Theta$  ( $\Theta$ ) se realizó la prueba de  $D$  Tajima y de  $D^*$  Fu y Li, para conocer si los genes empleados en el análisis de diversidad genética se desvían del modelo neutral (Tajima, 1989; Fu y Li, 1993).

## 2.3.2 Estructura genética y endogamia

La estimación de la diferenciación genética ( $F_{st}$  pareada, Rousset F., 1997) se realizó para cada locus y variedad de *P. greggii* con el paquete *Hierfstat* para R (Jombart *et al.*, 2008). Para este análisis y los demás en relación de la estructura genética previamente se generó una matriz con información del número de alelos por locus de cada secuencia de los individuos de *P. greggii*, donde los alelos fueron codificados en números de la siguiente manera (01, 02...n). Para las secuencias provenientes de tejido diploide se determinó las dos secuencias haploides de nucleótidos con los software SeqPHASE y PHASE Ver. 2.1 (Stephens *et al.*, 2001), la codificación del número de alelos se integró de la tal manera (0101, 0202...n) tanto para secuencias de origen haploide y diploide con el motivo de obtener los genotipos en un solo individuo.

La estimación de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) se realizó en con *Adegenet* ver. 2.0.2 (Jombart, 2008) empleando únicamente las secuencias de origen de tejido diploide (hoja). El coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) se estimó utilizando el programa GENEPOP ver. 1.2 (Raymond y Rousset, 1995), y además se corroboró manualmente utilizando la siguiente fórmula:

$$F = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

Para evaluación del modelo de aislamiento por distancia se realizó una prueba de Mantel en Rstudio (bibliotecas *Adegenet* y *Vegan*). Las distancias genéticas se calcularon a partir de la formula  $F_{st} / 1 - F_{st}$  utilizando los valores de  $F_{st}$  pareadas. La matriz de distancias geográficas (km) se obtuvo a partir de los puntos de colecta georreferenciados con los paquetes *ade4* y *RgoogleMaps*.

Además de estimar el coeficiente de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) para conocer la estructura poblacional de *P. greggii*, se implementó un análisis de

componentes principales espacial (ACPs) para la identificación de patrones genéticos espaciales con la biblioteca *Adegenet*. También se implementó el método de asignación bayesiana del programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), para la asignación de los individuos a grupos genéticos ( $K$ ) y se eligió el modelo con admixtura que indica que los individuos pueden provenir de varias poblaciones, este programa se ejecutó con un “*burnin*” de 10,000 y 100,000 cadenas.

Una desventaja que ha mostrado STRUCTURE es que el número de grupos identificados ( $K$ ) no es consistente en cada corrida y puede estar influenciado por el tamaño de muestra (Hubisz *et al.*, 2009; Garrido y Vázquez 2013). Debido a esto, para inferir el número de grupos ( $K$ ) que mejor se ajustan a los datos, se implementó el método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005), donde el valor de ( $K$ ) se elige por los valores que tienen mayor verosimilitud. El método de Evanno fue implementado por Structure Harvester (Earl y vonHoldt, 2012), y como resultado se obtuvo archivos de entrada para CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007) este es un programa que alinea el grupo de asignación a través de una media de matrices permutadas de todas las réplicas, finalmente se utilizó el programa DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004) para obtener la representación visual de STRUCTURE.

## 2.4 Análisis de información geográfica

### 2.4.1 Distribución potencial de *Pinus greggii* de la actualidad y proyecciones a futuro

La modelación de la distribución geográfica de *P. greggii* actual y a futuro bajo escenario de cambio climático (año 2050 y 2070) se realizó con el enfoque de máxima entropía de Maxent 3.3.3k (Phillips et al., 2008). El algoritmo de este software busca la distribución más amplia (de máxima entropía) de la especie sujeta a restricciones (variables ambientales) (Phillips et al., 2006; 2008). Para el modelado se obtuvo una base de datos de registros de ocurrencia para *P. greggii* a partir de los registros de colecta en campo y registros disponibles de Global Biodiversity Information Facility. Esta base de datos se corrigió manualmente eliminando los registros fuera de la distribución informada de la especie (es decir, errores de referencia probables) y los que se encontraron fuera del rango altitudinal reportado para la especie, además se implementó The Geographic Distance Matrix Generator 1.2.3. (Ersts, 2016) para eliminar los registros con cercanía de 1 km de distancia y evitar el remuestreo de pixel, ya que uno de los problemas de los modelos de distribución potencial para especies es la cantidad y calidad de información georreferenciada disponible, ya que un porcentaje variable pero significativo presenta errores de georreferenciación, por lo que en muchas ocasiones son una representación sesgada de la distribución de las especies (Schulman et al., 2007).

Para el modelado se empleó el conjunto de capas bioclimáticas de la plataforma Worldclim (Hijmans et al., 2005) con resolución de 30 arc/seg en formato *ascii* y se realizó la identificación de las variables ambientales que en la actualidad determinan la distribución de *P. greggii*, a partir de un análisis de componentes principales (ACP). Para ello se elaboró una matriz a partir de la “extracción de valores” de los registros de la especie en la variables bioclimáticas de Worldclim, este proceso se realizó en RStudio con las bibliotecas *sp* y *raster*.

Para la elaboración de los modelos de distribución potencial de *P. greggii* a futuro se utilizó las capas bioclimáticas de escenario de cambio climático CMIP5-

rcp45 para el año 2050 y 2070. Las capas bioclimáticas CMIP5-rcp45, corresponden a un modelo de circulación global y establecen un escenario de cambios antrópicos y naturales en las propiedades del sistema climático, denominados trayectorias de concentración representativas (RCP) (UCAR, 2016).

La elección de las variables climáticas para los modelos a futuro se realizó con base al resultado del ACP que explica la distribución geográfica de *P. greggii* en la actualidad. Para cada escenario se llevó a cabo 30 réplicas tipo bootstrap y 1000 iteraciones en Maxent y el promedio de las réplicas se tomó como mejor modelo. La sobre proyección de la distribución de *P. greggii* se eliminó haciendo recorte de la capa *ascii* restringiendo a la Sierra Madre Oriental y el norte de la sierra. Los modelos fueron reclasificados en QGIS 2.14.8, en 3 categorías de idoneidad ambiental donde 1= más idoneidad y 3= menor idoneidad.

# 3 Resultados

## 3.1 Diversidad genética y pruebas de neutralidad

El tamaño de las secuencias ensambladas para los loci analizados varía de 674 pb a 1358 pb (tabla 1). En los 20 loci analizados en *P. greggii* el número promedio de alelos por locus fue  $A = 11.3$ . El valor promedio estimado para la diversidad haplotípica es  $Hd = 0.8315$  y la diversidad nucleotídica  $\pi = 0.009817$ .

De los loci putativos de este estudio, el locus 0\_13031 resulto ser el más polimórfico (tabla 1) respecto a los demás, ya que presento mayor número de alelos  $A= 49$  y valores altos de diversidad haplotípica  $Hd = 0.999$  y nucleotídica  $\pi = 0.01974$ . Mientras que el locus 2\_5632 mostró el menor polimorfismo, con solo 2 alelos por locus así como poca diversidad haplotípica ( $Hd = 0.344$ ) y nucleotídica ( $\pi = 0.00066$ ).

**Tabla 1.** Valores estimados del polimorfismo para los 20 loci analizados en *Pinus greggii*.

Locus ID	Tamaño (pb)	A	S	Hd (SE)	$\pi$	$\Theta_w$
2_202	1358	16	60	0.93 (0.006)	0.01135	0.01014
2_9822	1271	5	71	1.00 (0.004)	0.00971	0.01247
0_10047	1100	16	54	0.987 (0.008)	0.01339	0.01156
0_13246	1082	6	81	0.997 (0.005)	0.01704	0.01683
0_10453	1064	4	4	0.285 (0.080)	0.00032	0.00084
0_10282	1062	31	70	0.995 (0.005)	0.02192	0.01824
0_10104	1057	3	32	0.990 (0.007)	0.00703	0.00681
0_9068	1046	5	54	0.994 (0.006)	0.01189	0.01177
0_10001	1028	5	57	0.988 (0.007)	0.01082	0.01235
0_18049	1012	12	27	0.800 (0.060)	0.00418	0.00598
2_5632	1006	2	5	0.344 (0.081)	0.00066	0.00111
0_16967	953	10	32	0.986 (0.007)	0.00579	0.00766
2_9708	941	6	36	0.997 (0.005)	0.00976	0.0087
0_17145	938	3	3	0.115 (0.060)	0.00021	0.00071
0_12465	923	6	41	0.993 (0.006)	0.01069	0.01004
0_11655	826	5	48	0.981 (0.011)	0.0094	0.01325
0_13031	824	49	46	0.999 (0.004)	0.01974	0.0159
0_15715	810	4	38	0.967 (0.013)	0.01469	0.01081
0_1760	744	27	9	0.289 (0.082)	0.00086	0.0028
0_3243	674	11	51	0.994 (0.005)	0.01689	0.01779
Promedio		11.3	40.95	0.8315	0.009817	0.009788

$A$ = número de alelos por locus;  $S$ = número de sitios segregantes;  $Hd$  =diversidad haplotípica;  $\pi$ =diversidad nucleotídica;  $\Theta_w$ = theta de Watterson,  $DE$ = desviación estándar.



De las pruebas de neutralidad (tabla 2) se encontraron 10 loci con valores negativos, indicando que hay un exceso de alelos raros, y 10 loci con valores positivos, índice de que hay una deficiencia de alelos raros. Sin embargo únicamente los loci (0\_1760 y 2\_9708) resultaron ser estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ) de los demás.

**Tabla 2.** Valores estimados de heterocigosidad y diferenciación genética para los 20 loci analizados en *Pinus greggii*.

Locus ID	$H_o$	$H_e$	$F_{st}$ pareada gre/aus	$F_{is}$	$D_{Tajima}$	$D_{Fu y Li}$	$F_{Fu y Li}$
2_202	0.25	0.85	0.03346	0.70588	0.41459	0.08977	0.24997
2_9822	0.17	0.46	0.08391	0.63043	-0.77575	-1.39715	-1.39363
0_10047	0.17	0.78	0.11332	0.78205	0.545	0.20319	0.39205
0_13246	0.17	0.64	0.04433	0.73437	0.04447	-0.07239	-0.03452
0_10453	0.08	0.08	0.08333	0	-1.39814	-1.2085	-1.47947
0_10282	0.33	0.9	0.10579	0.63333	0.70606	1.15113	1.1779
0_10104	0	0.28	0.05416	1	0.10807	-0.19067	-0.09986
0_9068	0	0.29	0.10184	1	0.03554	0.36677	0.29268
0_10001	0.08	0.71	0.05715	0.88732	-0.42925	-0.79188	-0.78601
0_18049	0.05	0.84	0.08273	0.94047	-0.99161	0.62335	0.06178
2_5632	0	0	0.09607	0	-0.97583	0.129	-0.25262
0_16967	0.17	0.84	0.05285	0.79761	-0.81429	-1.46968	-1.47047
2_9708	0.17	0.3	0.02343	0.43333	0.41274	1.66066 *	1.44319
0_17145	0	0.38	0.032	1	-1.46171	-0.41843	-0.85434
0_12465	0.17	0.63	-0.01105	0.73015	0.22043	-0.97728	-0.64774
0_11655	0.08	0.08	0.13229	0	-0.99814	-0.56541	-0.86268
0_13031	0.92	0.95	0.05693	0.03157	0.82705	1.02138	1.13355
0_15715	0	0.15	0.14306	1	1.21073	0.57935	0.96161
0_1760	0.05	0.91	-0.01723	0.94505	-1.93155 *	-0.63556	-1.24657
0_3243	0	0.62	0.07818	1	-0.17612	0.61265	0.38658
Promedio	0.143	0.5345	0.0673275	0.662578			

$H_o$ = heterocigosidad observada;  $H_e$ = heterocigosidad esperada;  $F_{st}$ = diferenciación genética; gre= *Pinus greggii* var. *greggii*; aus= *Pinus greggii* var. *australis*;  $F_{is}$ = endogamia;  $D_{Tajima}$ ; \*valores significativos  $p < 0.05$ .

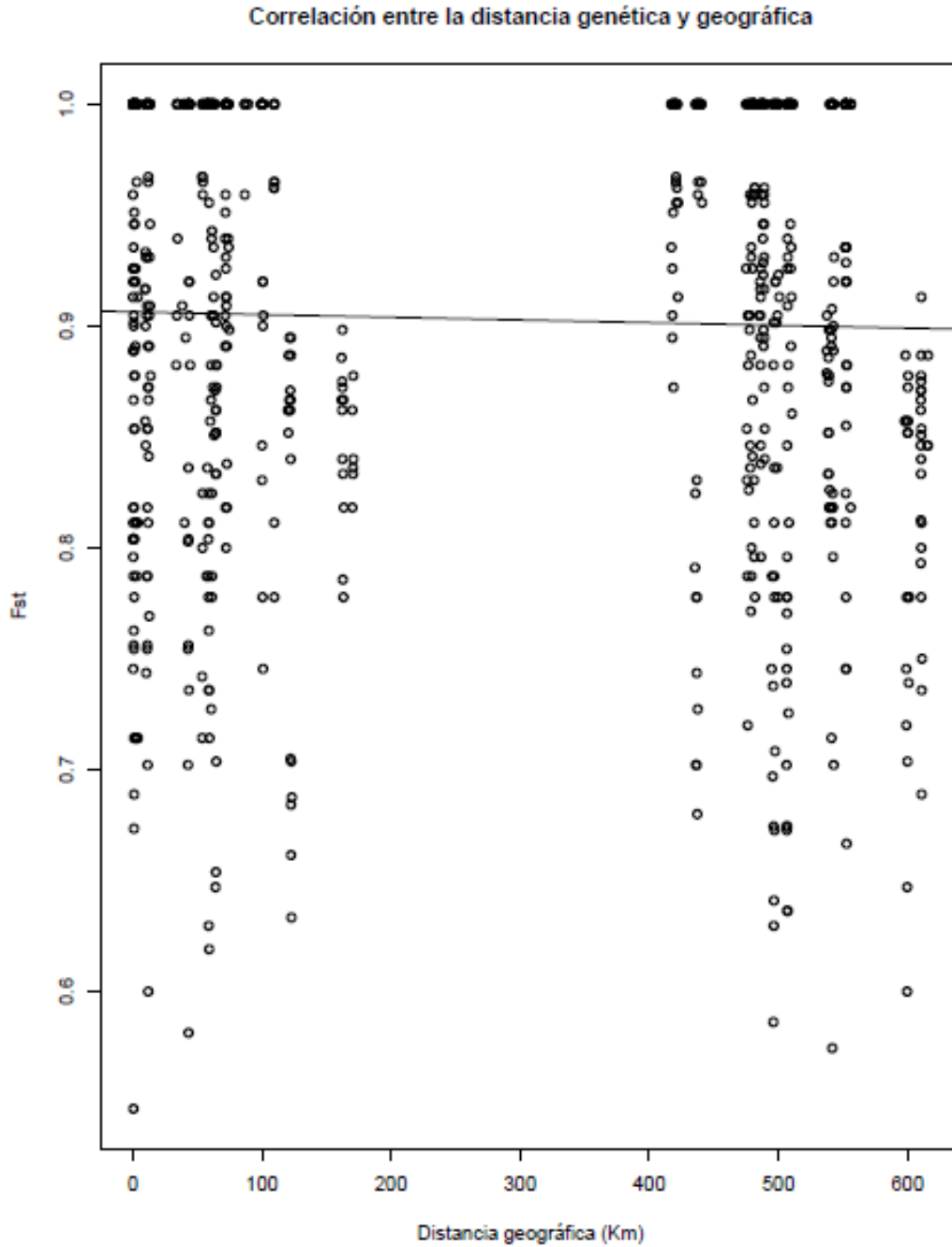
## 3.2 Endogamia y estructura poblacional

El valor promedio de la heterocigosidad esperada en los loci analizados fue  $H_e = 0.5345$  mayor al valor promedio de la heterocigosidad observada  $H_o = 0.143$  y se encontraron algunos loci con nula heterocigosidad: 0\_10104, 0\_9068, 2\_5632, 0\_17145, 0\_15715, 0\_3243 (tabla 2).

En la mayoría de los loci analizados los coeficientes de endogamia ( $F_{is}$ ) resultaron muy próximos al valor máximo de la endogamia = 1, indicando un exceso de homocigosis. En promedio el coeficiente de endogamia para *P. greggii* se estimó como un valor muy alto  $F_{is} = 0.6625$ , sugiriendo una alta tasa de autofertilización en el sistema de apareamiento y se encontró que cinco de los loci presentan el máximo valor de endogamia  $F_{is} = 1$  siendo los mismos que reportan nula heterocigosidad (tabla 2).

Los valores de  $F_{st}$  pareada para cada locus (tabla 2) en *Pinus greggii* var. *greggii* y *Pinus greggii* var. *australis* muestran valores de  $F_{st}$  cercanos a cero, indicando poca diferenciación genética entre los loci analizados presentes en ambas variedades, donde el valor promedio es  $F_{st} = 0.0673$ .

Para evaluación del modelo de aislamiento por distancia se realizó la prueba de Mantel (figura 5) y se encontró una correlación negativa ( $r = -0.0280$ ,  $p\text{-value} = 0.8906$ ) indicando que la diferenciación genética no se explica por la distancia geográfica entre las poblaciones. La prueba de Mantel también se realizó para cada variedad de forma independiente a manera de poder encontrar algún otro posible patrón, sin embargo ambas pruebas para cada variedad resultaron ser no significativas.

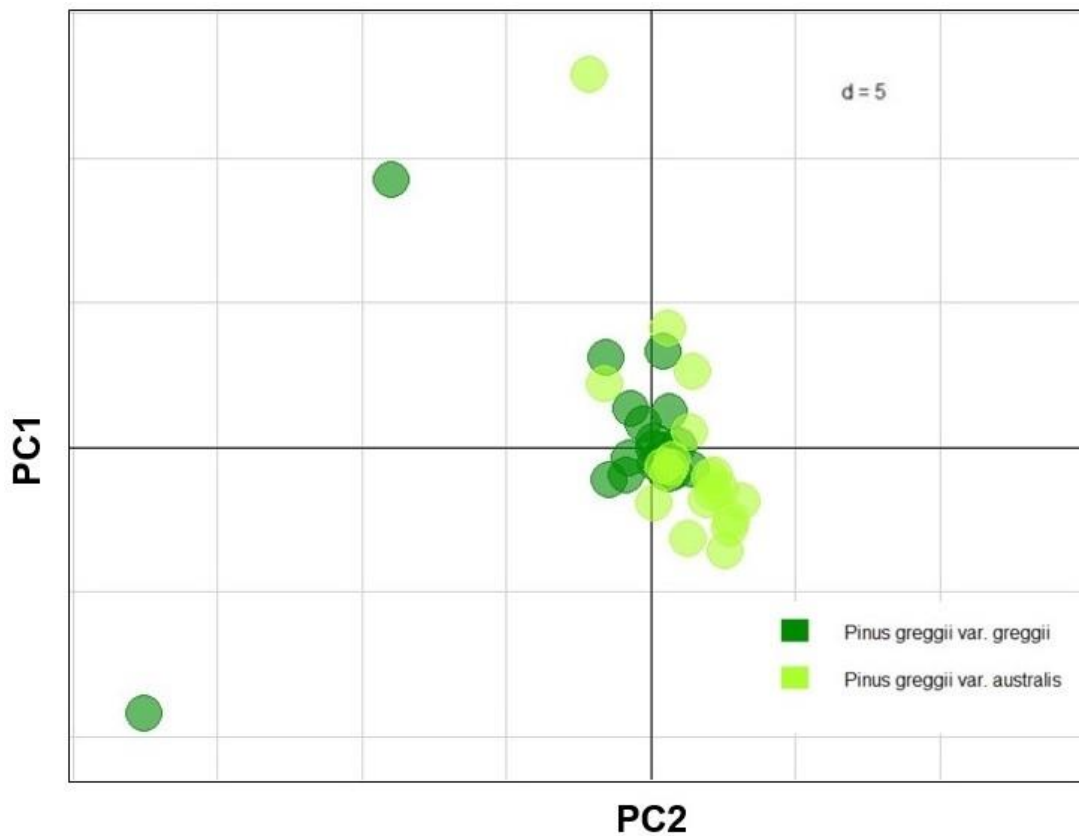


**Figura 5.** Prueba de Mantel de las distancias genéticas y geográficas ( $r = -0.0280$ ,  $P \leq 0.05$ ) en *Pinus greggii* var. *greggii* y *Pinus greggii* var. *australis*.

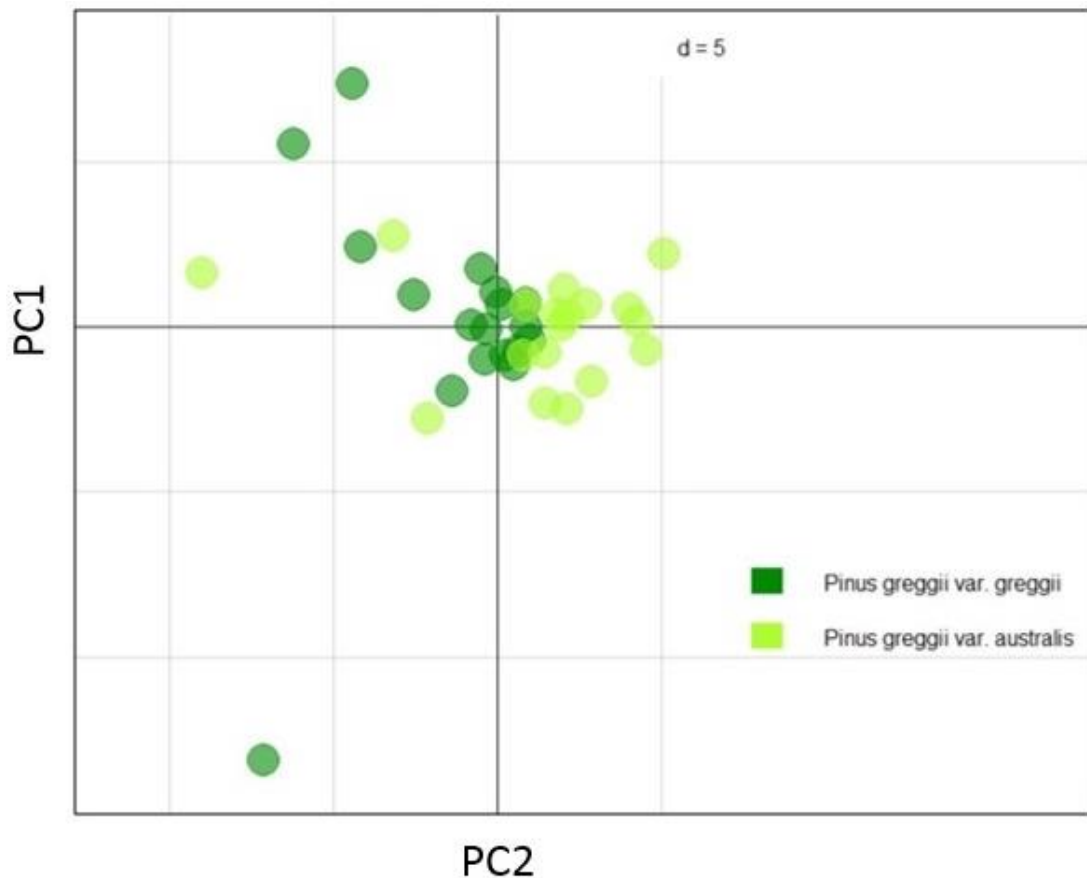
Mediante el análisis de componentes principales espaciales (ACPs) para la evaluación de patrón espacial de la variabilidad genética, se encontró que los individuos correspondientes a *P. greggii* var. *greggii* y los individuos de *P. greggii*

var. *australis* forman un solo grupo genético (figura 6) esto es un resultado interesante ya que al omitir los datos para los loci que son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en las pruebas de selección ( $D$  Tajima,  $D^*$  y  $F$  de Fu y Li; tabla 2) los individuos de la variedad *greggii* y variedad *australis* logran diferenciarse un poco en dos grupos genéticos (figura 7). Esto sugiere que los loci que se encuentran bajo selección natural, modifican la forma en que se agrupan los individuos, y se observa además algunos individuos con valores atípicos indicando la presencia de alelos raros.

### Análisis de Componentes Principales Espaciales (ACPs)

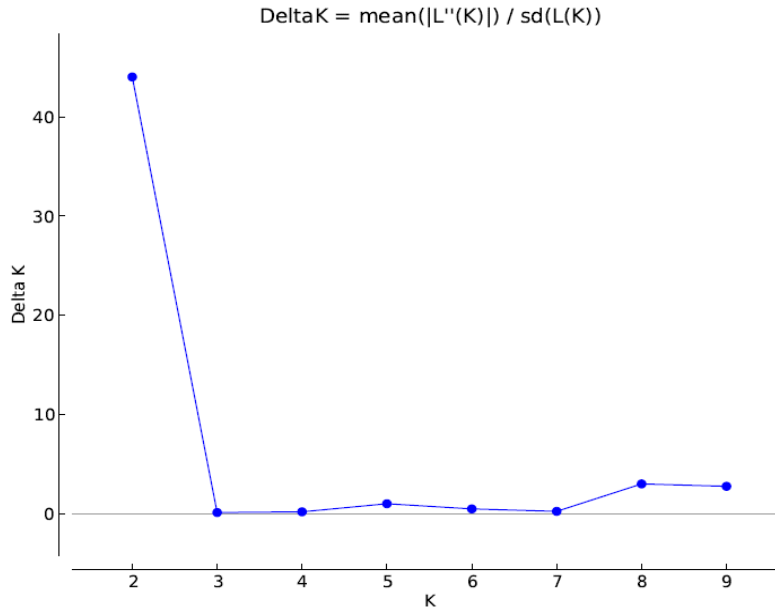


**Figura 6.** Resumen de las posiciones de los individuos de cada variedad de *Pinus greggii* de acuerdo al primer y segundo eje de dispersión del ACPs basado en la matriz de correlación de las frecuencias alélicas todos los loci (20) analizados.

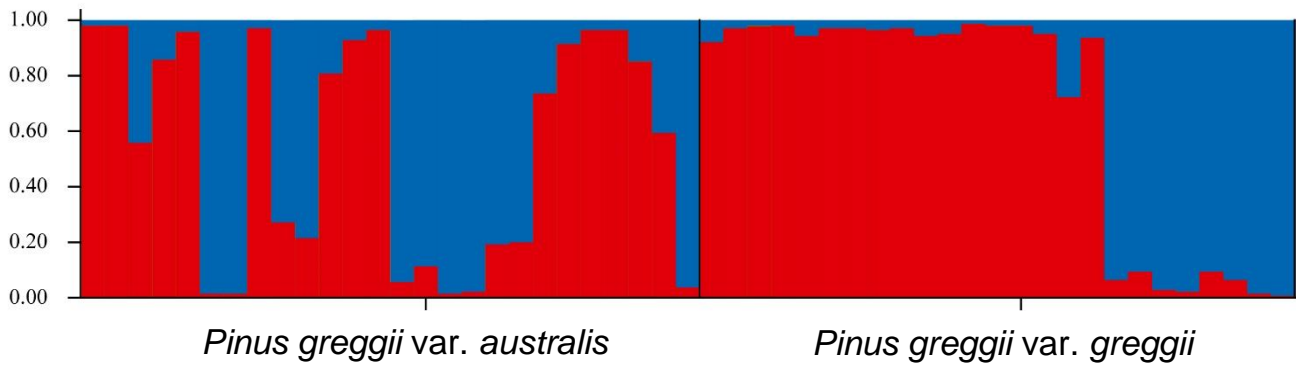


**Figura 7.** Resumen de las posiciones de los individuos de cada variedad de *Pinus greggii* de acuerdo al primer y segundo eje de dispersión del ACPs basado en la matriz de correlación de las frecuencias alélicas omitiendo los loci que resultaron ser estadísticamente significativos en las pruebas de neutralidad ( $D$  Tajima y  $D^*$  de Fu y Li).

El análisis de agrupación de individuos realizado con el programa STRUCTURE diferencia claramente dos grupos genéticos que corresponden a cada variedad; *greggii* y *australis* de acuerdo al valor óptimo de  $K = 2$  según el método de Evanno (figura 8), y puede observarse elevado flujo génico entre ambas variedades, sobre todo parece ser que ocurre mayor contribución del flujo génico de la población de *P. greggii* var. *greggii* a la población de *P. greggii* var. *australis* (figura 9).



**Figura 8.** Número de grupos genéticos ( $K=2$ ) en *Pinus greggii*, encontrados con el método de Evanno.



**Figura 9.** Análisis de agrupación de individuos realizado con el programa STRUCTURE para un número óptimo de agrupaciones  $K=2$ .

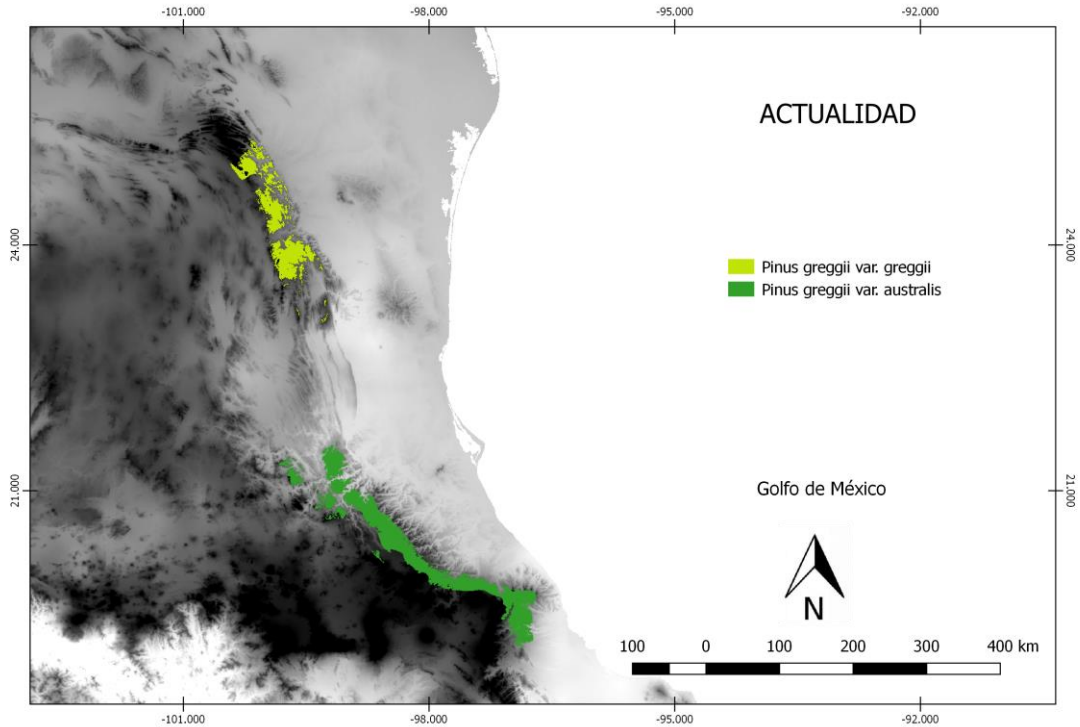
### 3.3 Modelos de distribución potencial actual y proyecciones a futuro CCSM-rcp45 (año 2050 y 2070).

De las 19 variables bioclimáticas de la plataforma WorldClim se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para determinación de la variables bioclimáticas que explican la varianza ambiental de *Pinus greggii*. Se obtuvieron seis componentes que resuelven la contribución de cada variable en la distribución de la especie, y resultado siete variables ambientales informativas que explican su distribución (tabla 3).

**Tabla 3.** Variables bioclimáticas (WorldClim) que contribuyeron significativamente a la varianza para la distribución de *Pinus greggii*.

Abreviación	Variable
BIO 1	Temperatura media anual
BIO 3	Isotermalidad
BIO12	Precipitación anual
BIO 13	Precipitación del mes más húmedo
BIO 16	Precipitación del cuarto más lluvioso
BIO 18	Precipitación del cuarto más cálido
BIO 19	Precipitación del cuarto más frío

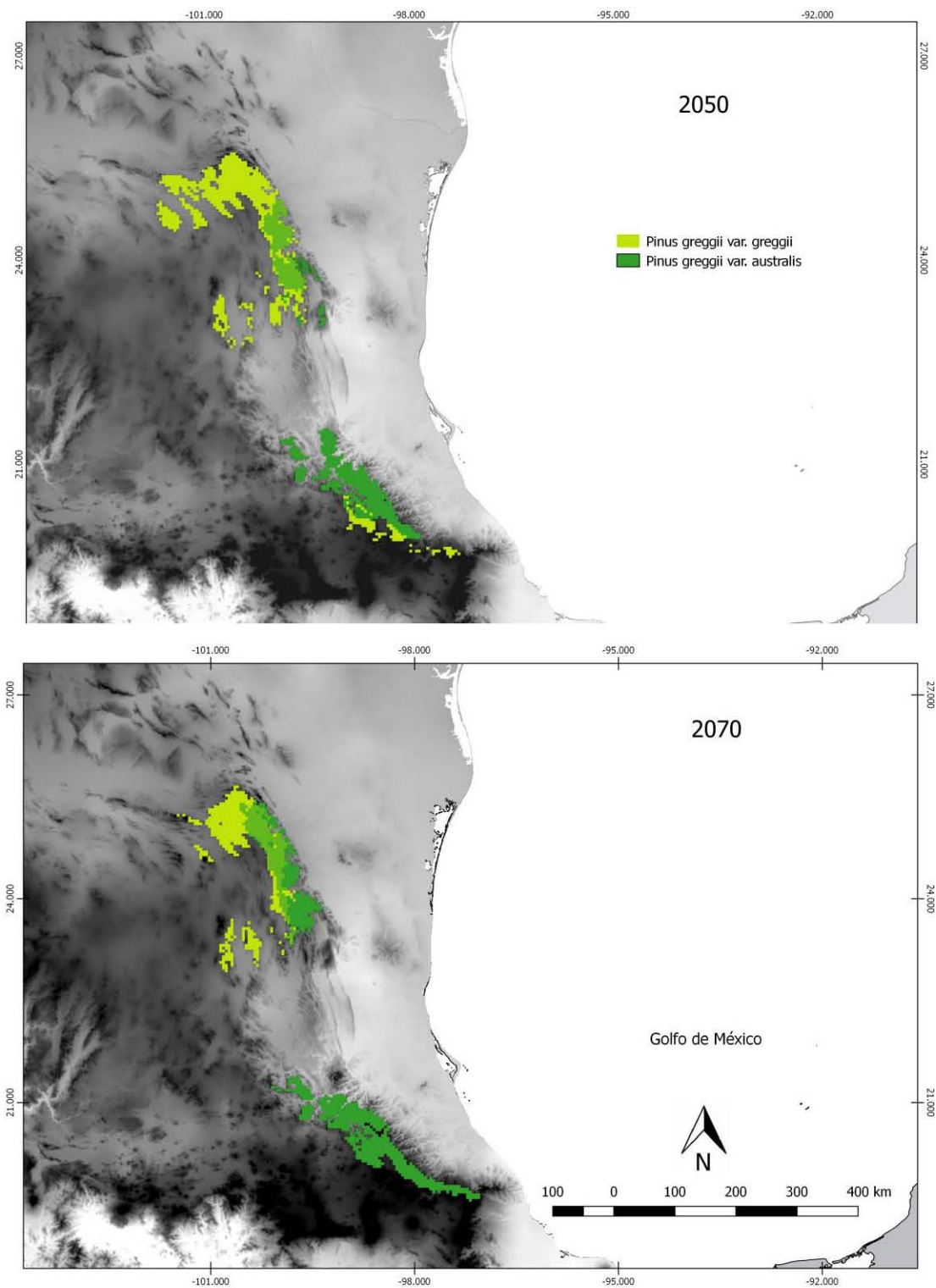
El modelo de distribución potencial de *P. greggii* en la actualidad (figura 10), muestra claramente que las poblaciones de la variedad *greggii* y variedad *australis* ocupan diferente área geográfica y ambiental en la Sierra Madre Oriental y que no hay contacto entre sus poblaciones ya que no se presentan traslapes en su distribución.



**Figura 10.** Modelo de distribución geográfica en la actualidad de las poblaciones de *Pinus greggii*.

En el modelo de distribución potencial de *P. greggii* bajo escenario de cambio climático (año 2050), se observa desplazamiento altitudinal y expansión de la distribución para ambas variedades de la especie hacia el norte en la Sierra Madre Oriental (figura 11), quedando en contacto ambas poblaciones. Además, en el caso de la variedad *greggii* se observa desplazamiento de su distribución hacia el sur. En el caso del modelo de distribución potencial para el año 2070, se observa que las poblaciones de ambas variedades de *P. greggii* mantienen contacto (como también lo predice el modelo para el año 2050), y que además incrementa la expansión en la distribución de ambas variedades en la región norte de la sierra, y en el caso de la variedad *greggii* su distribución ya no se observa en el sur de la sierra (figura 11).





**Figura 11.** Modelos de distribución geográfica de las poblaciones de *Pinus greggii* bajo escenario de cambio climático, arriba distribución potencial para 2050 y abajo distribución potencial para 2070.

## 4 Discusión

### 4.1 Diversidad genética y análisis de las pruebas de neutralidad

En la mayoría de las coníferas y en el género *Pinus* en particular, se han reportado altos niveles de diversidad genética (Hamrick *et al.*, 1992; Piñero *et al.*, 2008; Sork *et al.*, 2013). Esto es el resultado de un conjunto de factores como su sistema genético y reproductivo exclusivamente sexual con entrecruzamiento (Moreno-Letelier, 2002), así como el tiempo generacional que presentan y la longevidad que caracteriza a las coníferas permitiéndoles preservar su diversidad genética durante largos periodos de tiempo (Petit y Hampe, 2006). Sin embargo, el aislamiento geográfico entre poblaciones de una especie y el proceso de fragmentación pueden disminuir el valor de diversidad genética (Hedrick, 2011). Por lo anterior, en *P. greggii* se esperaba encontrar poca diversidad genética ya que sus poblaciones están fragmentadas y presentan aislamiento geográfico (Farjon, 2013). Los resultados muestran el caso contrario, ya que los análisis de diversidad genética en las secuencias de los 20 loci nucleares de este estudio, revelan niveles altos de diversidad genética en *P. greggii*, donde el número promedio de alelos por locus fue  $A = 11.3$  mayor al valor  $A = 3.5$  reportado por Parraguirre y colaboradores (2002).

El valor estimado de diversidad haplotípica  $Hd = 0.8315$  indica alta diversidad genética y coincide también con lo reportado por Parraguirre y colaboradores (2002), pero el valor estimado de diversidad nucleotídica  $\pi = 0.009817$  estimado es bajo con respecto a la diversidad haplotípica, pero alto comparado con otros pinos.

Una alta diversidad haplotípica acompañada de una baja diversidad nucleotídica, significa que los haplotipos difieren en un número reducido de nucleótidos, lo cual es característico de efectos de expansión demográfica poblacional en un tiempo relativamente reciente (Hamilton, 2009). Los valores negativos en las pruebas de neutralidad  $D$  Tajima y  $D^*$  de Fu y Li (tabla 2), indican la presencia de alelos raros y son más numerosos de lo esperado, y sugiere una expansión demográfica reciente (Tajima, 1989; Hamilton, 2009). Sin embargo el

tamaño de muestra en el análisis puede generar un sesgo en la estimación de estos parámetros poblacionales, por lo que la expansión demográfica de *P. greggii* debe tomarse como una hipótesis que requiere ser sometida a prueba en estudios futuros.

## 4.2 Estructura genética

En general, un valor de *Fst* mayor a 0.10 se considera como indicador de alta diferenciación genética entre poblaciones, situación poco común en especies alógamas y de polinización favorecida por el viento como es caso del género *Pinus* (Hamrick *et al.*, 1996; Ledig *et al.*, 1998).

En el caso de *P. greggii* se esperaba encontrar alta diferenciación genética entre la variedad *greggii* y la variedad *australis*, ya que sus poblaciones se encuentran aisladas por aproximadamente 360 km, situación que puede favorecer el poco flujo de genes entre ambas variedades. Por el contrario, en este análisis se encontró poca diferenciación genética  $Fst = 0.0673$  entre las variedades de *P. greggii*, lo cual indica que la distancia geográfica entre las dos regiones donde se encuentran las variedades de *P. greggii* no representa una barrera al flujo de genes. Se realizó la prueba de Mantel para evaluación del modelo de flujo génico de aislamiento por distancia, y se encontró una correlación negativa entre las distancias genéticas y geográficas  $r = -0.0280$ ,  $p\text{-value} = 0.8906$  (figura 5), esto indica que la distancia geográfica entre las poblaciones no se explica la diferenciación genética en las variedades de *P. greggii* y señala que esta puede deberse a otros factores.

El origen reciente de la subsección *Australes* (5 m.a.) al que pertenece *P. greggii* (Gernandt *et al.*, 2005), puede ser causa posible del bajo grado de diferenciación genética, que debido a las características de tiempo generacional y longevidad del grupo, el tiempo estimado no ha sido lo suficiente para encontrar grandes diferencias genéticas en las variedades *P. greggii* var. *greggii* y *P. greggii* var. *australis*.

La poca estructura encontrada en *P. greggii*, puede atribuirse a que la mayoría de los loci empleados muestran poca diferenciación genética entre ellos (Tabla 2). Kremer y Le Corre (2012) demostraron que en loci implicados con rasgos

fenotípicos como en el caso de varios de los loci utilizados en este estudio, pueden mostrar niveles modestos de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) en las poblaciones incluso cuando puede existir una fuerte diferenciación.

Con el análisis de componentes principales espaciales (ACPs, figura 6) y empleando los 20 loci de este estudio, no se logró resolver la estructura genética, ya que los individuos de *P. greggii* var. *greggii* y *P. greggii* var. *australis* forman un solo grupo genético. Pero al omitir del análisis de ACPs los loci que se desvían del modelo neutral y que resultaron ser estadísticamente significativos (tabla 2), el comportamiento de agrupación de los individuos de ambas variedades es distinto y estos se recuperan en dos grupos genéticos, aunque su diferenciación no es muy grande (figura 7). Esta situación sugiere que los loci que se desvían del modelo neutral generan un comportamiento distinto en la posición de los individuos.

De acuerdo a un estudio más amplio sobre la genómica de *Pinus* desarrollado en el laboratorio (datos aún no publicados) que incluye a *P. greggii* y utilizando loci únicamente neutrales, se encontró valores mayores de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) que reflejan alta estructura poblacional. Es por ello que se propone en este caso que los loci que se desvían del modelo neutral, generan un sesgo en la información respecto a la estructura poblacional. En otras especies de coníferas como *Picea mariana*, *Pinus palustris*, *Pinus strobus* y *Pinus taeda* no se han encontrado patrones consistentes en la estructura de la diversidad genética al comparar resultados de loci isoenzimáticos con loci asociados a características morfológicas o adaptativas (Parraguirre *et al.*, 2002).

La presencia de dos grupos genéticos encontrados con el (ACPs), se confirmó con el análisis bayesiano de STRUCTURE que determino un valor óptimo de  $K = 2$  según el método de Evanno (figura 8), y que corresponden a *Pinus greggii* var. *greggii* y *Pinus greggii* var. *australis*. Además, con este análisis se puede observar flujo génico entre ambas variedades y parece ser que hay mayor contribución de la variedad *greggii* que se encuentra en la región norte de la Sierra Madre Oriental a la variedad *australis* que se ubica en la región sur de la sierra

(figura 9). Esto puede deberse por la dirección de las masas de aire que viajan desde latitudes altas hacia el sur y al este en la Sierra Madre Oriental (Osorio, 2015) y que facilitan el movimiento de polen y semillas en las coníferas en dicha dirección.

El polen de coníferas puede recorrer distancias de más de 600 km (Di-Giovanni *et al.*, 1996), mientras que las semillas viajan distancias más cortas entre 12 y 90 m, dependiendo del tamaño, forma del ala y dirección del viento (Savolainen *et al.*, 2007; Castilleja *et al.*, 2016). Esto último puede provocar el establecimiento de grupos de árboles que estén genéticamente emparentados y promover la endogamia (Castilleja *et al.*, 2016), que en poblaciones pequeñas y aisladas la probabilidad del apareamiento entre parientes se incrementa aún más que en poblaciones grandes.

### 4.3 Endogamia

A excepción de tres loci que presentaron valor de cero de  $F_{is}$ , cinco loci presentaron el valor máximo de endogamia  $F_{is} = 1$  y el resto de los loci mostraron valores muy próximos de 1 (tabla 2), y se estimó el valor promedio de endogamia de  $F_{is} = 0.6625$ . Esto confirma la deficiencia de individuos heterocigotos en *P. greggii* descrito anteriormente por Parraguirre y colaboradores (2002), quienes reportan un alto coeficiente de endogamia de  $F_{is} = 0.271$ . Es poco común que se presente deficiencia de individuos heterocigotos en especies de polinización cruzada como los pinos (Ledig *et al.*, 2002; Parraguirre *et al.*, 2002), pero cuando las poblaciones de una especie se encuentran aisladas entre sí y presentan fragmentación, es probable que exista limitaciones significativas en la dispersión de polen y de las semillas, ya que en el proceso de fragmentación el tamaño de las poblaciones disminuye y aumenta la distancia entre grupos remanentes (Rathcke y Jules, 1993; Artz y Waddington, 2006), favoreciendo la polinización entre individuos cercanos.

En poblaciones de pinos que presentan tamaños poblacionales pequeños y que tienen baja densidad de individuos maduros en comparación de otros árboles, se ha reportado que ocurre bajo nivel de entrecruzamiento y se favorece la autopolinización (Mitton, 1992). En estos casos cada árbol es polinizado por su

propio polen puesto que en pinos no hay barreras precigóticas que eviten que el polen de un mismo árbol fertilice sus óvulos (Ledig, 1998), y además los individuos pueden ser parcialmente polinizados por el polen de árboles vecinos, aumentando los niveles de endogamia (Mitton, 1992; Castilleja *et al.*, 2016). En particular, *P. greggii* que además de tener poblaciones aisladas y fragmentadas, la disposición espacial de los árboles maduros en campo se observan distanciados unos de otros y en baja densidad, rodeados por individuos de otras especies de pinos en mayor densidad como; *P. teocote*, *P. montezumae*, *P. arizonica*, *P. pseudostrobus* y *P. patula* (Farjon, 2005; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005).

Otra de las causas que pueden explicar los altos niveles de endogamia en *P. greggii* es el fenómeno de serotinia, característico de la especie y de la asociación a los eventos de incendios forestales. En la Sierra Madre Oriental donde se distribuye *P. greggii* se ha reportado una fuerte actividad de incendios forestales durante el periodo del año 1860 a 2002 (González *et al.*, 2007). Cada año *P. greggii* produce semillas y las acumulan en su copa (al menos una parte de la producción) encerradas en los conos y las libera cuando se produce un incendio, ya que el calor del fuego abre los conos serótinos y permite la dispersión de las semillas en el ambiente pos incendio, donde existe una elevada disponibilidad de recursos que facilitan el reclutamiento de nuevos individuos (Pausas y Keeley, 2009). Esta situación favorece el incremento de los niveles de endogamia, ya que la dispersión de semillas que dan origen a nuevos individuos no es muy amplia (Savolainen *et al.*, 2007), y favorece el establecimiento de grupos de árboles genéticamente emparentados.

Debido a los altos niveles de endogamia  $F_{is} = 0.6625$  encontrados en *P. greggii* y la disposición espacial del arbolado maduro que se encuentran en menor densidad respecto a los otros árboles que forman parte del sistema de bosque (Farjon, 2005; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005), se propone el caso de cambio de sistema de apareamiento cruzado a sistema de apareamiento intermedio. El sistema de apareamiento intermedio representa tasas variables de entrecruzamiento y autofertilización, y se presenta en poblaciones aisladas, y en procesos de

colonización (Brown, 1990). En coníferas se ha reportado que dentro una misma especie el sistema de apareamiento puede variar en distintas poblaciones debido a factores ambientales y demográficos (Brown, 1990; Moreno-Letelier, 2002).

Generalmente la autofertilización en pinos ocurre en tasas bajas debido que son especies alógamas y de polinización favorecida por el viento (Vogl *et al.*, 2002), pero dado las condiciones de pequeño tamaño en las poblaciones y bajo número de individuos maduros de una especie en un sistema de bosque, la autofertilización puede presentar una tasa mayor, ya que los pinos no cuentan con barreas precigóticas así la autofertilización en los pinos es una consecuencia natural de su reproducción y su tasa puede ser en realidad más alta que la reportada (Mitton, 1992; Moreno-Letelier, 2002).

Este patrón se ha observado en otras coníferas, como las poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii* que presenta distribución fragmentada y restringida, Cruz Nicolás y colaboradores (2008) en un análisis de las frecuencias alélicas del polen y óvulos, reportan que no hay diferencias significativas en sus frecuencias alélicas, e indican que el polen proviene de la misma comunidad de árboles madre y que la autofertilización es la principal forma de endogamia en las poblaciones de *P. menziesii*.

En otras coníferas como *Picea chihuahuana*, *Picea mexicana* y *Pinus rzedowskii*, también se ha reportado el caso de autofertilización en su sistema de apareamiento y además una proporción elevada de semillas vanas (Ledig *et al.*, 1997; Ledig *et al.*, 2002; Castilleja *et al.*, 2016). En las poblaciones de *P. greggii*, Parraguirre y colaboradores (2002) también reportan un elevado porcentaje de semillas vanas y problemas de germinación de las semillas en ambas variedades de la especie, e incluso reportan la presencia de algunas plantas albinas y lo relacionan a la alta carga genética debida a la endogamia.

En los pinos, la carga genética debida a la endogamia es tan alta que es poco probable que los individuos producto de autofertilización sobrevivan, pues la depresión por endogamia contrarresta la ventaja de la autofertilización (Vogl *et al.*, 2002). La depresión por endogamia en los pinos puede visualizarse en diferentes

estadios y generalmente se presenta en etapas tempranas; durante el desarrollo de la semilla dando como resultado semillas vacías, una alta tasa mortalidad de plántulas, disminución de la tasa de crecimiento de los individuos y disminución en la tasa de fecundación (Remington y O'Malley, 2002).

Sin embargo el proceso de purgamiento genético sobre los alelos deletéreos hace posible que individuos producto de la autofertilización sobrevivan y lleguen a la etapa reproductiva con altos niveles de endogamia (Remington y O'Malley, 2002; Hedrick, 2011). En especies con sistema de apareamiento intermedio con alto nivel de autofertilización, los alelos deletéreos en estado homócigo son expuestos a la selección natural (Vog *et al.*, 2002) y esta exposición puede conducir a la purga de alelos deletéreos recesivos solo si el coeficiente de selección es alto y si la tasa de mutación no es lo suficientemente alta como para restaurar la carga genética (Remington y O'Malley, 2002). Un ejemplo de purgamiento genético es el caso de las poblaciones de *Pinus radiata*, que presenta sistema de apareamiento intermedio con una alta tasa de autofertilización (Vogl *et al.*, 2002). La historia demográfica de esta especie indica que sus poblaciones han sufrido fragmentaciones y cuellos de botella históricos, por lo que en principio el primer paso debió ser el purgamiento de la depresión por endogamia, una vez que el nivel de depresión por endogamia ha disminuido, una endogamia más reciente es posible y en consecuencia el sistema de apareamiento exclusivamente cruzado cambió a un sistema de apareamiento intermedio con un alto nivel de autofertilización (Vogl *et al.*, 2002).

El purgamiento de los alelos deletéreos que explique la alta tasa de endogamia de *P. greggii* es todavía una hipótesis, que deberá ser evaluada en estudios futuros, ya que el material biológico colectado para este trabajo pertenece únicamente a individuos adultos y se encontró un coeficiente de endogamia muy alto ( $F_{is} = 0.6625$ ).



## 4.4 Distribución potencial de *Pinus greggii* en la actualidad y a futuro (año 2050 y 2070)

Los modelos de distribución potencial presente y a futuro de *P. greggii* reflejan que la distribución de la especie responde en gran medida a las condiciones ambientales. En el modelo de distribución potencial de la actualidad (figura 10) se observa que la variedad *greggii* y variedad *australis* no presentan traslapes en sus distribuciones potenciales, lo cual coincide con lo reportado por Donahue y López-Upton (1999) sobre el área de distribución de la especie, que la registran en dos regiones geográficas aisladas.

El modelo de distribución potencial para la actualidad (figura 10) representa el nicho fundamental de la especie, es decir representa el conjunto de condiciones que le permiten sobrevivir y señala también la probabilidad de encontrar individuos de *P. greggii* en lugares donde no se ha reportado su presencia, como al sureste del estado de Veracruz, ya que de acuerdo al modelo existen las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo. Sin embargo, la distribución actual de *P. greggii* puede ser menor y ocupar solo una parte del área de la proyección de distribución potencial, esto puede deberse a factores asociados a diferentes actividades humanas como el cambio de uso de suelo, incendios forestales, así como las interacciones bióticas, como la competencia interespecífica con otros pinos (Leal-Nares *et al.*, 2012) y que en la realización de este modelo no se incluyeron.

Una aplicación de los sistemas de información geográfica (SIG), es que es posible predecir la distribución geográfica de las especies bajo diferentes condiciones ambientales (Manel y Holderegger, 2013) y hace de los modelos de distribución potencial una herramienta importante para la toma de decisiones sobre la gestión y conservación de las especies (Heller y Zavaleta, 2009; Leal-Nares *et al.*, 2012; Morales y Narkis, 2012).

En las proyecciones de cambio climático se espera a futuro que las temperaturas medias anuales sean mayores, lo que modificará las pautas pluviales y la presencia cada vez más frecuente de fenómenos climáticos extremos (FAO,

2006), lo cual puede afectar de manera negativa la distribución de los sistemas de bosque de coníferas, generando reducción del área de distribución, desplazamientos altitudinales y modificación en la dinámica ecológica (Heller y Zavaleta, 2009).

Debido a los efectos esperados en los bosques de coníferas por el proceso de cambio climático, se planteó como hipótesis que a futuro la distribución de *P. greggii* pudiese verse reducida en tamaño, ya que las coníferas son árboles que viven por periodos de mucho tiempo en un mismo lugar y su capacidad de desplazamiento es limitada en contraste con especies de animales que son altamente móviles y plantas herbáceas que pueden dispersarse anualmente y ocupar nuevos ambientes (Petit y Hampe 2006).

Sin embargo bajo la predicción de los modelos de distribución potencial de *P. greggii* bajo escenario de cambio climático para el año 2050 y 2070 se observa que la distribución de la especie no se ve reducida en tamaño (figura 11 y 12) y además se observa traslape entre la distribución de la variedad *greggii* y *australis* por el desplazamiento de la población de la variedad *australis* hacia el norte de la Sierra Madre Oriental. Es posible que a futuro bajo escenario de cambio climático las poblaciones de *P. greggii* puedan sobrevivir y ocupar diferentes ambientes, ya que se ha reportado que la especie tiene gran capacidad de supervivencia en condiciones de baja precipitación y tolerancia a un amplio rango de climas (Vargas y Muñoz, 1998; López y Muñoz, 1991; Dvorak *et al.*, 1996).

Esta información sobre el desplazamiento hacia el norte de la variedad *australis* debe tomarse en cuenta en caso de que se desarrolle un programa de conservación *in situ* para la especie, ya que en la actualidad no hay traslape entre la distribución de las variedades de *P. greggii* (Donahue y López-Upton, 1999; Parraguirre *et al.*, 2002; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005) y a futuro las poblaciones de estas variedades podrían estar nuevamente en contacto como ocurrió en el pasado. Sin embargo es necesario que en la actualidad se tomen acciones de conservación en *P. greggii* para asegurar su permanencia en el futuro puesto que actualmente las poblaciones de la especie presentan severa fragmentación, poniendo en riesgo su permanencia.

## 4.5 Conservación de *Pinus greggii*

Una estrategia adecuada de conservación para los recursos genéticos forestales requiere mantener las condiciones en que la estructura genética de una especie pueda continuar evolucionando en respuesta a los cambios ambientales en su área de distribución natural (Ledig, 1998).

Medidas de conservación *in situ* en *P. greggii* deben considerar como se distribuye la diversidad genética de la especie, en este trabajo y en estudios anteriores (Parraguire *et al.*, 2002) se ha encontrado que existe alta diversidad genética, que le confiere la capacidad para seguir evolucionando y se ha encontrado además que existe un elevado porcentaje de alelos raros y privados (Parraguire *et al.*, 2002). Sin embargo, debido a la distribución geográfica que tiene *P. greggii* en dos regiones aisladas en las Sierra Madre Oriental, es difícil la conservación mediante la protección de toda su área de distribución, por lo que una manera de proteger a las poblaciones de manera *in situ* podría ser mediante el establecimiento de áreas prioritarias con base a diferentes criterios, como el grado de diversidad ecológica y genética de especies arbóreas, arbustivas y herbáceas que se encuentran asociadas a *P. greggii* (Ramírez-Herrera *et al.*, 2005). Para proyectos a futuro sobre el establecimiento de áreas prioritarias de conservación, en esta tesis se propone deben ser considerados los modelos que predicen el impacto que ejercerá el cambio climático en la distribución de las poblaciones de *P. greggii*, puesto que en los resultados de nuestros modelos bajo dos escenarios de cambio climático, se espera el desplazamiento hacia latitudes mayores de *P. greggii*.

Por otra parte acciones inmediatas para la conservación pueden ser las de tipo *ex situ* para mantener la diversidad genética en huertos semilleros o bancos de semillas (Amaral *et al.*, 2007). La Cooperativa CAMCORE (Dvorak *et al.*, 1996; Dvorak *et al.*, 2000), el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), el Centro de Genética Forestal A.C. y el Instituto de Genética Forestal de la Universidad Veracruzana (Alba *et al.*, 1998; Azamar *et al.*, 2000) han recogido semillas de la mayoría de las poblaciones naturales de *P. greggii*

con el propósito de iniciar un programa de conservación *ex situ* (Ramírez-Herrera *et al.*, 2005). En la actualidad el Dr. Javier López-Upton, profesor investigador titular en el posgrado de Ciencias Forestales del Colegio de Posgraduados (COLPOS) encabeza el proyecto; “Establecimiento de huertos semilleros con material genéticamente superior de *Pinus patula* y *Pinus greggii*”, con el objetivo de generar huertos semilleros de alta calidad, para producir nuevas plantas de *P. patula* y *P. greggii* que sirvan en programas de reforestación (López-Upton, 2016). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de colecta de semilla para *P. greggii* en México no existe un programa integrado de conservación a nivel nacional y los proyectos existentes tratan más bien de intentos particulares de producción de germoplasma para abastecer programas locales de plantaciones y no con el propósito estricto de conservación *ex situ* (Ramírez-Herrera *et al.*, 2005).

## 5 Conclusiones

- Los resultados de este estudio muestran que *P. greggii* posee alta diversidad genética a pesar tener un alto índice de endogamia y distribución restringida y fragmentada, esta alta diversidad genética es además similar a lo reportado en pinos de zonas templadas, pero no de pinos que tienen distribución subtropical y restringida, lo que en principio esta condición le confiere la habilidad para evolucionar en respuesta a cambios ambientales.
- El bajo grado de diferenciación genética encontrado en los loci empleados, con estos marcadores, impactan en la estructura genética poblacional de *P. greggii*, por lo que esta fue estimada como poca diferenciación genética aunque esta puede ser mayor. El análisis de ACPs y STRUCTURE confirman la presencia de dos grupos genéticos, los cuales corresponden a las variedades taxonómicas; *Pinus greggii* var. *greggii* y *Pinus greggii* var. *australis*.
- La alta endogamia encontrada en *P. greggii* se debe al alto grado de autofertilización y al posible purgamiento genético. En consecuencia, es posible que el sistema de apareamiento ha cambiado de ser un sistema cruzado a ser un sistema de apareamiento intermedio con alto grado de autofertilización.
- Los modelos de distribución potencial a futuro bajo el escenario de cambio climático para el año 2050 y 2070 muestran que en las poblaciones de *Pinus greggii* var. *australis* hay desplazamiento de su distribución hacia el norte de la Sierra Madre Oriental y queda en contacto con las poblaciones de *Pinus greggii* var. *greggii*. Además los modelos muestran que no hay reducción significativa del área de distribución de la especie.

## 6 Glosario

**Alogamia:** Tipo de reproducción sexual en plantas que consiste en la polinización cruzada y fecundación entre individuos genéticamente diferentes.

**Organismo monoico:** Las funciones reproductivas (femenina y masculina) se encuentran separadas en diferentes estructuras en la misma planta.

**Organismo dioico:** Las funciones reproductivas se encuentran completamente separadas en diferentes plantas.

**Plastoma:** Genoma de cualquier miembro de una familia de organelos presentes únicamente en el citoplasma de las células vegetales, que desempeñan una función de reserva, de fotosíntesis o de biosíntesis de moléculas esenciales para el funcionamiento celular.

**Proceso estocástico:** Proceso que involucra una variable aleatoria y tiene un número de valores definidos llamados espacios de muestreo, donde cada resultado tiene una probabilidad asociada. Los procesos estocásticos o “procesos al azar” pueden ser procesos genéticos, ambientales y catastróficos.

**Serotinia:** Retención de las semillas en conos cerrados después de su maduración dentro del dosel de la planta por más de un año.

**Sonificador:** Procesador basado en ultrasonido para procesar muestras de laboratorio pequeñas. La sonificación es la aplicación de corriente eléctrica para transmitir energía a un sistema mecánico convirtiéndose en vibraciones de alta intensidad (ondas de ultrasonido), y se emplea para fragmentar moléculas de ADN.

# 7 Anexos

## 1. Información geográfica de *Pinus greggii* Engelm.

Ubicación geográfica de los individuos colectados de *P. greggii* var. *greggii* y *P. greggii* var. *australis*, en los diferentes estados que forman parte de la Sierra Madre Oriental y tipo de tejido que se empleó para extracción de material genético.

ESPECIE	ESTADO	MUNICIPIO	LATITUD	LONGITUD	TEJIDO HAPLOIDE	TEJIDO DIPLOIDE
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Coahuila	25.454278	-100.574702	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Coahuila	25.453934	-100.57372	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Coahuila	25.453796	-100.572892	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Coahuila	25.453616	-100.570352	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Coahuila	25.453478	-100.56947	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Coahuila	25.453162	-100.568727	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Coahuila	25.455577	-100.580176		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Arteaga	25.366913	-100.899675		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Arteaga	25.376959	-100.506549	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Arteaga	25.378061	-100.511189	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Arteaga	25.380245	-100.519655		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Arteaga	25.372959	-100.493609	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Arteaga	25.375713	-100.502055	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Coahuila	Arteaga	25.367928	-100.484344	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Nuevo León	Galeana	24.889417	-100.217986	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Nuevo León	Galeana	24.889515	-100.21832	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Nuevo León	Galeana	24.889531	-100.21869		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Nuevo León	Galeana	24.897661	-100.213714		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>greggii</i>	Nuevo León	Galeana	24.887456	-100.186816		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Queretaro	Pinal de Amoles	21.133193	-99.687627	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Queretaro	Pinal de Amoles	21.133269	-99.687686	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Queretaro	Pinal de Amoles	21.161995	-99.577701	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Queretaro	Pinal de Amoles	21.162025	-99.577329	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Queretaro	Pinal de Amoles	21.179707	-99.576649	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Queretaro	Pinal de Amoles	21.182584	-99.571503	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Jacala de Ledezma	21.086163	-99.173617		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Jacala de Ledezma	21.083498	-99.171266	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Jacala de Ledezma	21.081471	-99.170101	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Jacala de Ledezma	21.079741	-99.171523	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Jacala de Ledezma	21.057497	-99.176321		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Jacala de Ledezma	21.052107	-99.172356	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Xochicoatlán	20.794609	-98.69603	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Xochicoatlán	20.798859	-98.698582		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Xochicoatlán	20.798253	-98.698134		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Xochicoatlán	20.797928	-98.697918		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	Xochicoatlán	20.797077	-98.697034	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	San Bartolo Tutotepec	20.397626	-98.247496		*
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	San Bartolo Tutotepec	20.399483	-98.249153	*	
<i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	Hidalgo	San Bartolo Tutotepec	20.396438	-98.255999	*	

## 2. Extracción de ADN / Wizard Kit

Protocolo para extracción de DNA a partir del tejido haploide del megagametófito encontrado en la semilla.

- Prender baños 65°C y 37°C
  - Isopropanol y etanol 70% a temperatura ambiente
- 1) Moler 5-10 mg de tejido
  - 2) Agregar 600 µl de Nuclei Lysis Solution, vortexear 3 segundos
  - 3) Incubar 15 minutos a 65°C
- Etiquetar nuevos tubos 1.5 ml.
- 4) Agregar 3 µl de RNase Solution, invertir tubo 5 veces
  - 5) Incubar 15 minutos a 37°C
  - 6) Dejar enfriar a temperatura ambiente 5 minutos
  - 7) Agregar 200 µl de Protein Precipitation Solution, vortexear máxima velocidad 20 s.
  - 8) Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
  - 9) Transferir sobrenadante 550 µl a nuevo tubo 1.5 ml
  - 10) Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm
- Etiquetar nuevos tubos 1.5 ml. Ponerles 600 µl isopropanol
- 11) Transferir el sobrenadante 400 µl a nuevo tubo 1.5 ml con isopropanol
  - 12) Invertir suavemente los tubos. Dejar reposar 1 h a -20°C
  - 13) Centrifugar 2 minutos a 13000 rpm
  - 14) Decantar el sobrenadante, agregar 600µl de etanol 70%, invertir suavemente varias veces
  - 15) Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm
  - 16) Retirar etanol por decantación. Dejar secar boca abajo o en vacufuga
  - 17) Agregar 50 µl de DNA Rehydration Solution, incubar a 65°C durante una hora o toda la noche a temperatura ambiente. Almacenar 2-8°C.



### 3. Extracción de ADN en plantas Método “Mini-Prep”

Protocolo modificado por Alejandra Vázquez-Lobo, 1996. Filogenia de hongos endófitos del género *Pinus*: Implementación de técnicas moleculares y Resultados preliminares. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

- 1) Moler finamente las hojas en un mortero con 600 µl de buffer de extracción CTAB2x (Tris-HCl 100mM pH8, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm, CTAB 2% y b-ME 0.3) con el objeto de romper las paredes celulares y extraer el ADN. La cantidad puede variar de 0.1g a 1g dependiendo del tipo de planta.
- 2) La mezcla de CTAB2x y tejido se recupera en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 3) Se centrifuga a 10,000 rpm durante 8 min a 4°C.
- 4) Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 600 µl de buffer CTAB2x.
- 5) Incubar a 65°C durante 15 minutos. Conservar en hielo de 10 a 15 minutos.
- 6) Posteriormente se agregan 600 µl de cloroformo: octanol 24:1 y se agita hasta homogeneizar.
- 7) Se centrifuga a 1300 rpm durante 15 min.
- 8) Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio y repetir el paso 7 hasta que el sobrenadante quede transparente.
- 9) El sobrenadante se recupera (aproximadamente 600 µl) y traslada a un tubo nuevo con una pipeta de 200 µl.
- 10) Añadir 2/3 volumen (aproximadamente 600 µl) de isopropanol frío y dejar reposar de 30 min a 12 horas a -20°C.
- 11) Se centrifuga a 13000 rpm durante 8 min a 4°C y se elimina el sobrenadante.
- 12) Agregar al ADN (pellet) 1 ml de etanol 70% frío y centrifugar a 13000 rpm durante 8 min a 4°C.
- 13) Eliminar el sobrenadante sin perder de vista el pellet.
- 14) Por último, se deja evaporar el etanol (30 min aproximadamente) y el pellet se resuspende con 40 µl de TE o en ddH<sub>2</sub>O.

## 4. Loci putativos analizados en *Pinus greggii* Engelm.

Relación de función de los 20 loci putativos analizados.

Locus ID	Función
2_202	Respuesta a estrés salino
2_9822	Respuesta de defensa por deposición callosa en la pared celular
0_10047	Proceso metabólico del ADN
0_13246	Pared celular
0_10453	Formación de patrones de tejido vascular foliar
0_10282	Pared celular
0_10104	Membrana peroxisomal
0_9068	Ensamble de la pared del polen
0_10001	Desarrollo de la raíz
0_18049	Actividad de transporte transmembrana de carbohidratos
2_5632	Resistencia adquirida sistémica, vía de señalización mediada por ácido salicílico
0_16967	Morfogénesis de la hoja
2_9708	Pared celular
0_17145	Ensamble de la pared del polen
0_12465	Respuesta a estrés salino
0_11655	Respuesta a estrés
0_13031	Respuesta a estrés
0_15715	Respuesta a estrés salino
0_1760	Membrana peroxisomal
0_3243	Actividad de transporte transmembrana de cationes

## 8 Literatura Citada

Abarca G. C. y López V. A. 2007. La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: una interpretación de su significado evolutivo. En Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (Eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México DF. pp. 183-204.

Aguirre-Planter E., Furnier G. R., Eguiarte L. E. 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern México and Guatemala. *American Journal of Botany*. 87: 362–371.

Aguirre-Planter E., 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (Eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México DF. pp. 49-59.

Alba L. J., Mendizábal H. L., Aparicio R. A. 1998. Respuesta de un ensayo de procedencias de *Pinus greggii* Engelm. en Coatepec, Veracruz, México. *Forestal Veracruzana* 1(1): 25-28.

Amaral W., Thomson L., Yanchuk A. 2007. Conservación de los recursos genéticos en su ambiente natural. En FAO, FLD, Biodiversity International. *Conservación y manejo de recursos genéticos forestales*. Vol. 1: visión general, conceptos y algunos métodos sistemáticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma Italia. pp. 1-2.

Andrews A. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) Consultado 25 de marzo 2016.

Artz D. R. y Waddington K. D. 2006. The effects of neighbouring tree islands on pollinator density and diversity, and on pollination of a wet prairie species, *Asclepias lanceolata* (Apocynaceae). *Journal of Ecology*. 94: 597–608.

Arzate Fernández A., Gutiérrez González G., Heredia Bobadilla R. 2016. *Diversidad genética de dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca: una alternativa de conservación*. México: Universidad Autónoma del Estado de México, ISBN: 978-607-422-682-9.

Azamar O. M., López-Upton J., Vargas H. J., Plancarte B. A. 2000. Evaluación de un ensayo de procedencias-progenies de *Pinus greggii* y su conversión a huerto semillero. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Reforestación. Programa Nacional de Reforestación-Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. pp.7.

Beck J. B. y Semple J. C. 2015. Next-generation sampling: Pairing genomics with herbarium specimens provides species-level signal in *Solidago* (Asteraceae). *Applications in Plant Sciences*. 3(6): 1500014.

Brown A. H. D. 1990. Genetic characterization of plant mating systems. In Brown A. H. D., Clegg M. T., Kahler A. L., Weir B. S. (Eds.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, U.S.A. pp. 145-162.

Castilleja S. P., Delgado V. P., Sáenz R. C., Herrerías D. Y. 2016. Reproductive Success and Inbreeding Differ in Fragmented Populations of *Pinus rzedowskii* and *Pinus ayacahuite* var. *veitchii*, Two Endemic Mexican Pines under Threat. *Forests*. 7-178.

Castillo Cobián A. 2007. La selección natural a nivel molecular. En Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (Eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México DF. pp. 11-43.

Comes H. P. y Kadereit J. W. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*. 3(11): 432-438.

Clegg M. 1980. Measuring plant mating systems. *BioScience*. 30(12): 814-818.

Cruz Nicolás J., Vargas-Hernández J., Ramírez Vallejo P., López-Upton J. 2008. Parón de cruzamiento en poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en México. *Agrociencia*. 42: 367-378.

Dafni A. 1992. *Pollination Ecology: A practical approach*. Oxford University Press. Oxford. pp. 24-27.

Darwin C. 1887. The various contrivances by which orchids are fertilized by insects. 2<sup>d</sup> edition. London. pp. 8-31.

De Lucas H. A. 2009. Flujo genético, demografía y variabilidad genética en una conífera mediterránea emblemática, el pino negral o rodendo. Tesis de Doctorado. Universidad de Valladolid. Departamento de producción vegetal y recursos forestales.

Delgado P., Piñero D., Chaos A., Pérez N., Álvarez E. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*. 86(5): 669-676.

Di-Giovanni F., Kevan P. G., Arnold J. 1996. Lower planetary boundary layer profiles of atmospheric conifer pollen above a seed orchard in northern Ontario, Canada. *Forest Ecology and Management*. 83: 87-97.

Domínguez-Domínguez O. y Vázquez-Domínguez E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1): 59–70.

Donahue J. K y López-Upton J. 1996. Geographic variation in leaf, cone and seed morphology of *Pinus greggii* Engelm. In native forest. *Forest Ecology and Management*. 82: 144-157.

Donahue J. K y López-Upton J. 1999. A new variety of *Pinus greggii* (Pinaceae) in Mexico. *SIDA*. 18(4): 1083-1093.

Dvorak W. S., Kietzka J. E., Donahue J. 1996. Three-year survival and growth of provenances of *Pinus greggii* in the tropics. *Forest Ecology and Management*. 83: 123-131.

Dvorak W. S., Kietzka J. E., Donahue J., Hodge G. R., Stanger T. K. 2000. *Pinus greggii*. In: Conservation & Testing of Tropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative. Central America & Mexico Coniferous Resources Cooperative, North Carolina State University, Raleigh, NC. pp. 52-73.

Earl Dent A. y vonHoldt Bridgett M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservations Genetics Resources*. 4(2): 359-361

Eguiarte L. y Piñero Dalmau D. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. En Nuñez Farfán J. y Eguiarte L. (editores). La Evolución Biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, CONABIO. México pp. 371-398.

Eguiarte L., Aguirre-Planter E., Scheinvar E., Gonzáles A., Souza V. 2010. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Lab. de Evolución Molecular y Experimental, Depto. Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM. México. pp. 1-30.

Eguiarte L., Aguirre-Liguori J., Jardón-Barbolla L., Aguirre-Planter E., Souza V. 2013. Genómica de Poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 16(1): 42-56.

Eguiluz-Piedra T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Bosques. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo. México. pp. 614.

Enright N., Lamont B., Marsula, R. 1996. Canopy seed bank dynamics and optimum fire regime for the highly serotinous shrub, *Banksia hookeriana*. *Journal of Ecology*. 84 9–17.

Ersts P.J. 2016. Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. [http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg). Consultado 5 octubre 2016.

Escalante E. A., Jardón B. L., Ramírez-Barahona S., Eguiarte L. 2014. The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 1249-1264.

Etherington T. R., 2011. Python based GIS tools for landscape genetics: visualising genetic relatedness and measuring landscape connectivity. *Methods in Ecology and Evolution*. 2: 52–55

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.

FAO. 2006. Los bosques y el cambio climático. Sala de prensa. [www.fao.org](http://www.fao.org) consultado 4 mayo 2017.

FAO, FLD, Biodiversity International. 2007. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. Vol. 1: visión general, conceptos y algunos métodos sistemáticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.

Farjon A. y Styles B. T. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica monograph 75. Bronx, The New York Botanical Garden.

Farjon A. 2005. Pines: drawings and descriptions of the genus *Pinus*. 2<sup>d</sup> edition. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK. pp. 235.

Farjon A. 2010. A handbook of the world's conifers. Leiden; Boston, Brill.

Farjon A. 2013. *Pinus greggii*. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1.

Fu Y. X. y Li W. H. 1993. Statistical tests of neutrality mutations. *Genetics*. 133: 693-709.

Futuyma D. 2009. Evolution. Sinauer Associates. Inc. Estados Unidos de América.

Frankel O. H. y Soulé M. E. 1981. Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2002. Introduction to conservations genetics. Cambridge, Reino Unido.

Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez. 2013. Genetic, spatial and connectivity methods of analysis in landscape genetics. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84: 1031-1054.

Gernandt D. S., Geada López G., Ortiz García S., Liston A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*. 54: 29–42.

Gernandt D. S. y Pérez de la Rosa J.A. 2013. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 5: 126-133.

González-Tagle M. A., Schewendenmann L., Jiménez P. J., Himmelsbach W. 2007. Reconstrucción del historial de incendios y estructura forestal en bosques mixtos de pino-encino en la Sierra Madre Oriental. *Madera y Bosques*. 13(2): 51-63.

Gnrke A., Melnikov A., Maguire J., Rogov P., LeProust E., Brockman W., Fennell T., Giannoukos G., Fisher S., Carsten R., Stacey G., Jaffe D., Lander E., Nusbaum C. 2009. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature Biotechnology*. 27(2): 182-189.

Hamilton M. B. 2009. Populations genetics. Wiley-Blackwell, Oxford. pp. 424.

Hamrick J. L. y Godt M. J. W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 351: 129-198.

Hedrick P. W. 2011. Genetics of populations. 4<sup>a</sup> edition. Jones and Bartlett publishers. Sudbury, Massachusetts. pp. 65-523.

Heller N. E. y Zavaleta E. S. 2009. Biodiversity management in the face of climate change: a review of 22 years recommendations. *Biological Conservation*. 142: 14-32.

Hewitt G. M. 1989. The subdivision of species by hybrid zones. In Otte D. y Endler J. (Eds.). Speciation and its consequences. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. pp. 85-110.

Hijmans R. J., Cameron S. E., Parra J. L., Jones P. G., Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 25: 1965-1978.

Hubisz M. J., Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*. 9: 1322-1332.

UICN. 2001. Categorías y criterios de la lista roja de la UICN: Versión 3.1. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido. pp. 33.

IUCN. 2017. Red List of Threatened Species. Version 2017-2.

Jakobsson M. y Rosenberg N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 23: 1801–1806.

Jombart T. 2008. ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 24: 1403-1405.

Jombart T., Devillard S., Dufour A. B., Pontier D. 2008. Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity*. 101: 92103.

Jombart T., Devillard S., Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*. 11: 94-108.

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12): 1647-1649.

Kelly D. y Sork V. 2002. Mast Seeding in Perennial Plants: Why, How, Where? *Annual Review of Ecology and Systematics*. 33: 427-447.

Kimura M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217(129): 624-626.

Kremer A. y Le Corre V. 2012. Decoupling of differentiation between traits and their underlying genes in response to divergent selection. *Heredity*. 108(4): 375–385.

Larsson A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics*. 30(22): 3276-3278.

Leal-Nares O., Mendoza M. E., Pérez-Salicrup D., Geneletti D., López-Granados E., Carranza E. 2012. Distribución potencial del *Pinus martinezii*: un modelo espacial basado en conocimiento ecológico y análisis multicriterio. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83: 1152-1170.

Ledig F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In Richardson D. M. (ed.). Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 251-280.

Ledig F. T., Mápula L. M., Bermejo V. B. 2000. Locations of endangered spruce populations in México and the demography of *Picea chihuahuana*. *Madroño* 47(2): 71-88.



- Lian C., Miwa M., Hogetsu T. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity*. 87: 88-98.
- López-Upton J. 2016. Científicos producen “árboles superiores” para mejorar actividad forestal. Agencia Informativa CONACYT. Consultado 13 de diciembre 2016.
- Manel S., Schwartz K., Luikart G., Taberlet P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and populations genetics. *Trends in Ecology & Evolution*. 20: 136-142.
- Manel S. y Holderegger R. 2013. Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology & Evolution*. 28: 614-621.
- Michel A. P., Sim S., Powell T. H. Q., Taylor M. S., Nosil P., Feder J. L. 2010. Widespread genomic divergence during sympatric speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:9724-9729.
- Mitton J. B. 1992. The dynamic mating systems of conifers. *New Forest*. 6: 197-216.
- Moreno-Letelier A. 2002. Sistema de apareamiento y variación genética en *Pinus maximartinezii* Rzedowski. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. pp. 3-19.
- Moreno-Letelier A. 2007. Tamaño efectivo de la población. En Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (Eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 63-84.
- Moreno-Letelier A. 2009. Estructura filogeográfica de *Pinus strobiformis* y su relación con los cambios climáticos durante el Pleistoceno. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología. UNAM. pp. 13-17.
- Moritz C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*. 51: 238-254.
- Musálem M. A. y Martínez C. G. 2003. Monografía de *Pinus greggii* Engelm. Proyecto de investigación manejo sustentable y conservación de la biodiversidad de los bosques de clima templado y frío de México. Libro técnico No. 9. División forestal. México. pp. 5-9.
- Nei M. y Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5269-5273.
- Neves L. G., Davis J. M., Barbazuk W. B., Kirst M. 2013. Whole exome targeted sequencing of the uncharacterized pine genome. *The Plant Journal*. 75: 146-156.

Núñez Farfán J. y Tapia López R. 2010. La fragmentación de hábitat y la biodiversidad genética de la selva húmeda tropical. En Núñez Farfán J., Tapia López R., Aguirre-Planter E., Domínguez C. Diversidad genética y conservación. *Oikos* Instituto de Ecología UNAM. pp. 4.

Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*. 13: 1143–55.

Osorio T. M. 2015. Estudio de la intensificación de los vientos en el puerto de Veracruz mediante modelación numérica. Tesis de Maestría. UNAM. Centro de Ciencias de la Atmósfera. pp. 1-20.

Pausas J. G. y Keeley J. E. 2009. A burning story: The role of fire in the history of life. *BioScience*. 59: (7) 593-601.

Parraguirre L. C., Vargas Hernández J. J., Ramírez Vallejo P., Azpíroz Rivero H. S., Jasso Mata J. 2002. Structure of genetic diversity in natural populations of *Pinus greggii* Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25 (3): 279 – 287.

Perfectti F., Picó F. X., Gómez J. M. 2009. La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas*, 18: 10-16.

Peterson A. T. 2001. Predicting species geographic distributions based on ecological niche modeling. *The Condor*. 103: 599-605.

Petit A. J. y Hampe A. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. Imperial College London. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 37: 187-214.

Piñero D., Caballero M. J., Cabrera T. D., Canteros E., Casas A., Castañeda S. A., Castillo A., Cerritos R., Chassin N. O., Colunga G. P., Delgado P., Píndaro D. J., Eguiarte L., Escalante A. E., Espinoza B., Fleury A., Flores R. S., Fragoso G., González A. J., Islas V. V., Martínez E., Martínez F., Martínez C. J., Mastretta Y. A., Medellín R., Medrano G. L., Molina F. F., Morales V. B., Murguía V. A., Payró de la Cruz E., Reyes M. R., Robles S. R., Rodríguez A. G., Rojas B. L., Romero M. R., Sahaza C. J., Salas L.R., Sciutto E., Scott B. C., Schramm U. Y., Silva C., Souza V., Taylor M., Urbán R. J., Uribe A. M., Vázquez C. M., Vázquez D. E., Vovides A., Wegier A., Zaldívar R. A., Zúñiga G. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México*. Vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO. México. pp. 437-494.

Primack R., Rozzi R., Feinsinger P., Massardo F., 2001. Conservación fuera de las áreas protegidas. En Primack R., Rozzi R., Feinsinger P., Massardo F. (Eds.). *Fundamentos de conservación biológica: perspectivas latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica, México. pp. 521–557.

Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.

Ramírez-Herrera C., Vargas-Hernández J. J., Jasso M., Carrillo C., Guillén A. 1997. Variación isoenzimática en diez poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Agrociencia* 31(2): 223-230.

Ramírez-Herrera C., Vargas-Hernández J. J., López-Upton J. 2005. Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta Botánica Mexicana*. 72: 1-16.

Rathcke B. J. y Jules E. S. 1993. Habitat fragmentation and plant-pollinator interactions. *Current Science*. 65: 273-277.

Raymond M. y Rousset F. 1995. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.

Remington D. L. y O'Malley D. 2002. Evaluation of major genetic loci contributing to inbreeding depression for survival and early growth in a selfed family of *Pinus taeda*. *Evolution*. 54: 1580-1589.

Rentería A. 2007. Breve revisión de marcadores moleculares. En Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (Eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México DF. pp. 541- 554.

Richardson D. M. y Rundell P. W. 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. In: Richardson DM editor. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge, Cambridge University Press. pp. 3B46.

Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*. 145: 1219-1228.

Rocha M. y Gasca J. 2007. Ecología molecular de la conservación. En Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (Eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México DF. pp. 251-272.

Rosenberg N. A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology*. 4: 137-138.

Rzedowski J. 2005. México como área de origen y diversificación de linajes vegetales. En: Llorente Bousquets J. y Morrone J. (Eds.). *Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 375-382.

Salazar G., Vargas-Hernández, Jasso M., Molina G., Ramírez-Herrera, López-Upton. 1999. Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. *Madera y Bosques*. 5(2): 19-34.

Savolainen O., Pyhäjärvi T., Knurr T. 2007. Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 38, 595–619.

Segelbacher G., Cushman S., Epperson B., Fortin M., Francois O., Hardy O., Holderegger R., Taberlet P., Waits L., Manel S. 2010. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. *Conservations Genetics*. 11: 375–385.

Sork V. L., Aitken S. N., Dyer R. J., Eckert A. J., Legendre P., Neale D. B. 2013. Putting in landscape into the genomics of trees: approaches for understanding local adaptation and population responses to changing climate. *Tree Genetics & Genomes*. 9: 901-911.

Schulman I., Toivonen T., Ruokolainen K. 2007. Analysing botanical collecting effort in Amazonia and correcting for it in species range estimation. *Journal of Biogeography*. 34: 1388-1399.

Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 16: 393-430.

Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236: 787-792.

Stephens M., Smith N. J., Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*. 68: 978–989.

Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics*. 105: 437-460.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by ADN polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.

Terborgh J. 1992. Maintenance of diversity in tropical forests. *Biotropica*. 24: 283-292.

Turner T. L. y Hahn M. W. 2007. Locus- and population specific selection and differentiation between incipient species of *Anopheles gambiae*. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 2132-2138.

Thuiller W., Lavorel S., Araújo M. B., Sykes M. T., Prentice I. C. 2005. Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 8245-8250.

Vander Wall S. 1992. The Role of Animals in Dispersing a "Wind-Dispersed" Pine. *Ecology*. 73(2): 614-621.

van Zonneveld M., Koskela J., Vinceti B., Jarvis A. 2009. Repercusiones del cambio climático en la distribución de los pinos tropicales en Asia sudoriental. *Unasyuva. Revista Internacional de silvicultura e industrias forestales*. 60: 231-232.

Vargas H. y Muñoz O. 1988. Resistencia a sequía: II. Crecimiento y supervivencia en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. *Agrociencia*. 72: 197-208.

Vargas H. y Muñoz O. 1991. Potencial hídrico, transpiración y resistencia estomatal en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. *Agrociencia*. 1(3): 25-38.

Vázquez-Lobo A. 1996. Filogenia de hongos endófitos del género *Pinus* L.: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. pp. 66.

Vogl C., Karhu A., Moran G., Savolainen O. 2002. High resolution analysis of mating systems: Inbreeding in natural populations of *Pinus radiata*. *Journal of Evolutionary Biology*. 15: 433-439.

Vogler D. W. y Kalisz S. 2001. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution*. 55(1): 202-204.

Watterson G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7: 256-276.

Wegier A. 2013. Diversidad genética y conservación de *Gossypium hirsutum* silvestre y cultivado en México. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología. UNAM. pp. 11-14.

Wright S. 1930. The population number. In *Evolution in mendelian populations*. University of Chicago Press. Chicago Illinois. pp.110.

Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28: 114-138.

Wright S. 1969. *Evolution and Genetics of Populations vol.2. The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.

Yang H., Nielsen R., Wang J., Wang J. 2010. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science*. 329: 75-78.

Yi X., Liang Y., Huerta-Sánchez E., Jin X., Xi Z., Cuo P., Pool J.E., Xu J., Liu X., Jiang T., Wu R., Zhou G., Tang M., Qin J., Ouyang W., Ren X., Liang H., Zheng H., Huang Y., Li J., Bolund L., Kristiansen K., Li Y., Zhang Y., Zhang X., Li R., Li S., Li

H., Yang H., Nielsen R., Wang J., Wang J. 2010. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science*. 329: 75-78.

Zhang J., Chiodini R., Badr A., Zhang G. A. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics*. 38: 95-109.