



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

**FILOGENIA MOLECULAR Y EVOLUCIÓN
DE CARACTERES FOLIARES DE *PINUS*
SECCIÓN *TRIFOLIAE***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)**

P R E S E N T A

SERGIO HERNÁNDEZ LEÓN

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT
COMITÉ TUTOR: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
DR. MARK EARL OLSON**

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

FILOGENIA MOLECULAR Y EVOLUCIÓN
DE CARACTERES FOLIARES DE *PINUS*
SECCIÓN *TRIFOLIAE*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

SERGIO HERNÁNDEZ LEÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT
COMITÉ TUTOR: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
DR. MARK EARL OLSON

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2011

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** del alumno **HERNÁNDEZ LEÓN SERGIO** con número de cuenta **509015141** con la tesis titulada **"Filogenia molecular y evolución de caracteres foliares de *Pinus* sección *Trifoliae*"**, realizada bajo la dirección del **DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT**:

Presidente: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Vocal: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Secretario: DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT
Suplente: DRA. TERESA TERRAZAS SALGADO
Suplente: DR. MARK EARL OLSON

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de febrero de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme cursar mis estudios de Maestría bajo un nivel académico de excelencia.

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca para cursar los estudios de maestría así como el financiamiento a través de los proyectos, Código de Barras Genéticos en Coníferas del Conacyt, Clave: 000000000123126 e Integración de datos morfológicos y moleculares para el género *Pinus* (Pinaceae) del DGAPA-PAPIIT, Clave: IN228209.

La presentación de resultados preliminares de este trabajo en congresos nacionales e internacionales fue posible gracias al financiamiento por parte del Posgrado en Ciencias Biológicas a través del programa de apoyos PAEP.

Agradezco enormemente el apoyo, guía y tiempo del Dr. David Sebastian Gernandt del Instituto de Biología, UNAM, tutor del proyecto de investigación así como de mi comité tutorial integrado por el Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau del Instituto de Ecología, UNAM y el Dr. Mark Earl Olson del Instituto de Biología, UNAM.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Biológicas y al Instituto de Biología de la UNAM por darme la oportunidad de cursar el programa de maestría en un ambiente de excelencia académica.

A mi director de tesis Dr. David Sebastian Gernandt, quien ha sido la clave para llevar a cabo mi grado de maestría, por su apoyo, tiempo y guía, durante estos años; a su esposa la Dra. Sol Ortiz García y sus hijas Elizabeth, María y Sol por su apoyo y amistad ofrecidos durante estos años.

Al Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau y Dr. Mark Earl Olson quienes fueron integrantes de mi comité tutorial y de quienes recibí comentarios importantes y siempre constructivos para concluir satisfactoriamente mi trabajo de investigación. A la Dra. Teresa Terrazas Salgado y el Dr. Juan José Morrone Lupi quienes como miembros del jurado, también aportaron valiosos comentarios y correcciones que permitieron el mejoramiento de la versión escrita de este trabajo; así como a la Dra. Sol Ortiz García y al Dr. Jorge A. Pérez de la Rosa por la revisión de versiones preliminares del escrito de tesis.

A Dylan O. Burge, Lev Jardon Barbolla, Rodger Gwiazdowski, Dr. Aaron Liston, Dr. Jorge A. Pérez de la Rosa, Dr. Richard Bond por su gran apoyo en las salidas a campo y por aportar muestras que permitieron llevar a cabo este trabajo.

A mis profesores Dra. Blanca Hernández Baños, Dra. Dení Claudia Rodríguez Vargas, Dra. Margarita Villegas Ríos, Dra. Martha Martínez Gordillo, Dra. Tania Escalante Espinosa, Dra. Teresa Terrazas Salgado, Dr. David S. Gernandt, Dr. Fernando Cervantes Reza, Dr. Fenando Chiang Cabrera, Dr. Francisco Vergara Silva, Dr. Gerardo Salazar Chávez, Dr. Guillermo Salgado Maldonado, Dr. Juan José Morrone Lupi, Dr. Mark E. Olson por sus valiosas enseñanzas.

Al Dr. Pablo Vinuesa organizador del Taller Latinoamericano de Evolución Molecular y el Dr. José M. Ponciano organizador del Taller de Modelos de Captura y Recaptura así como a todos los investigadores que participaron en estos talleres en los cuales aprendí muchas cosas interesantes de ambas disciplinas.

A mis compañeros y amigos de generación, Emanuel, Géminis e Ibeth, con quienes compartí mucho tiempo en clase y muchos momentos agradables. A mis

compañeros y amigos del laboratorio Alejandro, Eduardo, Marcos y Paty un buen equipo de trabajo. A mis amigos de hace mucho tiempo, Edith Jiménez Muñoz quien siempre me ha escuchado y apoyado de manera incondicional en todos mis proyectos y Fernando Cortes Medina por estar conmigo en todos momentos y compartir todo este tiempo conmigo, dandome ánimos para seguir siempre adelante. Ángeles, Ari, Borre, Juanita, Meche y Rigo con quienes he pasado muchos momentos agradables y divertidos, agradezco y valoro muchísimo su amistad y apoyo.

A Rocío González por su ayuda en todos los trámites durante la maestría, al Dr. Armando Rodríguez por la orientación en los trámites de titulación, a la M. en C. Laura Márquez por la asesoría en el trabajo de laboratorio de molecular y al Dr. Calixto León por su apoyo y enseñanza en las técnicas de anatomía.

Este trabajo lo dedico a mi familia, mi mamá Lucia León López, mis hermanos Julián, Verónica, Vicente, Yazmín y mis sobrinos Carlos, Erick, Fernanda, Fernanda, Mayte y Roberto quienes son parte fundamental en mi vida y siempre me han brindado su amor y apoyo incondicional. Gracias por todos los momentos que hemos compartidos, tengo una profunda admiración y respeto por cada uno de ustedes.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	5
INTRODUCCIÓN	7
Marco teórico.....	7
Hipótesis.....	22
Objetivos generales.....	22
Objetivos particulares	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Material biológico	23
Extracción de DNA y PCR.....	24
Matriz de datos moleculares.....	32
Análisis de los datos moleculares.....	32
Cortes foliares	33
Matriz de datos morfológicos	33
Análisis combinados y mapeo de caracteres	34
RESULTADOS	37
Caracterización de la matriz concatenada de secuencias	37
Caracterización de las regiones secuenciadas	37
Análisis filogenéticos.....	38
Relaciones filogenéticas en <i>Pinus</i> sección <i>Trifoliae</i>	38
Monofilia de secuencias de cpDNA por especie en la sección <i>Trifoliae</i>	42
Caracterización de los datos morfológicos	44
Mapeo de caracteres foliares.....	44
DISCUSIÓN	47
Marcadores moleculares.....	47
Relaciones filogenéticas en la sección <i>Trifoliae</i>	48
Monofilia de las especies en la sección <i>Trifoliae</i>	50
Conceptos de especies en la sección <i>Trifoliae</i>	52
Subsección <i>Contortae</i>	53

Subsección <i>Ponderosae</i>	53
Subsección <i>Australes</i>	53
<i>Pinus chihuahuana</i> y <i>P. leiophylla</i>	53
<i>Pinus cubensis</i> y <i>P. maestrensis</i>	54
<i>Pinus tecunumanii</i>	55
<i>Pinus georginae</i> y <i>P. luzmariae</i>	55
Rasgos foliares en la sección <i>Trifoliae</i>	56
Intrusiones hipodermales	57
Vaina basal del fascículo	57
Número de canales resiníferos	58
Posición de los canales resiníferos	59
Cristales en el floema	60
CONCLUSIONES	61
LITERATURA CITADA	63

RESUMEN

En sistemática biológica aún persisten diversas cuestiones asociadas con diversidad y filogenia que deben ser exploradas en los diferentes linajes biológicos, tales como ¿Qué es una especie? ¿Cuántas especies existen? ¿Cómo están relacionadas en el árbol de la vida? ¿Cuál ha sido la historia de transformación de sus caracteres? La reconstrucción filogenética a partir de diversas fuentes de datos es crucial para el entendimiento de procesos evolutivos tales como especiación, biogeografía, coevolución, evolución de caracteres, estimados de tiempos de divergencia, entre otros. Con el uso cada vez más común de los datos moleculares, se ha acumulado evidencia de incongruencia filogenética. La incongruencia filogenética a nivel de los organismos puede ser causada por procesos evolutivos tales como hibridación, introgresión o sorteo de linajes; estos procesos evolutivos comúnmente resultan en patrones de especies no monofiléticas. En sistemática existe un renovado interés en la delimitación de especies, por medio de evidencia recuperada a partir de datos tanto morfológicos como moleculares.

En este estudio se utilizan las especies de la sección *Trifoliae* como modelo para abordar problemas persistentes en la clasificación y sistemática del género *Pinus*, tales como la falta de resolución filogenética con base en datos moleculares por debajo del nivel de subsecciones, la documentación de incongruencia filogenética, delimitación de especies y la falta de sinapomorfias morfológicas que caractericen linajes por debajo de subgénero. La reconstrucción filogenética para la sección *Trifoliae* se hizo con base en múltiples individuos por especie (entre 2 y 8) a partir de secuencias de DNA de cinco regiones altamente variables del genoma del plástido: dos espaciadores intergénicos (*trnD-trnY-trnE* y *trnH-psbA*) y secuencias parciales de tres regiones codificantes (*matK*, *rbcL* y *ycf1*). La evolución de once caracteres foliares en la búsqueda de sinapomorfias morfológicas se llevó a cabo a través de mapeo de caracteres sobre filogenias recuperadas a partir de análisis combinados.

Se obtuvieron secuencias para un total de 167 individuos incluyendo el grupo externo *P. thunbergii*. La matriz concatenada tuvo una longitud de 5,250 p.b. y 239 posiciones filogenéticamente informativas. La región codificante *ycf1* presentó la mayor proporción de sitios variables. Las tres subsecciones de la sección *Trifoliae* se recuperan como monofiléticas, la subsección *Contortae* es el grupo hermano de las subsecciones *Austerales* y *Ponderosae*. Se recupera mayor resolución filogenética por debajo del nivel de subsecciones con clados que corresponden de manera parcial a grupos de especies basadas en combinación

de caracteres morfológicos. La hipótesis filogenética recuperada sugiere una inesperada relación de *P. glabra* con *P. attenuata*, *P. muricata* y *P. radiata*. El análisis filogenético de este estudio incorpora por primera vez dos especies de reciente descripción, *P. georginae* y *P. luzmariae*.

Para las especies de las subsecciones *Austerales* y *Contortae* se recuperan linajes de DNA del cloroplasto monofiléticos, parafiléticos o no resueltos en contraste con las especies de la subsección *Ponderosae* donde la presencia de linajes polifiléticos es común, resultado probablemente de la presencia de procesos evolutivos tales como introgresión, hibridación o sorteo de linajes. En cuanto a la delimitación de especies en la sección *Trifoliae* se discute evidencia basada en linajes de cloroplasto sumada a información previa proveniente de otras fuentes para evaluar el estatus específico de *P. chihuahuana*, *P. maestrensis* y *P. tecunumanii*. En cuanto a los caracteres morfológicos, las intrusiones hipodermales que tocan la endodermis, fueron la única sinapomorfia encontrada, la cual caracteriza a dos especies cercanamente relacionadas *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. Por otro lado la vaina del fascículo decidua en *P. leiophylla* y *P. lumholtzii* parece tener orígenes independientes, de acuerdo al esquema de relaciones recuperado en este estudio.

Es necesaria la integración de datos morfológicos y moleculares antes de tener un esquema de relaciones filogenéticas más robusto para las especies del género *Pinus*. Por lo que trabajos futuros de inferencia filogenética en el género deberán integrar caracteres morfológicos y moleculares de fuentes diversas. Las regiones del genoma del cloroplasto usadas en este estudio presentan variación importante a niveles por debajo de subsección por lo que pueden ser apropiadas para aumentar el grado de resolución filogenética en otras subsecciones del género. La documentación de incongruencia filogenética común sugiere precaución cuando se realizan interpretaciones filogenéticas a partir de una sola fuente de evidencia y muestreo de individuos únicos por especie.

Palabras clave: inferencia filogenética, hibridación, introgresión, sorteo de linajes, sinapomorfia, delimitación de especies, *Pinus*, *Trifoliae*.

ABSTRACT

Many questions in systematic biology still remain unanswered. What is a species? How many species are there? How are species related on the tree of life? What has been the history of character transformation? These are questions associated with diversity and phylogeny that are unanswered for most biological lineages. Phylogenetic reconstruction based on different independent data is of main importance as the basis for understanding many diverse evolutionary processes such as speciation, biogeography, coevolution, character evolution, lineage time divergence and others. With more frequent use of molecular data, many different evolutionary processes that cause phylogenetic incongruence have been documented. Phylogenetic incongruence at the individual level is probably due to evolutionary processes like hybridization, introgression or lineage sorting. All these evolutionary processes can result in non monophyletic species lineage patterns. In biological systematics there is a renewed interest in species delimitation, ideally based upon both morphological and molecular data.

Phylogenetic relationships were inferred for multiple accessions (2-8 individuals) of all widely recognized species classified in *Pinus* section *Trifoliae* using five cpDNA regions: two intergenic spacers (*trnD-trnY-trnE* and *trnH-psbA*) and partial sequences of three coding regions (*matK*, *rbcL*, and *ycf1*). In this study, species of section *Trifoliae* were used as a model for studying persistent problems in the classification and systematics of the genus, such as lack of phylogenetic resolution within subsections when using molecular data, phylogenetic incongruence, species delimitation, and the lack of morphological synapomorphies below the level of subgenus.

Sequences were obtained for a total of 167 individuals including the outgroup *P. thunbergii*. The concatenated molecular matrix was 5,250 b.p. in length and included 239 phylogenetically informative characters. A high proportion of variable sites was present in the coding region *ycf1*. All three subsections were recovered as monophyletic with subsection *Contortae* recovered as sister to subsections *Austroales* and *Ponderosae*. Compared with previous molecular phylogenetic studies, more resolution was recovered below the subsectional level, with clades partially corresponding with previously recognized groups based on combinations of morphological characters, but interspecific relationships were only partially resolved. Chloroplast sequences of *P. glabra* are

unexpectedly related to those of *P. attenuata*, *P. muricata*, and *P. radiata*. Two recently described species, *P. georginae* and *P. luzmariae*, are included in a phylogenetic analysis for the first time.

Chloroplast DNA lineages were recovered as monophyletic, paraphyletic or unresolved for species in subsections *Contortae* and *Australes*, while in subsection *Ponderosae* DNA lineage polyphyly is common, probably due to evolutionary processes such as hybridization, introgression, or lineage sorting. Species delimitation for *P. chihuahuana*, *P. maestrensis* and *P. tecunumanii* in subsection *Australes* is discussed in light of molecular and previously reported morphological data in order to evaluate their specific status. One morphological character; hypodermal intrusions touching the endodermis, is the only morphological synapomorphy found. It characterized two closely related species, *P. douglasiana* and *P. maximinoi*. The deciduous fascicle sheath in *P. leiophylla* and *P. lumholtzii* is inferred to have independent origins based on the relationships recovered with chloroplast DNA.

Future phylogenetic studies of *Pinus* species should integrate independent morphological and molecular data. The chloroplast genome regions sequenced in this study have a high proportion of phylogenetically informative variation, and could be successfully applied for phylogenetic inference in other *Pinus* subsections where lack of resolution persists. Common phylogenetic incongruence at the organismal level suggests caution when relying on phylogenies based on single molecular sources and single species accessions.

Key words: Phylogenetic inference, hybridization, introgression, lineage sorting, sinapomorphy, species delimitation, *Pinus*, *Trifoliae*.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de relaciones filogenéticas para el género *Pinus*, basado en análisis filogenéticos de secuencias de DNA tanto del genoma del núcleo como del genoma del cloroplasto.

Figura 2. Hipótesis filogenética para las especies de la sección *Trifoliae*, con base en secuencias de las regiones *matK* y *rbcL* del genoma del cloroplasto. Tomado de Gernandt *et al.* (2005).

Figura 3. Genoma del cloroplasto de *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et al.*, 1994). En el círculo interior se muestran en color azul las regiones secuenciadas en este estudio.

Figura 4. Corte transversal de una acícula de *Pinus durangensis* (RG540, 10×). a) Epidermis b) Hipodermis c) Estoma d) Mesofilo e) Canales resiníferos f) Endodermis g) Tejido de transfusión h) Esclerenquima i) Xilema y j) Floema. Tejido dermal: a-c; Tejido del mesófilo: d, e; Tejido vascular: f-j.

Figura 5. Puntos de colecta para las especies de *Pinus* sección *Trifoliae* incluidas en este estudio. Para aquellas muestras que no contaban con georreferencia, esta fue calculada a partir de la información de la localidad de colecta por medio de sistemas de información geográfica. Doce de 175 muestras son de origen desconocido o provienen de instituciones de genética forestal por lo cual no cuentan con georreferencia o datos de colecta y no han sido tomadas en cuenta para la elaboración de este mapa (ver Tabla 2).

Figura 6. Caracteres y estados de carácter para los once rasgos foliares evaluados en *Pinus* sección *Trifoliae*. **1. Número de acículas por fascículo** (1) Tres a y b; **2. Vaina basal del fascículo** (0) Persistente a, (1) Decidua b; **3. Espesor de las paredes de las células de la hipodermis** (0) Uniformes c, (1) Biformes d, (2) Multiformes e; **4. Intrusiones hipodermiales** (0) Presentes g y h, (1) Ausentes f; **5. Número de canales resiníferos** (0) cero i, (1) uno k, (3) tres m, (4) cuatro j, (8) catorce l; **6. Posición de los canales resiníferos** (0) Externa j, (1) Interna m, (2) Media l, (3) Septal k. **7. Paredes de las células de la endodermis** (0) Uniformemente engrosadas o, (1) Externamente engrosadas n y p; **8. Haces vasculares** (0) Separados n, (1) Conados o, (2) Fusionados p; **9. Esclerenquima en la región vascular** (0) Presente u, (1) Ausente t; **10. Cristales en el floema** (0) Presentes q y r, (1) Ausentes s; **11. Intrusiones hipodermiales** (0) En el mesofilo g, (1) En el mesofilo tocando la endodermis h. **(a)** *P. ponderosae* DSG1177, **(b)** *P. chihuahuana* DSG926, **(c y m)** *P. herrerae* SHL12, **(d)** *P. jaliscana* SHL10, **(e)** *P. nubicola* DSG903, **(f)** *P. montezumae* DSG885, **(g)** *P. durangensis* RG540, **(h e i)** *P. maximinoi* JAPR1970, **(j)** *P. georginae* SHL07, **(k)** *P. praetermissa* DSG454, **(l)** *P. attenuata* DSG980, **(n q y r)** *P. contorta* DSG953, **(o)** *P. lumholtzii* DSG937, **(p)** *P. georginae* SHL05, **(s)** *P. cooperi* DSG929, **(t)** *P. hartwegii* DSG907, **(u)** *P. attenuata* DSG980.

Figura 7. Consenso estricto para las especies de la sección *Trifoliae*, con énfasis en los taxones terminales de las subsecciones *Contortae* y *Ponderosae*. El grupo externo a la sección *Trifoliae* es *Pinus thunbergii* de la sección *Pinus*, subgénero *Pinus*. Consenso estricto de 6,351 árboles más parsimoniosos, con una longitud de 576 pasos, IC= 0.807, ICexc= 0.706 e IR= 0.973. Los valores de bootstrap basados en 10,000 réplicas se muestran en la parte superior de la rama cercana a los nodos y en la parte inferior los valores de decaimiento. Del lado derecho del cladograma se indican las principales agrupaciones. Los asteriscos indican especies recuperadas como monofiléticas.

Figura 8. Consenso estricto para las especies de la sección *Trifoliae*, con énfasis en los taxones terminales de la subsección *Austroales*. El grupo externo a la sección *Trifoliae* es *Pinus thunbergii* de la sección *Pinus*, subgénero *Pinus*. Consenso estricto de 6,351 árboles más parsimoniosos, con una longitud de 576 pasos, IC= 0.807, ICexc= 0.706 e IR= 0.973. Los valores de bootstrap basados en 10,000 réplicas se muestran en la parte superior de la rama cercana a los nodos y en la parte inferior los valores de decaimiento. Del lado derecho del cladograma se indican las principales agrupaciones. Los asteriscos indican especies recuperadas como monofiléticas.

Figura 9. Caracteres mapeados en el consenso de dos árboles más parsimoniosos obtenidos de la búsqueda heurística. El número en cada cladograma indica el carácter y el color sus estados. **1. Número de acículas por fascículo** (*) Dos (*) Tres (*) Cuatro (*) Cinco; **2. Vaina basal del fascículo** (*) Persistente (*) Decidua; **3. Espesor de las paredes de las células de la hipodermis** (*) Uniformes (*) Biformes (*) Multiformes; **4. Intrusiones hipodermes** (*) Presentes (*) Ausentes; **5. Número de canales resiníferos** (*) Cero (*) Uno (*) Dos (*) Tres (*) Cuatro (*) Seis (*) Siete (*) Ocho (*) Catorce; **6. Posición de los canales resiníferos** (*) Externa (*) Interna (*) Media (*) Septal; **7. Paredes de las células de la endodermis** (*) Uniformemente engrosadas (*) Externamente engrosadas; **8. Haces vasculares** (*) Separados (*) Conados (*) Fusionados; **9. Esclerenquima en la región vascular** (*) Presente (*) Ausente; **10. Cristales en el floema** (*) Presentes (*) Ausentes; **11. Intrusiones hipodermes** (*) En el mesofilo (*) En el mesofilo tocando la endodermis. (*) Representa ambigüedad.

Tabla 1. Clasificación de *Pinus* sección *Trifoliae* o “New World *Diploxylon* Pines” de acuerdo con Price *et al.* (1998).

Tabla 2. Datos de colecta de las muestras en este estudio. Se indica la especie, el número de colecta, localidad, georreferencia. Los datos faltantes de localidad de colecta o georreferencia se indican con un asterisco.

Tabla 3. Regiones del genoma del cloroplasto amplificadas en este estudio. Los nombres de los primers están dados por su posición en el genoma del cloroplasto de *Pinus thunbergii*. La secuencia de cada primer se encuentra en el sentido 5' a 3'. Se indica la fuente de publicación de cada uno de los primers.

Tabla 4. Caracterización de cada una de las regiones secuenciadas en este estudio. El número de secuencias, la longitud por región, el contenido de G+C, el número de caracteres variables y caracteres informativos fueron calculados con PAUP*.

Tabla 5. Sumario de los patrones intraespecíficos de DNA del plástido que afectan la monofilia alélica y la identificación de especies. La monofilia haplotípica fue determinada a partir de un árbol más parsimonioso de la búsqueda heurística. Se considera que las especies son diagnósticables si todos los individuos muestreados difieren del resto de las especies por al menos la sustitución de un nucleótido.

INTRODUCCIÓN

Marco teórico

La sistemática biológica juega un papel central en las ciencias de la biodiversidad; sus cuatro áreas principales: diversidad, filogenia, biogeografía y clasificación, constituyen la base para el resto de las disciplinas biológicas (Cracraft, 2002). De acuerdo con Cracraft (2002), existen cuestiones fundamentales en la sistemática biológica que pueden clasificarse de acuerdo a cada una de las cuatro áreas, por ejemplo en el área de diversidad existen cuestiones tales como ¿qué es una especie? ¿cuántas especies existen?, mientras en el área de filogenia las cuestiones son ¿cómo es el árbol de la vida? y ¿cuál ha sido la historia de la transformación de los caracteres? Dichas cuestiones por lo tanto tienen que ver con las especies y cómo éstas están relacionadas en el árbol de la vida.

En inferencia filogenética se recuperan hipótesis de relaciones de parentesco entre linajes, expresadas gráficamente por medio de cladogramas o árboles filogenéticos (Schuh, 2000). Un árbol filogenético teóricamente representa una escala relativa de tiempo y un patrón evolutivo de descendencia (Simpson, 2006). Conocer la filogenia de un grupo, en la forma de un árbol filogenético puede ser visto como un resultado final por sí mismo, pero también puede ser la base para abordar diversas cuestiones de interés biológico en los linajes, tales como su clasificación, historia biogeográfica o ecológica, procesos de especiación, integración del registro fósil en la estimación del marco temporal de los linajes, conocimiento de la historia de transformación de los caracteres y la delimitación de especies, entre otros (Cracraft, 2002; De Salle, 2005).

Tradicionalmente se han empleado atributos o caracteres morfológicos y más recientemente caracteres moleculares como la base para llevar a cabo análisis filogenéticos. Con el aumento en el uso de caracteres moleculares se ha acumulado evidencia que sugiere la existencia de incongruencia filogenética de manera común, por lo que también ha disminuido la confianza en hipótesis filogenéticas recuperadas a partir de secuencias de DNA de regiones o genes particulares (Wendel y Doyle, 1998).

La filogenia desde una perspectiva molecular está compuesta por todos los árboles de las regiones o genes, por lo cual el árbol de las especies puede ser visto como una distribución estadística o una nube de historias de genes. Los árboles de los genes, por lo tanto pudieran o no corresponder con los árboles de las especies (Maddison, 1997).

La incongruencia filogenética puede ser resultado de procesos evolutivos que operan a diferentes niveles. Existen procesos evolutivos que causan incongruencia filogenética a nivel de los organismos, genomas, genes; incluso algunas fallas técnicas pueden resultar en falsa evidencia de incongruencia filogenética. La incongruencia entre árboles de genes y árboles de especies es causada por procesos evolutivos que operan a nivel de individuos tales como: evolución morfológica rápida o convergencia, diversificación rápida, hibridación e introgresión, sorteo de linajes o transferencia horizontal (Maddison, 1997; Wendel y Doyle, 1998).

La hibridación e introgresión son dos procesos evolutivos comunes en plantas que causan incongruencia filogenética, la hibridación es el intercambio genético interespecífico reciente, mientras que la introgresión en el sentido filogenético es el intercambio genético interespecífico ancestral, por lo que es posible recuperar evidencia de eventos de hibridación reciente o ancestral a través de la reconstrucción filogenética de un grupo (Wendel y Doyle, 1998). La hibridación o introgresión resulta en especies no monofiléticas, en aquellos casos en los que las muestras han sido taxonómicamente bien determinadas. Sin embargo, existe otro proceso evolutivo causante de incongruencia filogenética que opera en el mismo nivel y que resulta en patrones similares a los de la hibridación e introgresión: el sorteo de linajes (Maddison, 1997; Wendel y Doyle, 1998).

El sorteo de linajes es un proceso evolutivo que causa incongruencia filogenética y que resulta en patrones de especies no monofiléticas (Por ejemplo Syring *et al.*, 2007; Gernandt *et al.*, 2009; Willyard *et al.*, 2009). Este proceso está asociado con grupos que se han diversificado en periodos de tiempo relativamente cortos, requiere la existencia de polimorfismo ancestral, el cual es heredado a los diferentes linajes de manera aleatoria (Maddison, 1997; Wendel y Doyle, 1998). Debido a que el polimorfismo ancestral es heredado al azar, los haplotipos compartidos entre diferentes linajes no reflejan relaciones filogenéticas (Wendel y Doyle, 1998). Por lo tanto, al igual que en la hibridación e introgresión en casos donde ha ocurrido sorteo de linajes, es posible detectar más de un haplotipo de manera intraespecífica cuando se incluyen múltiples individuos por especie.

En general es difícil discriminar entre la hibridación e introgresión y el sorteo de linajes como causantes de incongruencia filogenética debido a que resultan en patrones similares; sin embargo, es posible sugerir cual de estos dos procesos evolutivos es más

probable cuando se considera información auxiliar u otras fuentes de datos (Wendel y Doyle, 1998). En general la presencia de incongruencia filogenética a nivel específico causa linajes de genes no monofiléticos, específicamente polifiléticos, en los árboles de genes; por lo cual las especies recuperadas como monofiléticas o parafiléticas en análisis filogenéticos moleculares deben ser consideradas como evidencia de linajes evolutivos independientes (Brower, 1999; De Salle, 2005; De Queiroz, 2007). Por lo tanto la monofilia o parafilia de las especies puede ser considerada como evidencia de la ausencia de procesos evolutivos causantes de incongruencia filogenética entre las especies.

Finalmente cuando se trata de estimar la causa de incongruencia filogenética es útil adoptar un enfoque holístico (Wendel y Doyle, 1998), en el que idealmente la reconstrucción filogenética debe llevarse a cabo a partir de fuentes independientes de caracteres, mediante análisis filogenéticos combinados (Nixon y Carpenter, 1996).

Los análisis filogenéticos combinados incorporan evidencia proveniente de fuentes de datos independientes; por lo tanto este tipo de análisis permite llevar a cabo reconstrucciones filogenéticas altamente corroboradas y con un gran valor explicativo (Farris, 1983). La combinación de caracteres que provienen de fuentes de evidencia independientes aun está en debate; sin embargo, algunos autores sugieren que combinar en un análisis global diferentes grupos de datos es la forma más adecuada para llevar a cabo análisis filogenéticos, ya que los análisis combinados maximizan el criterio de parsimonia cladística en comparación con análisis separados (Nixon y Carpenter, 1996). Los análisis simultáneos pueden permitir que surgan señales secundarias a la vez que miden la fuerza de la evidencia que soporta resultados contradictorios. Las hipótesis filogenéticas basadas en diversas líneas de evidencia independiente por lo tanto presentan altos niveles de corroboración y un alto grado de poder explicativo (Nixon y Carpenter, 1996).

Otra de las cuestiones fundamentales en la sistemática filogenética tiene que ver con ¿cuántas especies existen? en este caso se requiere de un marco teórico así como de métodos prácticos para la delimitación de especies. En sistemática existe literatura extensiva en cuanto a la teoría y metodología de inferencia filogenética y teoría de conceptos de especies, pero existe muy poca literatura en cuanto a los métodos para la delimitación de especies (Sites y Marshall, 2003). Recientemente ha resurgido el interés

en la delimitación de especies y algunos métodos novedosos han sido propuestos en los últimos años para evaluar los límites de las especies en un marco teórico estadístico riguroso; desde una perspectiva amplia de la teoría evolutiva, la delimitación de las especies es importante para entender muchos mecanismos y procesos evolutivos (Sites y Marshall, 2003). Existen dos tipos de métodos para inferir los límites de las especies: los basados en árboles y los basados en caracteres.

Entre los métodos basados en árboles se encuentran la agregación cladística de haplotipos (Brower, 1999), el criterio de exclusividad (Baum y Shaw, 1995), la genealogía DNA/morfología (Wiens y Penkrot, 2002) y la prueba de cohesión de Templeton (Templeton, 1998, 2001). Los métodos anteriores, con excepción del criterio de exclusividad de Baum y Shaw (1995) pueden ser ajustados con análisis filogenéticos que incluyan múltiples individuos por especie (revisadas por Sites y Marshall, 2003).

La delimitación de especies y la reconstrucción filogenética llevadas a cabo de manera adecuada, permiten abordar otra de las cuestiones fundamentales en la sistemática biológica, ¿cuál ha sido la historia de la transformación de los caracteres?. Conocer la historia de transformación de los caracteres y explorar la existencia de caracteres derivados compartidos o sinapomorfias que caractericen linajes específicos y supraespecíficos es de gran importancia para fines de clasificación. Por lo tanto análisis filogenéticos combinados que incorporen diversas fuentes de caracteres independientes, con individuos múltiples de especies delimitadas de manera adecuada, con sinapomorfias morfológicas que caractericen linajes específicos y supraespecíficos; permitirán el desarrollo de esquemas de clasificación naturales basados en filogenia con altos niveles de corroboración y estabilidad, que sirvan de base para el resto de las disciplinas biológicas. Por ejemplo para el género *Pinus* existen esquemas de filogenia y clasificación que en ocasiones son un tanto contradictorios y el número de especies reconocidas por diferentes autores es variable lo que sugiere que es necesaria una reevaluación de la filogenia, la clasificación y la delimitación de las especies en el género.

El género *Pinus* ha sido sujeto de diversas clasificaciones, generalmente conflictivas sobre todo por debajo del nivel de subgénero. Uno de los esquemas de clasificación con mayor influencia ha sido el de Little y Critchfield (1969) basado principalmente en estudios de entrecruzamiento interespecífico. Price *et al.* (1998) hacen

una revisión histórica de las clasificaciones para el género. La compleja historia nomenclatural del género refleja cambios en el tiempo, tanto en las convenciones y reglas para asignar nombres y rangos a los taxones, como en el grado de énfasis puesto en tipos particulares de caracteres y en corrientes filosóficas de clasificación.

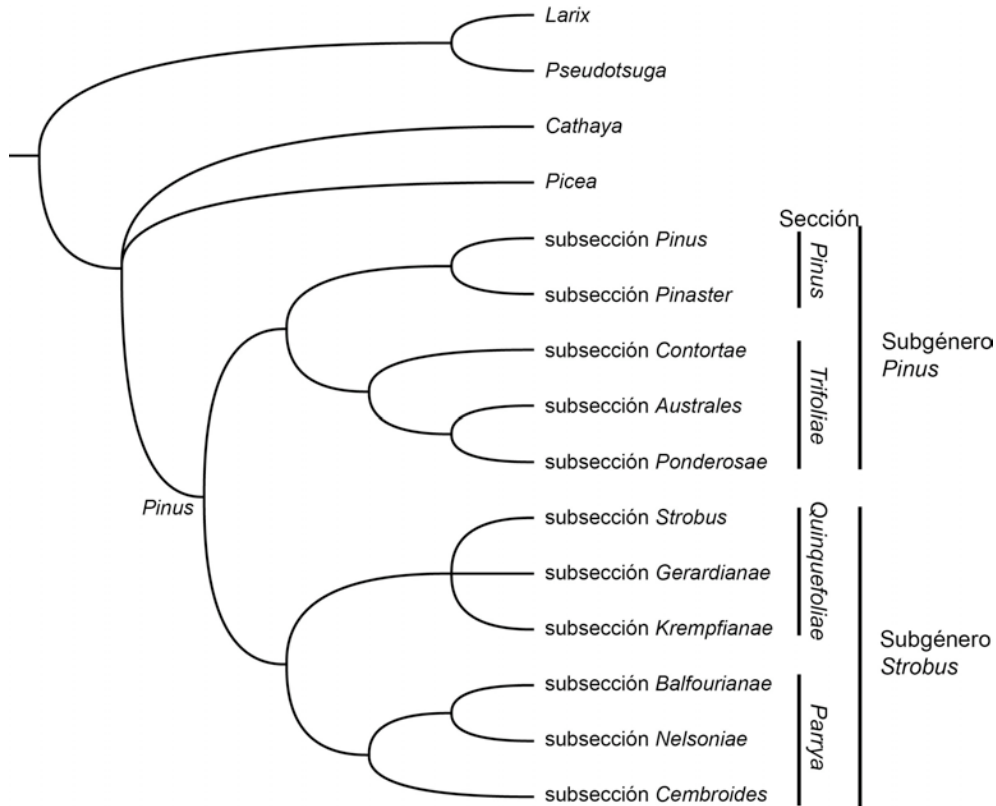


Figura 1. Esquema de relaciones filogenéticas para el género *Pinus*, basado en análisis filogenéticos de secuencias de DNA tanto del genoma del núcleo como del genoma del cloroplasto.

Las clasificaciones más antiguas para el género usualmente fueron artificiales, enfatizando solo un número muy pequeño de caracteres morfológicos, mientras que clasificaciones después de la última parte del siglo XIX, tratan de integrar diferentes tipos de datos; desde caracteres morfológicos y anatómicos, vegetativos y reproductivos y más recientemente de química de productos secundarios, entrecruzamiento y comparaciones macromoleculares (Price *et al.*, 1998). Las aproximadamente 111 especies del género *Pinus* están clasificadas en dos subgéneros, cuatro secciones (Price *et al.*, 1998) y 11 subsecciones (Gernandt *et al.*, 2005; Figura 1). El esquema de relaciones de los linajes principales por encima del nivel de subsección en el género presentados en la figura 1 ha

sido recuperado de manera consistente en estudios filogenéticos basados en caracteres moleculares tanto del genoma del núcleo como del cloroplasto (Gernandt *et al.*, 2005; Syring *et al.*, 2007; Willyard *et al.*, 2007; Parks *et al.*, 2009).

El género *Pinus* probablemente surgió durante el Cretácico temprano (Millar, 1998) y la divergencia entre los dos subgéneros *Pinus* y *Strobus* ocurrió entre el Cretácico Tardío (Millar, 1998) y el Eoceno Medio (Miller, 1985). Las especies de este género son plantas leñosas usualmente árboles y en ocasiones arbustos que se caracterizan principalmente por presentar dimorfismo de brotes extremo, con presencia de brotes largos ramificados y brotes cortos foliares (Farjon y Styles, 1997; 2005).

En las regiones axilares de los catáfilos u hojas escamosas, se encuentran los brotes cortos que dan origen a las hojas aciculares arregladas en fascículos (Mirov, 1967; Farjon y Styles, 1997, Farjon, 2005). Los fascículos están formados comúnmente por 1, 2, 3, 5 u 8 hojas aciculares rodeadas por escamas foliares imbricadas, más delgadas que los catáfilos. En estado maduro las escamas foliares se fusionan para formar una vaina que envuelve de forma ajustada la base de las acículas de cada brote foliar. Esta vaina puede ser persistente manteniendo las acículas unidas aun cuando caen los fascículos de hojas, mientras que en otras ocasiones la vaina puede ser decidua y las acículas pueden caer separadas de la vaina (Farjon, 2005). La mayoría de los pinos mudan los brotes foliares después de pocas estaciones, pero existen especies donde persisten entre 10 y 20 años. Los brotes foliares no crecen después de alcanzar su estado maduro ni producen más de un solo grupo de acículas (Farjon, 2005).

El género *Pinus* es monoico; los órganos reproductivos femeninos y masculinos se encuentran apartados y surgen de brotes axilares separados. Los conos masculinos o polínicos son estructuras pequeñas, débiles, ligeras y efímeras, formadas por una gran cantidad de microsporofilos arreglados helicilmente, con forma ovoide-oblonga a cilíndrica y de solo unos centímetros de largo (Shaw, 1914). En general el cono polínico es menos diverso en la familia Pinaceae en comparación con el cono ovulado. Los conos polínicos raramente han recibido atención en las descripciones taxonómicas, debido principalmente a la ausencia de diferencias interespecíficas (Farjon y Styles, 1997).

Los conos femeninos u ovulados son las estructuras más características del género *Pinus*; su tamaño, estructura y simetría son altamente variables entre especies y

ocasionalmente variables de manera intraespecífica (Farjon y Styles, 1997). Los conos ovulados se encuentran sujetos a las ramas mediante un pedúnculo, y pueden ser persistentes o deciduos, abrir tempranamente o ser seróticos en la madurez. Los conos ovulados maduros presentan escamas leñosas con arreglo en espiral, las cuales tienen dos estructuras especializadas denominadas apófisis y umbo, esta última puede presentar una espina. Cada escama regularmente contiene dos semillas que pueden presentar alas, ya sea articuladas o adnadas (Farjon y Styles, 1997; Farjon, 2005).

Los pinos se encuentran distribuidos de manera natural en el hemisferio norte, desde las regiones ártica y subártica de Norteamérica y Eurasia hacia el sur en regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica y Asia, con una especie (*Pinus merkusii*) distribuida al sur del Ecuador en Sumatra (Mirov, 1967). El mayor centro de diversidad de especies se encuentra en Norte y Centroamérica y el Este de Asia, con concentraciones particulares en México, California, el sureste de los EUA y China (Farjon y Styles, 1997; Price *et al.*, 1998).

Las especies del género *Pinus* son componentes importantes y usualmente dominantes en bosques boreales, bosques templados y ambientes semiáridos, que juegan un papel significativo en la determinación del clima tanto a nivel regional como global (Richardson y Rundel, 1998). Los pinos afectan procesos biogeoquímicos, regímenes de incendios e hidrológicos y proveen comida y hábitats para diversas especies de animales (Richardson y Rundel, 1998). Algunas especies han sido cultivadas dentro y fuera de su área de distribución natural (por ejemplo, *Pinus caribaea*, *P. radiata*, *P. patula* y *P. pinaster*) y son la base de empresas forestales en muchos países del hemisferio sur, ya que son fuente importante de madera, pulpa, semillas y resinas, entre otros productos (Le Maitre, 1998). “Sin duda *Pinus* es el género de árboles más importante en el mundo tanto económica como ecológicamente” (Richardson y Rundel, 1998).

Dentro del género *Pinus* las especies de la sección *Trifoliae* se encuentran ampliamente distribuidas en América desde Canadá hasta Nicaragua y la región del Caribe. Las especies de esta sección poseen dos, tres o cinco (menos común seis u ocho) acículas por fascículo. En corte transversal, las acículas presentan dos haces vasculares, canales resiníferos comúnmente internos y medios y raramente septales o externos. La longitud de las acículas en la sección es típicamente de media a larga (6-40 cm), en la

mayoría de las especies la vaina de los fascículos es persistente, aunque en esta sección se encuentran las tres únicas especies del subgénero con vainas de los fascículos deciduas (*Pinus chihuahuana*, *P. leiophylla* y *P. lumholtzii*).

Los conos ovulados son comúnmente de tamaño medio a grande (5 x 3.5 x 20 cm); presentan escamas leñosas gruesas con el umbo en la parte dorsal y presencia variable de espina; pueden estar abiertos o cerrados cuando son maduros y la serotinia puede ocurrir en varias especies. El ala de la semilla suele estar articulada por medio de dos pinzas (Farjon, 2005; Gernandt *et al.*, 2005).

La sección *Trifoliae* Duhamel o “New World *Diploxylon* pines” (*Pinus*, Pinaceae) está clasificada en el subgénero *Pinus* (Figura 1). En esta sección están clasificados todos los pinos duros de America del Norte excepto *P. resinosa* y *P. tropicalis* (Gernandt *et al.*, 2005). Sus aproximadamente 47 especies (Price *et al.*, 1998) están clasificadas en tres subsecciones: *Australes* (26 especies), *Contortae* (4 especies) y *Ponderosae* (17 especies; Figuras 1 y 2, Tabla 1). Price *et al.* (1998) con base en una revisión de los esquemas de clasificación en el género proponen algunos grupos de especies por debajo del nivel de subsección (Tabla 1)

Tabla 1. Clasificación de *Pinus* sección *Trifoliae* o “New World *Diploxylon* Pines” de acuerdo con Price *et al.* (1998).

Sección <i>Trifoliae</i> “New World <i>Diploxylon</i> Pines”
Subsección <i>Contortae</i> Little y Critchfield (América del Norte)
<i>P. banksiana</i> Lambert
<i>P. clausa</i> (Chapman ex Engelmann) Sargent
<i>P. contorta</i> Douglas ex Loudon
<i>P. virginiana</i> Miller
Subsección <i>Australes</i> Loudon (este de los EUA, región del Caribe y América Central)
<i>P. caribaea</i> Morelet
<i>P. cubensis</i> Grisebach
<i>P. echinata</i> Miller
<i>P. elliottii</i> Engelmann
<i>P. glabra</i> Walter
<i>P. occidentalis</i> Swartz
<i>P. palustris</i> Miller
<i>P. pungens</i> Lambert
<i>P. rigida</i> Miller
<i>P. serotina</i> Michaux

P. taeda Linnaeus

Subsección *Ponderosae* Loudon (oeste de América del Norte, al sur de América Central)

P. cooperi Blanco

P. durangensis Martínez

P. engelmannii Carrière

P. jeffreyi Balfour

P. ponderosa Douglas ex P. y C. Lawson

P. washoensis Mason y Stockwell

Grupo *Montezumae*

P. devoniana Lindley

P. donnell-smithii Masters

P. hartwegii Lindley

P. montezumae Lambert

Grupo *Pseudostrobus*

P. douglasiana Martínez

P. maximinoi Moore

P. nubicola Perry

P. pseudostrobus Lindley

Grupo *Sabinianae*

P. coulteri D. Don

P. sabiniana Douglas ex D. Don

P. torreyana Parry ex Carrière

Subsección *Attenuatae* Van der Burgh (oeste de los EUA y México)

P. attenuata Lemmon

P. muricata D. Don

P. radiata D. Don

Subsección *Oocarpae* Little y Critchfield (México, sur de América Central)

Grupo *Oocarpa*

P. greggii Engelmann ex Parlato

P. jaliscana Perez de la Rosa

P. oocarpa Schiede ex Schlechtendal

P. patula Schiede y Deppe ex Schlechtendal y Chamisso

P. praetermissa Styles y McVaugh

P. pringlei Shaw

P. tecunumanii Eguiluz y Perry

Grupo *Teocote*

P. herrerae Martínez

P. lawsonii Roetzl ex Gordon

P. teocote Schiede y Deppe ex Schlechtendal y Chamisso

Subsección *Leiophyllae* Loudon (México y suroeste de los EUA)

P. leiophylla Schiede y Deppe

P. lumholtzii Robinson y Fernald

Un estimado del tiempo de divergencia de los principales linajes del género *Pinus* sugiere que las subsecciones *Australes*, *Contortae* y *Ponderosae* (sección *Trifoliae*) divergieron de su último ancestro común hace 9-18 millones de años (Willyard *et al.*, 2007).

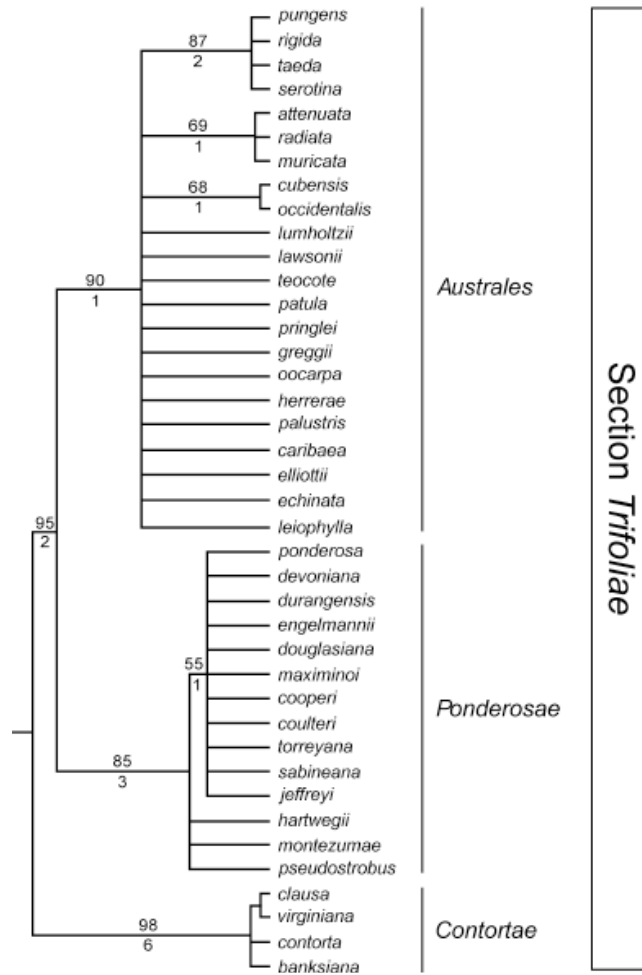


Figura 2. Hipótesis filogenética para las especies de la sección *Trifoliae*, con base en secuencias de las regiones *matK* y *rbcL* del genoma del cloroplasto. Tomado de Gernandt *et al.* (2005).

A pesar de la gran atención puesta en la clasificación y sistemática del género, aún quedan muchas cuestiones por resolver tales como:

1) La falta de resolución filogenética con base en datos moleculares por debajo del nivel de subsecciones. En el género es persistente la falta de resolución filogenética

que limita nuestro conocimiento de las relaciones interespecíficas por debajo del nivel de subsecciones (con excepción de Gernandt *et al.*, 2003).

2) Incongruencia filogenética. La incongruencia filogenética también ha sido reportada en el género *Pinus*. Por ejemplo, existen diferentes esquemas de relaciones para las subsecciones de la sección *Trifoliae* cuando se utilizan marcadores del cloroplasto (Krupkin *et al.*, 1996; Geada Lopez *et al.*, 2002; Gernandt *et al.*, 2005) o del núcleo (Liston *et al.*, 1999; Syring *et al.*, 2007) y la presencia de no monofilia a nivel de especies en el género es común, causada probablemente por procesos evolutivos tales como sorteo de linajes, introgresión o hibridación (Liston *et al.*, 2007; Syring *et al.*, 2007; Gernandt *et al.*, 2005; Gernandt *et al.*, 2009, Willyard *et al.*, 2009).

3) Delimitación adecuada de especies. El número de especies reconocidas para el género es variable de acuerdo a diferentes autores. Por ejemplo Price *et al.*, (1998) reconocen 111 especies, Farjon (2005), 109 especies y Eckenwalder (2009), 97 especies por lo que es necesaria una adecuada delimitación de especies que incorpore evidencia de fuentes independientes de caracteres, con la finalidad de generar un acuerdo en el número de especies clasificadas en el género (Price *et al.*, 1998; Gernandt *et al.*, 2005).

4) Se desconocen sinapomorfias morfológicas por debajo del nivel de subgénero. Las hipótesis filogenéticas moleculares recientes para el género *Pinus* recuperan de manera consistente linajes equivalentes a subgéneros, secciones y subsecciones con valores altos de soporte; sin embargo, los linajes por debajo del nivel de subgénero aún carecen de sinapomorfias morfológicas, por lo que la mayoría de los grupos se encuentran definidos con base en combinación de caracteres morfológicos que suelen ser altamente homoplásticos (con excepción de la subsección *Strobus* donde la posición del umbo es terminal; Gernandt *et al.*, 2005).

En este estudio se utilizan secuencias del genoma del cloroplasto o plastidio como fuente de caracteres moleculares. El genoma del cloroplasto es una importante fuente de caracteres moleculares y ha sido ampliamente usado en análisis filogenéticos del género (Krupkin *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Geada-Lopez *et al.*, 2002; Gernandt *et al.*, 2005; Syring *et al.*, 2007; Parks *et al.*, 2009). Una de las ventajas del genoma del cloroplasto para la reconstrucción filogenética es que los genes en el cloroplasto tienen pocas copias y el genoma total es de tamaño pequeño (Soltis y Soltis, 1998). En *Pinus* es de

aproximadamente de 120,000 p.b., el genoma de *P. thunbergii* tiene 4 genes de rRNA y 32 genes de tRNA, así como 61 genes codificantes de proteínas y 11 marcos de lectura abiertos conservados; en comparación con otros grupos de plantas, el genoma del cloroplasto en *Pinus* presenta numerosos rearrreglos (Wakasugi *et al.*, 1994; Figura 3).

Se considera que la evolución y estructura del genoma del cloroplasto es conservativa; su estructura cambia lentamente a nivel de nucleótidos. Sin embargo, diferentes porciones del genoma del cloroplasto presentan diferentes tasas de cambio, lo que potencialmente permitirá resolver relaciones filogenéticas, a niveles de especies, géneros, familias e incluso niveles superiores (Soltis y Soltis, 1998). Por lo tanto el DNA del cloroplasto representa un recurso primario de información para estudios de sistemática molecular en plantas (Shaw *et al.*, 2005), que continúa siendo explorado por medio de secuenciación de regiones parciales variables (Gernandt *et al.*, 2005; 2009; Syring *et al.*, 2007) o secuenciación de genomas completos (Parks *et al.*, 2009) dentro del género *Pinus* y ha probado ser útil para proporcionar un marco filogenético inicial a partir del cual se infiere la monofilia de grupos reconocidos en clasificaciones previas (Gernandt *et al.*, 2005). Sin embargo, debido a su herencia vía paterna en coníferas (Mogensen, 1996), su historia puede diferir de aquella de las especies en casos en los que ha ocurrido hibridación (Price *et al.*, 1998).

A partir de dos estudios recientes, cuatro regiones del genoma del cloroplasto, dos espaciadores *chlN-ycf1*, *trnD-trnY-trnE* y dos regiones parciales de la región codificante *ycf1* (amplicón A y amplicón B) han probado ser informativas entre especies estrechamente relacionadas de la subsección *Ponderosae* (Hernández-León, 2007; Gernandt *et al.*, 2009; F. Vázquez-Vera datos inéditos). Es necesario evaluar si estas regiones proporcionan mayores grados de resolución filogenética en otras subsecciones del género *Pinus*, así como confirmar si son más informativas que *matK* y *rbcL* en otros grupos de plantas.

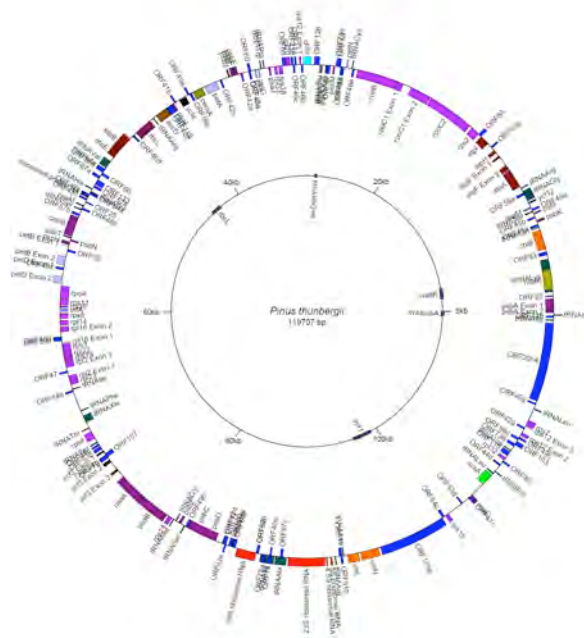


Figura 3. Genoma del cloroplasto de *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et al.*, 1994). En el círculo interior se muestran en color azul las regiones secuenciadas en este estudio.

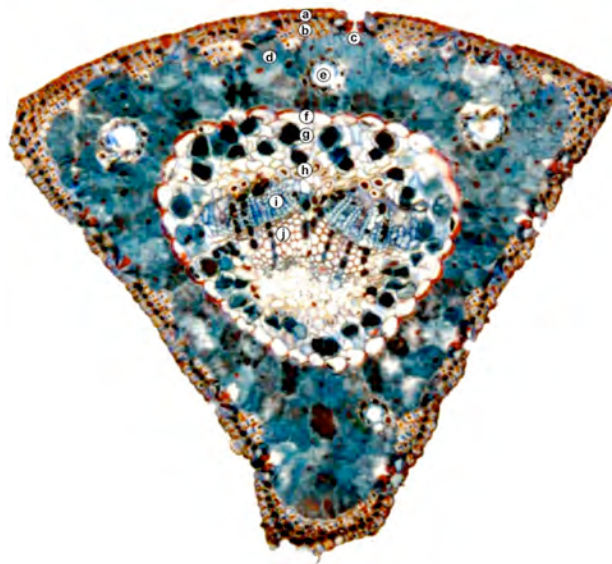


Figura 4. Corte transversal de una acícula de *Pinus durangensis* (RG540, 10×). a) Epidermis b) Hipodermis c) Estoma d) Mesofilo e) Canales resiníferos f) Endodermis g) Tejido de transfusión h) Esclerénquima i) Xilema y j) Floema. Tejido dermal: a-c; Tejido del mesófilo: d, e; Tejido vascular: f-j.

Se ha demostrado también el éxito de dos regiones del genoma del cloroplasto (*matK* y *rbcL*; CBOLD Plant Working Group, 2009) en la discriminación de especies de angiospermas (código de barras genético). Sin embargo es importante verificar su eficacia para la identificación de especies en el resto de los grupos de plantas (Kress y Erickson, 2007).

Diversos rasgos morfológicos han sido utilizados con fines de clasificación en el género. Aunque no se ha publicado ningún análisis filogenético de todas las especies de pinos a partir de datos morfológicos, existen análisis filogenéticos basados en morfología para grupos restringidos (Malusa 1992; Farjon y Styles, 1997) y análisis de datos morfológicos en matrices como tesis no publicados en la UNAM (Ortiz-García, 1999).

Los caracteres estructurales de las hojas secundarias en el género *Pinus* han sido útiles en la identificación de las especies y la documentación de hibridación interespecífica (Keng y Little, 1961; Little y Richter, 1965). Las acículas del género pueden ser usadas para obtener tanto caracteres morfológicos como caracteres moleculares a partir de las mismas muestras; lo cual crea la posibilidad de comparar, las hipótesis filogenéticas obtenidas a partir de cada tipo de datos, así como de llevar a cabo análisis filogenéticos simultáneos, combinando ambos tipos de caracteres. Las acículas de pinos se encuentran disponibles en la mayoría de los casos donde se almacenan muestras de tejido para estudios moleculares posteriores.

En el género *Pinus* se distinguen cuatro tipos de hojas: las primeras aparecen después de la germinación y reciben el nombre de cotiledones, los cotiledones forman grupos que van de 4 a 24; un segundo tipo de hojas lo constituyen las hojas primarias, las cuales se desarrollan inmediatamente después de que emergen los cotiledones y comúnmente son de tamaño reducido, solitarias, con arreglo en espiral y en la mayoría de las especies se desechan en unas pocas semanas; antes de que caigan las hojas primarias comienza el desarrollo de las hojas secundarias que forman el follaje siempre verde característico del género; un cuarto tipo de hojas son los catáfilos (Farjon y Styles 1997).

En la estructura interna (anatomía) de las hojas secundarias, se pueden reconocer tres tejidos definidos principalmente por su función: la dermis, el mesofilo y el tejido vascular (Figura 4). Las estructuras presentes en estos tres tejidos reevaluadas en un

contexto filogenético pueden ser fuente de sinapomorfias morfológicas que caractericen linajes recuperados en análisis filogenéticos moleculares.

La presencia de un haz vascular en las acículas es una condición que caracteriza a las especies del subgénero *Strobus* mientras que las especies del subgénero *Pinus* presentan dos haces vasculares por acícula. Otros rasgos foliares del género han sido comúnmente usados como auxiliares en la identificación de especies; sin embargo, pocas veces se han empleado caracteres de la anatomía foliar para realizar análisis filogenéticos a niveles inferiores de subgénero; por lo que es importante una evaluación de dichos caracteres morfológicos explícita a través del mapeo de caracteres sobre hipótesis filogenéticas.

En este estudio se lleva a cabo una reconstrucción filogenética con base en secuencias de DNA del genoma del cloroplasto y se explora la historia de transformación de los caracteres foliares en *Pinus* sección *Trifoliae*.

Pinus sección *Trifoliae* es un sistema de estudio ideal para evaluar la contribución de nuevas regiones variables del genoma del cloroplasto en la reconstrucción filogenética, la documentación de incongruencia filogenética, la delimitación de especies y la búsqueda de sinapomorfias que caractericen grupos recuperados mediante análisis filogenéticos moleculares debido a que:

- Los caracteres morfológicos presentan altos niveles de homoplasia, mientras que las hipótesis filogenéticas moleculares disponibles para las especies de la sección *Trifoliae* no cuentan con un grado de resolución adecuado para entender las relaciones filogenéticas por debajo del nivel de subsección (Gernandt *et al.*, 2005).
- Existen reportes previos de incongruencia filogenética en grupos de especies clasificadas en la sección *Trifoliae* (Gernandt *et al.*, 2009; Willyard *et al.*, 2009).
- A nivel de género se conocen pocas sinapomorfias morfológicas que caractericen a los grupos de especies recuperados en análisis filogenéticos con datos moleculares o resultado de combinación de datos morfológicos. Sin embargo, por debajo del nivel de subgénero la mayoría de los grupos de *Pinus* están definidos por combinaciones de caracteres morfológicos homoplásticos como es el caso para la sección *Trifoliae*.

- Existe un número variable de especies reconocidas por diferentes autores dentro de la sección *Trifoliae*, por lo que es necesaria una reevaluación de los límites de especie para los linajes clasificados en la sección.

Hipótesis

Los procesos evolutivos que causan incongruencia filogenética a nivel de individuos tales como hibridación, introgresión y sorteo de linajes han jugado un papel importante en la evolución del género *Pinus*, por lo cual alelos recuperados con base en cpDNA no forman grupos monofiléticos por especie. Cuestiones tales como reconstrucción filogenética, delimitación de especies y reconstrucción de la historia de transformación de los caracteres, requieren de la integración de múltiples fuentes independientes de evidencia.

Objetivos generales

Plantear una hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre las especies de *Pinus* sección *Trifoliae* con base en secuencias de DNA del plastidio, para evaluar la contribución de nuevas regiones del cloroplasto en la resolución de las relaciones filogenéticas interespecíficas que existen por debajo del nivel de subsección.

Buscar evidencia molecular a partir del reconocimiento de linajes monofiléticos de cpDNA que ayuden a inferir los límites de taxones en la sección *Trifoliae* para evaluar su reconocimiento a nivel específico y explorar caracteres foliares en la búsqueda de sinapomorfias morfológicas que caracterizen linajes recuperados en la sección.

Objetivos particulares

- Llevar a cabo un análisis filogenético con secuencias altamente variables del genoma del cloroplasto de los espaciadores *trnD-trnY-trnE*, *trnH-psbA* y fragmentos parciales de tres regiones codificantes *matK*, *rbcL* y *ycf1*, para múltiples individuos por especie en la sección *Trifoliae* con la finalidad de:
 - 1) Proponer una hipótesis filogenética para los principales linajes de la sección *Trifoliae*.

- 2) Determinar si múltiples individuos por especie forman o no grupos monofiléticos.
 - 3) Evaluar si existe evidencia genética para distinguir especies cuyo estatus es controversial de acuerdo a diferentes autores.
- Llevar a cabo la revisión y codificación de 11 caracteres morfológicos, a través de la observación de cortes foliares en preparaciones permanentes para muestras que representan los principales linajes recuperados en la sección *Trifoliae* con la finalidad de:
 - 1) Realizar un análisis combinado de datos moleculares y morfológicos.
 - 2) Mapear caracteres sobre el consenso del análisis combinado en la búsqueda de sinapomorfias morfológicas que caractericen a los principales linajes de la sección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se incluyeron en promedio tres individuos de las 47 especies reconocidas por Price *et al.* (1998; Tabla 1) para la subsección *Trifoliae*, más tres variedades reconocidas como especie por Gernandt *et al.* (2009) en la subsección *Ponderosae* (*P. arizonica*, *P. scopulorum* y *P. yecorensis*), más dos especies tratadas por Price *et al.* (1998) como subespecies (*P. chihuahuana* y *P. maestrensis*) así como dos especies del oeste de México recientemente descritas, *P. luzmariae* y *P. georginae* (Pérez de la Rosa, 1998, 2009). El muestreo trata de maximizar en lo posible el área de distribución geográfica así como la variación morfológica de las especies.

Las localidades de colecta se muestran en la figura 5 y los detalles se presentan en la Tabla 2. Existen algunas muestras incluidas en la matriz de secuencias con datos de colecta documentadas insuficientemente debido a que fueron colectadas en jardines botánicos o instituciones de genética forestal, el resto de las muestras se encuentran depositadas en el Herbario Nacional de México (MEXU).

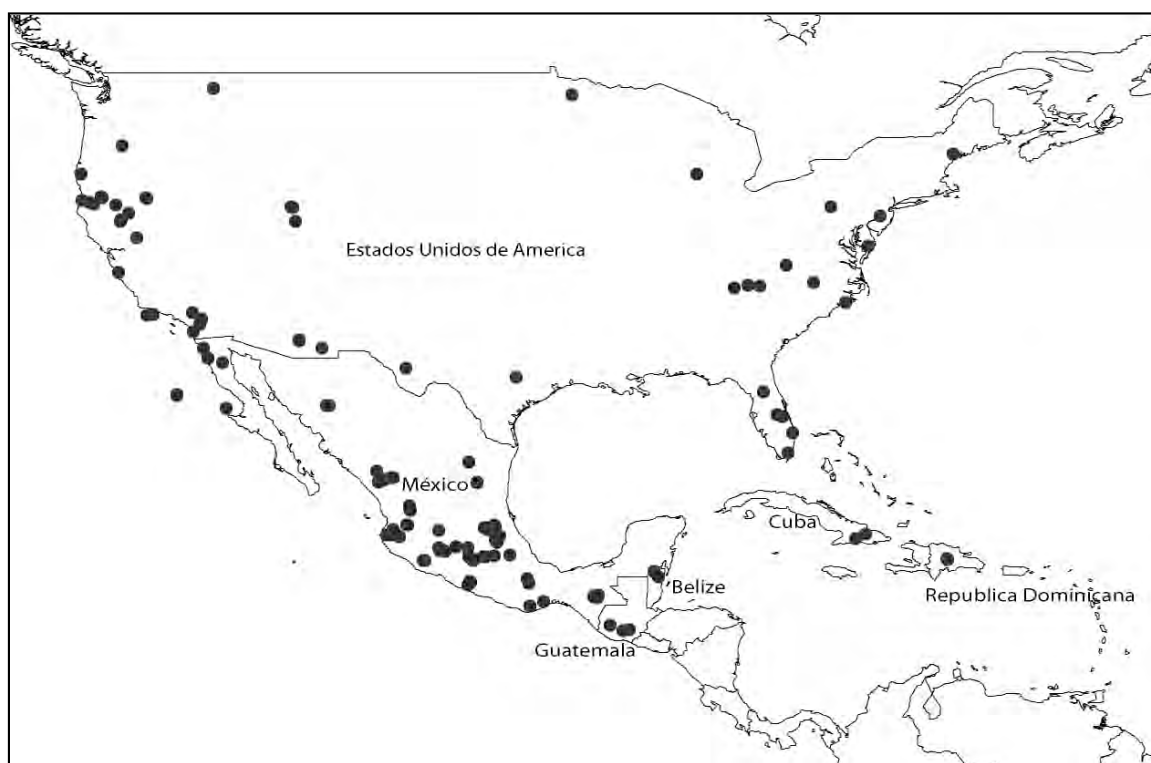


Figura 5. Puntos de colecta para las especies de *Pinus* sección *Trifoliae* incluidas en este estudio. Para aquellas muestras que no contaban con georreferencia, esta fue calculada a partir de la información de la localidad de colecta por medio de sistemas de información geográfica. Doce de 175 muestras son de origen desconocido o provienen de instituciones de genética forestal por lo cual no cuentan con georreferencia o datos de colecta y no han sido tomadas en cuenta para la elaboración de este mapa (ver Tabla 2).

Extracción de DNA y PCR

Se extrajo DNA total de las acículas para la mayoría de las muestras con una modificación de procedimiento del 2X CTAB descrito por Doyle y Doyle (1987). Cuando no se contaba con acículas, el DNA fue extraído con el mismo método a partir de semillas.

Tabla 2. Datos de colecta de las muestras en este estudio. Se indica la especie, el número de colecta, localidad y georreferencia. Los datos faltantes de localidad de colecta o georreferencia se indican con un asterisco.

Taxón	Recolecta	País	Estado	Localidad	Longitud	Latitud
Subsección	<i>Contortae</i>					
<i>P. banksiana</i>	DSG810 ^b	Estados Unidos	Michigan	Hallegan	-86.17452	42.67991
	AL02	Estados Unidos	Minnesota	Chippewa-Walker	-93.90027	47.58333
<i>P. clausa</i>	AL01s	Estados Unidos	Florida	Marion	-82.05000	29.20000

	DSG1003 ^b	Estados Unidos	Florida	Osceola	-80.89027	27.67277
	DSG1004	Estados Unidos	Florida	Yeehaw	-80.89027	27.67277
<i>P. contorta</i>	DSG953 ^b	México	Baja California	*	-115.46905	31.01802
	DSG710	Estados Unidos	California	Modoc	-120.15460	41.21143
	DSG401	Estados Unidos	Oregon	*	*	*
<i>P. virginiana</i>	DSG692	Estados Unidos	California	Placer	*	*
	AL02	Estados Unidos	Tennessee	Cocke	-83.00000	35.83333
	RBMB ^a	Estados Unidos	Tennessee	Cocke	-83.00000	35.83333
Subsección Australes						
<i>P. attenuata</i>	DSG673	Estados Unidos	California	Siskiyou	-122.94925	41.24436
<i>P. radiata</i> x <i>P. attenuata</i>	DSG684	Estados Unidos	California	Placer	*	*
	DSG980 ^b	México	Baja California	Ensenada	-116.60166	31.93972
<i>P. caribaea</i>	Lev 3	Belice	Crooked Tree	Crooked Tree	-88.54861	17.80338
	Lev 2 ^a	Cuba	Pinar del Rio	Cajalbana	-83.44555	22.79025
	Lev 1	Archipiélago de Cuba	Isla de la Juventud	La cañada	-88.82718	18.13976
<i>P. cubensis</i>	Lev1	Cuba	Holguín	Mayari Abajo	-75.75350	20.42041
	RMP403	Cuba	*	*	*	*
	Lev2	Cuba	Holguín	Pinares de Mayari	-75.75350	20.42041
<i>P. echinata</i>	Kew2766	Estados Unidos	New Jersey	Burlington	-74.86490	40.07120
	echiAL02	Estados Unidos	Tennessee	Cocke	-83.00000	35.83333
	RBMB ^a	Estados Unidos	Tennessee	Cocke	-83.00000	35.83333
	DOB1292	Estados Unidos	North Carolina	Campus de Duke University	-78.94176	36.00270
<i>P. elliottii</i>	DSG943 ^b	Estados Unidos	Florida	Miami-Dade	-80.50000	25.43333
	DSG1002	Estados Unidos	Florida	Palm Beach	-80.26666	26.68305
	DSG1007	Estados Unidos	Florida	Osceola	-81.21833	27.80250
<i>P. glabra</i>	AL02 ^a	Estados Unidos	Georgia	Pulaski	-80.66666	37.05000
<i>P. greggii</i>	DSG426	México	Hidalgo	Zimapan	-99.25861	20.83555
	DSG816	México	Michoacán	Angango	-100.31033	19.60866
	DSG506	México	Hidalgo	Tlanchinol	-98.65569	21.00166
<i>P. georginae</i>	SHL07 ^b	México	Jalisco	Mascota	-104.75597	20.45655
	SHL05 ^b	México	Jalisco	Atenguillo	-104.49686	20.25675

	SHL09 ^b	México	Jalisco	Mascota	-104.75580	20.45683
<i>P. herrerae</i>	DSG634	México	Michoacán	Dos Aguas	-103.05416	18.81972
	DSG644	México	Michoacán	Dos Aguas	-102.92638	18.82194
	SHL12 ^b	México	Jalisco	Talpa de Allende	-104.99338	20.36677
<i>P. jaliscana</i>	DSG456	México	Jalisco	El Tuito	-105.25983	20.35713
	SHL11	México	Jalisco	San Sebastián del Oeste	-104.89147	20.73647
	SHL10 ^b	México	Jalisco	San Sebastián del Oeste	-104.89261	20.73580
<i>P. lawsonii</i>	DSG431	México	Estado de México	Sultepec	-99.97472	18.81027
	DSG452 ^a	México	Oaxaca	San Mateo Río Hondo	-96.63888	17.69166
	DSG799	México	Michoacán	Ziracuaretiro	-101.91477	19.47536
	DSG 647 ^a	México	Michoacán	Santa Clara	-101.70000	19.38333
<i>P. leiophylla</i>	DSG934 ^b	México	Durango	El Salto	-105.61511	23.73394
	DSG433	México	Estado de México	Sultepec	-99.98305	18.83777
	DSG794	México	Michoacán	Paracho	-102.09219	19.59561
<i>P. chihuahuana</i>	DSG1053	México	Sonora	Yécora	-109.04286	28.38081
	DSG1066	México	Sonora	Yécora	-109.04383	28.37903
<i>P. lumholtzii</i>	DSG460	México	Jalisco	Jesús María	-102.06855	20.64947
	DSG732	México	Jalisco	Mezquitic	-103.89694	22.07777
	DSG937 ^b	México	Durango	El Slato	-105.83786	23.62241
<i>P. luzmariae</i>	DSG740	México	Jalisco	Mezquitic	-103.89861	22.17472
	SHL04	México	Jalisco	Atenguillo	-104.49541	20.25597
	JAPR3	México	*	*	*	*
<i>P. maestrensis</i>	Lev1	Cuba	Santiago de Cuba	Sierra Maestra. Los Rodrigos	-76.36190	20.14457
	Lev11	Cuba	Santiago de Cuba	Sierra Maestra. Los Rodrigos	-76.36190	20.14457
<i>P. muricata</i>	DSG663	Estados Unidos	California	Humboldt	-124.14110	41.07358
	DSG968 ^b	México	Baja California	Entre San Vicente y Erendria	-116.33361	31.29500
	AL01	Estados Unidos	California	Jardín Botánico Rancho Santa Ana en Claremont	-119.71666	34.01666
<i>P. occidentalis</i>	AL02 ^a	República Dominicana	La Vega	Constanza	-70.73333	18.90000
	Lev1	República Dominicana	La Vega	Agua Blanca	-70.68550	18.85041
	Lev2	República Dominicana	La Vega	Agua Blanca	-70.68550	18.85041
<i>P. oocarpa</i>	DSG459 ^b	México	Jalisco	El Tuito	-105.31227	20.35388
	JAPR1	México	*	*	*	*

	DSG711	México	Hidalgo	Calnali	-98.58746	20.88223
<i>P. palustris</i>	DSG1008	Estados Unidos	Florida	Osceola	-80.94083	27.71472
	AL02	Estados Unidos	Florida	Marion	-82.05000	29.20000
	DSG1009	Estados Unidos	Florida	Osceola	-80.94083	27.71472
	DOB1294	Estados Unidos	North Carolina	Croatan Game Land	-76.97111	34.76628
<i>P. patula</i>	DSG884	México	Chiapas	San Cristóbal de las Casas	-92.52197	16.59461
	DSG408	México	Hidalgo	Rancho Santa Elena	-98.52327	20.13305
<i>longipedunculata</i>	DSG1085	México	Oaxaca	San Juan Atepec	-96.49890	17.41785
<i>P. praetermissa</i>	DSG454 ^b	México	Jalisco	Magdalena	-104.04980	20.98833
	JAPR2 ^a	México	Jalisco	Magdalena	-104.03333	20.98333
	SHL03	México	Jalisco	Magdalena	-104.02852	20.98188
<i>P. pringlei</i>	DSG429	México	Estado de México	Sultepec	-99.97527	18.81000
	DSG645	México	Michoacán	Uruapan	-102.06413	19.43240
	DSG749	México	Guerrero	El Iris	-100.19038	17.47763
<i>P. pungens</i>	AL01	Estados Unidos	Pennsylvania	Huntingdon	-77.89888	40.67055
	RBMB ^{ab}	Estados Unidos	Tennessee	Condado de Blount	-83.83333	35.66666
<i>P. radiata</i>	radbin14 ^a	México	Baja California	Isla Cedros, Cañada de la Mina	-115.20000	28.18333
	DOB1045 ^a	México	Baja California	Isla Guadalupe	-118.26666	29.05000
	AL03s	México	Baja California	Isla Guadalupe	-118.26666	29.00000
	AL01	Estados Unidos	California	Institute of Forest Genetics	-120.74222	38.73916
	rad3799 ^a	Estados Unidos	California	Monterrey	-121.88333	36.60000
<i>P. rigida</i>	RMP407	*	*	*	*	*
	RBMB ^a	Estados Unidos	Tennessee	Blount	-83.83333	35.66666
	AL02	Estados Unidos	North Carolina	Yancey	-82.25027	35.75083
	DG3891	Estados Unidos	Maine	Cumberland	-70.33550	43.93638
<i>P. serotina</i>	RMP408	*	*	*	*	*
	AL01	Estados Unidos	Maryland	Institute of Forest Genetics	-75.55000	38.25000
	DOB1293	Estados Unidos	North Carolina	Croatan Game Land	-76.97111	34.76628
<i>P. taeda</i>	DSG605 ^b	Estados Unidos	Texas	Bastrop	-97.28794	30.11025
	DOB1291	Estados Unidos	North Carolina	Campus de Duke University	-78.94736	36.00173

<i>P. tecunumanii</i>	DSG896 ^b	Guatemala	San Jose Pinula	Amatepeque	-90.35269	14.53619
	AL01S1 ^a	México	Chiapas	Chanal	-92.25000	16.65000
<i>P. teocote</i>	DSG410	México	Hidalgo	Tenango de Doria	-98.34980	20.32205
	DSG928	México	Durango	Hacia El Salto	-104.98536	23.91380
	DSG611	México	Hidalgo	Zimapán	-99.22963	20.81008
Subsección <i>Ponderosae</i>						
<i>P. arizonica</i>	DSG781	Estados Unidos	Arizona	Pima	-110.68961	32.39994
	DSG784	Estados Unidos	Arizona	Pima	-110.68927	32.39708
<i>var.stomiae</i>	Sol ^a	México	Nuevo León	Cerro Potosí	-100.21666	24.86666
	DSG543	México	Tamaulipas	Miquihuana	-99.70719	23.60166
<i>P. cooperi</i>	AL01s1	México	Durango	El Salto	-105.40000	23.80000
	RG523	México	Durango	Camino El Salto	-105.04711	23.89913
	DSG929 ^b	México	Durango	El Salto	-105.51186	23.76044
<i>P. coulteri</i>	DSG406	Estados Unidos	California	Riverside	-116.73933	33.70333
	Kew723 ^a	Estados Unidos	California	San Bernadino	-117.28333	34.10000
	DSG990 ^b	México	Baja California	San Diego	-116.87027	33.35944
<i>P. donnell-smithii</i>	AL01	Guatemala	Guatemala	Quetzaltenango	-91.51666	14.80000
	AL02	Guatemala	Guatemala	Quetzaltenango	-91.51666	14.80000
	DSG903 ^b	Guatemala	Sacatepéquez	Volcán de Agua	-90.73625	14.47211
	DSG906	Guatemala	Sacatepéquez	Volcán de Agua	-90.74091	14.47138
<i>P. devoniana</i>	DSG6099 ^a	México	Michoacán	Morelia	-101.00000	19.63333
	DSG677	México	Hidalgo	Ocotillo	-98.61272	20.20502
	DSG727 ^b	México	Jalisco	Zapopan	-103.85611	21.88888
<i>P. douglasiana</i>	DSG434 ^b	México	Estado de México	Sultepec	-99.96638	18.83777
	DSG643	México	Michoacán	Coalcoman	-102.92638	18.82194
	DSG798	México	Michoacán	Uruapan	-101.96166	19.45238
<i>P. durangensis</i>	DSG931	México	Durango	El Salto	-105.61477	23.73386
	RG540 ^b	México	Durango	Norte de El Salto	-105.94175	24.34680
<i>P. engelmannii</i>	DSG851	Estados Unidos	Arizona	Cochise	-109.30808	31.94894
	RG546	*	*	*	*	*
	DSG927 ^b	México	Durango	Durango	-104.90505	23.93166
<i>P. hartwegii</i>	DSG6199 ^a	México	Estado de México	Amecameca	-98.63333	19.08333
	DSG616 ^a	México	Hidalgo	Siguilucan	-98.51666	19.95000
	DSG905 ^b	Guatemala	Volcán de Agua	Sacatepéquez	-90.74088	14.47122
	DSG907 ^b	Guatemala	Volcán de	Sacatepéquez	-90.74244	14.46677

			Agua			
<i>P. jeffreyi</i>	DSG300	Estados Unidos	Oregon	Iron Mountain	-124.14944	42.66611
	DSG656	Estados Unidos	Oregon	Iron Mountain	-124.14968	42.66705
	DSG701	Estados Unidos	California	Plumas	-121.25213	40.27986
	DSG668	Estados Unidos	California	Siskiyou	-122.89951	41.22248
<i>P. maximinoi</i>	DSG446 ^a	México	Estado de México	Valle de Bravo	-100.21666	19.03333
	DSG742	México	Guerrero	San Vicente	-100.29527	17.27694
	JAPR1870 ^b	México	Jalisco	Cabo Corrientes	-105.31638	20.36138
	JAPR1970 ^b	México	Oaxaca	Candelario Loxicha	-96.46075	15.96577
<i>P. montezumae</i>	DSG0101	México	Morelos	Huitzilac	-99.32241	19.04830
	DSG416	México	Hidalgo	Real del Monte	-98.60541	20.11191
	DSG538 ^b	México	Tamaulipas	Miquihuana	-99.70736	23.62097
	DSG885 ^b	México	Chiapas	San Cristóbal de las Casas	-92.51077	16.56588
<i>P. nubicola</i>	DSG893	México	Chiapas	San Cristóbal de las Casas	-92.30972	16.50161
	DSG898	Guatemala	Guatemala	San José Pinula	-90.34783	14.54172
	DSG900 ^b	Guatemala	Guatemala	San José Pinula	-90.34400	14.54102
<i>P. ponderosa</i>	DSG976	Estados Unidos	Oregon	Sisters	-121.64886	44.43133
	DSG665	Estados Unidos	California	Trinity	-123.6945	40.92161
	DSG698	Estados Unidos	California	Butte	-121.69360	39.85730
	AL06s2	Estados Unidos	Montana	Sanders	-115.98488	47.96886
<i>scopulorum</i>	DSG601 ^b	Estados Unidos	Texas	Jeff Davis	-104.10000	30.65716
	DSG679	Estados Unidos	California	Placer	*	*
<i>scopulorum</i>	DSG780	Estados Unidos	Arizona	Pima	-110.72236	32.41091
<i>scopulorum</i>	DSG858	Estados Unidos	Arizona	Cochise	-109.27900	31.90405
<i>scopulorum</i>	DSG1016	Estados Unidos	Utah	Summit	-111.11555	40.60138
	DSG1019	Estados Unidos	Utah	Summit	-111.19527	40.63055
	DSG1029	Estados Unidos	Utah	Carbon	-110.92500	39.76083
<i>P. pseudostrobus</i>	DSG764	México	Guerrero	Puerto de Gallo	-100.14222	17.45738
	DSG815	México	Michoacán	Angango	-100.31250	19.61075
	DSG822	México	Morelos	Huitzilac	-99.20991	19.02713

	DSG411	México	Hidalgo	Metepec	-98.34322	20.29516
	DSG631 ^a	México	Hidalgo	Nicolas Flores	-99.00000	20.66666
var. <i>apulcensis</i>	DSG7499 ^a	México	Puebla	Mazapiltepec	-97.70000	19.11666
	DSG531 ^a	México	Oaxaca	Santa Catarina Ixtepetli	-95.63333	16.28333
	DSG888	México	Chiapas	San Cristóbal de las Casas	-92.30175	16.49255
var. <i>estevezii</i>	DSG681	Estados Unidos	California	Placer	*	*
<i>P. sabiniana</i>	Kew2824 ^a	Estados Unidos	California	Shasta County	-122.03333	40.75000
	DSG696	Estados Unidos	California	Butte	-121.74046	39.75481
	DSG667 ^b	Estados Unidos	California	Trinity	-123.40910	40.79495
<i>P. torreyana</i>	AL01	Estados Unidos	California	Santa Rosa Island	-120.10000	33.95000
	DSG407	Estados Unidos	California	San Diego	-117.26633	32.95983
<i>P. washoensis</i>	DSG707	Estados Unidos	California	Modoc	-120.18828	41.19906
	DSG708	Estados Unidos	California	Modoc	-120.18776	41.19800
	DSG672	Estados Unidos	California	Institute of Forest Genetics	*	*
	AL01	Estados Unidos	California	R5 Camino Seed Orchard	-120.11955	41.15991
<i>P. yecorensis</i>	AL02s1	México	Sonora	Yécora	-108.86944	28.37916
	DSG1052	México	Sonora	Yécora	-109.04286	28.38073
	DSG1054	México	Sonora	Yécora	-109.04250	28.37994

^a Muestras cuya georreferencia fue aproximada por medio de sistemas de información geográfica a partir de los datos de la localidad de colecta disponibles.

^b Muestras utilizadas para preparaciones permanentes de cortes transversales, a partir de las cuales se observaron y codificaron los caracteres en la matriz morfológica.

Para la PCR se emplearon reactivos en cantidades previamente establecidas (Gernandt *et al.*, 2005, 2009). Los parámetros para la amplificación de las regiones *trnD-trnY-trnE*, *trnH-psbA* y *ycf1*, fueron los siguientes: 94° C, 3 min; 30 x (94°C, 60 s; 50°C, 50 s; 72°C, 80 s); 72°C, 5 min. Para la región *matK* fueron 94°C, 2 min; 30 x (94°C, 30 s; 48°C, 40 s; 72°C, 40 s); 72°C, 5min; 4°, ∞; y para *rbcL* los parámetros fueron 94°C, 2 min; 29 x (94°C, 2 min; 48°C, 1 min; 72°, 2 min 30 s); 72°C, 7 min; 4°C, 59 min.

Para la PCR se emplearon reactivos en cantidades previamente establecidas (Gernandt *et al.*, 2005, 2009). Los parámetros para la amplificación de las regiones *trnD-trnY-trnE*, *trnH-psbA* y *ycf1*, fueron los siguientes: 94° C, 3 min; 30 x (94°C, 60 s; 50°C,

50 s; 72°C, 80 s); 72°C, 5 min. Para la región *matK* fueron 94°C, 2 min; 30 x (94°C, 30 s; 48°C, 40 s; 72°C, 40 s); 72°C, 5min; 4°, ∞; y para *rbcL* los parámetros fueron 94°C, 2 min; 29 x (94°C, 2 min; 48°C, 1 min; 72°, 2 min 30 s); 72°C, 7 min; 4°C, 59 min.

Tabla 3. Regiones del genoma del cloroplasto amplificadas en este estudio. Los nombres de los primers están dados por su posición en el genoma del cloroplasto de *Pinus thunbergii*. La secuencia de cada primer se encuentra en el sentido 5' a 3'. Se indica la fuente de publicación de cada uno de los primers.

Región de DNA	Nombre del primer	Secuencia del primer (5'-3')	Fuente
<i>matK</i>	EquisetumF	ata ccc cat ttt att cat cc	RBG Kew
	matK2F	cgt act ttt atg ttt aca ggc taa	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>rbcL</i>	rbcLAF	atg tca cca caa aca gag act aaa gc	Kress y Erickson, 2007
	rbcLjaf634R	gaa acg gtc tct cca acg cat	Fazekas <i>et al.</i> , 2008
<i>ycf1</i>	Pt96499F	gga ccg aag tct ctc aat att ttt	Gernandt <i>et al.</i> , 2009
	Pt97365R	cgc caa aca ctc gaa aag g	Gernandt <i>et al.</i> , 2009
	Pt96887F	tca ttt cga atc ttt cgg att t	Este estudio
	Pt97833R	tac cag aat cgg acg tgt ca	Este estudio
	Pt97759F	gac gga aaa tta tga tat gga aga	Este estudio
	Pt98661R	cct tcg atc cgg tat gaa tc	Este estudio
	Pt98647F	gct ctc cta taa ctg gaa tgt ctc	Este estudio
	Pt99121R	tgt ggt ttt tcg tga tcc aa	Gernandt <i>et al.</i> , 2009
	Pt28456F	cag ggc ggt act cta acc aa	Gernandt <i>et al.</i> , 2009
	Pt28893R	ttt gtc caa cca acc cat tt	Gernandt <i>et al.</i> , 2009
<i>trnH-psbA</i>	trnH (Pt119036)	cgc gca tgg tgg att cac aat cc	Azuma <i>et al.</i> , 2001
	psbA (Pt119696)	gagcattacgttcgtgcataac	Azuma <i>et al.</i> , 2001

Para *trnD-trnY-trnE*, *trnH-psbA* y *ycf1*, la concentración final de los reactivos de PCR para cada reacción de 25 µl fueron: 1x buffer, 1.4 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1.2 µM de oligonucleótido (*primer*) F y R y 2 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen). Para las regiones *matK* y *rbcL*, la concentración final fue 1x buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 0.12 µM de oligonucleótido (*primer*) F y R y 2 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen). Los productos de PCR (1.5 µl por muestra) se visualizaron a través de electroforesis en gel de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron secuenciados en la University of Washington High Throughput Genomic Unit (Seattle, Washington).

La información de los primers empleados para la amplificación y secuenciación de las regiones de este estudio se encuentran en la Tabla 3. Las secuencias del espaciador

trnD-trnY-trnE (Pt28456F-Pt29344R) y la región codificante *ycf1* amplicón A (Pt96499F-Pt97365R) y *ycf1* amplicón B (Pt98232F-Pt99121R) para la subsección *Ponderosae* fueron previamente publicadas (Gernandt *et al.*, 2009). Las secuencias para las regiones *trnD-trnY-trnE* y *ycf1* fueron complementadas para el resto de las especies de la sección *Trifoliae* y se diseñaron nuevos primers internos (Pt96887F-Pt97833R) con el software Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) para lograr una secuencia continua de la región codificante *ycf1* (aprox. 2,542 de 5,270 p.b., 48%), que se amplificó en fragmentos de 474 a 946 p.b. Las secuencias de *matK* y *rbcL* son parciales y corresponden a las regiones propuestas como código de barras genético (CBOL Plant Working Group, 2009). La secuencia del plastoma de *Pinus thunbergii*, usada como grupo externo, fue bajada de GenBank de la accesión: *Pinus thunbergii* NC_001631 (Wakasugi *et al.*, 1994; Figura 3).

Matriz de datos moleculares

Las secuencias se ensamblaron mediante el uso del software Sequencer 4.8 (Gene Codes, Inc., Ann Arbor, Michigan) y se editaron con BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999). La alineación de las secuencias se llevó a cabo usando MAFFT 6 (Katoh *et al.*, 2005) con la opción NS-i y la matriz final concatenada se ensambló en BioEdit 7.0.5.

Análisis de los datos moleculares

Mediante el software PAUP* 4.0b10 para Windows (Swofford, 2003) se determinó el número de sustituciones dentro de la sección *Trifoliae* y cada una de las subsecciones y se llevaron a cabo los análisis filogenéticos. No se codificaron gaps, los cuales fueron tratados como datos faltantes.

La búsqueda heurística utilizó parsimonia de pesos iguales como el criterio de selección y TBR (tree-bisection and reconnection) para el intercambio de ramas, usando las condiciones de default. El soporte de las ramas se midió con valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) e índices de decaimiento (Bremer, 1994). Los bootstraps se llevaron a cabo con 10 000 réplicas usando adición de taxones simple e intercambio de ramas TBR, con 500 árboles guardados por réplica. Los índices de decaimiento se calcularon en PAUP mediante los comandos CONVERSE y CONSTRAINTS.

Los resultados y la discusión toman como referencia los grupos propuestos en la revisión de la clasificación para el género *Pinus* llevada a cabo por Price *et al.* (1998;

Tabla 1), para nombrar y comparar los linajes recuperados en este estudio con base en secuencias de DNA del cloroplasto.

Cortes foliares

Con base en la filogenia recuperada a partir de los caracteres moleculares se eligieron muestras representativas de los principales linajes de la sección *Trifoliae*. Las hojas secundarias de las muestras fueron fijadas en FAA (por tiempo indeterminado), lavadas en ddH₂O (3 veces por 5 min), deshidratadas en EtOH (70% EtOH por 6 horas), 90% EtOH (6 horas), 100% EtOH (12 horas), TEREtOH (tiempo indeterminado), glicerina (5 min); e incluidas en paraplast (15 min). Las muestras incluidas en paraplast se montaron en el microtomo para obtener cortes transversales de la región media de la hoja de un grosor de entre 10 y 20 micras.

Los cortes obtenidos fueron adheridos a portaobjetos y teñidos mediante el siguiente patrón de tinción: Citrisolv 2(15 min); EtOH 100% (5 min); EtOH 96% (5 min); EtOH 70% (5 min), EtOH 50% (5 min); dH₂O (5 min); Alcian blue (30 min); dH₂O (5 min); EtOH 50% (3 min); Safranina (2 hrs); 50% EtOH (3 min); 70% EtOH (3 min); 96% EtOH (3 min); 100% EtOH (3 min); Citrisolv (15 min). Una vez teñidos los cortes, se montaron en preparaciones permanentes con la resina sintética “Entellan”, para realizar su observación a diferentes aumentos en un microscopio óptico.

Matriz de datos morfológicos

Los 11 caracteres foliares codificados en la matriz de datos morfológicos, fueron elegidos a partir de una revisión de la literatura (Shaw, 1914; Martínez, 1945; Lanyon, 1966; Mirov, 1967; Farjon y Styles, 1997; Ortiz-García, 1999). La matriz de caracteres morfológicos fue ensamblada mediante el software Mesquite (Maddison y Maddison, 2007).

A continuación se describen los caracteres y sus estados (Figura 6): Los caracteres 1 y 2 son caracteres morfológicos externos y sus estados fueron determinados a simple vista. Los caracteres del 3 al 11 son caracteres morfológicos internos y sus estados fueron determinados mediante la observación de preparaciones

permanentes con ayuda de un microscopio óptico. Los caracteres fueron tratados como no ordenados y multiestados.

1. **Número de acículas por fascículo.** (0) Dos (1) Tres (2) Cuatro (3) Cinco
2. **Vaina basal del fascículo.** (0) Persistente (1) Decidua
3. **Espesor de las paredes de las células de la hipodermis.** (0) Uniformes (1) Biformes (2) Multifformes
4. **Intrusiones hipodermiales.** (0) Presentes (1) Ausentes
5. **Número de canales resiníferos.** (0) Cero (1) Uno (2) Dos (3) Tres (4) Cuatro (5) Seis (6) Siete (7) Ocho (8) Catorce
6. **Posición de los canales resiníferos.** (0) Externa (1) Interna (2) Media (3) Septal
7. **Paredes de las células de la endodermis.** (0) Uniformemente engrosadas (1) Externamente engrosadas
8. **Haces vasculares.** (0) Separados (1) Conados (2) Fusionados
9. **Esclerénquima en la región vascular.** (0) Presente (1) Ausente
10. **Cristales en el floema.** (0) Presentes (1) Ausentes
11. **Intrusiones hipodermiales.** (0) En el mesofilo (1) En el mesofilo tocando la endodermis.

Análisis combinados y mapeo de caracteres

La búsqueda heurística de la matriz combinada de datos moleculares y estructurales usó parsimonia de pesos iguales como el criterio de selección y TBR para el intercambio de ramas, usando las condiciones de default.

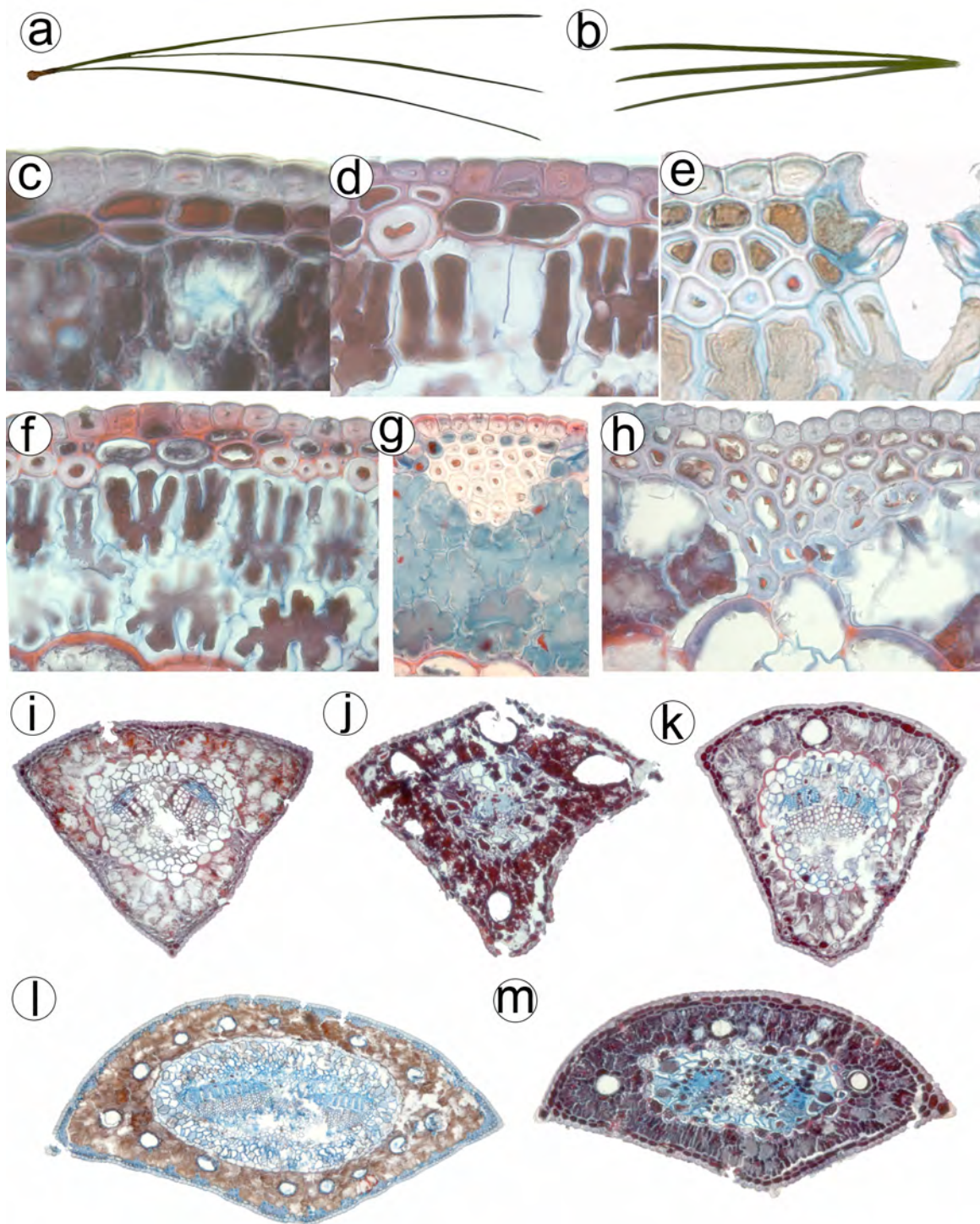


Figura 6. Caracteres y estados de caracter para los once rasgos foliares evaluados en *Pinus* sección *Trifoliae*. **1.** Número de acículas por fascículo (1) Tres a y b; **2.** Vaina basal del fascículo (0) Persistente a, (1) Decidua b; **3.** Espesor de las paredes de las células de la hipodermis (0) Uniformes c, (1) Biformes d, (2) Multiformes e; **4.** Intrusiones hipodermiales (0) Presentes g y h, (1) Ausentes f; **5.** Número de canales resiníferos (0) cero i, (1) uno k, (3) tres m, (4) cuatro j, (8) catorce l; **6.** Posición de los canales resiníferos (0) Externa j, (1) Interna m, (2) Media l, (3) Septal k. (a) *P. ponderosae* DSG1177, (b) *P. chihuahuana* DSG926, (c y m) *P. herrerae* SHL12, (d) *P. jaliscana* SHL10, (e) *P. nubicola* DSG903, (f) *P. montezumae* DSG885, (g) *P. durangensis* RG540, (h e i) *P. maximinoi* JAPR1970, (j) *P. georginae* SHL07, (k) *P. praetermissa* DSG454, (l) *P. attenuata* DSG980.

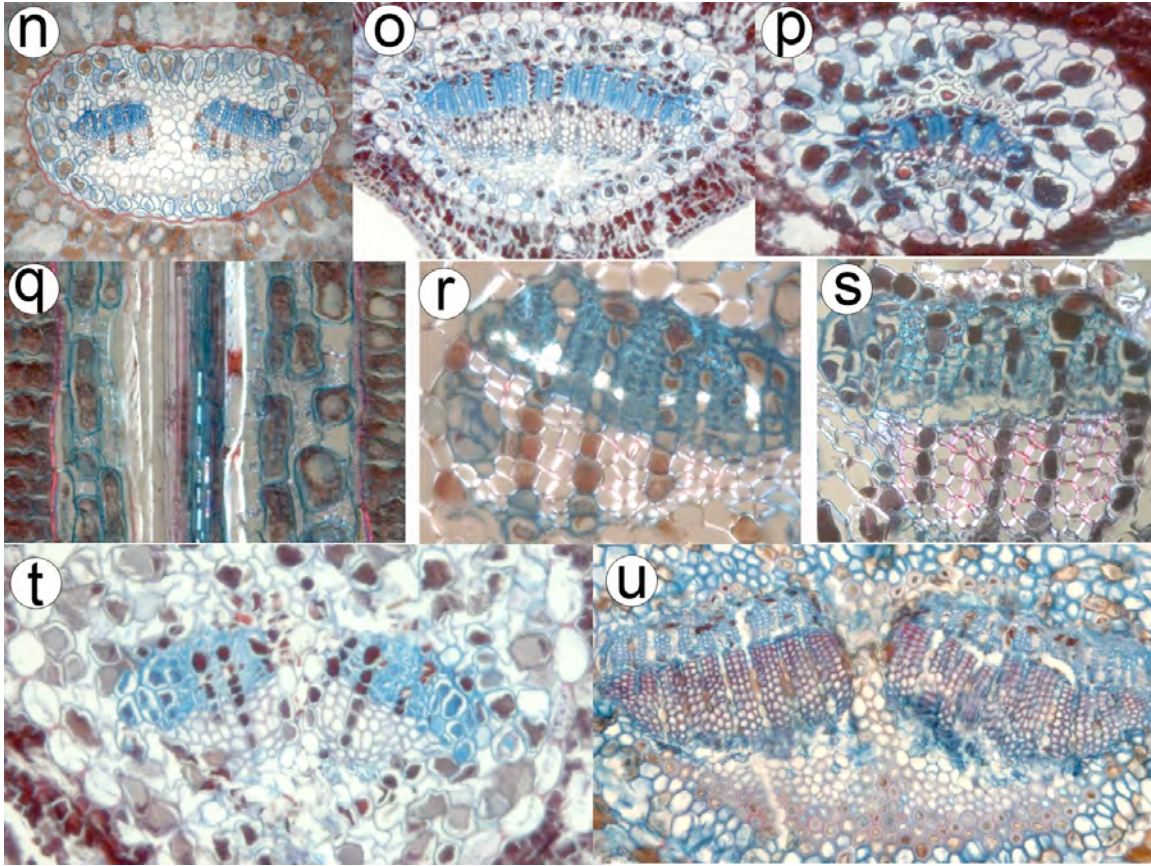


Figura 6 (Continuación). Caracteres y estados de caracter, para los once rasgos foliares evaluados en *Pinus* sección *Trifoliae*. **7. Paredes de las células de la endodermis** (0) Uniformemente engrosadas **o**, (1) Externamente engrosadas **n** y **p**; **8. Haces vasculares** (0) Separados **n**, (1) Conados **o**, (2) Fusionados **p**; **9. Esclerénquima en la región vascular** (0) Presente **u**, (1) Ausente **t**; **10. Cristales en el floema** (0) Presentes **q** y **r**, (1) Ausentes **s**; **11. Intrusiones hipodermiales** (0) En el mesofilo **g**, (1) En el mesofilo tocando la endodermis **h**. (**n q y r**) *P. contorta* DSG953, (**o**) *P. lumholtzii* DSG937, (**p**) *P. georginae* SHL05, (**s**) *P. cooperi* DSG929, (**t**) *P. hartwegii* DSG907, (**u**) *P. attenuata* DSG980.

El mapeo de los caracteres se llevó a cabo sobre el consenso estricto empleando el criterio de parsimonia mediante el software TNT (Goloboff *et al.*, 2008) con la opción “Character mapping”, con la finalidad de investigar si son o no característicos de grupos recuperados mediante análisis filogenéticos combinados y tener una idea de su contenido de homoplasia y contenido de información por el número de transformaciones en el consenso estricto.

RESULTADOS

Caracterización de la matriz concatenada de secuencias

La matriz incluyó 174 terminales del grupo interno y una terminal del grupo externo. El número de secuencias totales por región es menor a 174 debido a problemas de amplificación en la región *trnH-psbA* para las especies de la subsección *Contortae* (Tabla 4). La matriz concatenada tuvo una longitud total de 5,250 p.b. lo cual representa el 4.4% del genoma del cloroplasto de *P. thunbergii*. El contenido de G+C de la matriz concatenda fue de 0.373. En la Tabla 4 se detalla la información para cada una de las regiones.

Caracterización de las regiones secuenciadas

La matriz concatenada presentó 197 caracteres variables no informativos y 239 caracteres variables filogenéticamente informativos. La región más variable fue *ycf1* con 159 caracteres variables no informativos y 176 caracteres variables filogenéticamente informativos. La región con menor variación fue *matK* con 13 caracteres variables no informativos y 7 caracteres variables filogenéticamente informativos.

Tabla 4. Caracterización de cada una de las regiones secuenciadas en este estudio. El número de secuencias, la longitud por región, el contenido de G+C, el número de caracteres variables y caracteres informativos fueron calculados con PAUP*.

Región cpDNA	Num. de secuencias	Longitud(p.b.)	Contenido de G+C	Caract. var/inf
<i>matK</i>	172	744	0.354	13/7
<i>rbcL</i>	174	559	0.447	5/11
<i>ycf1</i>	175	2549	0.365	159/176
<i>trnD-trnY-trnE</i>	175	834	0.373	18/25
<i>trnH-psbA</i>	173	564	0.365	2/20

Se observaron dos indels en el espaciador *trnD-trnY-trnE* en la subsección *Ponderosae*. Este espaciador también presentó un mononucleótido A/T de longitud que varía entre ocho y once pares de bases en la subsecciones *Ponderosae* y *Austroales* y entre seis y siete pares de bases en la subsección *Contortae* y el grupo externo (*P. thunbergii*). Los indels en *ycf1* se observaron únicamente entre subsecciones y en múltiplos de tres pares de bases.

Análisis filogenéticos

La búsqueda heurística de la matriz concatenada recuperó 6,351 árboles más parsimoniosos, con una longitud de 576 pasos, un índice de consistencia (CI) de 0.807, un índice de consistencia excluyendo caracteres no informativos (CI_{exc}) de 0.706 y un índice de retención (IR) de 0.973. En las Figuras 6 y 7 se presenta el consenso estricto resultado del análisis filogenético, haciendo énfasis en cada una de las subsecciones de la sección *Trifoliae*.

Relaciones filogenéticas en *Pinus* sección *Trifoliae*

En el análisis filogenético se recuperan las tres subsecciones clasificadas en la sección *Trifoliae* como monofiléticas con altos valores de soporte. La subsección *Austroales* es el grupo hermano de la subsección *Ponderosae* y éstas a su vez constituyen el grupo hermano de la subsección *Contortae* (Figuras 7, 8). Los nombres de los clados recuperados por debajo del nivel de subsección corresponden a estudios moleculares anteriores (como en el caso de la subsección *Ponderosae*; Gernandt *et al.*, 2009) o son asignados en este estudio cuando corresponden de manera parcial con grupos de especies reconocidos en esquemas de clasificación previos (Por ejemplo, Price *et al.*, 1998; Little y Critchfield; 1969).

En la subsección *Contortae* no existen grupos por debajo del nivel de subsección. Las relaciones de filogenia entre las cuatro especies de esta subsección son las siguientes: *P. clausa* es el grupo hermano de *P. virginiana*, estas dos especies a su vez forman el grupo hermano de *P. contorta* y en conjunto las tres especies anteriores constituyen el grupo hermano de *P. banksiana* (Figura 7).

En la subsección *Ponderosae* se recuperan clados equivalentes a los recuperados en estudios anteriores (Hernández León, 2007; Gernandt *et al.*, 2009). Estos han sido nombrados informalmente como clado Devoniana, Montezumae, Ponderosae, Sabiniana y grado Jeffreyi (Gernandt *et al.*, 2009). El clado formado por *P. ponderosa* y un híbrido artificial de *P. washoensis* × *jeffreyi*, más el grado Jeffreyi es el grupo hermano a las especies del grupo Sabiniana, a su vez dichos linajes son el grupo hermano de los clados Devoniana, Montezumae y Ponderosae que son recuperados en una politomía.

Los resultados obtenidos para las especies de la subsección *Ponderosae* son totalmente consistentes con los resultados presentados por Gernandt *et al.* (2009) que fueron obtenidos con base en una cantidad menor de datos y un menor muestreo intraespecífico. Como parte de los resultados de este trabajo para las especies de la subsección *Ponderosae*, se logra un mayor grado de resolución de las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo Sabiniana, con *Pinus sabiniana* recuperado como grupo hermano de *P. torreyana* y estas especies como grupo hermano de *P. coulteri* (Figura 7).

En la subsección *Austerales* se recuperan al menos cuatro linajes con altos valores de soporte, el grupo *Attenuatae*, *Leiophyllae*, *Austerales* y *Taeda*. El grupo *Taeda* aparece como grupo hermano de *Austerales*, dichos linajes representan el grupo hermano de *Leiophyllae* y en conjunto *Taeda*+*Austerales*+*Leiophyllae* son el grupo hermano de *Attenuatae* (Figura 8).

En el clado *Attenuatae* se recuperan las siguientes relaciones filogenéticas interespecíficas: *P. radiata* es el grupo hermano de *P. muricata*. El híbrido artificial *P. attenuata* × *radiata* aparece con el resto de los individuos de *P. radiata* lo cual es consistente con el patrón de herencia vía paterna del cloroplasto. Es importante destacar que *P. glabra* es recuperada como una especie cercanamente relacionada a *P. radiata* y *P. muricata*. Estas tres especies a su vez conforman el grupo hermano de *P. attenuata*.

Dentro del clado *Leiophyllae* se recupera a *P. leiophylla* como grupo hermano de *P. chihuahuana* + *P. greggii*. En el clado *Austerales* se recupera a *P. elliottii*, *P. caribaea* y *P. palustris* en una politomía pobremente soportada, este clado a su vez se encuentra en una politomía que incluye a *P. cubensis*, *P. echinata*, *P. jaliscana*, *P. lawsonii*, *P. lumholtzii*, *P. maestrensis*, *P. occidentalis*, *P. oocarpa*, *P. praetermissa* y *P. pringlei*.

Otro clado formado por especies del grupo *Austerales*, recupera a *P. luzmariae* + *P. georginae* en una politomía junto con *P. herrerae*, *P. lawsonii*, *P. lumholtzii*, *P. patula*, *P. pringlei*, *P. tecunumanii* y *P. teocote*; este grupo de especies es recuperado como parafilético con respecto a las especies del grupo *Taeda*. En el grupo *Taeda* se recupera a *P. pungens*, *P. rigida*, *P. serotina* y *P. taeda* en una politomía (Figura 8).

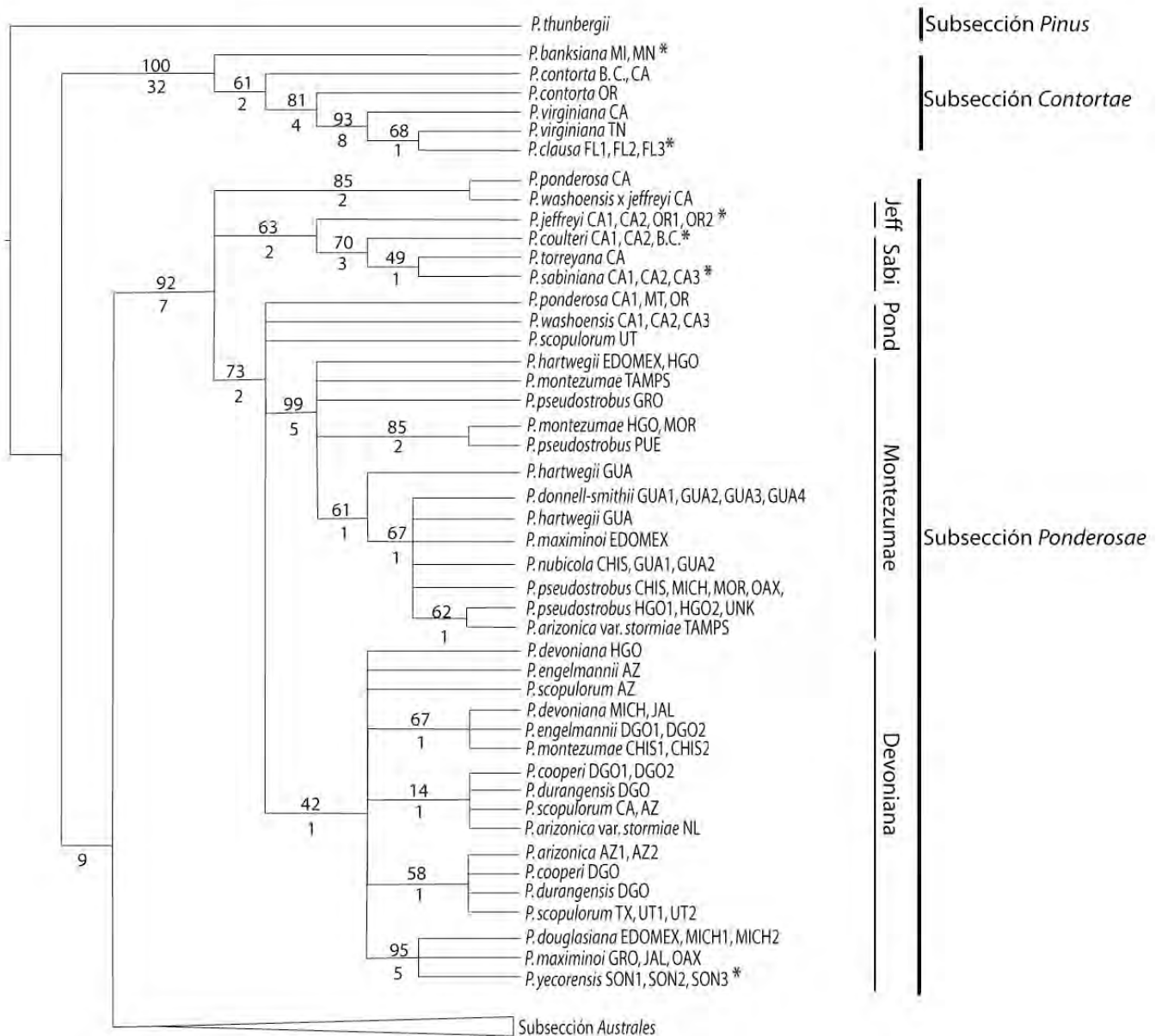


Figura 7. Consenso estricto para las especies de la sección *Trifoliae*, con énfasis en los taxones terminales de las subsecciones *Contortae* y *Ponderosae*. El grupo externo a la sección *Trifoliae* es *Pinus thunbergii* de la sección *Pinus*, subgénero *Pinus*. Consenso estricto de 6,351 árboles más parsimoniosos, con una longitud de 576 pasos, IC= 0.807, ICexc= 0.706 e IR= 0.973. Los valores de bootstrap basados en 10,000 réplicas se muestran en la parte superior de la rama cercana a los nodos y en la parte inferior los valores de decaimiento. Del lado derecho del cladograma se indican las principales agrupaciones. Los asteriscos indican especies recuperadas como monofiléticas.

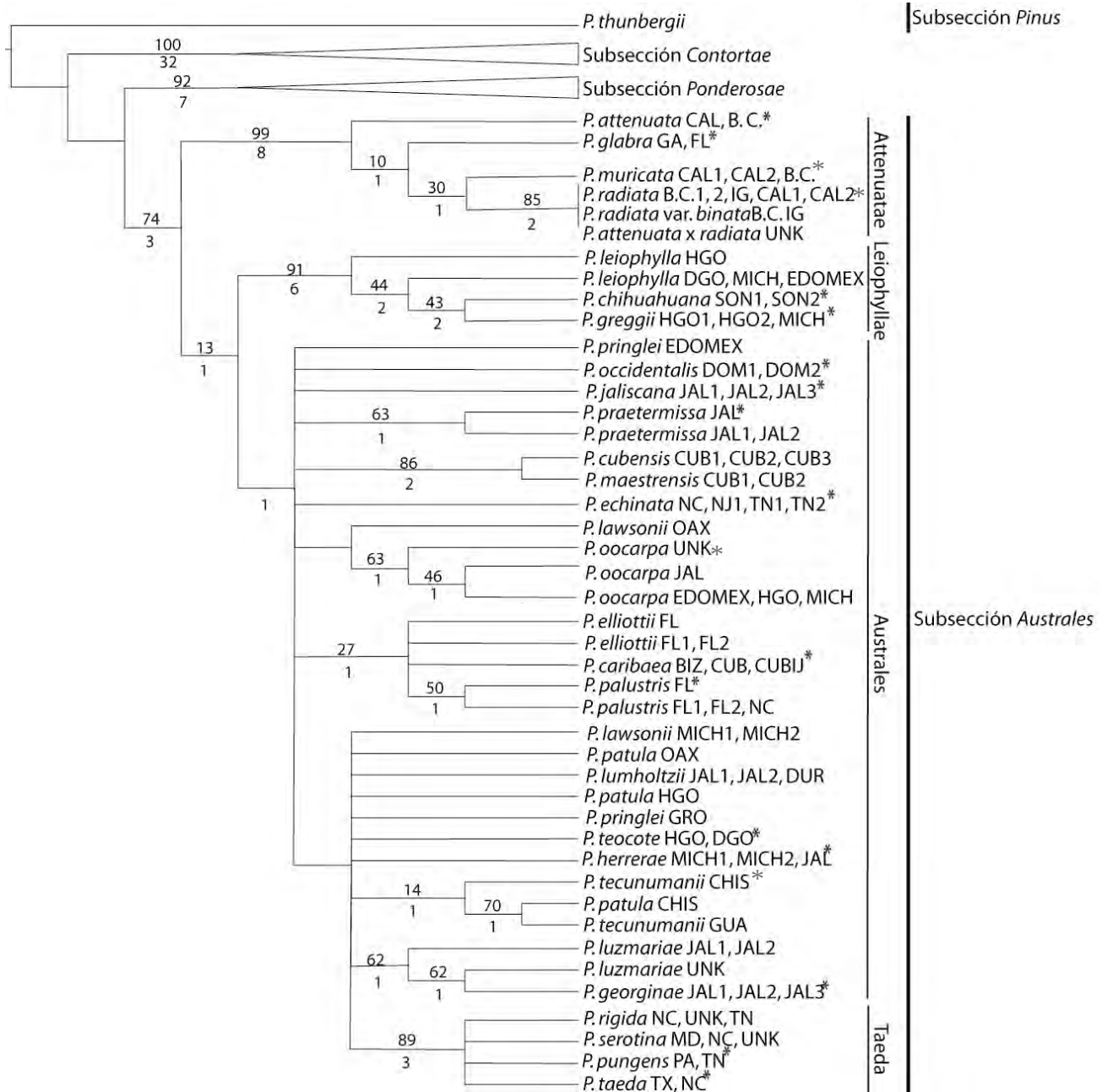


Figura 8. Consenso estricto para las especies de la sección *Trifoliae*, con énfasis en los taxones terminales de la subsección *Australes*. El grupo externo a la sección *Trifoliae* es *Pinus thunbergii* de la sección *Pinus*, subgénero *Pinus*. Consenso estricto de 6,351 árboles más parsimoniosos, con una longitud de 576 pasos, IC= 0.807, ICexc= 0.706 e IR= 0.973. Los valores de bootstrap basados en 10,000 réplicas se muestran en la parte superior de la rama cercana a los nodos y en la parte inferior los valores de decaimiento. Del lado derecho del cladograma se indican las principales agrupaciones. Los asteriscos indican especies recuperadas como monofiléticas.

Monofilia de secuencias de cpDNA por especie en la sección *Trifoliae*

En la subsección *Contortae*, *P. banksiana* y *P. clausa* son monofiléticas, mientras que *P. contorta* y *P. virginiana* se recuperan como especies parafiléticas. No se encontró ningún caso de especies polifiléticas en esta subsección (Figura 7, Tabla 5). En la subsección *Ponderosae* los individuos de *P. jeffreyi* son monofiléticos. Un híbrido artificial *P. washoensis* × *jeffreyi* se recupera como cercanamente relacionado a un individuo de *P. ponderosa*.

Dentro del grupo o clado Sabiniana *P. coulteri* y *P. sabiniana* aparecen como especies monofiléticas. La otra especie de este grupo, *P. torreyana*, solo cuenta con un individuo por lo que se requiere de mayor muestreo para evaluar su monofilia. En el clado *Ponderosae* los individuos de *P. washoensis* y *P. ponderosa* se recuperan como no resueltos en una politomía que incluye un individuo de *P. scopulorum*.

Tabla 5. Sumario de los patrones intraespecíficos de DNA del plástido que afectan la monofilia alélica y la identificación de especies. La monofilia haplotípica fue determinada a partir de un árbol más parsimonioso de la búsqueda heurística. Se considera que las especies son diagnósticables si todos los individuos muestreados difieren del resto de las especies por al menos la sustitución de un nucleótido.

Subsección	Especies representadas por mas de un individuo	Número de haplotipos	Monofilia de especies (%)	Especies diagnosticables (%)
<i>Australes</i>	22/26	54	12 (55%)	18 (82%)
<i>Contortae</i>	4/4	9	1 (25%)	2 (50%)
<i>Ponderosae</i>	17/17	29	4 (24%)	4 (24%)
TOTAL	43/47	92	17 (40%)	24 (56%)

En el clado Montezumae *P. hartwegii*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* son especies polifiléticas. Dentro del grupo Montezumae se recuperan, un individuo de *P. maximinoi* y un individuo de *P. arizonica* var. *stormiae*; mientras que el resto de los individuos de estas especies aparecen dentro del grupo Devoniana.

Dentro del clado Devoniana, *Pinus arizonica*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. devoniana*, *P. engelmannii* y *P. scopulorum* son polifiléticos. Los individuos asignados morfológicamente a las especies anteriores se recuperan en clados diferentes, aunque pobremente soportados; en este grupo también aparece un individuo de *P. montezumae*, mientras que el resto de los individuos de esta especie se recuperan dentro del grupo Montezumae.

El clado que incluye *P. douglasiana*, *P. maximinoi* y *P. yecorensis*, es el único con altos valores de soporte dentro del grupo Devoniana. En este clado se recuperan a los individuos de *P. douglasiana* y *P. maximinoi* en una politomía, mientras que *P. yecorensis* es recuperada como una especie monofilética (Figura 7, Tabla 5).

Dentro de la subsección *Ponderosae* es común observar que las especies se recuperan como polifiléticas. Los individuos asignados morfológicamente a una especie aparecen con individuos asignados a otras especies. En esta subsección es menos común observar especies monofiléticas, parafiléticas o no resueltas.

En la subsección *Australes* dentro del grupo *Attenuatae* *P. attenuata*, *P. glabra*, *P. muricata* y *P. radiata* (incluyendo un híbrido artificial *P. attenuata* × *radiata*) se recuperan como especies monofiléticas. Entre las especies del grupo *Leiophyllae* *P. chihuahuana* y *P. greggii* aparecen como especies monofiléticas mientras que *P. leiophylla* se recupera como una especie parafilética.

En el clado *Australes* las siguientes especies son monofiléticas: *P. caribaea*, *P. echinata*, *P. georginae*, *P. herrerae*, *P. jaliscana*, *P. occidentalis*, *P. oocarpa*, *P. palustris*, *P. praetermissa*, *P. tecunumanii* y *P. teocote*. Los individuos de *P. cubensis* y *P. maestrensis* forman una politomía, que claramente se diferencia tanto de *P. caribaea* como de *P. occidentalis*. *Pinus luzmariae* aparece como parafilética respecto de *P. georginae*, esta última especie aparece como monofilética. *Pinus caribaea* y *P. palustris* dos especies monofiléticas se encuentran formando una politomía con los individuos de *P. elliottii*. El resto de las especies del grupo *Australes* forman una politomía. Finalmente dentro de la subsección *Australes* en el grupo *Taeda* *P. pungens* y *P. taeda* son monofiléticos mientras que *P. rigida* y *P. serotina* aparecen como dos especies no resueltas.

Para las especies de la subsección *Australes* es común observar que las especies se recuperan como monofiléticas, parafiléticas o no resueltas. En esta subsección no existe ningún caso de especies polifiléticas (Figura 8, Tabla 5).

Caracterización de los datos morfológicos

La matriz combinada incluyó once caracteres morfológicos foliares y 5,151 p.b. de DNA del genoma del cloroplasto como caracteres moleculares, con un total de 5,163 caracteres, para 34 muestras del grupo interno y 1 muestra del grupo externo (*P. thunbergii*). Los datos moleculares corresponden a las secuencias de las regiones del cloroplasto empleadas en el análisis filogenético molecular de este trabajo.

La búsqueda heurística recuperó dos árboles más parsimoniosos de 520 pasos, con un IC= 0.819 y un IR=0.888. En el consenso estricto se recuperan las subsecciones *Austroales*, *Contortae* y *Ponderosae* como monofiléticas, con altos valores de soporte (Figura 9). Para el caso de la subsección *Austroales* se recuperan los nodos correspondientes a los grupos *Attenuatae*, *Austroales*, *Leiophyllae* y *Taeda* mientras que dentro de la subsección *Ponderosae* se recuperan los nodos correspondientes a los grupos *Sabinianae*, *Ponderosae*, *Devoniana* y *Montezumae* (Gernandt *et al.*, 2009).

Mapeo de caracteres foliares

Los caracteres foliares mapeados sobre el consenso estricto obtenido a partir del análisis combinado se muestran en la Figura 9.

Los siguientes caracteres son altamente homoplásticos debido a que surgen múltiples veces en eventos independientes en la filogenia y no caracterizan linajes particulares de la sección *Trifoliae*:

- Número de acículas por fascículo
- Vaina basal del fascículo
- Espesor de las paredes de las células de la hipodermis
- Número de canales resiníferos
- Posición de los canales resiníferos
- Paredes de las células de la endodermis

Mientras los siguientes caracteres pueden estar asociados a grupos particulares, aun cuando presentan homoplasia en menor grado:

- Intrusiones hipodermales. Están ausentes en las especies de la subsección *Contortae* y la subsección *Austroales*, así como el grupo *Montezumae* de la

subsección *Ponderosae*. Las intrusiones hipodermales están presentes en los grupos *Ponderosae*, *Devoniana* y *Sabiniana* de la subsección *Ponderosae*.

- Intrusiones hipodermales. Debido a que no están presentes en las subsecciones *Contortae*, *Australes* ni el grupo *Montezumae* de la subsección *Ponderosae*; en dichos grupos los estados de este carácter son inaplicables. Sin embargo, las intrusiones hipodermales en el mesofilo que no tocan la epidermis son característicos de los grupos *Sabiniana*, *Ponderosae* y *Devoniana* de la subsección *Ponderosae*, las intrusiones hipodermales que tocan la endodermis caracterizan a dos especies cercanamente relacionadas, *P. douglasiana* y *P. maximinoi*.
- Haces vasculares. En todas las especies del subgénero *Pinus* existe la tendencia de presentar dos haces vasculares claramente separados como es el caso para las especies de las subsecciones *Contortae* y *Ponderosae*. Sin embargo, existe un mayor grado de fusión de los haces vasculares en algunas especies de la subsección *Australes*.

Los siguientes caracteres parecen no ser informativos a este nivel debido a que se encuentran en todas las muestras salvo muy pocas excepciones

- Esclerenquima en la región vascular (ausente en el grupo *Taeda* de la subsección *Australes*)
- Cristales en el floema

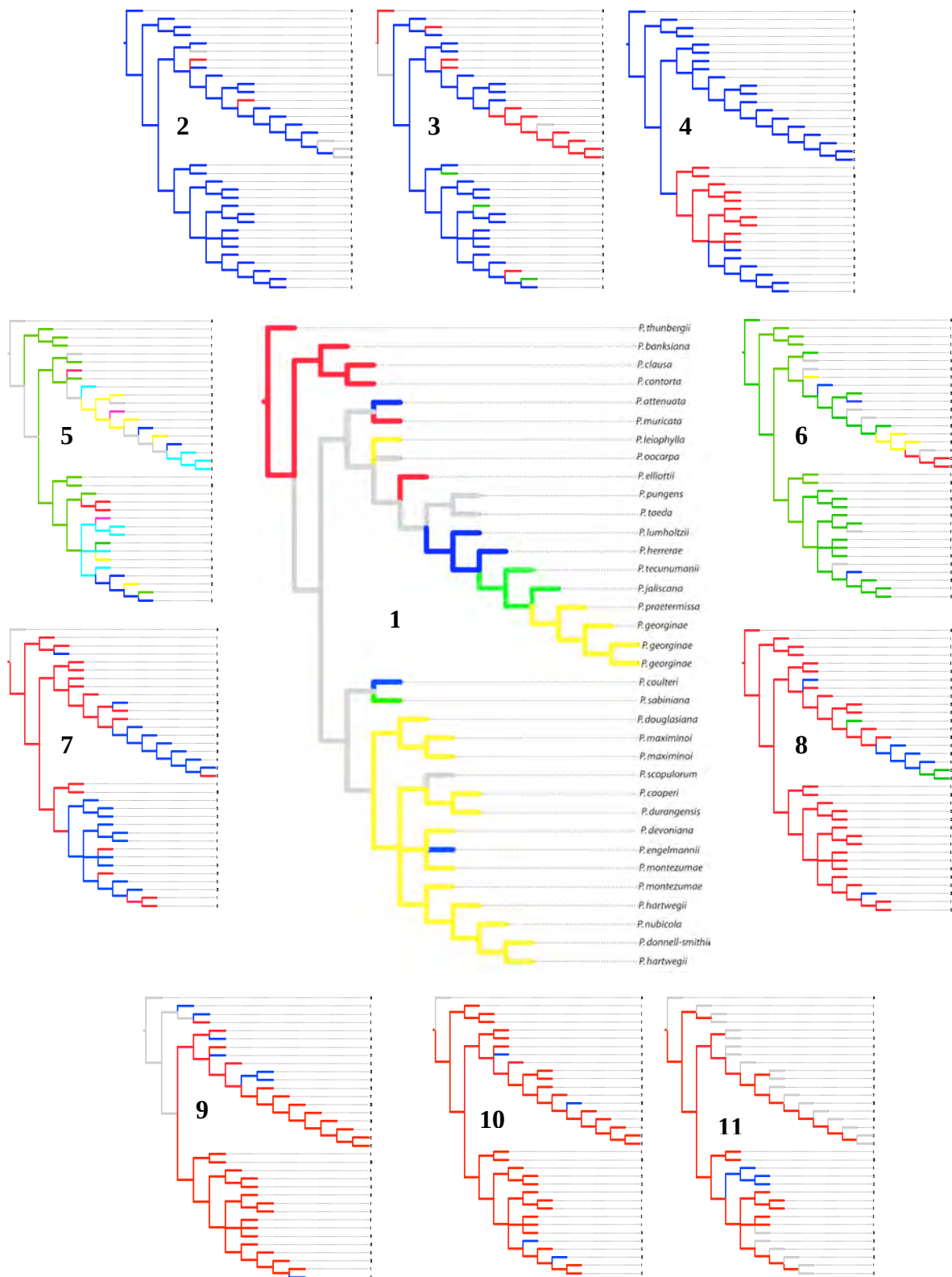


Figura 9. Caracteres mapeados en el consenso de dos árboles más parsimoniosos obtenidos de la búsqueda heurística. El número en cada cladograma indica el carácter y el color sus estados. **1. Número de acículas por fascículo** (*) Dos (*) Tres (*) Cuatro (*) Cinco; **2. Vaina basal del fascículo** (*) Persistente (*) Decidua; **3. Espesor de las paredes de las células de la hipodermis** (*) Uniformes (*) Biformes (*) Multifurcadas; **4. Intrusiones hipodermis** (*) Presentes (*) Ausentes; **5. Número de canales resiníferos**

(*) Cero (*) Uno (*) Dos (*) Tres (*) Cuatro (*) Seis (*) Siete (*) Ocho (*) Catorce; **6. Posición de los canales resiníferos** (*) Externa (*) Interna (*) Media (*) Septal; **7. Paredes de las células de la endodermis** (*) Uniformemente engrosadas (*) Externamente engrosadas; **8. Haces vasculares** (*) Separados (*) Conados (*) Fusionados; **9. Esclerenquima en la región vascular** (*) Presente (*) Ausente; **10. Cristales en el floema** (*) Presentes (*) Ausentes; **11. Intrusiones hipodermiales** (*) En el mesofilo (*) En el mesofilo tocando la endodermis. (*) Representa ambigüedad.

DISCUSIÓN

Marcadores moleculares

Las regiones secuenciadas en este estudio han sido previamente usadas para reconstrucción filogenética en el género *Pinus*. Estudios previos (Geada-Lopez *et al.*, 2002; Gernandt *et al.*, 2005), han probado la utilidad de las regiones códicantes *matK* y *rbcL* del genoma del cloroplasto para recuperar linajes y esquemas de sus relaciones filogenéticas en el género, con una limitada resolución de las relaciones interespecíficas por debajo de subsección. Por otro lado el espaciador *trnH-psbA* ha demostrado tener variación filogenéticamente útil (Kress y Erickson, 2007); sin embargo, esta región no ha sido incorporada en análisis filogenéticos moleculares del género, una limitación importante de esta región es la dificultad para ser amplificada en grupos particulares por ejemplo en la subsección *Contortae* de la sección *Trifoliae*. El espaciador *trnH-psbA* es una región propuesta como complemento de las regiones codificantes *matK* y *rbcL* como código de barras genético en plantas (Janzen, 2009).

Estudios previos en la subsección *Ponderosae* sugieren una gran cantidad de variación interespecífica, tanto del espaciador *trnD-trnY-trnE* como de la región codificante *ycf1* (Gernandt *et al.*, 2009; Parks *et al.*, 2009). *Ycf1* es un gen esencial y de función desconocida (Drescher *et al.*, 2000); en el género *Pinus* esta región presentan una gran cantidad de variación filogenéticamente informativa y parece estar bajo selección positiva a nivel molecular debido a la presencia de un gran número de sustituciones no sinónimas (Parks *et al.*, 2009).

En combinación las regiones utilizadas en este estudio han logrado recuperar un mayor grado de resolución filogenética entre las especies de la sección *Trifoliae*, permitiendo un mejor entendimiento de las relaciones del parentesco interespecífico por debajo del nivel de subsecciones, con base en secuencias de DNA del cloroplasto.

Relaciones filogenéticas en la sección *Trifoliae*

Duhamel (1755) propuso la sección *Trifolis* para acomodar las especies del sureste de América del Norte con tres acículas por fascículo, incluyendo *P. palustris* (Gernandt *et al.*, 2005). Little y Critchfield (1969) dividieron a los miembros de la sección *Trifoliae* entre la sección *Pinea* (subsección *Leiophyllae*) y la sección *Pinus* (subsecciones *Australes*, *Ponderosae*, *Sabinianae*, *Contortae* y *Oocarpae*). Van der Burgh (1973) separó *P. leiophylla* y *P. lumholtzii* en dos secciones dentro de su sección *Pinaster* pero retuvo *P. leiophylla* como una sección monotípica separada (Price *et al.*, 1998). En este trabajo se recuperan a las subsecciones *Australes*, *Contortae* y *Ponderosae* como monofiléticas y con altos valores de soporte. Las tres subsecciones o linajes de la sección *Trifoliae* han sido recuperadas de manera consistente en estudios moleculares previos, tanto con marcadores del genoma del cloroplasto (Krupkin *et al.*, 1996; Geada *et al.*, 2002; Gernandt *et al.*, 2005; Parks *et al.*, 2009) como con marcadores del núcleo (Liston *et al.*, 1999; Syring *et al.*, 2005).

El esquema de relaciones a nivel de subsecciones en el que las subsecciones *Australes* y *Ponderosae* son el grupo hermano de la subsección *Contortae*, es consistente con estudios anteriores basados en marcadores del genoma del cloroplasto. Sin embargo, estudios filogenéticos moleculares basados en marcadores nucleares (Strauss y Doerksen, 1990) recuperan a las subsecciones *Australes* y *Contortae* como el grupo hermano de la subsección *Ponderosae*. Cuando se llevan a cabo análisis filogenéticos con base en loci nucleares de una sola copia, el esquema de relaciones entre las tres subsecciones de *Trifoliae* reflejan las relaciones recuperadas con DNA del cloroplasto, aunque con valores bajos de soporte (Syring *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que el esquema de relaciones recuperado con base en marcadores del genoma del cloroplasto no refleja la filogenia de los linajes de *Trifoliae*, lo cual es consistente con evidencia adicional de morfología e hibridación artificial (Krupkin *et al.*, 1996; Liston *et al.*, 1999); por lo cual se ha propuesto que la posición de la subsección *Contortae* puede ser resultado tanto de atracción de ramas largas (Bergsten, 2005) como de captura de cloroplasto resultado de introgresión (Rieseberg y Soltis, 1991). Por otro lado Geada López *et al.* (2002) sugieren que la posición de la subsección *Contortae* en filogenias con base en marcadores del cloroplasto es robusta, tanto cuando se utiliza el

criterio de parsimonia, así como cuando se emplean otros criterios de optimización tales como neighbor-joining o máxima verosimilitud, métodos que son menos sensibles a atracción de ramas largas (Felsenstein, 2004; Bergsten, 2005). Así que existe la posibilidad de que la posición de la subsección *Contortae* en árboles filogenéticos a partir de DNA del cloroplasto refleje mejor su historia evolutiva que estudios basados total o parcialmente en datos nucleares (Gernandt *et al.*, 2005).

La resolución de las relaciones filogenéticas por debajo del nivel de subsección recuperada en este estudio es mayor con respecto a estudios anteriores e incorpora individuos múltiples por especie; sin embargo, las relaciones recuperadas entre las cuatro especies de la subsección *Contortae* pudiera modificarse al incorporar más caracteres variables informativos. En la subsección *Ponderosae*, las relaciones entre los clados *Sabiniana*, *Ponderosae*, *Devoniana*, *Montezumae* y el grado *Jeffreyi* corresponden con las descritas anteriormente por Gernandt *et al.* (2009). Este estudio es complementario ya que incorpora una mayor cantidad de muestreo y una mayor cantidad de marcadores para las especies de esta subsección.

Dentro de la subsección *Austroales* se recuperó un primer linaje con altos valores de soporte, que corresponde parcialmente con la subsección *Attenuatae* de Van der Burgh (Price *et al.*, 1998; Gernandt *et al.*, 2005) que originalmente incluyó a *P. attenuata*, *P. muricata* y *P. radiata*. Esta agrupación también fue recuperada en análisis previos de secuencias de DNA del cloroplasto (Krupkin *et al.* 1996; Geada López *et al.*, 2002) y DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD; Dvorak *et al.*, 2000). Los resultados de este estudio recuperan un linaje que incluye a las especies comúnmente clasificadas en la subsección *Attenuatae* junto con *P. glabra*; especie generalmente considerada como cercanamente relacionada a las especies de la subsección *Austroales* Loudon (Little y Critchfield 1969; Price *et al.*, 1998).

Price *et al.* (1998) clasificaron a *P. leiophylla* (con dos variedades, var. *leiophylla* y var. *chihuahuana*) con *P. lumholtzii* en la subsección *Leiophyllae* Loudon; debido principalmente a que estas son las únicas especies con vainas de los fascículos deciduas clasificadas en el subgénero *Pinus*. De acuerdo a los resultados de este estudio *P. leiophylla* es el grupo hermano de *P. chihuahuana*+*P. greggii*; mientras que *P. lumholtzii*

se recupera en una politomía que incluye otras especies de la subsección *Australes* (Figura 8).

La estrecha relación entre *P. elliotii*, *P. caribaea* y *P. palustris* recuperada en este estudio (aunque con valores bajos de soporte) ha sido recuperada de manera parcial por estudio anteriores mediante análisis filogenéticos de distancias genéticas empleando RAPDs (Dvorak *et al.*, 2000). El clado anterior forma parte de una politomía que además incluye *P. cubensis*, *P. echinata*, *P. jaliscana*, *P. maestrensis*, *P. oocarpa*, *P. oocidentalis*, y *P. praetermissa*.

Dentro de la subsección *Oocarpae*, Price *et al.* (1998) incluyen al grupo “Oocarpae” y al grupo “Teocote”. Estos grupos no pueden ser evaluados debido a falta de resolución filogenética; sin embargo, *P. greggii* incluido en el grupo “Oocarpae” por Price *et al.* (1998) se recupera más cercanamente relacionada con *P. leiophylla* y *P. chihuahuana* que con el resto de las especies incluidas en el grupo “Oocarpae”. Las especies del grupo “Teocote” aparecen en una politomía y las especies clasificadas en este grupo se recuperan como monofiléticas o no resueltas.

El resto de las especies de la subsección *Australes* de México y América Central (*P. georginae*, *P. lawsonii*, *P. lumholtzii*, *P. luzmariae*, *P. patula*, *P. teocote*, y *P. tecunumanii*) aparecen en una politomía que incluye al clado Taeda. El clado Taeda conformado por *P. pungens*, *P. rigida*, *P. serotina* y *P. taeda*, especies del sureste de los E.U.A. ha sido recuperado previamente (Gernandt *et al.*, 2005).

Monofilia de las especies en la sección *Trifoliae*

Algunos casos de especies recuperadas como polifiléticas en el género, han sido previamente documentados con base en secuencias del espaciador transcrito interno del DNA ribosomal nuclear en *Pinus* subsección *Cembroides* (Gernandt *et al.*, 2001) así como para genes nucleares de pocas copias en el subgénero *Strobus* (Syring *et al.*, 2007) y la subsección *Ponderosae* (Willyard *et al.*, 2009); y para regiones del cloroplasto en la subsección *Ponderosae* (Gernandt *et al.*, 2009). Entre los procesos evolutivos propuestos como causantes de especies polifiléticas a partir de DNA del cloroplasto están el sorteo de linajes, la hibridación e introgresión (Syring *et al.*, 2007; Gernandt *et al.*, 2009; Willyard *et al.*, 2009).

En este estudio (Tabla 5) los individuos múltiples por especies de la subsección *Contortae* fueron monofiléticos o parafiléticos. Para los individuos múltiples de cada especie de la subsección *Ponderosae* la polifilia fue común con excepción de las tres especies del grupo Sabiniana (*P. coulteri*, *P. sabiniana* y *P. torreyana*), *P. jeffreyi* y *P. yecorensis*. La polifilia en las especies de la subsección *Ponderosae* con base en genes nucleares de pocas copias ha sido reportada previamente (Willyard *et al.*, 2009). En contraste, en la subsección *Australes* la monofilia por especie es común y no existió ningún caso de polifilia entre las especie de esta subsección.

La falta de caracteres variables y por lo tanto de resolución filogenética en niveles menos inclusivos da lugar a politomías que incluyen individuos de diferentes especies. En tales politomías no es posible evaluar la condición de monofilia, parafilia o polifilia por especie. Los individuos de una especie recuperados como monofiléticos o parafiléticos (por ejemplo los individuos de *P. luzmariae* respecto de *P. georginae*) pueden ser evidencia de linajes diferenciados tanto morfológica como genéticamente, mientras que los individuos de una especies recuperados como polifiléticos (individuos de una especie que aparecen en clados bien soportados con individuos de otra especie) indican linajes morfológicamente diferenciados con evidencia genética de procesos evolutivos tales como sorteo de linajes, hibridación o introgresión (Wendel y Doyle, 1998).

Estimados recientes de tiempos de divergencia para los principales linajes del género basados en datos moleculares y registro fósil, a partir de dos calibraciones de 45 y 85 millones de años para la divergencia entre de los dos subgéneros de *Pinus*, sugieren que la sección *Trifoliae* es uno de los linajes más jóvenes del género con un tiempo de divergencia aproximado de entre 9 y 18 millones de años (Willyard *et al.*, 2007). El tiempo estimado para la divergencia de la subsección *Contortae* es de entre 8 y 15 millones de años y el de las subsecciones *Australes* y *Ponderosae* es de entre 7 y 13 millones de años. Se ha propuesto una asociación entre la no monofilia de las especies causada por eventos de sorteo de linajes, hibridación e introgresión en linajes de reciente divergencia como es el caso para las especies de la subsección *Ponderosae* y *Australes* (Syring *et al.*, 2007; Gernandt *et al.*, 2009; Willyard *et al.*, 2009). Sin embargo, de acuerdo a los resultados de este estudio, existe un contraste entre estas dos subsecciones

en cuanto al número de especies que se recupera como monofiléticas, parafiléticas o polifiléticas (Figuras 7 y 8). Estimados temporales más finos que permitan conocer tiempos de divergencia de linajes dentro de la sección *Trifoliae*, permitirán evaluar una posible asociación entre tiempos de divergencia y número de especies recuperadas como monofiléticas.

Conceptos de especies en la sección *Trifoliae*

Price *et al.* (1998) publicaron una lista de especies de *Pinus* pero advierten que puede estar sujeta a cambios conforme se lleven a cabo estudios moleculares en detalle en grupos críticos de especies, especialmente dentro de las floras de pinos altamente complejas de México y el este de Asia. Dentro del género *Pinus* la delimitación de especies aún está en desarrollo. El trabajo de Gernandt *et al.* (2009) en la subsección *Ponderosae* sugiere que la evidencia de los resultados filogenéticos moleculares junto con datos morfológicos y estudios de compatibilidad reproductiva previos, pueden ayudar a una mejor delimitación de las especies.

A partir de análisis filogenéticos moleculares que incluyan múltiples individuos por especie, se puede aportar evidencia de diferenciación genética para el reconocimiento de ciertos linajes a nivel de especies. En la sección *Trifoliae* existen diversos taxones que han sido sinonimizados o descritos como variedades morfológicas o geográficas que requieren de una reevaluación cuando se incorporan fuentes adicionales de evidencia (Farjon y Styles, 1997).

A continuación se discute evidencia del DNA del plastidio generada en este estudio más evidencia morfológica y de otras fuentes independientes de información, propuesta por autores previos para sustentar el reconocimiento o no de ciertos taxones a nivel específico en la sección *Trifoliae*. La integración de diferentes fuentes de información es de suma importancia para inferir los límites de las especies y tener más estabilidad en el número de especies reconocidas en los diferentes linajes del género *Pinus*.

Subsección *Contortae*

Dentro de la subsección *Contortae* las cuatro especies reconocidas tradicionalmente, *P. banksiana*, *P. contorta*, *P. clausa* y *P. virginiana*, se recuperan como linajes genéticamente diferenciados lo cual es congruente con su estatus de especies planteado morfológicamente.

Subsección *Ponderosae*

La circunscripción de las especies de la subsección *Ponderosae* respecto a la evidencia del genoma del cloroplasto y en combinación con datos morfológicos previos fue previamente revisada en Gernandt *et al.* (2009). En este trabajo se incorporaron secuencias e individuos adicionales para algunas especies. Sin embargo, no existen diferencias sustanciales y, en general, los resultados son similares. Solo las especies del grupo *Sabinianae* se recuperan como monofiléticas. Los tres individuos de *P. yecorensis* también forman un clado monofilético bien soportado y claramente diferenciado de *P. douglasiana* y *P. maximinoi*, confirmando la diferenciación de este último linaje con respecto a especies cercanamente relacionadas (ver Gernandt *et al.*, 2009; Figura 7).

Subsección *Austerales*

Pinus chihuahuana* y *P. leiophylla

Algunos autores reconocen *P. leiophylla* var. *chihuahuana* y *P. leiophylla* var. *leiophylla* (Fajon y Styles, 1997; Price *et al.*, 1998); sin embargo, otros autores tales como Martínez (1945) y Perry (1991) han reconocido a *P. leiophylla* y *P. chihuahuana* como dos especies distribuidas en la Sierra Madre Occidental de México. Martínez (1945) que mantuvo separados estos dos taxones en el rango de especie, sugiere que *P. chihuahuana* en la parte sur de su rango se une con *P. leiophylla* de tal manera que es difícil distinguir entre ambas especies. Farjon y Styles (1997) sugieren que la diferencia entre estas dos especies son solo caracteres foliares cuantitativos y proponen el rango de variedad para estos dos linajes, también comentan que se ha observado que en diferentes partes de Durango los dos taxones retienen sus diferencias a lo largo de grandes extensiones aún en áreas donde se encuentran cercanamente distribuidas, pero admiten

que es necesaria una valoración más detallada que incluya datos genéticos en la estimación de las relaciones entre estos dos taxones y sus parientes putativos. Estudios basados en información de flavonoides foliares también apoyan la diferenciación entre estas dos especies (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006). En este estudio se recuperan dos linajes genéticamente diferenciados que corresponden con *P. leiophylla* y *P. chihuahuana*. Estas dos especies aparecen cercanamente relacionadas. Sin embargo, *P. chihuahuana* aparece como más cercanamente relacionada a *P. greggii* que a *P. leiophylla*. En conjunto los datos morfológicos y de distribución presentados anteriormente junto con evidencia de diferenciación genética recuperada en este estudio sugieren el reconocimiento de estos taxones a nivel de especie.

Pinus cubensis* y *P. maestrensis

En la región del Caribe la mayoría de los autores reconocen la existencia de cuatro especies pertenecientes a la sección *Trifoliae*, *P. caribaea*, *P. cubensis*, *P. elliottii* y *P. occidentalis* (Farjon y Styles, 1997; 2005; Eckenwalder, 2009); sin embargo, existe controversia en cuanto a la existencia de otro linaje *P. maestrensis*. Esta especie ha sido sinonimizada con base en datos morfológicos con *P. cubensis* (Farjon y Styles, 1997; Price *et al.*, 1998) o tratada como una variedad de *P. occidentalis* (Farjon y Styles, 1997; Eckenwalder, 2009). Geada López *et al.* (2002) con base en análisis filogenéticos de secuencias de DNA de cloroplasto recuperan en una politomía a *P. maestrensis* y *P. cubensis* dicho clado esta claramente separado del resto de las especies de la subsección *Australes*. Por otro lado Jardon-Barbolla *et al.* (2010) mediante análisis poblacionales con el uso de SSRs (microsatélites del cloroplasto) recuperan a *Pinus cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis* en un mismo grupo como resultado de Análisis Bayesiano de Estructura Poblacional, pero sugieren sorteo de linajes aparente entre *P. cubensis* y *P. maestrensis*. Tanto Geada López *et al.* (2002) como Jardon-Barbolla *et al.* (2010) recuperan poca o nula diferenciación entre estas dos especies.

En el análisis filogenético presentado en este trabajo se recuperan a los individuos de *P. cubensis* en una politomía junto con los individuos de *P. maestrensis*, lo cual además de indicar su estrecha relación sugiere la ausencia de diferenciación genética. En contraste existe una marcada diferenciación de *P. cubensis*+*P. maestrensis* respecto del

resto de las especies del Caribe. La falta de diferenciación genética recuperada en este estudio más la falta de diferenciación morfológica y genética sugerida por estudios previos, constituye evidencia para no reconocer a *P. maestrensis* en un nivel específico e incluirla como una sinonimia de *P. cubensis* que se distribuye en la Sierra Maestra de Cuba.

Pinus tecunumanii

Pinus tecunumanii fue descrita con el rango de especie; sin embargo, algunos autores han reconocido a este taxón como una subespecie de *P. patula* (*P. patula* subsp. *tecunumanii*) o como una variedad de *P. oocarpa* (*P. oocarpa* var. *ochoteranae*). En un estudio detallado de este taxón, Styles y McCarter (1988) sugiere que existe dificultad para diferenciar entre *P. oocarpa* y *P. tecunumanii* en elevaciones medias (900-1600m) o en sitios donde se encuentran ambas especies. Por esta razón mantienen la clasificación de Styles (1984) donde se reconoce a este taxón como subespecie de *P. patula* pero sugieren que su estatus es aún controversial. Squillace y Perry (1992) empleando compuestos de terpeno como principal fuente de caracteres mantienen el estatus específico de *P. tecunumanii*. Por otro lado Farjon y Styles (1997) consideran prudente reconocer estos dos taxones en su rango original de especie hasta que sus relaciones con *P. oocarpa* y *P. patula* incluidas sus respectivas variedades se clarifiquen. Los resultados de este estudio recuperan a *P. tecunumanii* como una especie monofilética y claramente diferenciada de *P. oocarpa* y *P. patula*, por lo que considerando la información previa es conveniente reconocer a *P. tecunumanii* como una especie.

Pinus georginae* y *P. luzmariae

Hasta el momento no existe controversia en reconocer a *Pinus luzmariae* y *P. georginae* como dos linajes separados pero al ser dos especies recientemente descritas (Pérez de la Rosa, 1998; 2009) no habían sido incluidas en estudios filogenéticos moleculares previos. De acuerdo con los resultados de este estudio son dos especies genéticamente y morfológicamente diferenciadas por lo cual es importante incluirlas en revisiones o estudios filogenéticos a nivel del género.

Rasgos foliares en la sección *Trifoliae*

Encontrar sinapomorfias morfológicas que caractericen linajes recuperados en la sección *Trifoliae* a partir de análisis filogenéticos moleculares o combinados, permitirá la asignación y clasificación de las especies a dichos linajes de una manera no ambigua (Gernandt *et al.*, 2005). Considerando los datos moleculares y morfológicos de este estudio de manera separada, es evidente que los datos moleculares proporcionan el mayor número de caracteres variables informativos y por lo tanto dan la estructura general del consenso estricto sobre el cual se lleva a cabo el mapeo de los caracteres morfológicos (Figura 9).

En el mapeo de caracteres morfológicos sobre el consenso estricto resultado del análisis filogenético combinado, muchos caracteres son altamente homoplásticos. Sin embargo, este tipo de caracteres pudieran ser informativos y caracterizar grupos de especies a niveles menos inclusivos por ejemplo: el número de hojas por fascículo (Gernandt *et al.*, 2005), la vaina del fascículo decidua, las intrusiones hipodermales, la posición de los canales resiníferos (Fajon y Styles, 1997, Martínez, 1945). En combinación ciertos caracteres parecen tener mayor utilidad para la asignación de especies a grupos; por ejemplo la presencia de intrusiones hipodermales, más los canales resiníferos medios caracterizan a los clados Sabinianae, Ponderosae y Devoniana de la subsección *Ponderosae*.

Los rasgos morfológicos foliares que presentan una mayor homoplasia pueden estar fuertemente influenciados por el ambiente (por ejemplo, el tipo de hipodermis, el número de canales resiníferos y el grosor de las paredes externas de las células endodermales), mientras que otros caracteres en los que no existe variación y parecen ser mas constantes (por ejemplo, dos haces vasculares (Price *et al.*, 1998; Gernandt *et al.*, 2005), presencia de esclerénquima y presencia de cristales en el floema), pueden representar caracteres ampliamente distribuidos en las especies del subgénero *Pinus* o el género *Pinus*.

A continuación se hacen comentarios adicionales de rasgos morfológicos foliares particulares que se consideran relevantes para las especies y linajes de la sección *Trifoliae*.

Intrusiones hipodermales

En este estudio se propone que dos condiciones deben ser evaluadas con respecto a las intrusiones hipodermales, por un lado su presencia o ausencia y por otro cuando está presente si toca o no la endodermis. Diferentes autores han sugerido diferentes grados de intrusiones hipodermales en el mesófilo (Martínez, 1945; Farjon y Styles, 1997). De acuerdo a los resultados de este estudio la presencia de intrusiones hipodermales está asociada a las especies de la subsección *Ponderosae*, excepto en el grupo *Montezumae*.

La segunda condición cuando las intrusiones hipodermales están presentes, refleja si estas tocan o no las células de la endodermis. Las intrusiones hipodermales que tocan las células de la endodermis han sido ampliamente documentadas para *P. douglasiana* y *P. maximinoi* (Martínez, 1945; Farjon y Styles, 1997) que de acuerdo a la hipótesis filogenética de este estudio constituyen dos especies estrechamente relacionadas. La estrecha relación de estas dos especies sugiere un origen común para esta condición que representa la única sinapomorfia morfológica que caracteriza linajes dentro de la sección *Trifoliae*.

Vaina basal del fascículo

La subsección *Trifoliae* incluye las dos únicas especies de pinos duros con la vaina basal del fascículo decidua: *Pinus leiophylla* y *P. lumholtzii*. La presencia de este carácter ha sido utilizada como base para sugerir la estrecha relación y clasificar estas dos especies en un solo grupo a pesar de sus marcadas diferencias. Las diferencias morfológicas entre *P. leiophylla* y *P. lumholtzii* incluyen, brotes resinosos y no resinosos, acículas en fascículos de 3-5 y 2-3, acículas medianas y largas, número de estomas menor y mayor, hipodermis en las acículas uniforme y multiforme, dos y tres años para el desarrollo de los conos ovulados y cariotipos diferentes (Farjon y Styles, 1997)

Estudios previos han sugerido un origen común de la vaina decidua en estas dos especies (Krupkin *et al.*, 1996; Price *et al.*, 1998; Gernandt *et al.*, 2005). Sin embargo, la hipótesis de relaciones filogenéticas recuperada en este estudio sugiere un origen independiente de la vaina basal del fascículo caediza para *P. leiophylla* y *P. lumholtzii* debido a que estas especies no están cercanamente relacionadas. Algunos esquemas de

relaciones de filogenia han recuperado a *P. leiophylla* y *P. lumholtzii* estrechamente relacionadas y dentro de un grupo monofilético (Krupkin *et al.*, 1996); sin embargo, este esquema de relaciones puede estar asociado con una menor cantidad de muestreo taxonómico.

Si *P. chihuahuana* es reconocida como un linaje diferenciado pero cercanamente relacionado de *P. leiophylla*, dicha condición en este caso si tendría un origen común para estas dos últimas especies. Sin embargo, sería necesaria al menos una reversión al estado vaina basal del fascículo persistente en *P. greggii*. El carácter de la vaina del fascículo caediza es por lo tanto un carácter homoplástico y condiciones intermedias entre los dos estados de este carácter pueden estar presentes en otra especie no cercanamente relacionadas tales como *P. georginae* y *P. lawsonii* donde las vainas de los fascículos son deciduas de manera tardía (Perry, 1991).

Número de canales resiníferos

El número de canales resiníferos es variable en las acículas de algunas especies mientras que en otras es constante (Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997); la variación en el número de canales resiníferos en general parece tener una estrecha relación con el ambiente (Helmers, 1943); sin embargo, en algunas especies el número de canales resiníferos parece ser bastante constante (Cole *et al.*, 2008).

Una alta variación en este carácter sugiere que no puede tomarse como elemento sistemático (Martínez, 1945), lo cual es consistente con los resultados obtenidos en este estudio; por ejemplo se puede observar que las especies de la subsección *Contortae* y el grupo *Sabinianae* de la subsección *Ponderosae* presentan dos canales resiníferos por acícula aunque estos grupos de especies no están directamente relacionados; sin embargo, sus áreas de distribución al suroeste de los Estados Unidos pudieran sugerir condiciones ambientales y ecológicas similares y por lo tanto un cierto grado de influencia ambiental sobre esta característica.

En este estudio también se documentan casos donde no existen canales resiníferos en la acículas, para dos muestras de *P. maximinoi* y una de *P. leiophylla*. La ausencia de canales resiníferos en las acículas es considerada como una condición rara, no asociada

con ninguna especie en particular (*P. donnell-smithii*, puede ser la excepción, ya que muchas acículas se encuentran sin canales resiníferos; Perry, 1991).

Posición de los canales resiníferos

La posición de los canales resiníferos ha sido comúnmente usada para la clasificación e identificación de especies desde Engelmann (1880) y Coulter y Rose (1886). La posición de los canales resiníferos en la acícula es más constante que su número, pero existe cierto grado de polimorfismo en casi todos los taxones para ambos caracteres (Farjon y Styles, 1997). La posición de los canales resiníferos al ser menos variable que el número, puede ser de mayor utilidad sistemática (Martínez, 1945).

En el mapeo de caracteres llevado a cabo en este trabajo se puede observar que la subsección *Contortae* y *Ponderosae* presentan canales resiníferos en posición predominantemente media (*P. durangensis*, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*; Martínez 1945, Fajon y Styles, 1997; Gernandt *et al.*, 2005). En las especies de la subsección *Austroales* existe una mayor diversidad de este carácter y se pueden observar canales resiníferos internos, septales, medios y externos (Internos: *P. pringlei*, *P. herrerae*, etc; Septales: *P. oocarpa*; Martinez, 1992; *P. pringlei*, Shaw, 1914; ver también Gernandt *et al.*, 2005).

Los canales internos son peculiares de los pinos duros de América; su presencia en las especies de Asia y Europa es extremadamente rara (Shaw, 1914). Los canales en posición media son comunes en especies de ambos hemisferios, ya sea de forma única o en asociación con canales en otras posiciones. Los canales resiníferos septales son peculiares de algunas pocas especies (*P. oocarpa*, *P. tropicalis* y menos frecuente en *P. pringlei* y *P. merkusii*). Los canales resiníferos internos y septales parecen estar confinados a especies de países tropicales o cálido-templados (Shaw, 1914).

Los canales resiníferos externos están presentes únicamente en tres especies de pinos de América: *P. resinosa*, *P. tropicalis* y *P. georginae* (Shaw, 1914; Perry, 1991; Perez de la Rosa, 2009); *P. georginae* es la única especie de la sección *Trifoliae* que presenta canales resiníferos externos, carácter que es común entre las especies de pinos duros de Asia y Europa; *P. resinosa* y *P. tropicalis* son las dos únicas especies de pinos duros en América que no pertenecen a la sección *Trifoliae* y se recuperan dentro de la

subsección *Pinus* un grupo de especies distribuidas principalmente en Asia y Europa (Gernandt *et al.*, 2005); ninguna de las posiciones de los canales resiníferos es característica de algún grupo en particular.

En comparación con las cuatro especies de la subsección *Contortae* distribuidas al suroeste de los Estados Unidos, las subsecciones *Ponderosae* y *Australes* tienen un mayor número de especies ampliamente distribuidas en una gran diversidad de ambientes; sin embargo como se mencionó anteriormente en la subsección *Ponderosae* la posición de los canales resiníferos es predominantemente media mientras que en la subsección *Australes* se pueden observar los cuatro posiciones de los canales resiníferos.

Un origen único para estados de carácter que solo ocurren en la subsección *Australes* dentro de *Trifoliae* como en el caso de los canales resiníferos internos, externos y septales podrá evaluarse con base en hipótesis filogenéticas que presenten mayor resolución de las relaciones interespecíficas. Por ejemplo, los canales septales son característicos de unas pocas especies tales como *P. oocarpa* (Shaw, 1914) y *P. jaliscana* (Farjon y Styles, 1997; Perez de la Rosa 1998), pero, la relación de parentesco entre estas dos especies aun no es clara.

Cristales en el floema

La presencia de cristales en el floema es un carácter que no ha sido reportado en la literatura previamente para las acículas de *Pinus*. La formación de cristales de oxalato de calcio suele estar asociada con ambientes de suelos calcáreos, sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio los cristales en el floema en las acículas están presentes en la mayoría (con raras excepciones) de las especies de la subsección *Trifoliae* a pesar de la diversidad de ambientes en las que dichas especies se distribuyen. Así que la presencia de cristales pudiera estar asociada con el linaje más que a condiciones medioambientales.

Otros caracteres donde no es fácil separar estados de carácter más o menos discretos y que tiene que ver directamente con grosor de paredes celulares, podrán incorporarse de manera más adecuada para análisis filogenéticos a través de mediciones directas que ayuden a discriminar entre estados de carácter.

CONCLUSIONES

En conjunto las regiones empleadas en este estudio para la reconstrucción filogenética con base en caracteres moleculares e individuos múltiples por especie permiten una mayor resolución de las relaciones filogenéticas para las especies de la sección *Trifoliae* y pueden ser evaluadas en otras secciones del género donde las relaciones por debajo del nivel de subsección son poco claras. Estas regiones también permitieron documentar incongruencia filogenética resultado de hibridación e introgresión o sorteo de linajes. La presencia común de incongruencia filogenética para las especies de la subsección *Ponderosae*, sugiere precaución al realizar interpretaciones filogenéticas fuertes con base en individuos únicos por especie o fuentes de caracteres no independientes.

Esta es una primera aproximación a las relaciones filogenéticas que existen entre las especies de la sección *Trifoliae*, caracteres moleculares de otras regiones no ligadas así como estudios que incluyan genomas del cloroplasto para múltiples individuos ayudarán a esclarecer las relaciones filogenéticas incorporando una mayor cantidad de variación y generando un mayor grado de resolución filogenética. Se puede sugerir que en las especies de la sección *Trifoliae* los procesos evolutivos tales como la hibridación, introgresión y el sorteo de linajes causantes de incongruencia filogenética a nivel de individuos han jugado un papel diferencial en la evolución de las especies entre diferentes subsecciones, con un mayor impacto en este caso para las especies de la subsección *Ponderosae*. La documentación de incongruencia filogenética y los posibles procesos que la causan ayudará a entender los límites en inferencia filogenética del género y a diseñar estudios alternativos que nos permitan obtener estimados más precisos de las relaciones filogenéticas interespecíficas en el género.

Antes de que se tenga un tratado global para las especies del género *Pinus* es necesaria la integración en análisis combinados de fuentes de caracteres independientes tanto moleculares como morfológicos. La incorporación de regiones independientes de los diferentes genomas permitirá tener mejores estimados de los procesos que causan incongruencia filogenética a niveles por debajo de subsección en el género. Mientras que la reevaluación e integración de datos morfológicos en la búsqueda de sinapomorfias

morfológicas permitirá una adecuada incorporación del registro fósil, como base para estimar el marco temporal de los linajes en el género.

El reconocimiento de grupos monofiléticos o parafiléticos con base en árboles filogenéticos que incorporan múltiples individuos por especie, son una fuente importante de evidencia para inferir los límites de las especies, al determinar de manera objetiva la transición entre la variación intra e interespecífica. La incorporación de información adicional a la monofilia de las especies, provenientes de otras fuentes de evidencia es de utilidad para una adecuada delimitación de especies en el género.

La delimitación basada en el reconocimiento de especies monofiléticas o parafiléticas estará limitada en aquellos casos en los que existe incongruencia filogenética. Aun se requieren estudios enfocados a la delimitación de especies y taxones infraespecíficos utilizando métodos que ayuden de manera objetiva y práctica a inferir los límites de las especies. Una adecuada delimitación de especies permitirá una mayor estabilidad en el número de especies reconocidas para el género.

LITERATURA CITADA

- Almaraz-Abarca N., M. S. González-Elizondo, J. A. Tena-Flores, J. A. Ávila-Reyes, J. H. Herrera-Corral y N. Naranjo-Jiménez. 2006. Foliar flavonoids distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (Coniferales: Pinaceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 119: 426-436
- Azuma, H., J. G. García-Franco, V. Rico-Gray y L. B. Thien. 2001. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: the biogeography of tropical and temperate disjunctions. *American Journal of Botany* 88: 2275-2285
- Bergsten, J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163-193
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304
- CBOLD Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(31): 12794-12797
- Cracraft, J. 2002. The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 89: 127-144
- Cole K. L., J. Fisher, S. T. Arundel, J. Cannella y S. Swift. 2008. Geographical and climatic limits of needle types of one and two needled pinyon pines. *Journal of Biogeography* 35: 257-269
- DeSalle, R., M. G. Egan y M. Siddall. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1905-1916

- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56(6): 879-886
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15
- Drescher, A., S. Ruf, T. Calsa Jr., H. Carrer y R. Bock. 2000. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *The Plant Journal* 22: 97-104
- Dvorak, W. S., A. P. Jordon, G. P. Hodge y J. L. Romero. 2000. Assessing evolutionary relationships of pines in the *Oocarpae* and *Australes* subsections using RAPD markers. *New Forest* 20: 163-192
- Eckenwalder J. E. 2009. Conifers of the world: the complete reference. Timber Press. Oregon
- Farjon, A. y B. T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica Monograph 75. The New York Botanical Garden, New York
- Farjon, A. 2005. Pines: drawings and descriptions of the genus *Pinus*. Segunda Edición, E.J. Brill and W. Backhuys, Leiden, Netherlands
- Fazekas, A. J., K. S. Burgess, P. R. Kesanakuri, S. W. Graham, S. G. Newmaster, B. C. Husband, D. M. Percy, M. Hajibabaei y S. C. H. Barret. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. 2008. PLoS ONE 3(7): e2802
- Farris, J. S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. En Platnick, N. I. y V. A. Funk (eds.) *Advances in Cladistics* 2: 7-36. Columbia University Press, New York

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791

Felsenstein, J. 2004. Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Geda-López, G., K. Kamiya y K. Harada. 2002. Phylogenetic relationships of diploxylon pines (subgenus *Pinus*) based on plastid sequences data. *International Journal of Plant Sciences* 163: 737-747

Gernandt, D. S., A. Liston y D. Piñero. 2001. Variation in the nrDNAITS of *Pinus* subsection *Cembroides*: implications for molecular systematic studies of pine species complexes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 449-467

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

Gernandt, D. S., S. Magallón, G. Geda-López, O. Zerón Flores, y A. Liston. 2008. Use of simultaneous analyses to guide fossil-based calibrations of Pinaceae phylogeny. *International Journal of Plant Sciences* 169: 1086-1099

Gernandt, D. S., S. Hernández-León, E. Salgado-Hernández y J. A. Pérez de la Rosa. 2009. Phylogenetic relationships of *Pinus* subsection *Ponderosae* inferred from rapidly evolving cpDNA regions. *Systematic Botany* 34: 481-491

Goloboff, P., J. S. Farris, y K. C. Nixon. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786

Greguss, P. 1972. *Identification of living gymnosperms on the basis of xylotomy*. Budapest: Akadémiai

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98

Helmers, E. A. 1943. The ecological anatomy of ponderosa pine needles. *The American Midland Naturalist* 29: 55-71

Hernández-León, S. 2007. Análisis filogenético de *Pinus* subsección *Ponderosae* con base en secuencias del DNA del cloroplasto (CpDNA). Tesis de Licenciatura, Área Académica de Biología, Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo, México

Huelsenbeck, J. P., D. M. Hillis y R. Nielsen. 1996. A Likelihood-Ratio Test of Monophyly. *Systematic Biology* 45(4): 546-558

Janzen, D. H. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (31): 12794-12797

Jardón-Barbolla, L., P. Delgado-Valerio, G. Geada-López, A. Vázquez-Lobo y D. Piñero. 2010. Phylogeography of *Pinus* subsection *Australes* in the Caribbean Basin. *Annals of Botany*. doi:10.1093/aob/mcq232

Katoh, K., K. Kuma, H. Toh, and T. Miyata. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511-518

Keng, H. y E. L. Jr. Little. 1961. Needle characteristics of hybrid pines. *Silvae Genetica* 10: 131-146

Kress, W. J. y D. L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508

Krupkin, A. B., A. Liston y S. H. Strauss. 1996. Phylogenetic analysis of hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*, Pinaceae) from chloroplast DNA restriction site analysis. *American Journal of Botany* 83: 489-498

Lanyon, J. W. 1966. A card key to *Pinus* based on needle anatomy. Forestry Commission of New South Wales, Australia, Pp. 5-27

Le Maitre, D. C. 1998. Pines in cultivation: a global view. Pp. 407–431 en: Ecology and biogeography of *Pinus*, ed. D. M. Richardson. Cambridge University Press. Cambridge

Liston, A., W.A. Robinson, D. Piñero y E. R. Alvarez-Buylla. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 95-109

Liston, A., M. Parker-Defeniks, J. V. Syring, A. Willyard y R. Cronn. 2007. Interspecific phylogenetic analysis enhances intraspecific phylogeographical inference: a case study in *Pinus lambertiana*. *Molecular Ecology* 16(18): 3926-3937

Little, E. L. Jr. y W. B Critchfield. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (Pines). USDA Forest Service Miscellaneous Publication 1144. Washington D.C.: U. S. Forest Service

Little, E. L. Jr. y F. I. Richter. 1965. Botanical descriptions of forty artificial pine hybrids. USDA Forest Service Technical Bulletin 1345

Maddison, W. P. 1997. Gene trees and species trees. *Systematic Biology* 46: 523-536

Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2007. Mesquite a modular system for evolutionary analysis. Versión 2 <http://mesquiteproject.org>

Malusa, J. 1992. Phylogeny and biogeography of the pinyon pines (*Pinus* subsect. *Cembroides*). *Systematic Botany* 17: 42-66

Martínez, M. 1945. Los Pinaceas Mexicanas. Vol. I. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional de México* 16: 1-35

Millar C. I. 1998. Early evolution of pines. Pp. 69–91 en: Ecology and biogeography of *Pinus*. ed. D. M. Richardson. Cambridge: Cambridge University Press

Miller C. N. Jr. 1985. *Pityostrobus pubescens*, a new species of pinaceous cones from the Late Cretaceous of New Jersey. *American Journal of Botany* 72: 520-529.

Mirov, N. T. 1967. The genus *Pinus*. The Ronald Press Company. New York

Mogensen, H. L. 1996. The hows and whys of cytoplasmatic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* 83: 383-404

Nixon, K. C. y Carpenter, J. M. 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics* 12 (3): 221-241

Ortiz García, S. 1999. Evolución y filogenia en pinos y sus hongos endófitos: aspectos sistemáticos de la coespeciación. Ph.D. tesis, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Parks, M., R. Cronn, y A. Liston. 2009. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BioMed Central Biology* 7: 84-101

Pérez de la Rosa, J. A. 1998. Promoción de una variedad de pino serotino mexicano a nivel de especie. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 5: 127–135

Pérez de la Rosa, J. A. 2009. *Pinus georginae* (Pinaceae), a new species from western Jalisco, México. *Brittonia* 61: 56-61

Perry, J. P. Jr. 1991. The pines of Mexico and Central America. Portland, Oregon: TimberPress

Price, R. A., A. Liston, y S. H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. Pp. 49-68 en: Ecology and biogeography of *Pinus*, ed. D. M. Richardson. Cambridge: Cambridge University Press

Richardson, D. M. y P. W. Rundel. 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. Pp. 49-68 en: Ecology and biogeography of *Pinus*, ed. D. M. Richardson. Cambridge: Cambridge University Press

Rieseberg, J. H. y D. E. Soltis. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 5(1): 65-84

Rozen S. y H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Pp. 365-386 en Krawetz S., Misener S. (eds.) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Totowa: Humana Press

Schuh, R. T. 2000. Biological Systematics: Principles and applications. Ithaca: Cornell University Press

Shaw, G. R. 1914. The Genus *Pinus*. Arnold Arboretum Publications 5. Forage Village, Mass.: The Murray Printing Co.

Shaw, J., E. B. Lickkey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling y R. L. Small. 2005. The tortoise and the hare II, relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166

Simpson, M. G. 2006. Plant Systematics. Burlington: Elsevier Academic Press

Sites Jr., J. W. y J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18(9): 462-470

Soltis, D. E. y P. S. Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En: Molecular systematics of plants II: DNA sequencing (D. E. Soltis, P. S. Soltis y J. J. Doyle, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands

Strauss, S. H. y A. H. Doerksen. 1990. Restriction fragment analysis of pine phylogeny. *Evolution* 44: 1081-1096

Squillace, A. E. y J. P. Perry Jr. 1992. Classification of *Pinus patula*, *P. tecunumanii*, *P. oocarpa*, *P. caribaea* var. *hondurensis*, and Related Taxonomic Entities. United States Department of Agriculture. Research Paper SE-285

Swofford, D. L. 2003. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*, Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Syring, J., A. Willyard, R. Cronn y A. Liston. 2005. Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci. *American Journal of Botany* 92: 2086-2100

Syring, J., K. Farrell, R. Businský, R. Cronn and A. Liston. 2007. Widespread genealogical nonmonophyly in species of *Pinus* subgenus *Strobus*. *Sytematic Biology* 56: 163-181

Wakasugi, T., J. Tsudzuki, S. Ito, K. Nakashima, T. Tsudzuki y M. Sugiura. 1994. Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black

pine *Pinus thunbergii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 9794-9798

Wendel, J. F and J. J. Doyle. 1998. Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution. Pags. 265-296 en: *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing* (D. E. Soltis, P. S. Soltis y J. J. Doyle, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands

Willyard, A., J. Syring, D. S. Gernandt, A. Liston y R. Cronn. 2007. Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Molecular Biology and Evolution* 24: 90-101

Willyard, A., R. Cronn y A. Liston. 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 498-511