

50



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE UNA ESPECIE DE PINO ENDÉMICA DE MÉXICO

(*Pinus nelsonii* SHAW)

29/740

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGA

PRESENTA:

ARGELIA CUENCA NAVARRO



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS :

DR. DANIEL I. PIÑERO DALMAU



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Variación y estructura genética de una especie de pino
endémica de México (Pinus nelsonii Shaw)

realizado por Argelia Cuenca Navarro

con número de cuenta 9177042-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Daniel Piñero

Propietario

Dr. Luis Eguiarte Fruns

Luis Eguiarte

Propietario

Dr. Eduardo Morales Guillaumin

Eduardo Morales

Suplente

Biol. Erika Aguirre Planter

Erika Aguirre P.

Suplente

Biol. Rodolfo Salas Lizana

Rodolfo Salas Lizana

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez D.



Dra. Edna María Suárez DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradecimientos

Antes que nada debo agradecer a la CONABYO por el financiamiento aportado al proyecto "Estructura poblacional, variación genética y conservación de tres especies del género *Pinus*, endémicas de México", del cual este trabajo forma parte. También agradezco al Sistema Nacional de Investigadores, por el apoyo económico que me brindó durante la realización de esta tesis.

Un agradecimiento a toda la gente que, de una u otra forma, participó en la elaboración de esta tesis. A Paty y Ale por ser las culpables de que empezara a trabajar con los pinos, además de sus muchas aportaciones a mi trabajo y su ayuda tanto en el campo como en el laboratorio. A Rodo por revisar esta tesis y por sus comentarios a todo mi trabajo, también por su ayuda en el campo. A Mario V. por su entusiasmo y su buena disposición en las colectas más difíciles de *P. nelsonii*, también a Pablo y Rafael. A Toño por todos los artículos y libros. A Rocío, Oscar y a toda la gente que conforma el laboratorio de Genética y Evolución.

En especial quiero agradecer a Ana Elena por ser una parte importante de esta tesis, por su compañía y solidaridad en todos los aspectos. A Daniel Piñero por su apoyo y confianza, así como por la paciencia que tubo con todas mis dudas y despistes.

A Antonio Ulises del laboratorio de la doctora Teresa Tusié en el Instituto Nacional de Pediatría por su ayuda en el montaje de la técnica de microsátélites.

A toda la gente que se tomó el trabajo de revisar esta tesis y enriquecerla con sus comentarios: Luis Eguiarte, Lalo Morales, Erika Aguirre y Rodolfo Salas.

A los amigos que me acompañaron durante todo este tiempo: Nico, Bárbara, Omar, Gabo, Tamara, Carlos, Barbara Ayala, Xanic, Luis, y todo el resto de la compañía. Sin ustedes la facultad de Ciencias no hubiera sido ni la mitad de divertida.

A Maite, Begoña y Jorge, por su cariño y solidaridad. A León. A Julián, Valeria, Pablo, Juan, Ariel, Sol, Anahí y el resto de mis tíos y primos. A mi abuelo Arturo. A Mario por su apoyo.

A Ricardo por inducirme a estudiar biología. A Trudi por ayudarme a no claudicar. A Enrique por las tardes platicando. A Chicha. A Mariso. A Jimena y a Sebastián.

Contenido

Resumen	
Abstract	
Introducción	
Genética de poblaciones de especies raras	1
Características del género <i>Pinus</i>	3
Sistema reproductivo y genético en pinos	5
Patrones de variación genética en pinos	7
Tabla 1. Valores de la diferenciación entre poblaciones, estimada con distintos marcadores genéticos, para diferentes especies de pinos	10
Demografía del género <i>Pinus</i>	10
Descripción de la especie	11
Fig. 1 Distribución geográfica de <i>P. nelsonii</i>	14
Tabla 2. Características morfológicas de <i>P. nelsonii</i>	16
Microsatélites (SSR's) como marcadores moleculares	16
Mecanismos de mutación en microsatélites	19
Fig. 2 Mecanismo de mutación en microsatélites	21
Objetivos	22
Metodología	
Colecta	23
Tabla 3. Localización geográfica de las 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> encontradas en México y número de individuos colectados en cada población..	24
Análisis de la estructura de edades	24
Amplificación de microsatélites de cloroplasto de pino	25
Marcaje radiactivo de los <i>primers</i>	25
Condiciones de amplificación	25
Detección de productos de PCR	26
Tabla 4. Primers utilizados en la amplificación de microsatélites de cloroplasto de <i>P. Nelsonii</i>	27
Análisis de variación y estructura genética	28
Obtención de la matriz de datos	28
Arboles basados en los distintos haplotipos	28
Diversidad genética	28
Estimador indirecto del número de mutantes por generación	29
Estimadores de distancia entre haplotipos	30
Análisis de varianza molecular (AMOVA)	31
Distancia genética entre poblaciones	33
Tiempo de coalescencia entre las poblaciones	34
Número de migrantes entre poblaciones	34
Demografía histórica	35
Distribución <i>mismatch</i>	35
Inferencias a partir de árboles filogenéticos	36
Resultados	
Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>P. nelsonii</i>	37
Tabla 5 Distancia promedio entre las 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> encontradas	

en México	37
Fig. 3. Mapa de la distribución geográfica de <i>P. nelsonii</i>	38
Análisis demográfico	39
Fig. 4. Correlación entre la edad (años) y el diámetro a la altura del pecho (DAP) para 256 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en 8 poblaciones de México	39
Fig. 5. Correlación entre la edad (años) y la altura para 256 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en 8 poblaciones de México.	39
Fig. 6. Distribución de edades para 256 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en 8 poblaciones en México.	40
Fig. 7. Categorías de edad para 27 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en la población de Tula	40
Fig. 8. Categorías de edad para 37 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en la población de Miquihuana.	41
Fig. 9. Categorías de edad para 45 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en la población de las Antonias	41
Fig. 10. Categorías de edad para 30 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en la población de Peña Nevada.	42
Fig. 11. Categorías de edad para 30 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en la población de San Lázaro.	42
Fig. 12. Categorías de edad para 30 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en la población de Palmillas.	43
Fig. 13. Categorías de edad para 27 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en la población de la Taponá.	43
Fig. 14. Categorías de edad para 29 individuos de <i>P. nelsonii</i> encontrados en la población de Duraznillos.	44
Variación genética	45
Tabla 6. Abundancia de Haplotipos de microsatélites encontrados en <i>P. nelsonii</i> en el total de la muestra de 9 poblaciones en México.	46
Tabla 7. Distribución de 27 haplotipos de microsatélites de <i>P. nelsonii</i> en 9 poblaciones de México.	46
Tabla 8. Distribución y frecuencia de los alelos de microsatélites encontrados en <i>P. nelsonii</i> en cada una de las poblaciones muestreadas.	47
Fig. 15. Fenograma de los distintos haplotipos encontrados en 9 poblaciones mexicanas de <i>P. Nelsonii</i> .	49
Fig. 16. Red de haplotipos de cloroplasto mostrando las mutaciones necesarias para pasar de un haplotipo a otro, según el modelo de mutación paso a paso.	50
Fig. 17. A) uno de los árboles más parsimoniosos obtenido con la matriz de presencia/ausencia de haplotipos, B) Arbol consenso para la matriz de presencia/ausencia de haplotipos	51
Estimados de diversidad genética.	52
Tabla 9. Diversidad genética (<i>He</i>) para cada uno de los loci.	53
Tabla 10. Diversidad genética intrapoblacional calculada con los haplotipos encontrados.	53
Estructura genética	54
Análisis de variación molecular	54
Tabla 11. Componentes de varianza molecular calculados a partir del método de distancia por la suma del cuadrado de las diferencias de tamaño de los alelos para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	54
Tabla 12. Componentes de varianza molecular calculados a partir del método de distancia por diferencias alélicas para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	55
Tabla 13. Valores de AMOVA locus por locus para 4 loci de microsatélites de	

cloroplasto en 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	55
Diferencias genéticas entre poblaciones	55
Tabla 14. Matriz de diferencias entre 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México, resultado de hacer el AMOVA entre pares de poblaciones.	56
Fig. 18. Correlación entre los índices de fijación obtenidos con dos distintos modelos de mutación (paso a paso y alelos infinitos).	57
Distancias genéticas	57
Tabla 15. Matriz del promedio corregido del número de diferencias nucleotídicas entre 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	58
Fig. 19. Correlación entre distancia genética (Da calculada con alelos infinitos) y distancia geográfica para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	58
Fig. 20. Correlación entre distancia genética (Da calculada con mutación paso a paso) y distancia geográfica para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	59
Tiempo de coalescencia entre poblaciones	59
Tabla 16. Matriz de tiempos de coalescencia entre 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	60
Número de migrantes entre poblaciones.	60
Tabla 17. Matriz de valores del número de migrantes por generación entre 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	61
Fig. 23. Número de migrantes contra la diferenciación entre poblaciones obtenida por alelos infinitos para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	62
Fig. 24. Número de migrantes contra la diferenciación entre poblaciones obtenida por mutación paso a paso para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	62
Fig. 25. LogM (alelos infinitos) contra la distancia geográfica para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	62
Fig. 26. LogM (mutación paso a paso) contra la distancia geográfica para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	63
Demografía histórica	63
Fig. 27. Distribución de las diferencias entre pares de haplotipos en 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	64
Fig. 28. Fenograma para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México, obtenido por el método de neighbor-joining para un modelo de mutación por alelos infinitos.	65
Fig. 29. Fenograma para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México, obtenido por el método de neighbor-joining para un modelo de mutación paso a paso.	66
Fig. 30. Log del número de linajes contra el tiempo de coalescencia (alelos infinitos) para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	66
Fig. 31. Log del número de linajes contra el tiempo de coalescencia (mutación paso a paso) para 9 poblaciones de <i>P. nelsonii</i> en México.	67
Discusión.	68
Análisis demográfico	68
Variación genética	69
Tabla 18. Número de alelos encontrados para microsatélites de cloroplasto para varias especies de pinos.	70
Tabla 19. Valores de diversidad calculados con distintos loci de microsatélites de cloroplasto en distintas especies de pino.	72
Tabla 20. Valores de diversidad genética calculados con distintos loci de microsatélites nucleares en distintas especies de pino.	72
Estructura genética	73
Tabla 21. Comparación entre algunos estudios donde se han utilizado simultáneamente los estadísticos basados en alelos infinitos y en mutación	

Resumen

Pinus nelsonii se haya dentro del grupo de los pinos blandos (Subgénero *Strabus*), los cuales se caracterizan por presentar sólo un haz vascular, y en particular dentro de la Subsección *Cembroides* *sl.* la cual agrupa a los pinos con semilla sin alas, o piñoneros. Sin embargo, *P. nelsonii* posee características propias que lo separan del resto de los pinos piñoneros, razón por la cual se ha formado la Subsección *Nelsoniae*, la cual no se encuentra directamente relacionada con los otros piñoneros, creyéndose que esta especie podría constituir un linaje antiguo, o taxa relictual, donde sus parientes más cercanos se encuentren extintos. *P. nelsonii* es una especie endémica que se encuentra distribuida en poblaciones fragmentadas entre el límite de Nuevo León y Tamaulipas, así como en San Luis Potosí, en ambientes de semidesierto y en altitudes muy variables. Las poblaciones de *P. nelsonii* son escasas y generalmente aisladas entre sí. Por lo que es un buen modelo para analizar la genética de poblaciones de especies raras de pinos que se encuentren aislados y con distribución restringida.

En el presente trabajo se implementó la técnica de microsatélites de cloroplasto como marcador molecular para estimar variación y estructura genética. Con dicha técnica, se encontró una alta variación genética para el conjunto de las poblaciones ($H_e = 0.73$), y una gran cantidad de haplotipos en el total de la muestra (27 haplotipos en 256 individuos). La estructura genética encontrada fue muy pequeña ($R_{st} = 0.05$ y $F_{st} = 0.13$), así como las distancias genéticas entre poblaciones, aunque dicho patrón varía dependiendo del modelo de mutación que se utilice (alelos infinitos o mutación paso a paso). Se trabajó con dos distintas estimaciones de distancia genética (basándose en el índice de fijación y en las diferencias entre nucleótidos de los alelos presentes en las poblaciones), pero con ninguna se encontró correlación entre distancia genética y geográfica, por lo que, en el caso de esta especie, no es aplicable un modelo de aislamiento por distancia. El flujo génico mediado por polen entre las poblaciones es muy elevado, lo cual coincide con las bajas distancias geográficas entre éstas y el mecanismo de polinización de los pinos.

Al hacer la distribución de las diferencias entre pares de haplotipos se encontró que las poblaciones de *P. nelsonii* han sufrido una expansión de 4.5 veces su tamaño entre 29,500 y 76,800 años. La expansión de las poblaciones se ve soportada por la filogenia en forma de estrella que éstas presentan, la cual da una relación parabólica entre el tiempo de coalescencia y el log del número de linajes.

Finalmente, a pesar que la variación genética de esta especie es elevada, y que el efecto de la deriva se ve contrarrestado por las altas tasas de migración entre poblaciones, cabría resaltar que es necesario implementar medidas de conservación para que el tamaño de estas poblaciones no disminuya considerablemente, acarreado la pérdida de variación genética que podría traer consecuencias en un futuro no muy lejano.

Abstract

Pinus nelsonii is a Mexican endemic distributed across a wide altitudinal range in semi-arid zones near the common border of Nuevo León and Tamaulipas, and in San Luis Potosí. Populations of *P. nelsonii* are rare and widely separated, for this reason *P. nelsonii* is a good model for the study of genetic patterns present in rare pines. *Pinus nelsonii* is classified in the monotypic subsection *Nelsoniae*, apart from other pinyon pines (subsection *Cembroides*) because it possesses several novel characters including persistent fascicle sheaths, connate needles, and a distinctive wood anatomy. Subsection *Nelsoniae* is a relictual lineage closely related to other pinyon pines, although it is uncertain whether the two subsections are sister groups.

In the present study, chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs) were used to measure genetic variation in nine populations of *P. nelsonii*. High genetic variation ($H_e = 0.73$) and a high number of haplotypes were found (27 haplotypes in 256 individuals). Population differentiation was low ($R_{st} = 0.05$ and $F_{st} = 0.13$), as were genetic distances. However, this pattern varied depending on which mutation model was used (infinite alleles or stepwise model). Two genetic distance estimators were used, the first based on the fixation index and the second on the number of bases that change between both haplotypes, but neither was correlated with geographic distance. Thus the isolation by distance model is not applicable in populations of this pine. Genetic flow (pollen) between populations is very high.

One result of mismatch distribution shows that populations of *P. nelsonii* have undergone an expansion of 4.5 times their size. The expansion occurred between 29,500 and 76,800 years ago. The populations' star like phylogeny supports these results, and a parabolic relationship was obtained between the coalescence times and the number of lineages.

Introducción

Genética de poblaciones de especies raras

El estudio del proceso evolutivo está basado en comprender la naturaleza de la variación genética, los mecanismos por los cuales está se origina y los factores que determinan los patrones en los cuales se encuentra distribuida (Futuyma, 1986).

La variación genética dentro de las poblaciones puede influenciar la habilidad de los miembros de una población para explotar ciertos ambientes, sobrevivir a eventos estocásticos, mantener niveles altos de reproducción o adaptarse a ambientes nuevos o cambiantes (Foster, 1991).

La variación total mantenida dentro de las especies puede estudiarse de una manera jerárquica, observando cómo se distribuye entre distintas regiones, poblaciones o individuos. La manera en que la variación se distribuye en estos distintos niveles es determinada directamente por las fuerzas evolutivas (migración, mutación, sistema de apareamiento, deriva génica y selección natural) en interacción con el sistema de recombinación que presentan los distintos organismos (Barrett y Kohn, 1991). La importancia de estos factores dependerá a su vez de los factores ecológicos y las características de historia de vida de las especies.

Algunos de los taxa que anteriormente presentaban amplia distribución geográfica son hoy grupos endémicos, los cuales permanecen como taxa relictuales con tamaños poblacionales pequeños. Muchos de los taxa que han sufrido cambios recientes en su distribución pueden presentar patrones de flujo génico radicalmente diferentes a los patrones mantenidos a lo largo de la historia evolutiva de la especie, con lo cual se puede estar afectando el potencial reproductivo de la misma y alterando sus patrones de variación genética (Foster, 1991).

Dos tipos de fenómenos son los principales causantes de la pérdida de variación genética en poblaciones naturales: los cuellos de botella y el efecto fundador. Un cuello de botella se refiere a la reducción drástica del número de individuos de una especie en un tiempo y lugar particular (Barrett y Kohn, 1991), debido generalmente a algún evento catastrófico. Normalmente un cuello de botella se ve acompañado de una reducción considerable en la variación genética de la población o especie que lo sufre. Sin embargo, la reducción en la heterocigosidad promedio depende no sólo de la intensidad del cuello de botella, sino también, aunque en menor medida, de la tasa de crecimiento poblacional subsecuente. Un tipo particular de cuello de botella es el llamado efecto fundador, el cual se refiere al establecimiento de una nueva población a partir de un número limitado de fundadores los cuales sólo poseen una proporción de la variación genética de la población original (Barrett y Kohn, 1991). Sin embargo, el efecto de este proceso es menos agresivo sobre la variación genética, ya que generalmente se pierden los alelos raros. En algunos estudios realizados en plantas se ha observado que tanto el efecto fundador como los cuellos de botella juegan un papel determinante en la formación de los patrones en los cuales se distribuye la variación genética, sobre todo en especies colonizadoras (Barrett y Kohn, 1991; Foster, 1991). Muchos autores han recurrido a los cuellos de botella ocurridos durante la historia evolutiva de las especies para explicar los bajos niveles de variación encontrados en las poblaciones contemporáneas; en la mayoría de los casos, dichos cuellos de botella se asocian a refugios pequeños asociados con cambios climáticos durante las glaciaciones en el Pleistoceno (Barrett y Kohn, 1991; Ledig *et al.*, 1997; Ledig *et al.*, 1999).

Si se cuenta con información genética de distintas especies congénicas con atributos de vida similares, se pueden hacer inferencias indirectas de los cuellos de botella ocurridos en la historia de dichas especies. Por ejemplo, en pinos la mayoría de las especies estudiadas presentan altos niveles de variación genética, excepto *Pinus torreyana* (Ledig y Conkle, 1983; Provan, 1999) y *P. resinosa* (Millar y Libby, 1991; Echt *et al.*, 1998). Por lo cual se cree ambas especies han pasado por este tipo de proceso en algún momento de su historia evolutiva.

Al reducirse el tamaño poblacional es mucho más factible que comiencen a ocurrir cruza entre individuos emparentados. Muchas veces el resultado de estas cruza endogámicas es un fenómeno llamado depresión por endogamia, el cual se refiere a un decremento de la adecuación de los individuos resultado de cruza endogámicas. Una posible causa genética de la depresión endogámica supone una poza génica con alelos deletéreos recesivos. En poblaciones con entrecruzamiento estos alelos se enmascaran al encontrarse como heterocigotos, sin embargo, bajo autofecundación o endogamia, estos se expresan en su estado homocigoto, lo cual acarrea una disminución en la adecuación del portador o depresión por endogamia (Futuyma, 1986; Barrett y Kohn, 1991).

No todas las especies raras presentan las mismas características. Por un lado se encuentran las especies que se restringen a parches de ambientes muy particulares, han sobrevivido en poblaciones aisladas por bastante tiempo y que pueden ser relativamente tolerantes a niveles altos de endogamia; poseyendo ciertas características que las hacen capaces de tolerar bajas densidades locales. Por otro lado, existen especies cuyos patrones de distribución han sido alterados históricamente, cobrando particular interés las especies que en el pasado se encontraban ampliamente distribuidas y cuyos tamaños poblacionales han sido severamente reducidos, por ser éstas más vulnerables a los procesos de extinción (Foster, 1991; Karron, 1991).

Características del género *Pinus*

El género *Pinus* es exclusivo del hemisferio norte, particularmente entre los 30° y los 55° de latitud norte. Los pinos pueden ocupar muy diversos hábitats, su gradiente altitudinal va desde el nivel del mar hasta los 3,700 m. Es difícil encontrarlos en ambientes tropicales, así que en latitudes más cercanas al ecuador ocupan principalmente las zonas altas, así como los semidesiertos (Millar, 1993).

México y Centro América poseen mayor número de especies de pinos que cualquier otra región con un tamaño similar, contando con 47 de las 111 especies que existen en el mundo (Farjon 1996, Farjon y Styles 1997). Por otro lado, el 74% de las especies encontradas en

México son endémicas para lo que Rzedowsky definió como Megaméxico III (Perry *et al.*, 1998).

Debido a que México ha experimentado grandes cambios geológicos y climáticos relativamente recientes, se ha sugerido que mucha de su diversidad refleja la evolución reciente del género (Farjon, 1996), siendo esta la razón por la que se le ha considerado el segundo centro de diversificación de pinos, los cuales provienen originalmente de zonas más boreales.

El considerar a México como centro de diversificación implica que éste podría contener tanto especies que son el resultado de la radiación de un único ancestro común, así como especies no relacionadas directamente, algunas de las cuales se conservan como relictos de grupos extintos, y especies inmigrantes de otras regiones (Farjon, 1996).

Farjon (1996) habla del noreste de México y en particular la Sierra Madre Oriental como uno de los centros de diversificación y evolución de pinos más importante de México y supone que la gran diversidad encontrada en esta región es en parte explicada por migraciones desde las montañas Rocallosas y en parte por la gran cantidad de endemismos locales. Entre los atributos que caracterizan dicho centro se encuentran: a) adaptación a ambientes áridos, b) disyunción entre altas montañas que se encuentran rodeadas por desierto ó semidesierto y c) presencia de endemismos locales, siendo esta región el probable centro de origen de la subsección *Cembroides*.

Uno de los grupos de pinos con mayor endemismo en México es el de los pinos piñoneros, el cuales es un grupo distintivo de Norteamérica, donde 9 de las 11 especies que conforman la subsección *Cembroides* son endémicas para México (Perry *et al.*, 1998). Algunas de las especies de este grupo se encuentran claramente localizadas como taxa relictuales. Se cree que este grupo representa una radiación relativamente reciente relacionada con el cambio climático ocurrido durante el Pleistoceno (Farjon, 1996).

Sistema reproductivo y genético en pinos

El género *Pinus* es, en promedio, uno de los más variables genéticamente, tanto a nivel intrapoblacional como entre poblaciones. Esto es probablemente el resultado del tipo de sistema genético que posee y que se refiere a las causas de la creación, almacenamiento e intercambio de información genética, incluyendo los sistemas de recombinación, reproducción, entrecruzamiento, dispersión y mutación (Ledig, 1998).

Los pinos se reproducen predominantemente de manera sexual, presentando altas tasas de entrecruzamiento (Loveless y Hamrick, 1984), lo cual promueve la recombinación y permite el mantenimiento de la variación debido al enmascaramiento de alelos deletéreos recesivos de la presión de selección, así como por efecto de selección a favor del heterocigoto. Las barreras a la autofecundación son postcigóticas y sólo existen por competencia con otros embriones resultado del entrecruzamiento (Ledig, 1998). Asimismo, en este género, generalmente se presenta alta depresión por endogamia, la cual se expresa comúnmente durante el desarrollo del embrión (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Foster, 1991; Ledig, 1998). Como por ejemplo, comparaciones de los distintos genotipos de embriones, juveniles y adultos de *Pinus sylvestris* muestran diferencias en la sobrevivencia y una fuerte presión de selección contra los homocigotos (Foster, 1991; Mitton, 1995). Lo anterior concuerda con la asociación frecuente entre heterocigosidad y mayores tasas de crecimiento y sobrevivencia encontrada en algunos árboles (Ledig, 1998).

La mayoría de las coníferas tienen un sistema mixto de apareamiento, esto es, producen semillas resultado tanto de entrecruzamiento como de autofecundación. Sin embargo, la viabilidad de las semillas es generalmente inversamente proporcional al coeficiente de endogamia que presenten (Mitton, 1995). Por otro lado, en general los pinos adultos presentan un exceso de heterocigotos, donde la adecuación de los individuos heterocigotos enzimáticamente es superior a la de los homocigotos (Ledig, 1988; Mitton, 1995). Tal es el caso de *Pinus ponderosa*, *P. banksiana*, *Picea mariana*, *P. radiata*, *P. leucodermis*, *P. taeda*, *P. rigida* (Mitton, 1995).

Un factor que afecta considerablemente la forma en la cual se encuentran estructuradas las poblaciones, así como la variación genética que presentan, son los mecanismos relacionados con la migración de una población a otra. En este caso, tiene que ver tanto con la dispersión de semillas como de polen, siendo el intercambio de genes entre poblaciones proporcional a la capacidad de dispersión de dichas poblaciones (Ledig, 1998).

La dispersión de semillas en pinos puede ser tanto por viento como por aves y pequeños mamíferos. En ambos casos la dispersión suele ser a gran distancia, lo cual por un lado previene la diferenciación y por otro provee la oportunidad de colonizar nuevas regiones (Ledig, 1998; Mitton, 1995). También se ha observado para las coníferas en general, que las especies cuyas semillas son dispersadas por animales presentan mayor variación genética dentro de las poblaciones y poca diferenciación interpoblacional, comparadas con las especies donde las semillas se dispersan por otro mecanismo (Hamrick *et al.*, 1992).

La polinización siempre ocurre por viento, por lo que el polen es capaz de viajar grandes distancias, manteniendo altas tasas de flujo génico siendo ésta la principal causa de que una gran proporción de la variación genética (alrededor del 90%) se encuentre dentro de las poblaciones, y que fenómenos como la deriva génica resulten poco probables. Sin embargo, cuando hay procesos de colonización en hábitats remotos la población puede quedar aislada y perder alelos por efecto fundador (Ledig, 1998).

El flujo genético entre poblaciones define los límites de dichas poblaciones y es un indicador de hasta donde una especie puede actuar como una única población funcional a pesar de encontrarse espacialmente fragmentada (Menges, 1991). Los vínculos genéticos entre poblaciones a través del flujo génico son muy importantes para la viabilidad de poblaciones pequeñas, ya que una reducida cantidad de migrantes es suficiente para contrarrestar los efectos de pérdida de variación por efecto de la deriva génica (Menges, 1991).

El flujo génico a través del intercambio de polen entre poblaciones es tan grande que hace al efecto de la deriva despreciable y permite el mantenimiento de altos niveles de variación,

condición necesaria para la adaptación a las condiciones cambiantes del ambiente. Sin embargo, para muchas especies de pinos endémicas o con distribución restringida el flujo génico puede ser muy limitado, lo cual convertiría a la deriva génica en una fuerza clave en la dinámica poblacional (Karron, 1991).

Patrones de variación genética en pinos

Varios estudios donde se han correlacionado los montos de variación genética con las características de vida de las especies (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick *et al.*, 1992; Hamrick y Godt, 1996. En general, las especies de vida larga, con entrecruzamiento, polinización por viento y de etapas sucesionales tardías presentan altos niveles de variación enzimática respecto a especies con la combinación de caracteres alterna. En el caso particular de las coníferas además de presentar altos niveles de variación, poseen poca diferenciación entre poblaciones ($P=71.1$, $He=0.169$, $Gst=0.073$; Hamrick *et al.*, 1992). Sin embargo, lo anterior puede cambiar dependiendo de las características particulares de cada especie. Dentro del género *Pinus* el intervalo de variación dentro de las especies va de $He=0.0$ para *P. resinosa* y *P. torreyana*, hasta $He=0.327$ para *P. longaeva* (Ge *et al.*, 1998). De la misma manera los valores para la diferenciación entre poblaciones tienen un gradiente bastante amplio con $Gst < 0.03$ para *P. rigida*, *P. banksiana*, *P. longaeva* hasta $Gst = 0.3$ para *P. halapensis* y $Gst = 0.337$ para *P. merkusii* (Ge *et al.*, 1998). En el caso de *P. resinosa* su invariabilidad enzimática se ha atribuido a un fuerte cuello de botella que redujo su tamaño poblacional durante el Pleistoceno (Millar y Libby, 1991; Echt *et al.* 1998).

Las coníferas que presentan alta variación adentro y entre las poblaciones, y se han dividido en dos patrones geográficos: continuo y discontinuo, dependiendo de la escala que se utilice. En el caso de las coníferas con patrones geográficos discontinuos se presentan marcadas diferencias entre las poblaciones, ya sea por efecto de la selección o por deriva. La diferenciación de las poblaciones debido a selección supone diferencias en los respectivos ambientes asociados a combinaciones particulares de alelos, llamados ecotipos (Millar y Libby, 1991). Los distintos ecotipos pueden encontrarse en escalas muy variables.

Por ejemplo, en el caso de *Pinus ponderosa* se pueden identificar cuatro grandes ecotipos separados por cientos de kilómetros. Por otro lado, *Pinus muricata* presenta dos ecotipos en el norte de California separados sólo por 500 metros (Millar y Libby, 1991). En el caso de que la discontinuidad en la variación genética sea dada principalmente por aislamiento de las poblaciones y deriva génica, no se podrá encontrar una correlación entre grupos particulares de alelos y ciertas condiciones ambientales; mientras que en el caso de poblaciones continuas y grandes donde se suponen cambios graduales en la selección, como ambientes donde cierto factor (como la temperatura) varía gradualmente, la variación genética puede presentar cambios continuos o clinas; (Millar y Libby, 1991).

Conkle (1992) comparó la variación isoenzimática encontrada en 14 especies de coníferas tratando de asociarla con la distribución geográfica que estas presentan dentro del territorio estadounidense, llegando a varias conclusiones importantes:

Las especies ampliamente distribuidas (*Pinus ponderosa*, *Calocedris decurrens*, *Pseudotsuga menziesii*, *Abies concolor*, *P. lambertiana* y *P. jeffreyi*) presentan una heterocigosidad promedio entre 0.21 y 0.28, con media en 0.24.

En contraste, las especies con algún tipo de restricción en su distribución geográfica (*P. coulteri*, *P. sabiniana*, *P. radiata*, *P. muricata* y *P. attenuata*) presentan comparativamente más alelos fijos, y una heterocigosidad promedio entre 0.13 y 0.16 con media en 0.14.

Por otra parte, las especies raras o endémicas (*P. torreyana*, *Cupressus macrocarpa*, *P. washoensis*) contrastan entre sí. Por un lado, *P. torreyana* no presenta variación isoenzimática, mientras que las otras dos especies presentan heterocigosidades comparables a las especies más ampliamente distribuidas.

En un nivel más fino, Conkle (1992) encontró que los loci utilizados para hacer las comparaciones anteriores difieren en el número de alelos entre especies, donde los alelos raros generalmente se encuentran en estado heterocigoto siendo los alelos con frecuencias intermedias los que contribuyen mayormente a la heterocigosidad promedio de la población. Al analizar 1,087 loci enzimáticos de coníferas, sólo el 6% de los loci son monomórficos, 15% presentan dos alelos y cerca del 80% presentan tres o más. Por otro lado, un tercio de los alelos tienen frecuencias mayores al 50% y esto es más común en genes con dos alelos

(31% de estos tienen frecuencias mayores al 95%) que en genes con cuatro o más alelos (sólo el 3% tiene frecuencias mayores al 95%). Los alelos raros (con frecuencias bajas) son numerosos pues constituyen un tercio de todos los alelos muestreados. En cuanto a la heterocigosis se refiere, el 50% de los genes tienen heterocigosis mayores a 0.1 y hay una correlación positiva entre el número de alelos por locus y la heterocigosis de dicho locus (Conkle, 1992).

A pesar que estas generalizaciones se han conseguido con base en estudios con enzimas, es posible empezar a identificar patrones con otros tipos de marcadores, encontrando que los análisis realizados con cpDNA y con mtDNA muestran patrones de variación algo distintos a los enzimáticos (Tabla 1).

Tanto en *Pseudotsuga menziesii*, como en *Pinus radiata* no se encontró variación en el cpDNA con fragmentos de restricción, mientras que en *Pinus muricata* se encontró poca variación dentro de las poblaciones pero muy marcada entre poblaciones ($G_{st}=0.87$), contrastando con del 12 al 22% encontrada con isoenzimas. Asimismo, aunque las isoenzimas revelan que sólo el 24% de la variación se encuentra entre poblaciones, el estimado es de 48% para cpDNA (RFLPs) (Mitton, 1995). De la misma manera, las enzimas y el cpDNA presentan patrones muy distintos en *Pinus banksiana* y en *P. contorta*. Para *P. contorta* la F_{st} estimada con cpDNA fue de 66% entre subpoblaciones y de 31% entre subespecies, mientras que al estimar esto con isoenzimas rara vez excede el 6%. (Mitton, 1995).

Tabla 1 Valores de la diferenciación entre poblaciones, estimada con distintos marcadores genéticos, para diferentes especies de pinos.

Especie	Índice de fijación	Marcador	Cita
<i>P. attenuata</i>	0.120	Isoenzimas	Millar <i>et al.</i> , (1988)
<i>P. banksiana</i>	0.052	Isoenzimas	Brown y Moran (1981)
<i>P. caribea</i>	0.130	Isoenzimas	Mathenson <i>et al.</i> , (1989)
<i>P. edulis</i>	0.012	Isoenzimas	Betancourt <i>et al.</i> , (1991)
<i>P. engelmannii</i>	0.130	Isoenzimas	Bermejo (1993)
<i>P. flexilis</i>	0.022	Isoenzimas	Schuster <i>et al.</i> , (1989)
<i>P. halepensis</i>	0.3	Isoenzimas	Ge <i>et al.</i> (1998)
<i>P. jeffreyii</i>	0.138	Isoenzimas	Furnier y Adams (1986)
<i>P. merkusii</i>	0.337	Isoenzimas	Ge <i>et al.</i> (1998)
<i>P. muricata</i>	0.22	Isoenzimas	Millar <i>et al.</i> , (1988)
<i>P. pinceana</i>	0.247	Isoenzimas	Molina-Freaner <i>et al.</i> , (2001)
<i>P. radiata</i>	0.130	Isoenzimas	Millar <i>et al.</i> , (1988)
<i>P. rigida</i>	0.023	Isoenzimas	Guries y Ledig (1982)
<i>P. rzedowskii</i>	0.175	Isoenzimas	Delgado <i>et al.</i> , (1999)
<i>P. washoensis</i>	0.016	Isoenzimas	Niebling y Conkle (1990)
<i>P. brutia</i>	Mayor a 0.3	CpSSR's	Bucci <i>et al.</i> , (1998)
<i>P. contorta</i>	0.66	CpRFLPs	Mitton (1995)
<i>P. halepensis</i>	Mayor de 0.2	CpSSR's	Bucci <i>et al.</i> , (1998)
<i>P. leucodermis</i>	0.22	CpSSR's	Powell <i>et al.</i> , (1995)
<i>P. leucodermis</i>	0.179	RAPD's	Bucci <i>et al.</i> , (1997)
<i>P. muricata</i>	0.87	CpRFLPs	Mitton (1985)
<i>P. resinosa Ait.</i>	0.068	CpSSR's	Echt <i>et al.</i> , (1998)

Demografía del género *Pinus*

El tamaño y estructura de una población en un momento dado es el resultado de los procesos de reproducción, establecimiento, crecimiento y sobrevivencia de los individuos que la componen (Delgado, 1997).

Dentro del género *Pinus* se han reconocido dos principales patrones de historias de vida: especies de vida corta que crecen y maduran rápidamente, y especies de vida larga, las primeras son típicamente fugitivas presentando reclutamiento episódico debido a disturbios. La estructura de edades característica de estas especies consiste en que la totalidad de la población presenta mas o menos la misma edad, o también se pueden observar ciclos de edades, coincidiendo con la ocurrencia de los disturbios. En contraste,

las especies de vida larga presentan madurez tardía y mayor inversión en estructuras vegetativas. La estructura de edades consiste típicamente en árboles de todas las edades, donde las categorías mayormente representadas son las que agrupan a plántulas y juveniles, exhibiendo una distribución de edades que se ajusta a una jota invertida, donde el número de individuos por categoría de edad disminuye exponencialmente conforme aumenta la edad. (Platt *et al.*, 1988; Delgado, 1997).

En cuanto a los pinos piñoneros se refiere, su tasa de crecimiento es extremadamente lenta, además que la estructura de edades que presentan se encuentra marcada por la sequía, la cual afecta principalmente el establecimiento de semillas y el reclutamiento de nuevos individuos (St. André *et al.*, 1965). La estación de crecimiento en pinos de zonas áridas se ve fuertemente limitada tanto por el régimen extremo de temperaturas, como por la carencia de agua; el establecimiento de semillas suele ser episódico y la estructura de edades se ve afectada por la disponibilidad de agua, ya que la sequía afecta principalmente a las semillas y los individuos jóvenes, lo cual ocasiona que el reclutamiento sea raro y altamente variable (Keeley and Zedler, 1998).

Descripción de la especie

Pinus nelsoni es un árbol pequeño de 5 a 10 metros de altura y con tronco de 10 a 30 cm de diámetro, tiene copa baja, ramas largas y corteza fina color blanco grisáceo de textura suave cuando el árbol es joven, mientras que en árboles viejos el color es gris oscuro y con fisuras formando placas rectangulares (Perry, 1991).

Las hojas son de 5 a 10 cm de largo y de color verde grisáceo, se encuentran en grupos de tres pero permanecen unidas, dando la apariencia de ser una sola acícula (Zavarín y Snajberk, 1987; Perry, 1991). Los estomas están distribuidos en cuatro a seis filas y se encuentran tanto en la parte dorsal como ventral de la hoja. Esta posee uno o dos canales resiníferos y un sólo haz vascular. El fascículo es pardusco y persistente, lo cual es una característica única de esta especie (Zavarín y Snajberk, 1987) midiendo de 0.5 a 0.8 cm de

largo (Tabla 2). Según Suzán (1985) la expectativa de vida de esta especie es de 80 años y el individuo más longevo que se ha localizado en un análisis dendrológico es de 120 años. *P. nelsonii* tiene un tiempo generacional que varía entre los 17 y 22 años (Suzán-Azpiri *et al.*, en prensa).

Los conos femeninos son simétricos, cilíndricos, de 8 a 15 cm de largo y 5 a 7 cm de ancho cuando están abiertos, y son de color naranja amarillento. Se encuentran solos o por pares al final de un ancho pedúnculo curvado cuya longitud es de 3 a 6 cm. Las escamas son anchas, gruesas, con apófisis piramidal levantada y con una quilla transversal prominente. El umbo está pobremente definido. Las semillas miden de 10 a 15 mm de largo y no presentan ala; tienen una cubierta ancha y dura y endospermo de color blanco, mientras el tiempo en el cual éstas persisten dentro del banco de semillas es de aproximadamente dos años (Suzán, 1985).

Pinus nelsonii pertenece al grupo de los pinos piñoneros (Subsección *Cembroides s.l.*) debido a que posee semillas sin alas. Sin embargo, es fácilmente diferenciable de los otros piñoneros por su robusto pedúnculo curvado y persistente, su corteza blanca grisácea y por sus hojas unidas y con vaina persistente. Shaw resalta la peculiaridad de este pino de presentar conos madurando continuamente (Perry, 1991), caracter único en los pinos. Zavarín y Snajberk (1987) afirman que *P. nelsonii* no muestra ninguna afinidad morfológica cercana con otro pino piñonero.

Todas las especies de pinos piñoneros poseen semillas que son dispersadas por aves y aunque no hay detalles de este mutualismo para pinos mexicanos, se ha sugerido que dos especies del género *Aphelocoma* y el cuervo (*Corvus corax*) podrían desarrollar dicha función (Farjon 1996). La dispersión por aves en general tiene un fuerte significado biológico, debido a que generalmente ocurre en el contexto del mutualismo (Lanner, 1998). En general, los integrantes de dicho mutualismo son pinos que presentan semillas sin alas y varias aves del grupo de los cuervos. En los únicos pinos piñoneros en los cuales se ha reportado extensivamente dicho mutualismo es en *P. monophylla* y *P. edulis*, los cuales presentan mutualismo con cuatro córvidos: *Aphelocoma coerulescens*, *Cyanocitta*

stelleri, *Gymnorhinus cyanocephalus* y *Nucifraga columbiana* (Lanner, 1998). Estas aves extraen las semillas de los conos abiertos, y pueden transportar entre 5 y 90 semillas dependiendo de la especie (Lanner, 1998) por distancias que varían desde 1 a 20 Km.

Pinus nelsonii, así como varios piñoneros más, se encuentran asociados al ambiente de chaparral de montaña. El clima característico consiste en tormentas de verano, niebla ocasional y en, altas elevaciones, heladas frecuentes; así como susceptibilidad a fuego causado por rayos. La sequía prolongada, así como la radiación intensa pudieron haber seleccionado las hojas cortas y rígidas de este tipo de pinos (Farjon 1996).

El otro ambiente donde se le puede encontrar es en zonas con vegetación arborescente bastante dispersa, en la cual se puede encontrar a *P. cembroides* y otros piñoneros en diferentes proporciones, junto con diferentes especies de *Juniperus*. Este tipo de vegetación se encuentra mucho en pendientes semiáridas y mesas que bordean las Sierras Madres Oriental y Occidental (Farjon 1996).

Según Perry (1991), *Pinus nelsoni* habita en zonas áridas o semiáridas de las mesas y partes bajas de la Sierra Madre Oriental. Su intervalo altitudinal generalmente es entre 1,800 y 3,100 m, aunque hay otros autores que sólo lo ubican hasta los 2500 m (Zavarín y Snajberk, 1987). Sin embargo, en Peña Nevada, en el límite entre Nuevo León y Tamaulipas, se pueden encontrar hasta los 3,200 m. La precipitación anual es de 300 a 600 mm y ocurre durante los meses de verano. Normalmente se encuentra asociado con *P. cembroides*, *P. johannis* y *Juniperus spp.*

La distribución de *P. nelsoni* se limita a la Sierra Madre Oriental, en los municipios de San Lorenzo, Aramberri, Galeana y Doctor Arroyo en el estado de Nuevo León; en Valle Hermoso municipio de Miquihuana, Palmillas y Tula en Tamaulipas; y en Las Tablas, San Luis Potosí. También se menciona una localidad en las Montañas del Carmen en Coahuila (Perry, 1991). Zavarín y Snajberk (1987) colectaron este pino en una localidad en Mina de las Cuevas San Luis Potosí (Figura 1).

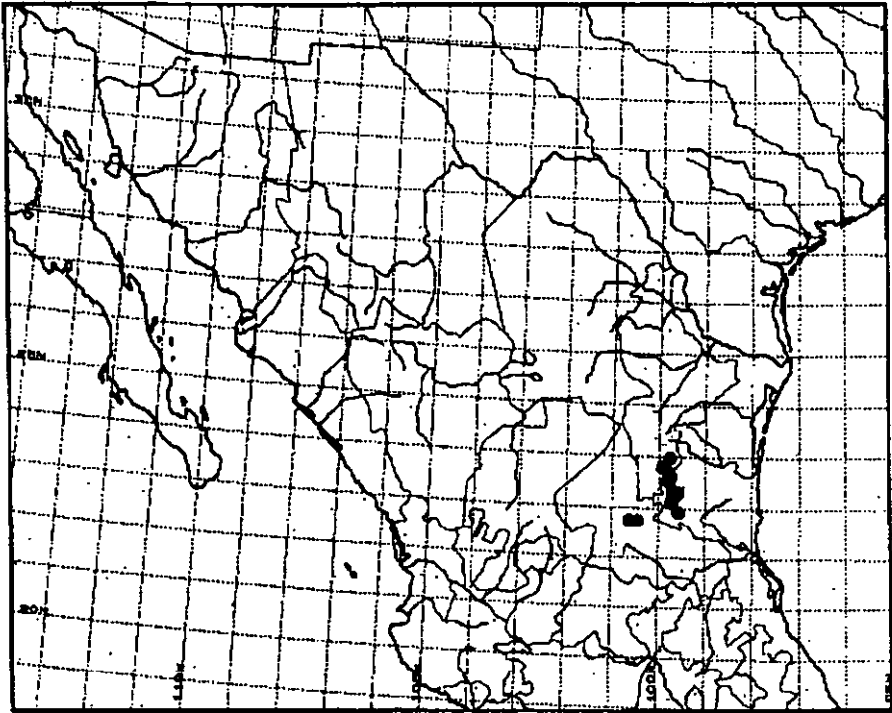


Figura 1 Distribución geográfica de *P. nelsonii* según Farjon y Styles (1997)

En cuanto a la demografía de esta especie, un estudio realizado por Suzán-Azpiri *et al.* (manuscrito) encontró que, en general, las poblaciones se encuentran constituidas por una gran proporción de plántulas y adultos, mientras que las etapas juveniles se encuentran pobremente representadas, lo cual lleva a los autores a afirmar que el reclutamiento de nuevos individuos es periódico en estas poblaciones. Sin embargo, la lambda (λ) encontrada en dos años consecutivos no es estadísticamente diferente de cero, por lo cual, el crecimiento poblacional no difiere de la estabilidad. (Suzán-Azpiri *et al.*, manuscrito).

La curva de sobrevivencia de *P. nelsonii* muestra una alta mortalidad durante los primeros cinco años después de la germinación; mientras que la curva de fecundidad muestra un rápido incremento después de los cuarenta años (Suzán-Azpíri *et al.*, manuscrito).

Considerando lo anterior, Suzán *et al.* (manuscrito) considera a *P. nelsonii* como una especie de vida corta, encontrada en zonas de disturbio, como es el caso de zonas áridas con propensión a fuegos ocasionales; presentando ciclos de tres años para la producción de conos y establecimiento de semillas.

P. nelsonii se encuentra dentro del género *Pinus*, dentro del subgénero *Strobus*, también conocido como *Haploxyton* o pinos blandos, por agrupar a las especies que sólo poseen un haz vascular. Pertenece a la sección *Parrya* por la naturaleza de su madera y, junto con los otros piñoneros, a la subsección *Cembroides s.l.* la cual según Balley (1983) incluye a *P. cembroides*, *P. discolor*, *P. johannis*, *P. remota*, *P. culminicola*, *P. pinceana*, *P. maximartinezii*, *P. quadrifolia* y *P. monophylla*. Debido a que *P. nelsonii* es muy diferente a los demás cembroides, Perry (1991) lo coloca junto con *P. pinceana*, *P. maximartinezii* y *P. rzedowskii* en la subsección *Pinceana*, dentro de la sección *Paracembra* del subgénero *Strobus*, por ser pinos piñoneros de cono grande. Por otro lado, análisis cladísticos han demostrado que el grupo de los pinos piñoneros es monofilético si no se incluye en él a *P. nelsonii*, el cual aparece como grupo hermano, tanto de la subsección *Cembroides* como de la subsección *Strobus*, representando un linaje viejo que no se encuentra relacionado directamente con el resto de los pinos piñoneros (Farjon, 1996). Por lo anterior, Liston *et al.* (1999) propone conformar la subsección *Nelsoniae* la cual, en un análisis realizado con ITS, se encuentra mucho más cerca de la subsección *Balfourianae* (Liston *et al.*, 1999) que de los pinos piñoneros.

Farjon (1996) se inclina a pensar que *P. maximartinezii*, *P. rzedowskii*, *P. pinceana* y *P. nelsonii* son taxa relictuales, siendo muy probable que sus parientes cercanos se encuentren extintos.

Tabla 2 Características morfológicas de *P. nelsonii* (Zavarin y Snajberk, 1987)

Acículas		Conos	
Número por fascículo	3	Largo del pedúnculo	3.0 - 5.0 cm
Largo	4.0 - 9.5 cm	Largo del cono	8.5 - 14.0 cm
Ancho	0.4 - 0.9 mm	Ancho del cono	5.0 - 6.0 cm
Filas de estomas adaxiales	3 - 4	Semillas (sin ala)	
Filas de estomas abaxiales	1 - 2	Largo	10.0 - 15.0 mm
Canales resiníferos	2	Ancho	7.0 - 10.0 mm
Haces vasculares	1		
Fascículo	Persistente	Altura del árbol	5.0 - 9.0 m
Largo	0.5 - 0.8 cm		

Finalmente, según la Norma Oficial Mexicana de Protección ambiental - Especies de flora y fauna silvestre de México, publicada en el Diario Oficial en octubre del 2000, *P. nelsonii* es una especie sujeta a protección especial. Esto implica que dicha especie podría llegar a encontrarse amenazada por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación o la recuperación y conservación de las especies que se encuentren asociadas.

Microsatélites (SSR's) como marcadores moleculares

Los microsatélites fueron descubiertos en los genomas eucariontes alrededor de 1980, y desde entonces han sido ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones, principalmente en análisis de parentesco (Jarne y Lagoda, 1996; Scotti, *et al.* 1999), demostrando ser una fuente altamente informativa para estudios de la historia de las poblaciones, el monitoreo de flujo genético e hibridación, entre otros.

Los microsatélites o Simple Sequence Repeats (SSRs) son secuencias de nucleótidos de DNA con grupos de uno a cinco pares de bases (motivos en tandem) los cuales en general se repiten de cinco a cien veces en un sitio. Se encuentran ampliamente distribuidos por

todo el genoma eucarionte (Powell, *et al.* 1995) tanto en el núcleo como en la mitocondria y el cloroplasto.

Se ha demostrado que alrededor del 25% de los microsátélites se heredan de forma mendeliana con un locus único (Anzidei, *et al.* 1999) y son marcadores codominantes, lo cual nos permite diferenciar los estados homocigos y heterocigos (Anzidei, *et al.*, 1999), además de considerarse selectivamente neutrales. En general, presentan altos niveles de polimorfismo en poblaciones naturales. (Jarne y Lagoda, 1996) como resultado de diferentes números de repetición del motivo en la región del microsátélite, lo cual es fácilmente detectable por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Anzidei, *et al.* 1999).

En estudios de genética de poblaciones generalmente se utilizan microsátélites de dos, tres y cuatro nucleótidos repetidos, de los cuales se tiene que ser capaz de distinguir diferencias de tamaño con una precisión de un par de bases. Subsecuentemente se caracterizan los alelos por el número de repeticiones que presenten. (Jarne y Lagoda, 1996).

Una ventaja de los microsátélites es que su estructura molecular se encuentra ampliamente caracterizada, así como sus tasas de mutación, encontrándose trabajos recientes sobre la evolución molecular de este tipo de secuencias (Jarne y Lagoda, 1996). El modelo más aceptado sobre la generación de nuevas variantes en este tipo de secuencias es el de mutación paso a paso (stepwise), por adición o delección de las unidades de repetición que la componen. Bajo este modelo la magnitud de las diferencias en el tamaño de los distintos alelos será proporcional al grado de relación entre ellos. Esto quiere decir que las variantes con pequeñas diferencias de tamaño se encuentran más cercanamente relacionadas que variantes con diferencias de tamaño mayores (Jarne y Lagoda 1996; Li, 1997; Anzidei *et al.*, 1999), al considerarse una unidad de repetición como la unidad de variación, con lo cual el modelo predice una relación lineal entre la distancia genética basada en las diferencias de tamaño de los alelos y el tiempo de divergencia de estos (Echt *et al.*, 1998). Sin embargo, la formulación original de este modelo (Ohta y Kimura, 1973; Kimura y Ohta, 1978) supone que no hay restricciones en el tamaño alélico y, por lo tanto, la

mutación actúa como un factor que potencia las diferencias genéticas. Sin embargo, cuando se ponen ciertas restricciones hacia el sentido en el cual muta el microsatélite, como se ha visto que efectivamente ocurre (Jarne y Lagoda, 1996; Krygryak *et al.*, 1998; Estoup y Cornuet, 1999), la probabilidad de que nuevas mutaciones resulten en la reaparición de alelos perdidos en el pasado se incrementa considerablemente, con lo cual la mutación actuaría como un factor homogeneizador más que un generador de divergencias (Gaggiotti *et al.* 1999).

Algunas de los estudios recientes en este campo han estado destinados a encontrar secuencias flanqueantes que puedan ser utilizadas en la amplificación de loci específicos de microsatélites, así como, ayudar a la determinación de los tipos de familias en las cuales se agrupan las secuencias repetidas, su distribución y densidad en el genoma (Jarne y Lagoda, 1996).

La caracterización de la secuencia completa del cloroplasto de *Pinus thunbergii* en 1994 (Wakasugi *et al.*, 1994) ha permitido la identificación de este tipo de secuencias dentro de dicho organelo (cSSRs), así como de sus regiones flanqueantes, con lo cual se han podido generar primers específicos para la amplificación de microsatélites particulares de pinos y otras coníferas (Vendramin, *et al.*, 1996).

La herencia de los microsatélites de cloroplasto se ha estudiado en varias especies de coníferas, entre ellas *Picea abies* K. (Sperisen *et al.*, 1998), *Abies alba* (Vendramin y Ziegenhagen, 1997), *Pinus radiata* (Cato y Richardson, 1996), y en cruza de *Pinus halepensis* y *Pinus brutia* (Anzidei, *et al.*, 1999), encontrándose en todos los casos herencia por vía paterna.

Debido a que el genoma del cloroplasto se encuentra altamente conservado, tanto en el arreglo de los genes como de las secuencias intergénicas, las cSSRs presentan un alto grado de universalidad; así, contrario a lo que sucede con microsatélites nucleares, los primers diseñados con la secuencia de *P. thunbergii* funcionan para amplificar cSSRs de otras coníferas (Powell *et al.*, 1995; Vendramin *et al.*, 1996). La secuencia de las regiones

amplificadas por estos primers ha confirmado la presencia de microsatélites en *Picea abies* (Vendramin *et al.* 2000), *Abies alba* (Anzidei *et al.*, 1999), *Pinus halepensis* (Bucci *et al.* 1998), *Pinus brutia*, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea*, y *Pinus cembra* (Anzidei, *et al.*, 1999).

El alto grado de polimorfismo de los microsatélites resulta sumamente útil en estudios genéticos de especies en las cuales se ha encontrado nula o baja variación genética con otro tipo de marcadores menos sensibles como RAPDs o isoenzimas como ocurriría en algunas de las especies con distribución restringida (ej. Echt *et al.*, 1998).

En el caso particular de poblaciones que suponemos hayan pasado por un fuerte cuello de botella, los marcadores moleculares haploides resultan mucho más eficaces como indicadores de grandes reducciones en el tamaño poblacional debido a que el tamaño efectivo de la población es dos veces más pequeño respecto a un marcador diploide (Echt *et al.*, 1998). Por otro lado, los genomas haploides transmitidos uniparentalmente en los cuales no hay procesos de recombinación, mantienen un registro de las nuevas mutaciones, lo cual puede encontrarse oscurecido en genomas diploides (Echt *et al.*, 1998).

Mecanismos de mutación en los microsatélites

Como se mencionó anteriormente, una de las características que permiten utilizar a los microsatélites en estudios de genética es su alta variabilidad. Las tasas de mutación de la mayoría de los microsatélites son varios ordenes de magnitud mayor que la de otros loci en el mismo genoma, siendo particularmente frecuentes las mutaciones que cambian el tamaño del microsatélite (Eisen, 1999). Se cree que existen dos mecanismos distintos con los cuales se puede explicar las diferencias de tamaño de los microsatélites, estos son el entrecruzamiento desigual y el *slip-strand misparing*. El primero supone que la presencia de regiones altamente repetidas aumenta la probabilidad de que los cromosomas homólogos se encuentren apareados incorrectamente durante la recombinación. El segundo ocurre durante la duplicación del DNA, debido a un error de la polimerasa, la cual permite que el templado y la cadena que se está polimerizando se desalinien temporalmente (Figura 2). Si esto ocurre en una región donde la secuencia es repetitiva, ambas cadenas se pueden

realinear fuera de su sitio, formándose así una cadena de distinto tamaño que el templado original (Li, 1997, Eisen, 1999, Hancock, 1999).

Recientemente se ha generado una serie de evidencias a favor del *slip-strand mispairing* como el principal responsable de los cambios de tamaño de los microsatélites, entre ellas se ha visto que la tasa de mutación de los microsatélites no se ve afectada cuando se suprime la recombinación, ni varía entre células mitóticas y meióticas, lo cual contradice la idea de que la recombinación es el mecanismo responsable de la variación en los microsatélites (Eisen 1999, Hancock 1999).

Independientemente del mecanismo molecular responsable de la alta tasa de mutación presente en este tipo de marcadores, se sabe que un evento de mutación en un microsatélite generalmente involucra un cambio de tamaño de una unidad de repetición, sin embargo, esto puede no ser siempre así, habiendo casos en los que la mutación puede implicar varias unidades de repetición (Estoup y Cornuet 1999). A pesar de carecer de datos suficientes respecto a los mecanismos de mutación de este tipo de secuencias, es sumamente importante resolver qué tipo de modelo teórico de mutación se debe aplicar a los datos de microsatélites, ya que una gran cantidad de parámetros poblacionales dependen de dicho modelo. Principalmente dos tipos de modelos teóricos de mutación han sido aplicados a los microsatélites, estos son el de mutación por alelos infinitos (Kimura y Crow 1964) y el de mutación paso a paso o *stepwise* (Kimura y Ohta 1978). Sin embargo, conforme más datos se van acumulando se vuelve más claro que no existe un modelo de mutación capaz de describir la dinámica de los distintos loci de microsatélites, aunque el modelo de mutación paso a paso parecería ajustarse mejor en las simulaciones (Valdés *et al.*, 1993) que cualquier otro tipo de modelo de mutación.

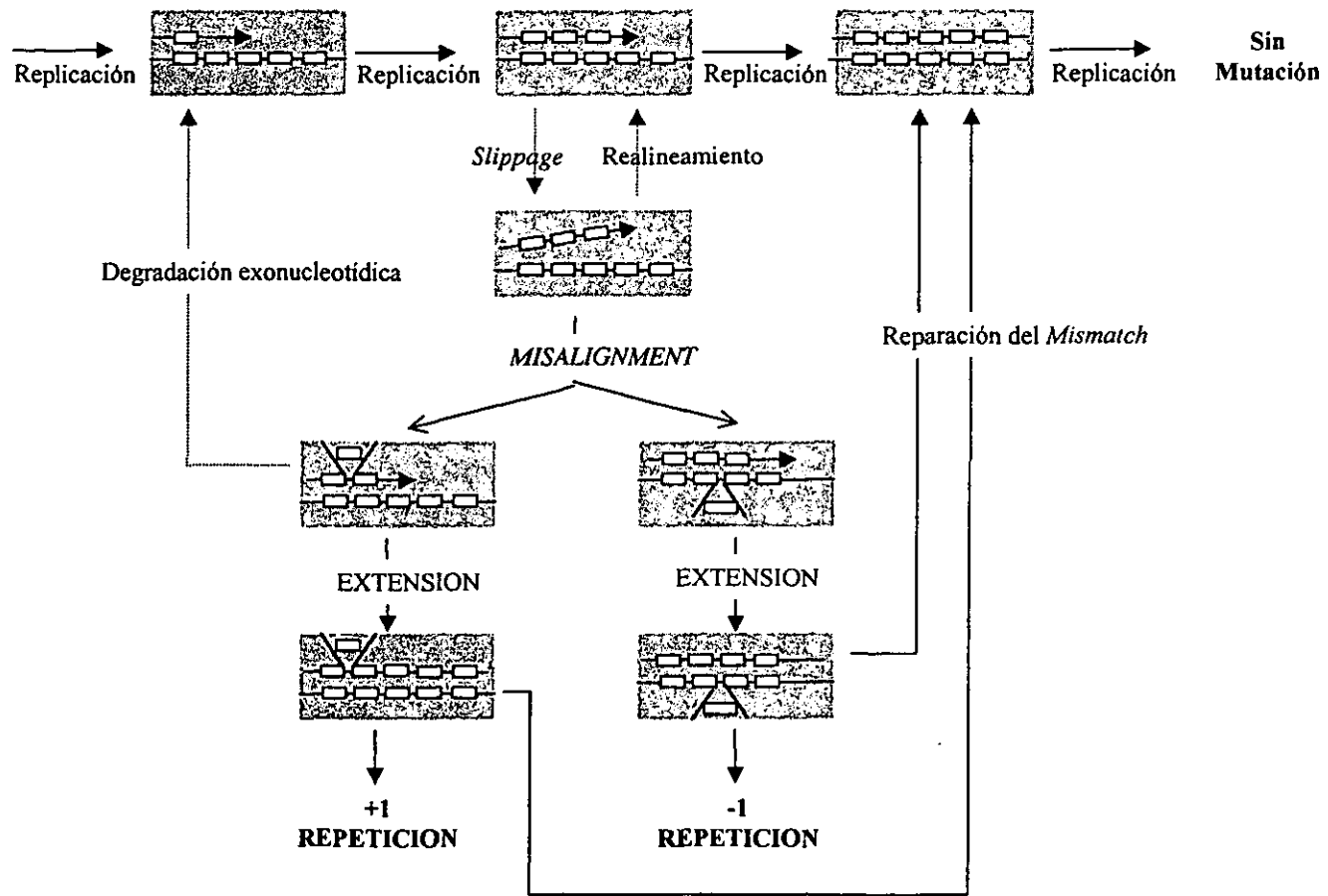


Figura 2. Modelo de mutación en loci de microsatélites. Las cadenas de DNA están representadas por líneas, las unidades de repetición por cajas (Eisen, 1999).

Objetivos

- 1- Estimar la estructura de edades de las poblaciones de *P. nelsonii*
- 2- Estimar los niveles y distribución de la variación genética encontrada tanto dentro como entre las poblaciones de *P. nelsonii* con base en microsatélites de cloroplasto como marcador molecular y utilizando dos diferentes modelos de mutación.
- 3- Obtener estimados de flujo genético mediado por polen entre poblaciones (N_m).
- 4- Correlacionar la distancia genética con la distancia geográfica, de modo que se pueda observar si las poblaciones de *P. nelsonii* se ajustan a un modelo de aislamiento por distancia.
- 5- Inferir los patrones demográficos que han seguido las poblaciones de *P. nelsonii* en un pasado no muy lejano.

Metodología

Colecta

La localización de las poblaciones se hizo con base en la ubicación geográfica de *Pinus nelsonii* encontrada en Perry (1991), Farjon y Styles (1997) y Martínez (1992); así como en una revisión de muestras de herbario en el Herbario del Instituto de Biología UNAM (MEXU), y el Herbario del Instituto Nacional para la Investigación Forestal, Agropecuaria y Pesquera (INIFAP). También se recaudó información con los habitantes de los diferentes lugares para detectar poblaciones no reportadas en la literatura. En el caso de la población de las Montañas del Carmen, se pidió información en la SAGAR y en la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", ambas ubicadas en Saltillo, Coahuila.

Se hicieron dos salidas al campo una en febrero de 1999 y otra en noviembre del mismo año. Las poblaciones fueron localizadas geográficamente con un geoposicionador obteniéndose latitud, longitud y altitud de cada una de ellas. Se calculó la distancia promedio entre poblaciones basándose en un método de triangulaciones sobre un mapa.

Se tomaron muestras de por lo menos 30 individuos al azar en cada población, a los cuales se les midió el perímetro con una cinta métrica y posteriormente se calculó el diámetro mediante la fórmula $P = 2\pi r$. La altura se estimó visualmente y se hizo una estimación de la edad por medio de los anillos de crecimiento, para lo cual se utilizó un taladro de Pressley. De cada individuo se colectaron acículas, guardándolas en hielo para su posterior tratamiento en laboratorio. También se colectaron plántulas en las poblaciones en que éstas se hallaban presentes.

En total se colectaron 293 individuos adultos y 50 plántulas. Del total de individuos adultos colectados, sólo para 177 se obtuvo su edad, mientras que para 247 se midió su perímetro y la altura se calculó para 251 individuos.

Tabla 3 Localización geográfica de las 9 poblaciones encontradas en México de *P. nelsonii* y número de individuos colectados en cada población.

Estado	Población	Latitud	Longitud	Altitud	Individuos
Tamaulipas	Tula	23°15.89 N	99°40.68 W	2265 msnm	30
		23°17.39 N	99°39.43 W	1747 msnm	
Tamaulipas	Miquihuana	23°35.15 N	99°45.01 W	1731 msnm	30
Tamaulipas	Las Antonias	23°24.03 N	99°51.2 W	1791 msnm	46
		23°28.20 N	99°49.29 W	2174 msnm	34 plántulas
Nuevo León	Peña Nevada	23°48.14 N	99°54.1 W	2244 msnm	30
		23°48.23 N	99°54.0 W	2240 msnm	15 plántulas
Tamaulipas	San Lázaro	23°48.42 N	99.33.92 W	2179 msnm	30
Tamaulipas	Palmillas	23°17.81 N	99°07.36 W	1597 msnm	30
San Luis	La Tapona	22°49.39 N	100°37.5 W	2191 msnm	27
Potosí		22°47.80 N	100°36.21W	2537 msnm	
San Luis	Los	22°47.89 N	100°35.81 W	2310 msnm	30
Potosí	Duraznillos	22°47.96 N	100°37.06 W	2514 msnm	
San Luis	Puerto	22°41.38 N	100°26.32 W	2168 msnm	29
Potosí	Membrillo				

Análisis de estructura de edades de las poblaciones

Debido a que el número de individuos para los cuales se pudo medir la edad era muy reducido en comparación con el total de individuos colectados (177 de 293) se buscó otro parámetro que se correlacionara con la edad, de modo que nos permitiera inferir la edad de los individuos sin tener que medirla directamente. Para hacer lo anterior, del total de individuos muestreados se estimó la regresión entre la edad y el diámetro a la altura del pecho, así como, entre la edad y la altura. Para hacer el análisis de la estructura de edades se eligió utilizar como parámetro el diámetro, por presentar un coeficiente de correlación

con la edad mayor que el encontrado en la regresión entre edad y altura. Con la ecuación obtenida se estimó la edad para 256 individuos de *P. nelsonii*, con la cual histogramas de frecuencia tanto para el conjunto de todos los individuos como para cada una de las poblaciones por separado. El número de categorías de edad se calculó con la fórmula $[(\text{Valor máximo} - \text{Valor mínimo}) / 5 \log N]$.

Amplificación de microsatélites de cloroplasto de pino

Las muestras de material biológico se guardaron a -20°C hasta la extracción de DNA, y éste se almacenó posteriormente a -70°C .

La extracción de DNA total se realizó por el método de miniprep según el protocolo de Vazquez-Lobo (1996; Apéndice I) y posteriormente se cuantificó el DNA con un fluorómetro. Se hicieron diluciones donde la concentración final de DNA fuera de aprox. $15 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Se eligieron primers utilizados con anterioridad en la amplificación de microsatélites de cloroplasto de pinos (Vendramin *et al.*, 1996; Echt *et al.*, 1998) basados en la secuencia de *P. thunbergii* (Tabla 3).

Marcaje radiactivo de los primers

El *forward* de cada uno de los primers se marcó de la siguiente manera:

En un volumen final de reacción de $25 \mu\text{l}$, el cual contenía 6.4 mM del oligonucleótido *forward*, 50 mM de imidazol-HCl (p.H. 6.4), 12 mM de MgCl_2 , 1 mM de 2-Mercaptoetanol, $70 \mu\text{M}$ de ADP, 5 unidades de cinasa T4, $0.5 \mu\text{l}$ de $[\gamma^{32}\text{-P}] \text{ ATP}$ ($10 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$).

La reacción fue incubada a 37°C por 10 minutos para activar la cinasa y posteriormente a 65°C por otros 10 minutos para detener la reacción. El primer marcado se almacenaba a -20°C hasta su utilización.

Condiciones de la amplificación

La reacción de amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó en un volumen total de 25 µl el cual contenía 0.2 mM de cada dNTP, 2.5 mM de MgCl₂, buffer de reacción 10X (Gibco), 0.15 mM de oligonucleótido reverse, 0.5 mM de oligonucleótido *forward* marcado radiactivamente, 0.1 mM de oligonucleótido *forward*, 45 ng de templado de DNA, 0.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Gibco).

La reacción fue hecha en un termociclador Gibco y los ciclos utilizados fueron los siguientes: 5 minutos de desnaturalización a 95°C, 5 minutos a 80°C, seguido por 33 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a 59°C y 1 minuto de extensión a 72°C, con una extensión final de 8 minutos a 72°C.

Detección de productos del PCR

Una vez amplificados los microsátélites de cloroplasto de pino se corrieron en geles desnaturalizantes de acrilamida 6%, urea 7 M, en cámaras de electroforesis vertical a 60 Watts constantes durante 3 horas aproximadamente (aunque el tiempo de corrimiento depende del tamaño del microsátélite que se haya amplificado), cuidando que la temperatura del gel no excediera los 40°C. Se utilizó un marcador de peso molecular de 10 pb (Gibco) el cual fue marcado radiactivamente (Apéndice II) y la secuencia del plásmido pUC18 obtenida con un kit de secuenciación de marca Gibco (Apéndice III).

Los geles fueron secados con una secadora de vacío por dos horas y expuestos en una placa autoradiográfica toda la noche, sin placas intensificadoras y a temperatura ambiente; aunque el tiempo de exposición puede variar dependiendo de la intensidad de la marca radiactiva. Posteriormente, las placas se revelaron en un revelador automático marca Kodak facilitado por el Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Tabla 4 Primers utilizados para la amplificación de microsatélites de cloroplasto de pino. Basados en la secuencia de *P. thunbergii* (Vendramin et al. 1996).

Primer	Secuencia	Ubicación
P11254	CAATTGGAATGAGAACAGATAGG TCCGTTGCACTTCGTTATAG	espaciador del <i>psbA - trnK</i> (UUU)
P19383	AGAATAAACTGACGTAGATGCCA AATTTTCAATTAAGGTCATTA	intrón del <i>trnG</i>
P130204	TCATAGCGGAAGATCCTCTTT CGGATTGATCCTAACCATACC	<i>clpP</i> *
P171936	TTCATTGGAAATACACTAGCCC AAAACCGTACATGAGATTCCC	IRF169 *
P187268	GCCAGGGAAAATCGTAGG AGACGATTAGACATCCAACCC	espaciador del <i>trnI(GAU) - trnA</i> (UGC)
P115169	CTTGGATGGAATACGAGCC GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA	<i>rps2</i>
P136081	CCCGTATCCAGATATACTTCCA TGGTTTGATTCATTCGTTTCCAT	<i>rpoB</i> *
P163480	TTTTGGCTTACAAAATAAAAGAGG AAATTCCTAAAGAAGGAAGAGCA	espaciador del <i>psbJ - petA</i> *
P141093	TCCCGAAAATACTAAAAAAGCA CTCATTGTTGAACTCATCGAGA	ORF119
P16718	CACAAAAGGATTTTTTTTCAGTG CGACGTGAGTAAGAATGGTTG	<i>rpl2</i>
P1110048	TAAGGGGACTAGAGCAGGCTA TTGCTATTGAACCTTGGACA	intrón del <i>rps12</i>

* Primers utilizados en el análisis de datos, por ser polimórficos y con buena resolución sus productos de PCR.

Análisis de variación y estructura genética

Obtención de la matriz de datos

Los distintos alelos de cada uno de los loci fueron identificados por las diferencias de tamaño de los productos de las amplificaciones. Con los tamaños de los microsatélites amplificados se realizó una matriz donde sólo se incluyeron los microsatélites polimórficos. Los datos se analizaron con el programa Arlequin ver. 2.000 (Schneider *et al.* 2000).

Arboles basados en los distintos haplotipos

Con la matriz de los diferentes alelos por individuo se obtuvieron los haplotipos existentes en las poblaciones (siendo éstos las distintas combinaciones presentes entre los alelos encontrados); posteriormente se midió la distancia entre haplotipos como el número de mutaciones necesarias para pasar de un haplotipo al otro, esto se estimó simplemente como el número de diferencias en pares de bases entre los distintos haplotipos. Con la matriz de distancia entre haplotipos se realizó un fenograma utilizando el método de neighbor-joining, con el programa Phylip ver. 3.5c para PowerMac (Felsenstein, 1995). En este fenograma se trató de observar si los haplotipos mayormente parecidos entre sí se encontraban más cercanos geográficamente. Por otro lado, con los haplotipos presentes en las distintas poblaciones se realizó una matriz de presencia/ausencia, utilizando cada haplotipo como un carácter. Con esta matriz se realizó un filograma entre las diferentes poblaciones utilizando una búsqueda exhaustiva en el programa PAUP ver. 3.0s.

Diversidad genética

Se utilizaron varias medidas de la diversidad genética, la primera fue la heterocigosis virtual pues los marcadores son haploides o H_e (Nei 1987) la cual es expresada como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar dentro de una población sean iguales. Es estimada como:

$$H_e = (n/n-1) (1 - \sum_{i=1}^k P_i^2)$$

donde n es el número de copias del gen dentro de la población, k es el número de haplotipos en la población y P_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo (Nei 1987). La H_e se estimó tanto para el conjunto de todos los loci como tomando cada locus por separado; en ambos casos se calculó H_e para cada una de las poblaciones, así como para el conjunto formado por estas. Este índice puede tomar valores de cero –cuando no existe variación genética- a uno –cuando la variación genética es total-.

El segundo estimador que se utilizó fue el número promedio de diferencias entre todos los pares de haplotipos (π , Tajima, 1983) la cual se calculó de la siguiente manera:

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j=i}^k p_i p_j d_{ij}$$

donde d_{ij} es un estimado del número de mutaciones –estimada como el número de diferencias- ocurridas desde la divergencia de los alelos i y j , k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i (Schneider *et al.*, 2000). P_i puede adquirir valores que van del cero –para secuencias idénticas- a infinito.

Estimador indirecto del número de mutantes por generación

Otra de las características de la estructura genética que se estimó fue theta, la cual está definida como $\theta = 2Mu$ donde, en el caso de utilizar un marcador haploide, M es igual al tamaño poblacional (N) y u es la tasa de mutación (Schneider *et al.*, 2000); theta se relaciona con la homocigosis (F) de la siguiente manera:

$$F = 1/\theta + 1$$

Siendo esta la homocigosis esperada en una población que se encuentre en equilibrio entre deriva y mutación (Schneider *et al.* 2000). Como en este caso los marcadores son haploides, la homocigosis (F) será virtual y es expresada como $1 - H_e$. θ se puede calcular

en primer término siguiendo un modelo de mutación de alelos infinitos, donde cada nueva mutación generará un alelo nuevo y diferente en estado a el resto de los alelos existentes en la población (Guillespie, 1998) y por lo cual la mutación borra cualquier memoria del estado alélico anterior (Slatkin, 1995). La otra forma de calcular θ es siguiendo un modelo de mutación paso a paso (stepwise) donde los posibles estados alélicos son visualizados como los enteros de una recta numérica, donde cada nueva mutación causa que el alelo se mueva un paso hacia la derecha o hacia la izquierda (Li, 1997) de su posición original, esto quiere decir que el tamaño del nuevo alelo mutante depende del tamaño que haya tenido el alelo que le dio origen (Slatkin, 1995).

Estimadores de distancia entre haplotipos

Para estimar la distancia entre los distintos haplotipos se utilizaron dos aproximaciones distintas. La primera fue utilizando el número de diferentes alelos entre haplotipos, con lo cual las diferencias serán dadas como:

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

donde $\delta_{xy}(i)$ es llamada la función de Kronecker y es igual a 1 si los alelos del i -ésimo locus son idénticos en ambos haplotipos, o igual a cero si ambos alelos son distintos (Schneider, 2000). Este método de medir las distancias entre haplotipos es más apropiado para marcadores moleculares que se ajustan a un modelo de mutación de alelos infinitos y que presentan tasas bajas de mutación (Slatkin, 1995). Cuando se estima la estructura genética basándose en este estimador de las diferencias entre haplotipos el índice de fijación obtenido será la F_{st} ponderada, la cual es idéntica a la θ de Weir y Cockerham (1984; Michalakis y Excoffier, 1996; Schneider, 2000) donde se corrige la F_{st} para tamaños poblacionales diferentes.

La segunda aproximación que se utilizó para medir las diferencias entre haplotipos fue la varianza que hay dentro del número de repeticiones (suma cuadrada de las diferencias de tamaño) entre dos haplotipos (Slatkin, 1995) donde

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

en el cual a_{xi} es el número de unidades de repetición del microsatélite del i -ésimo locus (Schneider, 2000). Cuando los índices de estructura genética se obtienen con base en este estimado de distancia, el índice de fijación es un análogo a la R_{st} de Slatkin (1995; Schneider, 2000). Este estimador ha sido diseñado específicamente para datos obtenidos de microsatélites, ya que supone un modelo de mutación paso a paso (stepwise) y tasas de mutación elevadas (Slatkin, 1995).

Análisis de varianza molecular (AMOVA)

La estructura genética fue inferida por medio de un análisis de varianza molecular (Weir y Cockerham, 1984), el cual se basa en el número de diferencias encontradas entre los distintos haplotipos. Este tipo de análisis jerárquico parte de la varianza total en distintos niveles, de manera que:

$$\sigma^2_T = \sigma^2_a + \sigma^2_b$$

donde σ^2_T representa la varianza molecular total, σ^2_a es el componente de varianza dado por las diferencias encontradas entre las poblaciones, σ^2_b es la varianza entre individuos de una misma población (Weir y Cockerham, 1984) En el caso particular de que se estén utilizando haplotipos, la variación encontrada entre poblaciones esta dada por:

$$n\sigma^2_a + \sigma^2_b$$

$$\text{donde } n = N - \frac{\sum_p (N_p^2 / N)}{P - 1}$$

siendo N el número total de copias de un gen, N_p el número total de copias de un gen dentro de la población p y P el número total de poblaciones (Schneider 2000). El índice de fijación que mide el efecto de la subdivisión se calcula como σ^2_a / σ^2_T (Schneider *et. al.*, 2000).

Los componentes de la varianza (σ^2) fueron utilizados para estimar los distintos índices de fijación y los tiempos de coalescencia propuestos por Slatkin (Slatkin, 1995; Schneider *et al.*, 2000). El análisis se realizó con ambos estimadores de distancia entre haplotipos; en el caso de utilizar la varianza de la frecuencia alélica o el modelo de alelos infinitos, el índice de fijación que se obtiene es la F_{st} , mientras que cuando se utiliza la varianza del número de repeticiones o mutación paso a paso, lo que se obtiene es la R_{st} . De esta manera:

$$F_{st} = f_0 - f_1 / 1 - f_1 = t_1 - t_0 / t_1 \quad y$$

$$R_{st} = S_t - S_w / S_t = t_1 - t_0 / t_1$$

Donde f_0 es la probabilidad de que dos genes elegidos al azar dentro de una población sean idénticos por descendencia, f_1 es la probabilidad de que dos genes provenientes de dos poblaciones distintas sean idénticos por descendencia, t_1 es la media del tiempo promedio de coalescencia de dos genes provenientes de poblaciones distintas y t_0 es la media del tiempo de coalescencia de dos genes provenientes de la misma población (Slatkin, 1995; Schneider *et al.*, 2000). S_w es el promedio de la suma de los cuadrados de las diferencias en el tamaño alélico dentro de cada población, y S_t es el promedio de la suma de los cuadrados de las diferencias en el tamaño alélico de todos los pares de copias de un gen siendo $S_t = S_w + S_b$ donde S_b define el componente de varianza entre poblaciones (Slatkin, 1995).

La significancia de los índices de fijación fue probada utilizando un enfoque no paramétrico, donde se permutan haplotipos, individuos o poblaciones entre individuos, poblaciones o grupos de poblaciones; después de cada permutación se computan todos los estadísticos para obtener su distribución nula. Con este método se necesitan por lo menos 1,000 permutaciones para que el resultado sea confiable (Excoffier *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2000), por lo que se hicieron 1023 permutaciones.

El análisis de AMOVA no sólo se hizo a nivel haplotípico, sino que se realizó también para cada locus por separado; dicho análisis permite ver si hay inconsistencias entre los

datos, ya que si los datos son consistentes, es decir, no faltan datos para algunos individuos, ambos análisis deberán tener el mismo resultado (Schneider *et al.*, 2000).

Distancia genética entre poblaciones

Se calcularon las diferencias genéticas entre pares de poblaciones, utilizando una matriz de valores pareados de F_{st} y otra de R_{st} . La significancia se calculó permutando haplotipos entre ambas poblaciones. Estos estadísticos se pueden utilizar como estimadores de distancia genética a corto plazo (Schneider *et al.*, 2000).

El segundo estimador que se utilizó fue el promedio de diferencias entre poblaciones, que es el número de diferencias nucleotídicas entre pares de poblaciones donde:

$$D = \pi_{12} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k x_{1i} x_{2j} \delta_{ij} \quad y$$

$$D_A = \pi_{12} - [(\pi_1 + \pi_2) / 2]$$

Donde D y D_A representan la diferencia bruta y la diferencia neta respectivamente, mientras que k y k' son el número de distintos haplotipos en la población 1 y 2, x_{1i} es la frecuencia del i -ésimo haplotipo en la población 1 y δ_{ij} es el número de diferencias entre el haplotipo i y j .

Por otro lado D_A corresponde a la distancia genética de Nei, siendo $D_A = 2\mu(\tau - t_0) = 2\mu\tau + \theta$ donde μ es la tasa de mutación por nucleótido, τ es el tiempo de coalescencia entre dos poblaciones y $\theta = 2N\mu$. Estos estimadores se aplican sólo a datos haploides (Schneider *et al.*, 2000).

Se hizo una correlación entre las matrices de distancia genética (D_A) y la distancia geográfica, con el fin de dilucidar si los datos se ajustan a algún modelo de aislamiento por distancia. Para lo anterior se realizó una prueba de Mantel que nos permite correlacionar dos matrices de datos que no son del todo independientes (Mantel, 1967).

Se hicieron dendogramas de las distintas poblaciones utilizando una matriz de distancias genéticas (DA) para ambos modelos de mutación, utilizando neighbor-joining (Swofford y Olsen, 1990).

Tiempo de coalescencia entre las poblaciones

Como se mencionó anteriormente, el índice de fijación puede encontrarse expresado en términos del tiempo de coalescencia, para lo cual hay que suponer dos poblaciones haploides de tamaño N , las cuales divergieron τ generaciones atrás, permaneciendo aisladas desde entonces. Bajo estas condiciones:

$$F_{st} = \tau / (\tau + N) \quad \text{por lo tanto} \quad F_{st} / (1 - F_{st}) = \tau / N$$

Se obtuvo la matriz de valores pareados de τ / N para ambos modelos (F_{st} y R_{st}), lo cual es proporcional al tiempo de divergencia (en generaciones) entre el par de poblaciones que se estén comparando (Schneider *et al.*, 2000; Slatkin, 1995).

Número de migrantes entre poblaciones

El número de migrantes se calculó partiendo de dos poblaciones de tamaño N que intercambian una fracción m de migrantes cada generación. Suponiendo que la tasa de mutación es despreciable respecto a la tasa de migración, y que la población se encuentra en equilibrio entre migración y deriva génica:

$$F_{st} = 1 / (2M + 1) \quad \text{por lo tanto} \quad M = (1 - F_{st}) / 2F_{st}$$

Siendo M el número absoluto de migrantes intercambiado entre las dos poblaciones; al suponer que ambas poblaciones sólo intercambian genes entre sí entonces se puede dividir M sobre dos y así obtener Nm para poblaciones haploides (Schneider *et al.*, 2000). Esta ecuación se aplicó tanto para los valores de F_{st} como para los de R_{st} , obteniéndose así las matrices de número de migrantes entre pares de poblaciones. Para tratar de ver si los datos

se ajustan en cierta medida a algún tipo de aislamiento por distancia, se graficó la distancia genética contra el $\log M$, obteniéndose el coeficiente de correlación entre ambos.

Demografía histórica

Distribución *mismatch*

Para hacer un análisis de demografía histórica, es decir, de los cambios demográficos que han ocurrido en el pasado el cual, en este caso, puede ser relativamente reciente o abarcar varios miles de años (Rogers, 1995), se parte del supuesto de que las diferencias entre individuos miden la distancia genealógica entre ellos, la cual tiende a aumentar conforme el tamaño poblacional es mayor. Una de las formas para medir la distancia genealógica entre los individuos es hacer un análisis de la distribución del número observado de diferencias entre pares de haplotipos (*mismatch*; Rogers, 1995; Schneider *et al.*, 2000). Dicha distribución es multimodal en muestras de poblaciones que se encuentran en equilibrio demográfico, mientras que si la población ha pasado por una expansión reciente la distribución será unimodal (Schneider *et al.*, 2000).

Para desarrollar la metodología de la distribución de las diferencias entre pares de haplotipos, Rogers (1995) se basó en un modelo de expansión repentina, en el cual se parte de una población inicial de tamaño N_0 la cual se encuentra en equilibrio entre deriva y mutación. Esta población se expande rápidamente hasta llegar a un nuevo tamaño N_1 , lo cual sucede en un tiempo de t generaciones. De esta manera, el modelo reduce la historia de la población a tres parámetros (Rogers, 1995) N_0 , N_1 y t , sin embargo el efecto de cada uno de ellos puede ser confundido con la tasa de mutación (u), por lo cual la distribución de las diferencias entre pares de haplotipos nos da información sobre: $\Theta_0 = 2uN_0$, $\Theta_1 = 2uN_1$ y $\tau = 2ut$ (Rogers, 1995). Utilizando un método de momentos y suponiendo que Θ_0 tiende a infinito se llega a las ecuaciones:

$$\Theta_0 = (\nu - m)^{1/2} \quad \text{y} \quad \tau = m - \Theta_0$$

Donde m es la media observada de la distribución de las diferencias entre individuos y v es la varianza de dicha distribución.

En el presente trabajo se estimó la distribución de las diferencias entre pares de haplotipos, (distribución del *mismatch*), la significancia de los valores de la media y la varianza fue estimada mediante una prueba de chi cuadrada. Las diferencias entre pares de haplotipos se calcularon tanto para el modelo de alelos infinitos (alelos diferentes o F_{st}) como para el modelo e mutación paso a paso o *stepwise* (varianza en el tamaño de los alelos o R_{st}).

Inferencias a partir de árboles filogenéticos

La segunda aproximación que se utilizó para estudiar la demografía histórica de las poblaciones fue basándose en el tiempo ocurrido entre los nodos de un árbol genealógico, es decir, el tiempo transcurrido entre los distintos eventos de coalescencia (Nee *et al.*, 1996), con lo cual se pueden detectar cambios ocurridos en el tamaño poblacional.

Este método parte de la idea de que las poblaciones que se encuentran expandiéndose mostrarán una filogenia a manera de estrella que resultará en una relación parabólica entre la distancia entre haplotipos, como un estimado del tiempo de coalescencia entre dichos haplotipos (suponiendo que ambos estimadores son directamente proporcionales), y el logaritmo del número de linajes; por el contrario, poblaciones que se encuentren estables presentarán una filogenia fuertemente estructurada, lo cual resultará en una relación exponencial entre la distancia genética y el logaritmo del número de linajes (Nee *et al.*, 1996, Delgado *et al.*, 1999).

Para hacer este análisis se utilizó el dendograma de los diferentes haplotipos construido a partir de la matriz de diferencias entre haplotipos para el modelo de mutación paso a paso, y utilizando neighbor-joinig (Swofford y Olsen, 1990). Posteriormente se graficó el logaritmo del número de linajes contra el tiempo de coalescencia (medido como las diferencias entre haplotipos) para lo cual se consideró el tiempo actual como el tiempo cero.

Resultados

Ubicación geográfica de las poblaciones de *Pinus nelsonii*

Se localizaron en total nueve poblaciones en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí y Nuevo León (Figura 3), de las cuales fueron colectados un total de 256 individuos. Las poblaciones de Aramberri, Galeana (cerro del Potosí) y Doctor Arroyo en Nuevo León y las Tablas, San Luis Potosí, reportadas por Perry (1992), no fueron localizadas en ninguna de las salidas al campo, teniendo la seguridad de que por lo menos la población de Aramberri no existe actualmente. No se intentó llegar hasta el sitio donde presumiblemente se podría encontrar la población de Montañas del Carmen, por lo cual no se tiene la seguridad de que actualmente exista. Por otro lado, los informes de la Universidad Forestal de Saltillo indican que no se ha encontrado ninguna población de *P. nelsonii* en el estado de Coahuila.

La distancia geográfica mayor se encuentra entre la Tapona, San Luis Potosí y San Lázaro, Tamaulipas, siendo de 114.3 km. Las poblaciones que más cercanas se encuentran son la Tapona y los Duraznillos, separadas sólo por 2.4 km. (Tabla 5). El promedio de las distancias geográficas entre poblaciones es de 64.9 Km.

Tabla 5. Distancia promedio (Km) entre las 9 poblaciones encontradas en México de *P. nelsonii*. En gris la mayor distancia geográfica encontrada entre poblaciones

	Miquih	Anton.	PNeV	SLaza	Palmill	Tapon	Durazn	Membr
Tula	31.4	17.6	43.9	42.8	28.5	93.7	92.8	73.5
Miquih		13.7	21.2	22.9	55.8	91.1	88.5	89.4
Anton			28.9	36.4	59.4	78.1	77.6	75.6
PNeV				28.4	75.2	96.2	96.4	98.2
SLaza					53.3	114.3	113	111.9
Palmill						121	119	111.9
Tapon							2.4	17.9
Durazn								15.6

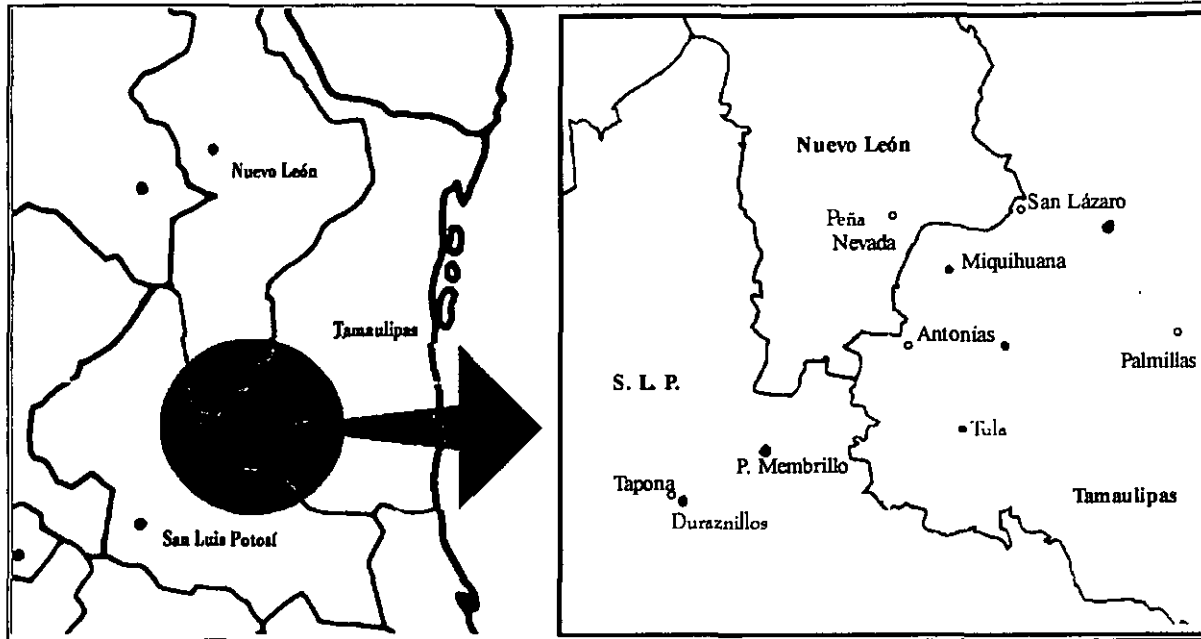


Fig. 3. Distribución geográfica de las 9 poblaciones de *P. nelsonii* encontradas en México

Análisis demográfico

Tanto la correlación de edad contra diámetro, como la de edad contra altura fueron estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), con un coeficiente de correlación $r = 0.8412$ para el diámetro y de $r = 0.7056$ para la altura (Figuras 4 y 5), encontrándose que la ecuación que mejor se ajusta en ambos casos es una regresión cuadrática entre los dos parámetros. La ecuación obtenida para inferir la edad utilizando el diámetro fue: $\text{edad} = 0.1114 (\text{DAP})^2 - 0.0757 (\text{DAP}) + 29.207$, mientras que en el caso de utilizar la altura: $\text{Edad} = 0.1604 (\text{altura})^2 + 5.4304 (\text{altura}) + 21.994$.

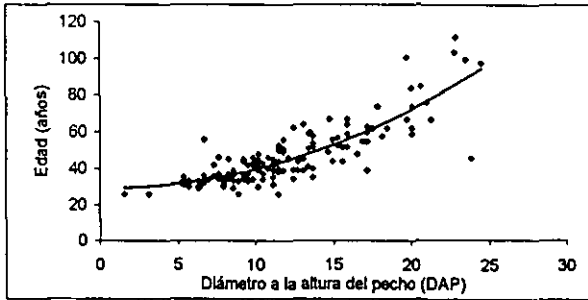


Figura 4. Correlación entre la edad medida en años y el diámetro a la altura del pecho (DAP) para 177 individuos de *P. nelsonii* encontrados en 9 poblaciones de México. $r = 0.8412$. $\text{Edad} = 0.114 (\text{DAP})^2 - 0.0757 (\text{DAP}) + 29.207$

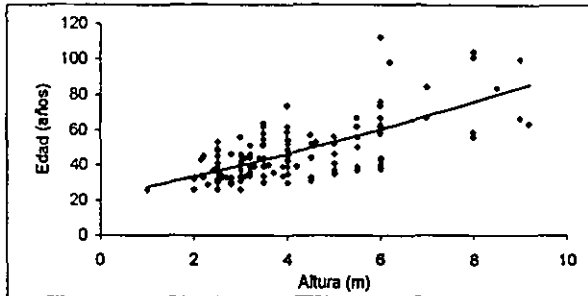


Figura 5. Correlación entre la edad medida en años y la altura en metros de 177 individuos de *P. nelsonii* encontrados en 9 poblaciones de México. $R = 0.7056$. $\text{Edad} = 0.1606 (\text{altura})^2 + 5.4304 (\text{altura}) + 21.994$.

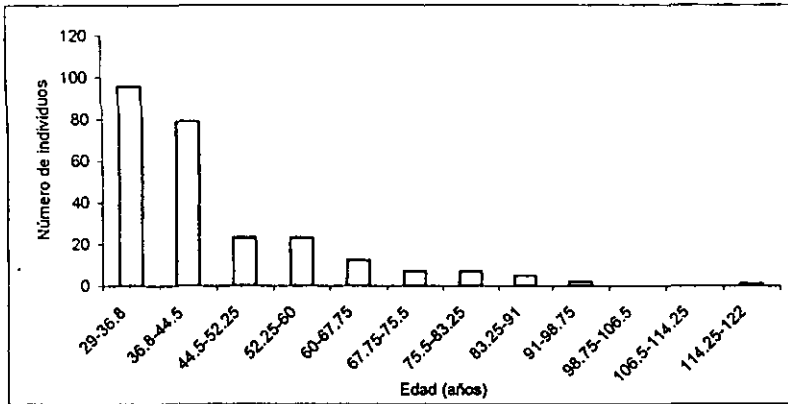


Figura 6. Distribución de edades para 256 individuos de *P. nelsonii* encontrados en 9 poblaciones de México (Media= 44.47, desviación estándar = 14.94).

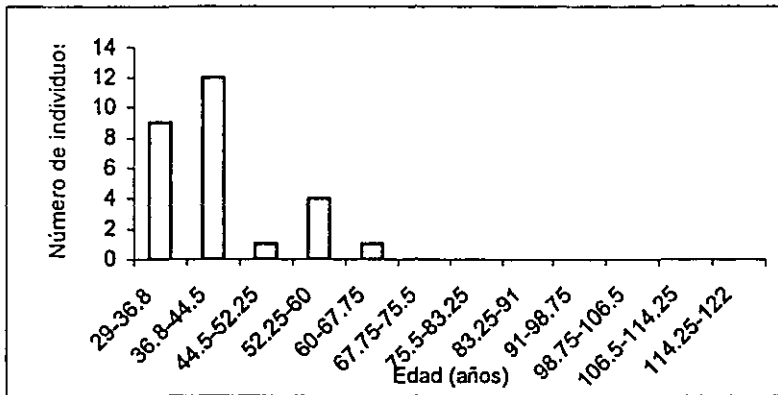


Figura 7. Distribución de edades para 27 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Tula, (Media=41.03, desviación estándar = 8.38).

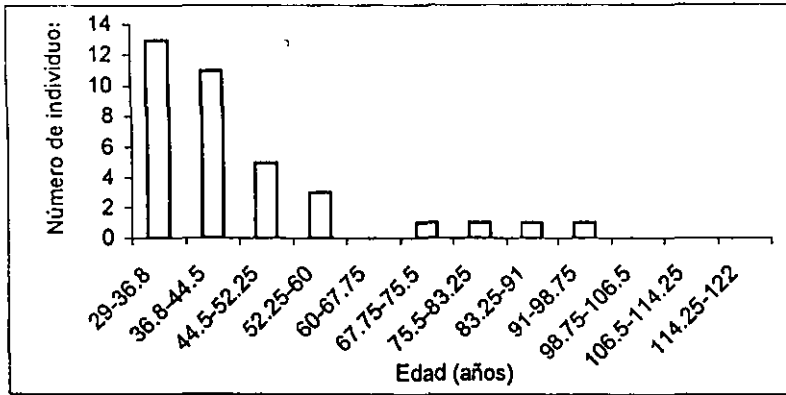


Figura 8. Distribución de edades para 37 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Miquihuana (Media = 43.29, desviación estándar = 15.76).

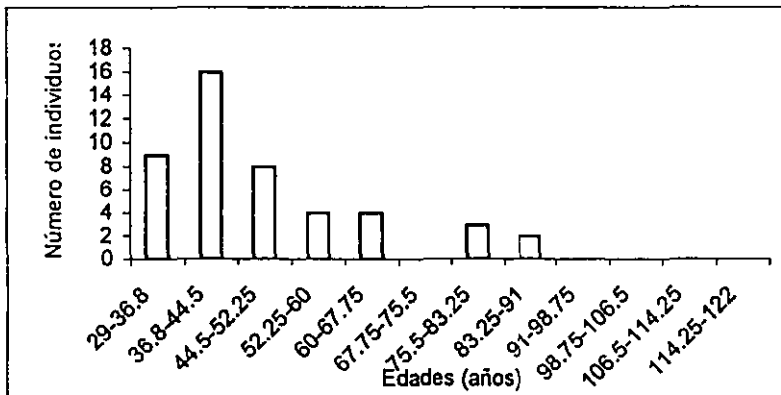


Figura 9. Distribución de edades para 45 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Las Antonias (Media = 46.76, desviación estándar = 13.87).

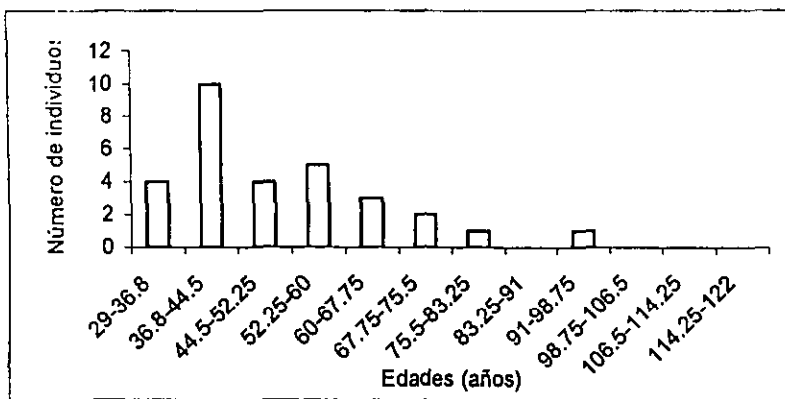


Figura 10. Distribución de edades para 30 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Peña Nevada (Media = 48.75, desviación estándar = 14.86).

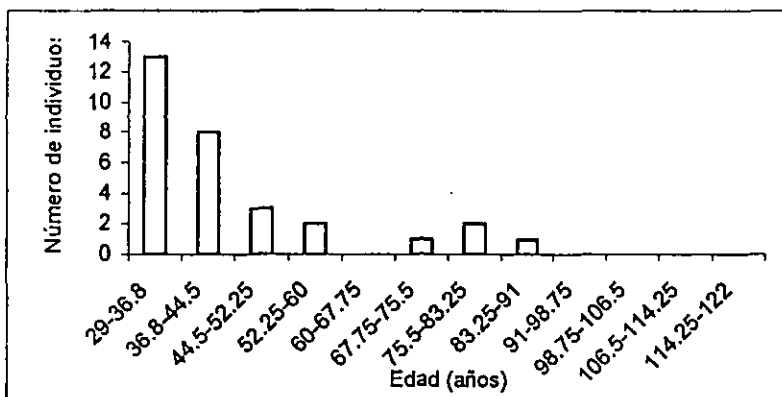


Figura 11. Distribución de edades para 30 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de San Lázaro (Media = 41.14, desviación estándar = 15.88).

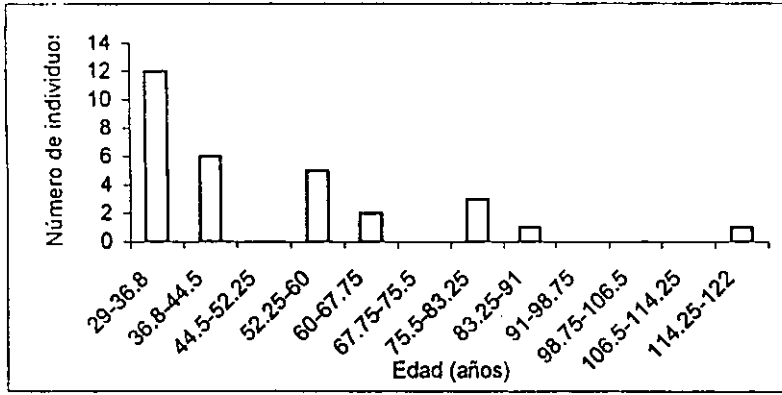


Figura 12. Distribución de edades para 30 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Palmillas (Media = 46.06, desviación estándar = 22.14).

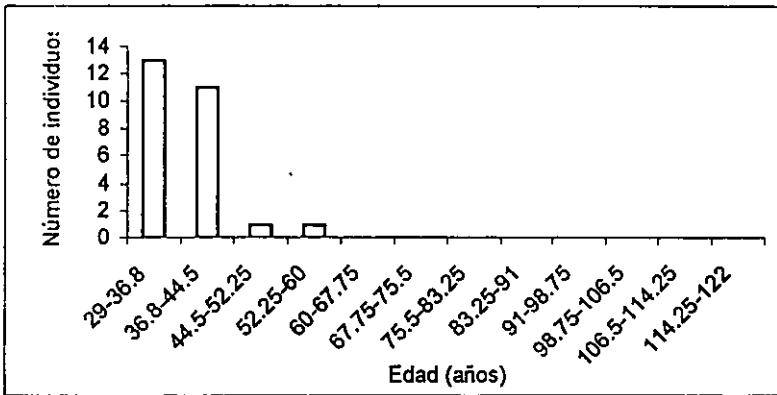


Figura 13. Distribución de edades para 27 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de La Tapona (Media = 37.77, desviación estándar = 6.16).

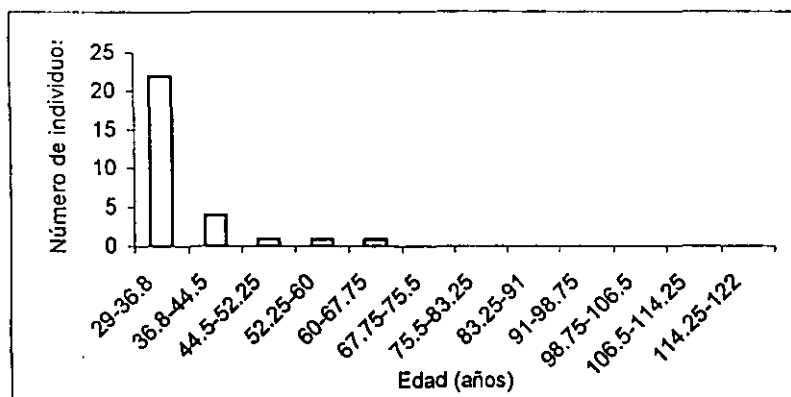


Figura 14. Distribución de edades para 29 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Los Duraznillos (Media = 34.18, desviación estándar = 4.6).

Por otro lado, al hacer un análisis de las categorías de edad para el conjunto de las poblaciones (N= 256 individuos), la distribución que presentan dichas categorías se ajusta bastante bien a una jota invertida, donde la categoría mayormente representada es la de 29 a 39.8 años, con una media de 44.5 años y una desviación estándar de 15 años (Fig. 6). Por otro lado, al hacer este mismo análisis para cada una de las poblaciones por separado, se encuentra que para casi todas las poblaciones esta misma categoría es la mayormente representada con la excepción de Las Antonias, Peña Nevada y Tula, donde se encuentra un mayor número de individuos en la categoría que abarca de los 36.8 a los 44.5 años (Figs. 7, 9 y 10). En ninguna de las poblaciones se pueden observar representantes de todas las categorías de edad encontradas en el total de la muestra (10 en total, Fig. 6); siendo Miquihuana y Peña Nevada las poblaciones en las que se observa el mayor número de categorías de edad (8 para cada una de ellas, Figs. 8 y 10), mientras que la población con menor variación en la edad de los individuos que se analizaron fue La Tapona con sólo tres categorías de edad (Fig. 13).

Aunque no en todas las poblaciones se puede observar claramente la estructura de edades como una jota invertida, en general se puede decir que en los individuos más jóvenes se encuentran mayormente representados que los más viejos. Por otro lado, se puede subrayar que en los histogramas de estructura de edad, la categoría más pequeña fue la que abarca de 29 a 38 años, y no se poseen datos para el estado de las poblaciones en categorías de edad menores, sin

embargo, al comparar la representación de esta categoría entre las diferentes poblaciones se observa que hay poblaciones, como Peña Nevada, Antonias y Tula, donde los individuos más jóvenes no se encuentran en mayor proporción que los más viejos, a pesar de no contar con datos para los individuos juveniles (de categorías menores de 29 años) de las diferentes poblaciones.

Variación genética

De los diez microsatélites de cloroplasto que fueron probados, cuatro de ellos (Pt30204, Pt36480, Pt63718 y Pt71936) fueron polimórficos para 232 individuos de *P. nelsonii*, encontrándose en total 27 haplotipos distintos (Tabla 6), distribuidos en las nueve poblaciones, siendo las Antonias la población que presenta el mayor número de haplotipos (12 en total) y Los Duraznillos, La Taponá y Puerto Membrillo las que menor número de haplotipos presentan (4 haplotipos en cada una de éstas). Las poblaciones que presentan haplotipos particulares son Peña Nevada (H13 y H14) Miquihuana (H10 y H11), San Lázaro (H17 y H19), Palmillas (H21, H22 y H23) y Las Antonias (H24, H25, H26 y H27). Los haplotipos más ampliamente distribuidos son el H1 (158 146 153 93) con una frecuencia del 48.7%, presente en todas las poblaciones; y el H4 con frecuencia de 9.9 %, siendo Miquihuana la única población en la cual no se encuentra dicho haplotipo (Tabla 7). Aunque el haplotipo H8 es el segundo haplotipo más común (con una frecuencia de 12.9 % del total de la muestra), no se encuentra presente en tres de las nueve poblaciones.

En todos los loci se observó un alelo que fue el más preponderante en todas las poblaciones (Tabla 8), teniendo una frecuencia mucho mayor en el total de la muestra que la que presentan el resto de los alelos de cada locus. En el caso del locus Pt30204 el alelo más abundante fue el 158 pb, con frecuencias que oscilan desde 96.7 % en los Duraznillos hasta 45.0% en Miquihuana, y con una frecuencia total de 66.4 % (Tabla 8), mientras que el segundo alelo en abundancia (alelo 157 pb) se encontró en el 18.1 % del total de los individuos. En el caso del locus Pt71936 la frecuencia del alelo más común (146 pb) fue de 79.7 % en total, hallándose con frecuencias desde 50 % en Miquihuana a el 100 % en Los

Tabla 6. Abundancia de los haplotipos de microsatélites encontrados en *P. nelsonii* en el total de la muestra (N=232) de 9 poblaciones en México.

Haplotipo	No. de Indiv.	Frecuencia	Haplotipo	No. de Indiv.	Frecuencia		
H1	158 146 153 93	114	0.4871	H14	159 146 153 95	1	0.0043
H2	158 146 153 95	3	0.0129	H15	159 147 153 93	3	0.0129
H3	158 146 153 92	2	0.0086	H16	158 146 152 93	2	0.0086
H4	159 146 153 93	23	0.0991	H17	157 145 154 93	1	0.0043
H5	159 145 153 93	3	0.0129	H18	157 147 153 93	3	0.0129
H6	158 147 153 93	13	0.0560	H19	158 147 153 94	1	0.0043
H7	157 145 153 95	2	0.0086	H20	160 146 153 93	5	0.0216
H8	157 146 153 93	30	0.1293	H21	160 146 153 94	1	0.0043
H9	158 145 153 93	12	0.0517	H22	157 146 152 93	1	0.0043
H10	159 145 153 95	1	0.0043	H23	158 146 153 94	2	0.0086
H11	157 146 153 95	1	0.0043	H24	158 145 153 94	1	0.0043
H12	158 147 153 95	2	0.0086	H25	158 148 153 93	1	0.0043
H13	158 145 154 93	2	0.0086	H26	157 146 154 93	1	0.0043
				H27	159 147 153 94	1	0.0043

Tabla 7. Distribución de 27 haplotipos de microsatélites de *P. nelsonii* en 9 poblaciones de México (el total de individuos estudiados fue de 232) y el total de los individuos analizados por población (T).

Haplotipos

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	T	
Duraznillo	27	1	1	1																								30	
Tapona	20			1	1	1																							23
Membrillo	12			4		1	1																						18
Miquihua	1	1	1		1	2	1	7	3	1	1	1																	20
Nevada	16	1		3		2		2	1				1	1	1														28
Lázaro	6			3		6		4	1						1	1	1	1											24
Palmillas	11			4		1		3							1					3	1	1	1						26
Tula	9			1				2	1			1						1		1				1					17
Antonias	12			6	1			12	6					2				1		1					1	1	1	1	45
total	114	3	2	23	3	13	2	30	12	1	1	2	1	1	3	2	1	3	1	3	1	1	1	2	1	2	1	1	232

Duraznillos. Este locus fue el único en el cual se encontró algún alelo privado, con un tamaño de 148 pb en la población de Las Antonias. En el locus Pt36480 el alelo más abundante fue el alelo 153 pb, para el cual hay cinco poblaciones monomórficas y se encuentra la menor frecuencia en San Lázaro (91.6 %). Finalmente, en el locus Pt63718 el alelo más común es el de 93 pb siendo monomórfico en la población de La Tapon, mientras que en Miquihuana sólo el 70 % de los individuos poseen dicho alelo.

Tabla 8 Distribución y frecuencia de los alelos de microsatélites encontrados en *P. nelsonii* en cada una de las poblaciones muestreadas en México.

Población		Pt30204				Pt71936				Pt36480			Pt63718			
		157	158	159	160	145	146	147	148	152	153	154	92	93	94	95
Duraznillos	total	0	29	1	0	0	30	0	0	0	30	0	1	28	0	1
	%	0	96.7	3.3	0	0	100	0	0	0	100.0	0	3.3	93.1	0	3.3
Tapon	total	0	21	2	0	1	21	1	0	0	23	0	0	23	0	0
	%	0	91.3	8.7	0	4.35	91.3	4.35	0	0	100.0	0	0	100	0	0
Puerto membrillo	total	1	13	4	0	1	16	1	0	0	18	0	0	17	0	1
	%	3.5	72.2	2.2	0	5.55	88.9	5.55	0	0	100.0	0	0	94.4	0	5.6
Miquihuana	total	9	9	2	0	7	10	3	0	0	20	0	1	14	0	5
	%	45.0	45.0	10	0	35.0	50.0	15.0	0	0	100.0	0	5.0	70.0	0	25.0
Peña nevada	total	5	20	3	0	2	23	3	0	0	27	1	0	26	0	2
	%	17.9	71.4	10.7	0	7.1	82.1	10.7	0	0	96.4	3.6	0	92.9	0	7.1
San Lázaro	total	6	15	3	0	2	14	8	0	1	22	1	0	23	1	0
	%	25.0	62.5	12.5	0	8.3	58.3	33.3	0	4.2	91.6	4.2	0	95.8	4.2	0
Palmillas	total	4	14	4	4	0	25	1	0	2	24	0	0	24	2	0
	%	15.4	53.8	15.4	15.4	0	96.1	3.9	0	7.7	92.3	0	0	92.3	7.7	0
Tula	total	3	12	1	1	1	14	2	0	0	17	0	0	15	1	1
	%	17.6	70.6	5.9	5.9	5.9	82.3	11.8	0	0	100.0	0	0	88.2	5.9	5.9
Antonias	total	14	21	10	1	8	32	4	2	0	45	1	0	44	2	0
	%	30.4	45.7	21.7	2.2	17.4	69.6	8.6	4.3	0	97.8	2.2	0	95.7	4.3	0
Total		42	154	30	6	22	185	23	2	3	226	3	2	214	6	10
% Total		18.1	66.4	12.9	2.6	9.5	79.7	9.9	0.9	1.3	97.4	1.3	0.9	92.2	2.6	4.3

En cuanto a los fenogramas realizados con los distintos haplotipos, no se encontró ningún patrón claro entre grupos de haplotipos y la forma en que se encuentran distribuidos espacialmente (Figura 15). En cuanto a la red de haplotipos, tampoco esta claro ningún patrón espacial de distribución de haplotipos (Figura 16), sin embargo, se puede observar como los haplotipos con mayor frecuencia se encuentran muy cercanos en la red surgiendo a partir del haplotipo H1, lo cual nos hace pensar en este haplotipo como el haplotipo ancestral. Por otro lado, al realizar los cladogramas entre poblaciones con la matriz de presencia/ausencia de haplotipos, se obtuvieron dos árboles más parsimoniosos, de los cuales se obtuvo después el árbol consenso, encontrándose un árbol con una politomía basal y, en el caso del consenso, una clara separación entre las poblaciones encontradas en San Luis Potosí y las poblaciones restantes (Fig. 17a y b).

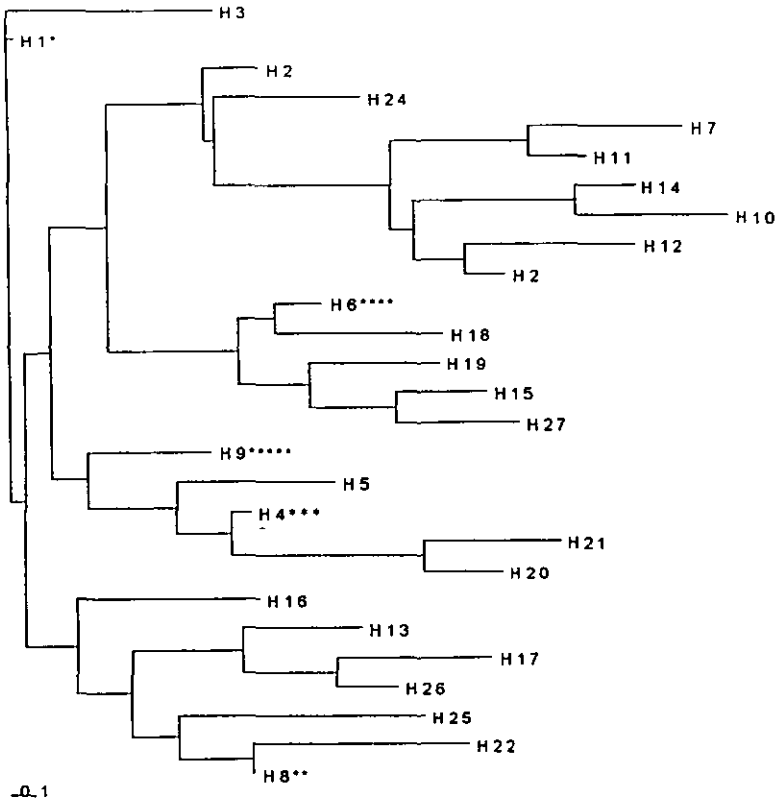


Figura 15 Fenograma hecho con el método de Neighbor-joining (Phylip ver. 3.5c) de los distintos haplotipos encontrados en 9 poblaciones mexicanas de *P. nelsonii*, utilizando el modelo de mutación paso a paso (*stepwise*) * Haplotipo presente en todas las poblaciones (Frecuencia 48.7%), **Segundo haplotipo con mayor frecuencia (12.9%), faltante en las poblaciones de Taponá, Duraznillos y Puerto Membrillo, ***Tercer haplotipo en cuanto a frecuencia (9.9%), presente en todas las poblaciones excepto Miquihuana. ****Cuarto haplotipo en cuanto a frecuencia (5.6%), se encuentra ausente en Duraznillos, Tula y Antonías. *****Quinto haplotipo en cuanto a frecuencia (5.2%), faltando en las poblaciones de Duraznillos, Taponá, Puerto membrillo y Palmillas.

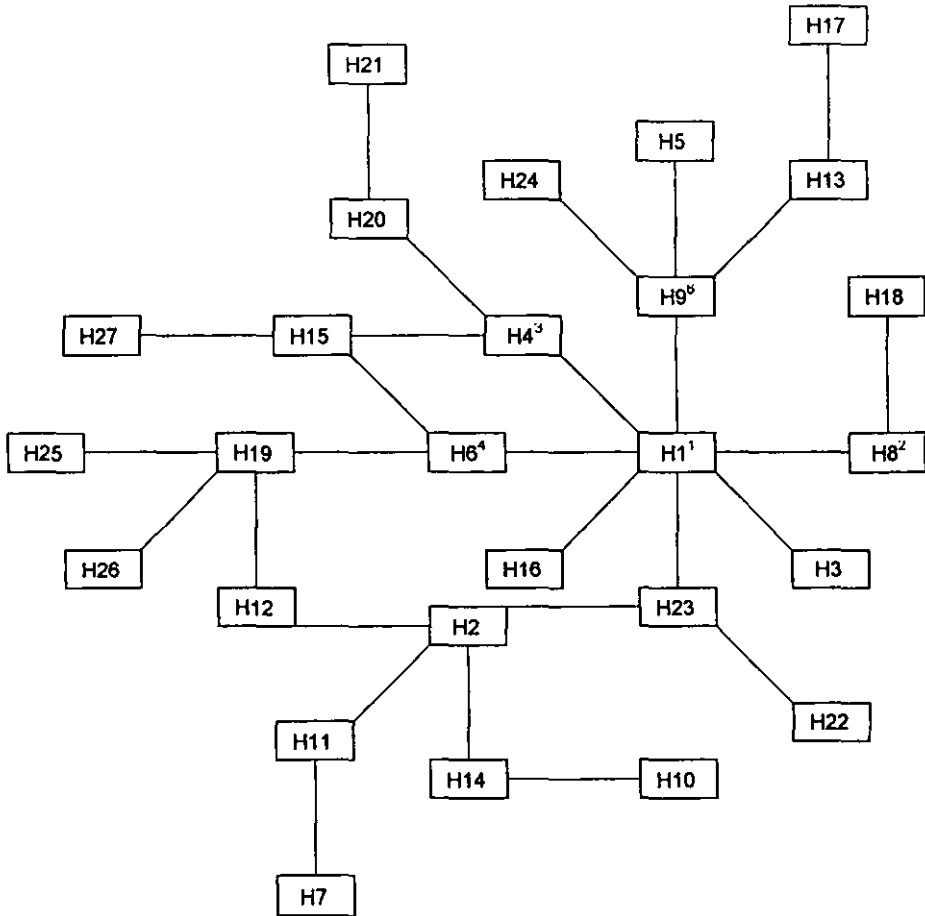


Figura 16. Red de haplotipos de cloroplasto de *P. nelsonii* mostrando las mutaciones necesarias para pasar de un haplotipo al otro según un modelo de mutación paso a paso, estimadas como las diferencias en tamaño de los distintos haplotipos. Las líneas entre haplotipos indican una diferencia nucleotídica. ¹H1 haplotipo más ampliamente distribuido, presente en todas las poblaciones y con la frecuencia más alta (48.7%), ²H8 segundo haplotipo con mayor frecuencia (12.9%), faltante en las poblaciones de Taponá, Duraznillos y Puerto Membrillo, ³H4 tercer haplotipo en cuanto a frecuencia (9.9%), presente en todas las poblaciones excepto Miquihuana. ⁴H6 cuarto haplotipo en cuanto a frecuencia (5.6%), se encuentra ausente en Duraznillos, Tula y Antonias. ⁵H9 quinto haplotipo en cuanto a frecuencia (5.2%), faltando en las poblaciones de Duraznillos, Taponá, Puerto membrillo y Palmillas.

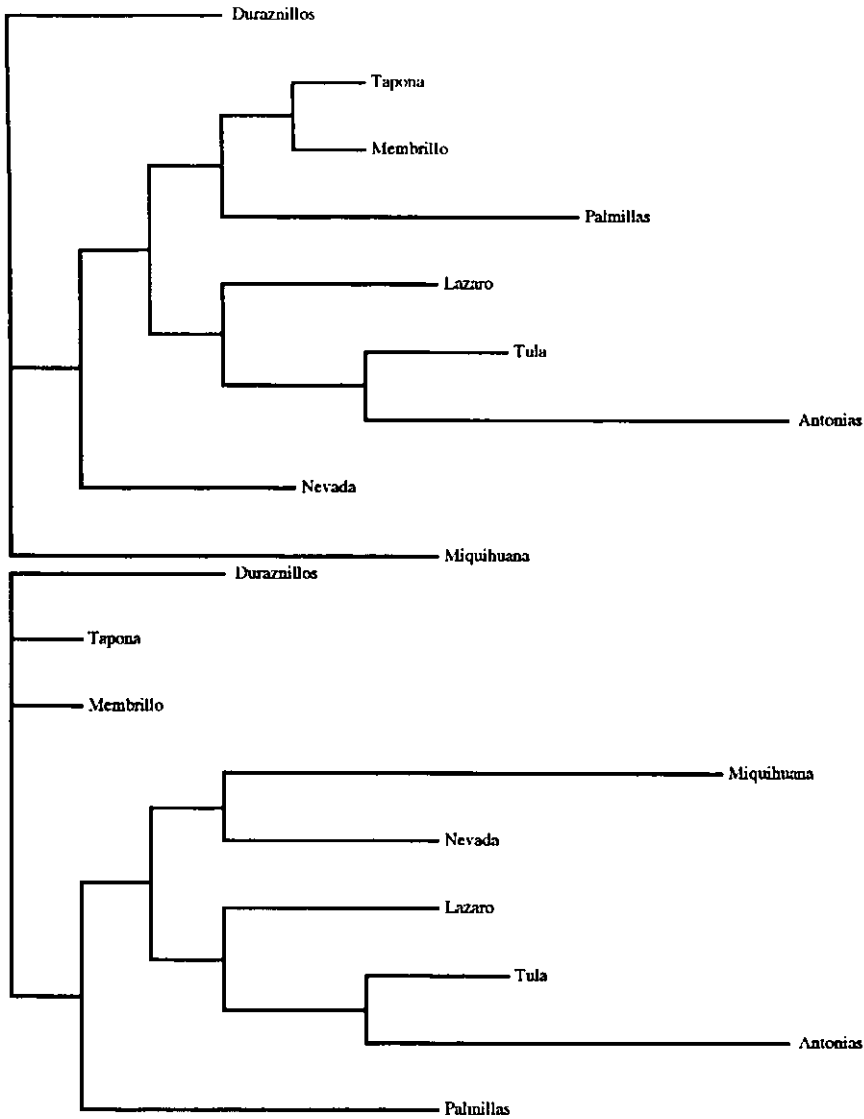


Figura 17. a) uno de los dos árboles más parsimoniosos obtenidos con la matriz de presencia/ausencia de haplotipos en 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México. b) Arbol consenso estricto de los dos árboles más parsimoniosos obtenidos.

Estimados de diversidad genética

La variación genética (H_e) total calculada con los distintos haplotipos fue de 0.7275 con una varianza se 0.0283 (tabla 10), mientras que el número promedio de diferencias nucleotídicas entre todos los pares de haplotipos (π) fue de 1.0515 ± 0.702 pb. Al estimar la H_e por separado en cada una de las poblaciones se encontró que la población que presenta mayor diversidad genética es Miquihuana (0.8684 ± 0.0640 ; Tabla 9). Sin embargo, la diversidad encontrada en San Lázaro, Palmillas y Las Antonias no difiere en gran medida a este valor (0.8587 ± 0.0402 , 0.8247 ± 0.0601 y 0.84105 ± 0.0300 respectivamente). Por otro lado, las poblaciones de San Luis Potosí presentan mucha menor variación genética, siendo Los Duraznillos la que menor diversidad tiene (0.1931 ± 0.0951). La diversidad genética total calculada para cada uno de los loci va de 0.0592 ± 0.0214 del locus Pt36480 a 0.5079 ± 0.0325 para el locus Pt30204.

En cuanto a la estimación de theta ($\theta = 2Nu$) (Tabla 10), con base en el modelo mutación paso a paso, se puede observar que, tanto Miquihuana como San Lázaro presentan los valores más elevados de theta ($\theta = 28.28$ y $\theta = 24.54$ respectivamente), lo cual coincide con el estimado de diversidad genética, mientras que en Los Duraznillos es donde se encuentra la theta más pequeña ($\theta = 0.27$), siendo la theta total de 6.24 En lo que a el número de diferencias nucleotídicas entre pares de haplotipos (π) respecta, el mayor número de diferencias promedio se encuentra en la población de Miquihuana ($\pi = 1.7316 \pm 1.05$ pb), mientras que el valor menor lo presenta la población de los Duraznillos ($\pi = 0.1931 \pm 0.095$ pb; Tabla 10).

Tabla 9. Diversidad genética (*H_e*) para cada uno de los loci.

Primer	No. de alelos	Durazn	Tapona	Membr	Miquih	Nevad	Lázaro	Palmill	Tula	Anton	<i>H_e</i> total
30204	4	0.0667 ±0.0613	0.1660 ±0.0976	0.4510 ±0.1174	0.6474 ±0.0565	0.4153 ±0.1003	0.5543 ±0.0872	0.6646 ±0.0784	0.4926 ±0.1314	0.6715 ±0.0319	0.5079 ±0.0326
71936	4	0.00	0.1708 ±0.1025	0.1111 ±0.0964	0.6158 ±0.0077	0.3201 ±0.1062	0.5652 ±0.0711	0.1508 ±0.0927	0.3072 ±0.1316	0.4570 ±0.0784	0.3399 ±0.0037
36480	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0714 ±0.0652	0.1630 ±0.099	0.1477 ±0.0888	0.00	0.0850 ±0.055	0.0592 ±0.0214
63718	4	0.1310 ±0.0821	0.00	0.00	0.3947 ±0.1006	0.1376 ±0.0837	0.0833 ±0.0749	0.1477 ±0.0888	0.1176 ±0.1012	0.085 ±0.055	0.1472 ±0.0312
Prom.	3.75	0.0494	0.0842	0.1405	0.4145	0.2361	0.3415	0.2777	0.2294	0.3246	0.2636

Tabla 10 Diversidad genética intrapoblacional calculada con los haplotipos encontrados.

Población	N	Nh	Diversidad genética	π	($\theta = 2Nu$) step-wise
Duraznillos	30	4	0.1931 +/- 0.0951	0.1977± 0.2538	0.267952
Tapona	23	4	0.2490 +/- 0.1165	0.3359± 0.3465	0.386551
Puerto membrillo	18	4	0.5294 +/- 0.1170	0.5621± 0.4804	1.757813
Miquihuana	20	11	0.8684 +/- 0.0640	1.7316± 1.0517	28.38
Peña nevada	28	9	0.6693 +/- 0.0963	0.9444± 0.6672	4.072287
San Lázaro	24	9	0.8587 +/- 0.0402	1.3659± 0.8733	24.5414
Palmillas	26	10	0.8247 +/- 0.0601	1.1508± 0.7688	15.755
Tula	17	8	0.7279 +/- 0.1143	1.0444± 0.7296	6.2553
Antonias	46	12	0.8415 +/- 0.0300	1.2985± 0.8275	19.414
	232		0.7275 +/- 0.0283	1.0515± 0.702	6.235

N = Número de individuos muestreados en la población.

Nh = Número de haplotipos encontrados en la población.

(θ) = $2Nu$ calculada bajo el modelo de mutación de step-wise para microsatélites.

(π) = Número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de haplotipos.

Estructura Genética

Análisis de variación molecular

Los resultados del análisis de AMOVA difieren dependiendo del modelo de mutación que se utilice (alelos infinitos o paso a paso) y por tanto del estimado de distancia entre los distintos haplotipos encontrados. Cuando el AMOVA se hace utilizando la varianza de las diferencias alélicas, es decir, el modelo de mutación de alelos infinitos, el índice de fijación obtenido (F_{st}) es de 0.13073, mientras que cuando se utiliza la varianza del tamaño de los alelos, o modelo de mutación paso a paso, el índice de fijación que se obtiene (R_{st}) es de 0.04662 (Tablas 11 y 12).

Lo anterior se refleja en el porcentaje de variación que se espera encontrar tanto dentro como entre las poblaciones. En el caso del modelo de alelos infinitos, se espera encontrar el 86.93 % de la variación total dentro de las poblaciones y sólo el 13.07 % entre ellas. Estos valores difieren considerablemente de los estimados por mutación paso a paso (stepwise), sin embargo, en ambos casos el índice de fijación es pequeño, encontrándose la mayoría de la variación dentro de las poblaciones. Cuando se hace el AMOVA locus por locus (Tabla 13) la mayor diferenciación genética entre poblaciones se encuentra para el locus Pt30204 (R_{st} o F_{st} = 0.10821), mientras que el índice de fijación entre poblaciones para los cuatro loci es de 0.08868.

Tabla 11 Componentes de varianza molecular calculados a partir del método de diferencias alélicas (F_{st} ; alelos infinitos) para 9 poblaciones de *P. nelsonii* encontradas en México.

Fuente de variación	Componente de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	$\sigma_a = 0.04874^*$	13.07 %
Dentro de las poblaciones	$\sigma_b = 0.32406$	86.93 %
Índice de fijación (F_{st})	0.13073*	

- *significativamente diferentes de cero después de 1023 permutaciones.

Tabla 12 Componentes de varianza molecular calculados a partir del método de distancia por la suma del cuadrado de las diferencias de tamaño de los alelos (R_{st} : mutación paso a paso) para 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México.

Fuente de variación	Componente de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	$\sigma_a = 0.04891$	4.66 %
Dentro de las poblaciones	$\sigma_b = 1.0003$	95.34 %
Indice de fijación (R_{st})	0.04662*	

* significativamente diferente de cero después de 1023 permutaciones.

Tabla 13 Valores del AMOVA locus por locus para cuatro loci de microsatélite de cloroplasto en 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México.

Locus	Variación entre poblaciones		Variación dentro de las poblaciones		R_{st} o F_{st}
	σ_a	% variación	σ_b	% variación	
3025	0.02863	10.82131	0.23595	89.17869	0.10821**
71251	0.01510	8.95313	0.15355	91.04688	0.08953**
3628	0.00003	0.08819	0.02959	99.91180	0.00088
63428	0.00088	4.1838	0.06300	95.23414	0.04766*
Promedio	0.04691		0.48208		0.08868**

** significativamente diferentes de cero ($P < 0.01$) después de 1023 permutaciones

*significativamente diferente de cero ($P < 0.05$) después de 1023 permutaciones.

Diferenciación genética entre poblaciones

Al hacer las comparaciones genéticas entre pares de poblaciones, en general, los valores obtenidos de F_{st} son tres veces más grandes que los que se obtuvieron para R_{st} (aunque hay casos, como entre Duraznillos y San Lázaro, donde los valores de F_{st} son siete veces mayores que los de R_{st}) sin embargo, existen pares de poblaciones donde los valores de R_{st} superan a los valores de F_{st} , como en los pares Miquihuana - San Lázaro, Miquihuana - Palmillas, Palmillas - Peña Nevada, Palmillas - San Lázaro, Palmillas - Tula y Palmillas -

Antonias (Tabla 14) En el caso de utilizar el modelo de mutación por alelos infinitos (F_{st}) la diferenciación mayor se encuentra entre Miquihuana y Los Duraznillos ($F_{st} = 0.506$), mientras que utilizando el modelo de mutación paso a paso (R_{st}) las poblaciones más diferentes son Miquihuana y la Tapona ($R_{st} = 0.15513$). Cabe resaltar que Miquihuana es la población que presenta mayor diferenciación genética con respecto a las otras poblaciones, independientemente del modelo de mutación que se utilice. Al hacer la correlación entre ambos índices de diferenciación entre poblaciones obtenidos con los dos modelos de mutación utilizados se encontró un coeficiente de correlación de 0.51718 entre R_{st} y F_{st} el cual es significativamente diferente de cero ($P < 0.01$) (Figura 18).

Tabla 14. Matriz de diferenciación entre las 9 poblaciones de *P. nelsonii*; resultado de hacer el análisis de AMOVA entre pares de poblaciones. Sobre la diagonal valores obtenidos de R_{st} (mutación paso a paso). Bajo la diagonal valores obtenidos de F_{st} (alelos infinitos).

	Duraz	Tapona	Memb	Miquih	Nevada	Lázaro	Palmil	Tula	Anton.
Duraz.		-0.02880	-0.00002	0.14592*	-0.01314	0.04769*	0.06707*	-0.02006	-0.01864
Tapona	-0.02272		-0.03057	0.15513*	-0.01585	0.05674	0.03770	-0.00960	-0.01437
Memb.	0.09971	0.05290		0.15358*	-0.02408	0.04673	0.00395	-0.01068	0.00003
Miquih	0.506*	0.44777*	0.27152*		0.08914*	0.09948*	0.13996*	0.02951	0.06695*
Nevada	0.10632*	0.06700*	-0.02240	0.20005*		0.02977	0.03091	-0.04007	-0.00465
Lázaro	0.33697*	0.27428*	0.10688*	0.04498*	0.06092*		0.09885*	-0.01174	0.01349
Palmil	0.22570*	0.17639*	0.02927	0.10770*	0.00800	0.01472		0.03460	0.08823*
Tula	0.15075*	0.10412*	-0.00143	0.15303*	-0.02562	0.04882	0.01625		-0.02451
Anton.	0.28983*	0.24919*	0.10825*	0.03072	0.06663*	0.02161	0.01621	0.03151	

* significativas $P < 0.0500$ después de 110 permutaciones. En negritas los valores de $R_{st} > F_{st}$

En gris el valor mayor tanto para alelos infinitos (F_{st}) como para mutación paso a paso (R_{st}).

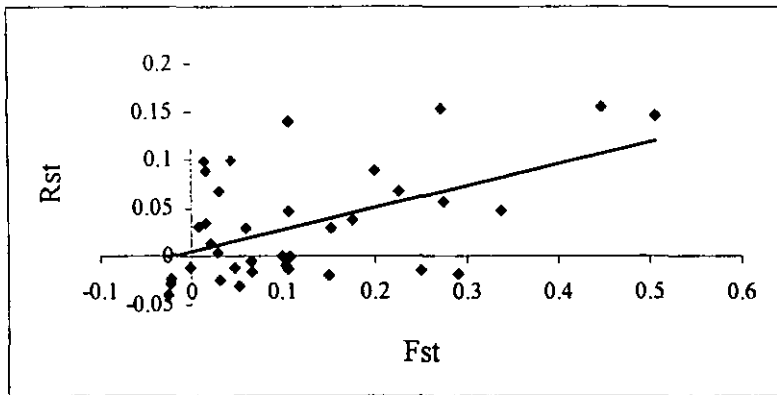


Figura 18. Correlación entre los índices de fijación obtenidos con distintos modelos de mutación (F_{st} con alelos infinitos y R_{st} con mutación paso a paso) para 9 poblaciones de *P. nelsonii*. $r = 0.5$ ($P < 0.01$)

Distancias genéticas

En las matrices de distancia de Nei, se puede observar que los resultados obtenidos para ambos modelos de mutación difieren considerablemente (Tabla 15). Cuando se toman en cuenta las diferencias netas (DA) entre poblaciones, todos los valores obtenidos utilizando el modelo de mutación paso a paso (R_{st}) son mayores que los obtenidos con el modelo de alelos infinitos (F_{st}). Cuando se utiliza la F_{st} , el valor mayor de DA se obtiene entre Duraznillos y Miquihuana (0.466), siendo ésta última la población que presenta los valores más elevados de DA. Por otro lado al utilizar R_{st} , la DA mayor se encuentra entre Palmillas y Miquihuana (0.78), siendo Palmillas la que presenta, por mucho, los valores mayores para DA.

La prueba de Mantel para correlacionar distancia geográfica y genética dio un coeficiente de correlación (r) de 0.38 utilizando la distancia (DA) obtenida por alelos infinitos (F_{st}), mientras que cuando en la distancia obtenida por mutación paso a paso (R_{st}) el coeficiente de correlación fue de 0.015. (Figura 19 y 20). Ninguno de ambos coeficientes de correlación entre distancia genética y geográfica fue estadísticamente significativo después de 1000 permutaciones en la prueba de Mantel.

Tabla 15 Matriz del promedio corregido del número de diferencias nucleotídicas (D_A) entre 9 poblaciones de *P. nelsonii*. Bajo la diagonal D_A calculada con base en alelos infinitos. Arriba de la diagonal D_A calculada con base en mutación paso a paso.

	Duraz	Tapona	Memb	Miquih	Nevada	Lázaro	Palmil	Tula	Anton.
Duraz.		-0.01039	-0.00264	0.25575	-0.01333	0.04444	0.18874	-0.03842	-0.01668
Tapona	-0.00512		-0.01591	0.32586	-0.01070	0.06522	0.13659	-0.02206	-0.00218
Memb.	0.03133	0.01900		0.40342	-0.01867	0.07044	0.05769	-0.01552	0.026120
Miquih	0.06094	0.43259	0.26497		0.21376	0.27550	0.07066	0.09280	0.16451
Nevada	0.04974	0.03618	-0.01206	0.18649		0.04844	0.10475	-0.06874	-0.00404
Lázaro	0.24493	0.21245	0.08835	0.04061	0.04850		0.41822	0.02270	0.03176
Palmil	0.13986	0.12038	0.02384	0.10156	0.00578	0.01251		0.18771	0.29865
Tula	0.06105	0.04861	-0.00123	0.14594	-0.01795	0.04247	-0.01157		-0.04582
Anton.	0.24354	0.22126	0.09713	0.02654	0.05668	0.01854	0.01391	0.02856	

En gris el valor mayor para ambos modelos de mutación.

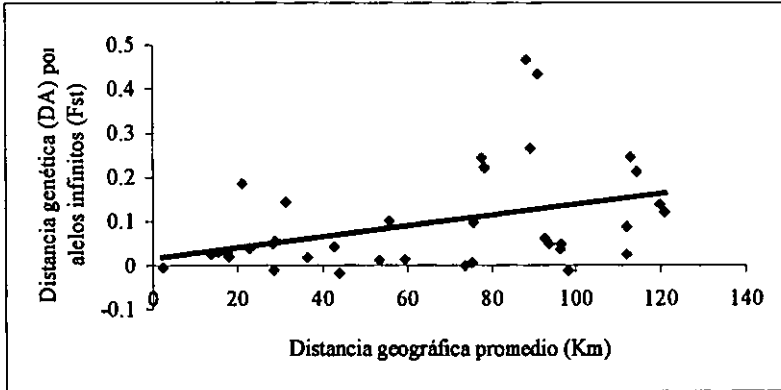


Figura 19. Correlación entre la distancia genética (D_A calculada con alelos infinitos o F_{st}) y la distancia geográfica para 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México. Coeficiente de correlación de la prueba de Mantel $r = 0.3822$ ($P > 0.172$ después de 1000 permutaciones).

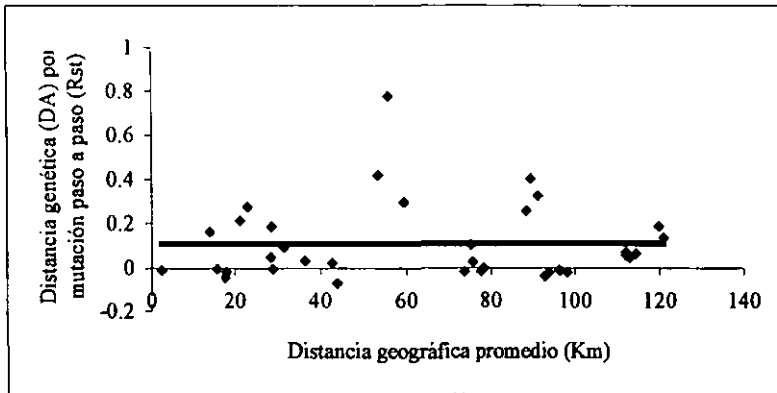


Figura 20. Correlación entre la distancia genética (D_a calculada con mutación paso a paso o R_{st}) y la distancia geográfica para 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México. Coeficiente de correlación de la prueba de Mantel $r = 0.015430$ ($P < 0.557$) después de 1000 permutaciones)

Tiempo de coalescencia entre poblaciones

Los tiempos de coalescencia entre poblaciones presentan el mismo patrón visto con anterioridad. Si se calcula utilizando el modelo de mutación por alelos infinitos (F_{st}) las poblaciones que coalescerán en mayor número de generaciones son Miquihuana y Duraznillos (con $\tau/N = 1.02$), mientras que si se utiliza el modelo de mutación paso a paso (R_{st}), las poblaciones de coalescerán en mayor número de generaciones serán Miquihuana y Tapona ($\tau/N = 0.18$; Tabla 16).

Ya que los tiempos de coalescencia se calcularon con base en los índices de fijación (F_{st} y R_{st}), según la fórmula de Slatkin (1995), no es de extrañar que el patrón obtenido sea redundante con la matriz de F_{st} o R_{st} para pares de poblaciones. Por otro lado, bajo ambos modelos existen varias poblaciones donde el tiempo de coalescencia entre ellas es de cero, esto ocurre debido a que el índice de fijación es muy cercano a este valor y, por lo tanto, las dos poblaciones no son genéticamente distintas entre sí.

Tabla 16 Matriz de tiempos de coalescencia entre 9 poblaciones de *P. nelsonii* [$\tau / N = F_{st} / (1 - F_{st})$] (Slatkin, 1995). Sobre la diagonal valores calculados con R_{st} (mutación paso a paso); bajo la diagonal valores calculados con F_{st} (alelos infinitos).

	Duraz	Tapona	Memb	Miquih	Nevada	Lázaro	Palmil	Tula	Anton.
Duraz.		0	0	0.17085	0	0.05008	0.07190	0.03583	0.09677
Tapona	0		0	0.17085	0	0.06015	0.03917	0	0
Memb.	0.11076	0.05586		0.18145	0	0.04902	0.00397	0	0.00003
Miquih	0.11076	0.81084	0.37271		0.09787	0.11047	0.16274	0.03041	0.07175
Nevada	0.11905	0.07181	0	0.25007		0.03068	0.03190	0	0
Lázaro	0.50823	0.37794	0.11967	0.04710	0.06487		0.10969	0	0.01368
Palmil	0.29149	0.21417	0.03015	0.12070	0.00807	0.01494		0	0.09677
Tula	0.17746	0.11623	0	0.18067	0	0.05132	0		0
Anton.	0.40811	0.33189	0.12139	0.03169	0.07138	0.02208	0.01648	0.03254	

En gris los valores máximos para cada uno de los modelos de mutación.

Número de migrantes entre poblaciones

Cuando se calcula en número de migrantes entre poblaciones ($M = Nm$) se puede observar una gran cantidad de pares de poblaciones donde el intercambio de migrantes es infinito o muy elevado (Tabla 17). Como era de esperarse, las poblaciones con menor intercambio de migrantes son Miquihuana y Duraznillos para los cálculos realizados con alelos infinitos (F_{st} ; $M = 0.488$), mientras que para los de mutación paso a paso (R_{st}) las poblaciones con menor intercambio de migrantes son Miquihuana y Tapona ($M = 2.72$).

Al hacer la correlación entre el logaritmo del número de migrantes ($\log M$) y la distancia geográfica el coeficiente de correlación fue muy pobre, tanto para F_{st} como para R_{st} ($r = 0.31$ y 0.084 respectivamente). Sin embargo, la correlación fue mucho menor en el caso de utilizar el modelo de mutación paso a paso (R_{st}) (Figuras 21 y 22).

Tabla 17 Matriz de valores del número de migrantes por generación ($M = Nm$) para 9 poblaciones de *P. nelsonii*. Sobre la diagonal valores obtenidos con Rst. Bajo la diagonal valores obtenidos con Fst.

	Duraz	Tapona	Memb	Miquih	Nevada	Lázaro	Palmil	Tula	Anton.
Duraz.		infinito	infinito	2.92656	infinito	9.98348	6.95445	13.95291	5.16680
Tapona	infinito		infinito	2.72308	infinito	8.31196	12.76404	infinito	Infinito
Memb.	4.51443	8.95092		2.75553	infinito	10.20009	126.0104	infinito	1683.00
Miquih	0.48809	0.61664	1.34152		5.10904	4.52592	3.07243	16.44320	6.96826
Nevada	4.20003	6.96234	Infinito	1.99941		16.29706	15.67365	infinito	Infinito
Lázaro	0.98381	1.32295	4.17830	10.61623	7.70749		4.55810	infinito	36.55682
Palmil	1.71535	2.33462	16.58505	4.14283	61.98873	33.45874		13.95291	5.16680
Tula	2.81755	4.30196	Infinito	2.76740	Infinito	9.74275	Infinito		infinito
Anton.	1.22516	1.50654	4.11891	15.77637	7.00435	22.64175	30.34704	15.36547	

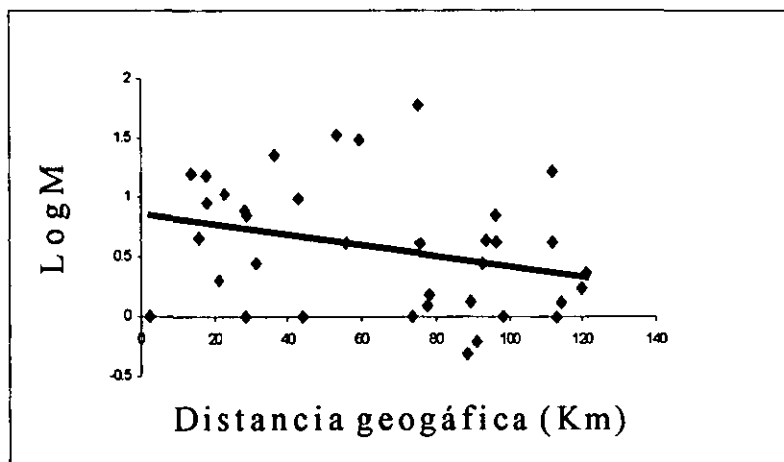


Figura 21. LogM contra distancia geográfica para 9 poblaciones de *P. nelsonii*. El logM se calculó basándose en un modelo de mutación por alelos infinitos (F_{∞}). Coeficiente de correlación = 0.2896.

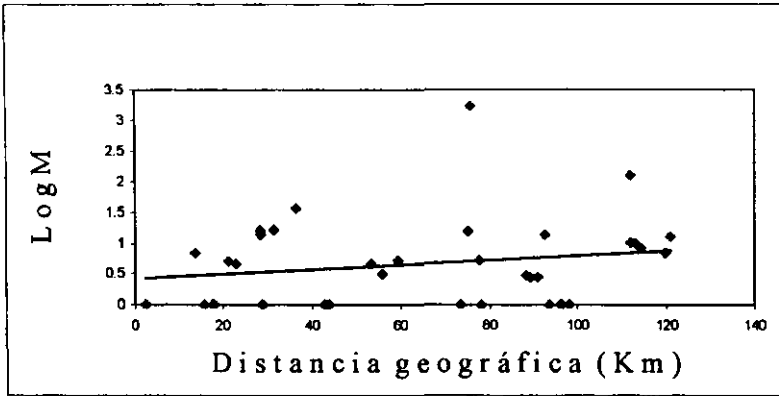


Figura 22. Correlación entre el LogM contra distancia geográfica para 9 poblaciones de *P. nelsonii*. El logM se calculó basándose en un modelo de mutación paso a paso (stepwise) (R_w). Coeficiente de correlación = 0.199.

Demografía histórica

La distribución de las diferencias entre pares de haplotipos sólo se pudo hacer para los datos obtenidos con un modelo de mutación paso a paso (stepwise), donde dichas diferencias entre haplotipos son calculadas por la varianza en el tamaño de los alelos que éstos presentan. Al hacer la distribución de las diferencias entre pares de haplotipos con base en este modelo, se encontró una media de 1.7 y una varianza de 3.852. (Figura 23). Al graficar la distribución de las diferencias se observa un pico donde caen la mayoría de las combinaciones posibles de haplotipos, el cual corresponde a la media. Sin embargo, cabe resaltar la existencia de otro pico más pequeño alrededor de las cinco diferencias entre haplotipos, obteniéndose una distribución con dos modas. Con esta distribución el valor calculado del tamaño poblacional antes de la expansión (θ_0) en unidades de mutación ($2Nu$) fue de 1.467, mientras que el número de generaciones en las cuales se ha dado dicha expansión (τ), también en unidades mutacionales ($2ut$), se calculó en 0.233. La prueba de chi cuadrada entre la distribución de diferencias haplotípicas observadas y la esperada bajo el modelo de expansión súbita de Rogers (1995), indica que ambas distribuciones son estadísticamente diferentes.

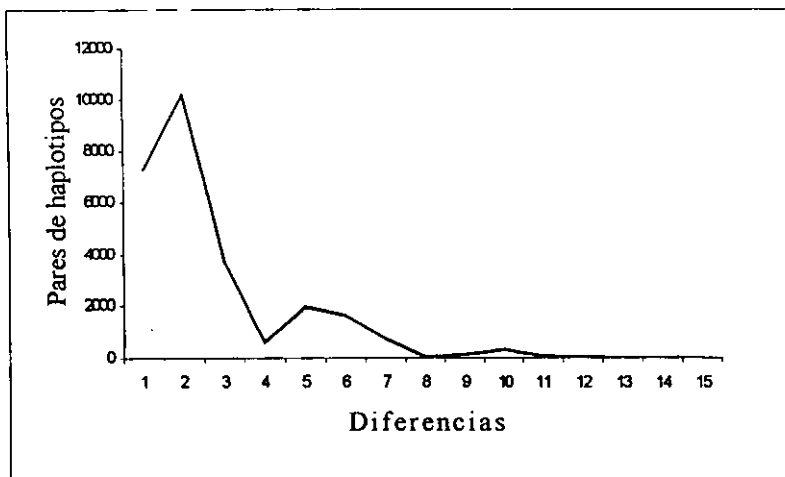


Figura 23. Distribución de las diferencias entre pares de haplotipos de 9 poblaciones de *P. nelsonii* encontradas en México; basada en un modelo de mutación paso a paso (stepwise). Media = 1.7, varianza = 3.852.

Siguiendo el modelo de Rogers (1995) se encontró para la distribución de las diferencias entre pares de haplotipos una Θ de 1.467 lo cual equivale a $2N\mu$, con lo cual podemos calcular el tamaño poblacional antes de la expansión y después de esta ($\Theta = 6.235$). Si suponemos que la tasa de mutación es la misma independientemente del tiempo, entonces será idéntica en ambas ecuaciones, con lo cual podemos concluir que la población de *P. nelsonii* ha crecido 4.25 veces. Para estimar el tiempo que ha llevado dicha expansión utilizamos tau donde $\tau = 2ut$. Para estimar t en generaciones es necesario tener alguna referencia de la tasa de mutación de loci de microsatélites en cloroplasto; Provan *et al.* (1999) calculó una tasa de mutación en SSRs de cloroplasto en *P. torreyana* de entre 3.2×10^{-5} y 7.9×10^{-5} . Utilizando estas tasas de mutación encontramos que la expansión de la población de *P. nelsonii* duró entre 1,474.68 y 3,640.63 generaciones. Si se considera como 20 años el tamaño generacional de un pino, entonces el tiempo de expansión fue de entre 29,473.28 y 76,812.26 años.

Por otro lado, los fenogramas obtenidos por el método de neighbor-joining presentan algunas diferencias dependiendo del modelo utilizado para medir la distancia genética. Sin embargo, en ambos casos se carece de una estructura bien definida entre las poblaciones.

En el caso de la F_{st} , el fenograma (Figura 24) presenta dos grupos distintos, el primero formado por las poblaciones de Puerto Membrillo, la Tapona y Duraznillos, mientras el segundo grupo esta conformado por Tula, Palmillas, San Lázaro, Miquihuana y Antonias. Cabe notar que la población de Peña Nevada no se encuentra dentro de ningún grupo y forma una politomía junto con las ramas basales de los grupos 1 y 2. Por otro lado, cuando se realiza el dendrograma con la R_{st} , (Figura 25), también se forman dos grupos aunque las poblaciones que los integran son diferentes, el primer grupo esta compuesto por Miquihuana y Tula, mientras que en el segundo se encuentran las demás poblaciones excepto las Antonias, la cual se encuentra sin agruparse y formando una politomía en la base del fenograma.

Al graficar el logaritmo de los linajes contra el tiempo de coalescencia, se observa para ambos modelos de mutación una relación parabólica entre la distancia genética (como indicador del tiempo en el cual coalescen los distintos linajes) y el logaritmo de los linajes (Figura 26 y 27); lo cual nos habla de que la población de *P. nelsonii* se encuentra en expansión.

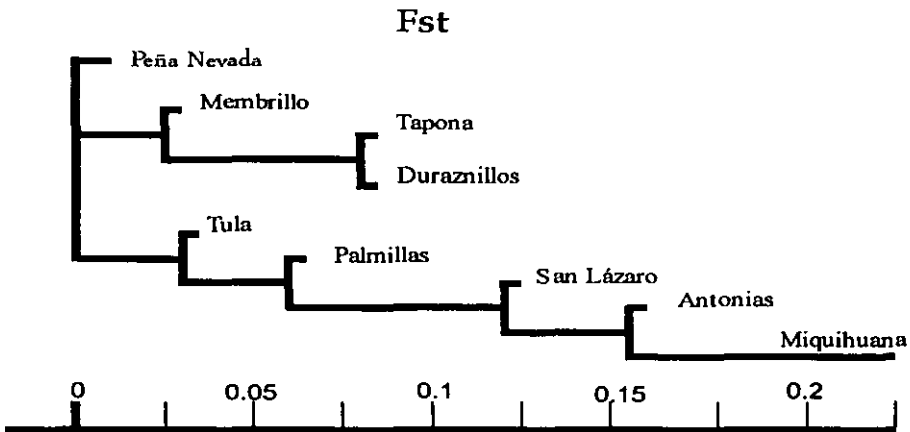


Figura 24 Fenograma para 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México, obtenidos por el método de neighbor-joining con base en la distancia genética de Nei (D_a), para un modelo de mutación por alelos infinitos o F_{st} .

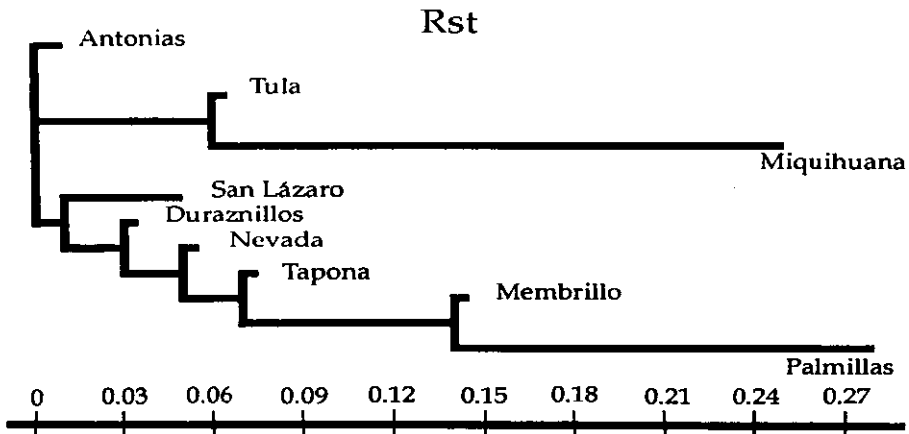


Figura 25 Dendrograma para 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México, obtenidos por el método de neighbor-joining con base en la distancia genética de Nei (D_a), para un modelo de mutación paso a paso o Rst.

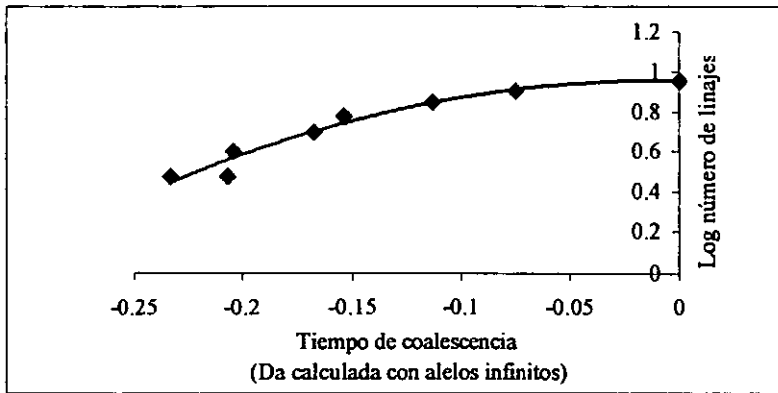


Figura 26. Logaritmo del número de linajes contra tiempo de coalescencia (expresado como la distancia genética [D_a] calculada con un modelo de mutación por alelos infinitos o F_{st}) para 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México.

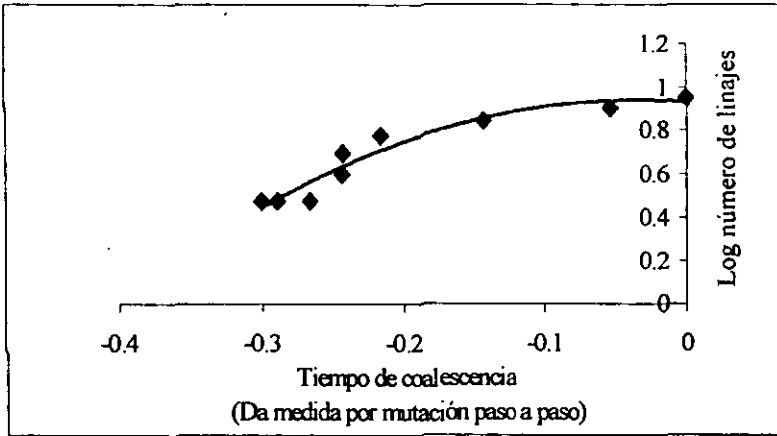


Figura 27. Logaritmo del número de linajes contra el tiempo de coalescencia (expresado como la distancia genética [Da] calculada a partir de un modelo de mutación paso a paso o de Rst) para 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México.

Al realizar el análisis de inferencia de la historia de las poblaciones a partir del árbol de distancia entre los linajes haplotipicos, realizados con el método de Neighbor-joining, (Figura 15) se observa el mismo patrón en la historia de los haplotipos que cuando el análisis se realiza con las poblaciones y los árboles de distancia entre éstas (Figura 28).

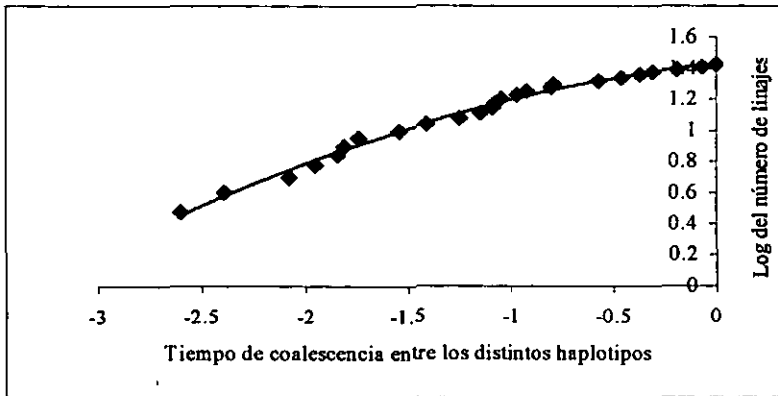


Figura 28. Logaritmo del número de linajes contra el tiempo de coalescencia (expresado como la distancia entre haplotipos a partir del modelo de mutación paso a paso) para 27 haplotipos encontrados en 9 poblaciones de *P. nelsonii* en México.

Discusión

Análisis demográfico

Al hacer la estructura de edades podemos observar que prácticamente en todas las poblaciones se presenta una estructura de edades donde las categorías de individuos más jóvenes se encuentran mayormente representadas que las de los individuos adultos y viejos. Al tomar en cuenta el total de las poblaciones se puede observar la distribución esperada de jota invertida (Keeley y Zedler, 1998) donde los jóvenes se encuentran altamente representados y, conforme la edad se incrementa, el número de individuos va disminuyendo. Debido a que en las poblaciones se encuentran representantes de todas las categorías de edades, este análisis nos permitiría enmarcar a *P. nelsonii* dentro del patrón que Strauss y Ledig (1985) le asignan a especies longevas donde los eventos de colonización y extinción no rigen la historia de vida de la especie, siendo de mayor importancia el reclutamiento de nuevos individuos. Sin embargo, el no ser una especie muy longeva y presentar tiempos generacionales cortos, así como encontrarse en hábitats donde los disturbios son frecuentes, acercaría más a *P. nelsonii* al patrón de vida descrito en especies colonizadoras de corta vida.

Por otro lado, hay que tomar en cuenta que la primera categoría representada en la distribución de categorías de edad es la que inicia en los 29 años, y, aunque se carece de datos sobre la frecuencia de plántulas y juveniles, parecería que esta fuera baja, lo cual indicaría que el reclutamiento en estas poblaciones no está siendo del todo efectivo, pudiendo estar afectando de manera importante la dinámica poblacional de la especie.

Al hacer la regresión cuadrática entre el DAP y la edad se obtiene una ecuación: con la que se pueden estimar las categorías de edades con saber el diámetro de los distintos individuos, de esta manera se puede observar que la edad mayormente representada en el total de los individuos es la que va de los 29 años a los 36.8. Sin embargo, la media de la edad se encuentra en los 44.47 años, valor que corresponde a la segunda categoría mayormente representada que es la que abarca de los 36.8 a los 44.5 años, mientras que la categoría con

menos individuos es la que va de los 114.25 años a los 122 años, aunque hay que resaltar que no se encontraron individuos que tuvieran entre 99 y 114 años. En la distribución encontrada parecería que la mayor mortandad ocurriera después de los 44 años, pues es este el momento en el cual hay una fuerte caída en la distribución de edades, lo cual pudiera encontrarse asociado con algún tipo de disturbio ambiental.

Por otro lado, cuando observamos las categorías de edades de las distintas poblaciones podemos encontrar que cinco poblaciones de las ocho que se trabajaron presentan una gran cantidad de individuos relativamente jóvenes, siendo esta la categoría mayormente representada. Sin embargo hay que hacer notar que sólo en las poblaciones de Las Antonias y Peña Nevada se encontraron cantidades altas de plántulas, a pesar de que en estas la categoría de individuos más jóvenes no es la mayormente representada. En general los individuos más viejos hallados en las poblaciones se encuentran alrededor de entre 90 y 98 años, excepto en Palmillas donde hay un representante de 120 años y en poblaciones como La Taponá, donde la mayor longevidad encontrada fue de 60 años, esto es muy cercano a lo ocurrido en Los Duraznillos y Tula, donde los individuos más viejos se encontraban cerca de los 65 años. Tanto La Taponá como Los Duraznillos parecerían ser las poblaciones de más reciente establecimiento. Es importante resaltar que estas tres poblaciones son las más sureñas, encontrándose dos de ellas en San Luis Potosí y la tercera (Tula) en Tamaulipas (Figura 3).

Variación genética

El número de haplotipos encontrados en *P. nelsonii* fue bastante elevado (27 haplotipos) si se toma en cuenta que sólo se utilizaron cuatro *primers* polimórficos. Esto coincide con lo encontrado en otras coníferas, por ejemplo, en *P. resinosa* Echt *et al.* (1998) encontró 23 haplotipos distintos utilizando 9 *primers* polimórficos, mientras que Vendramin *et al.* (2000) encontraron 41 haplotipos con 21 *primers* en *Picea abies*. Sin embargo, en este último trabajo se emplearon 97 poblaciones con una distribución muy amplia, que abarca todo el continente europeo.

El número de alelos por locus encontrados en los loci polimórficos no es muy distinto de los encontrados para estos mismo loci en otros pinos (Tabla 18). Aunque es notorio que, en general, *P. sylvestris* es la especie que mayor número de alelos tiene por locus, excepto en el caso del locus Pt63718/PCP63771 donde *P. nelsonii* es la especie que presenta mayor número de alelos (4 alelos en *P. nelsonii* contra 2 alelos en *P. sylvestris*), sin embargo todavía son muy pocas las especies de pino analizadas con este tipo de marcadores como para generar conclusiones al respecto.

Tabla 18 Número de alelos encontrados para microsatélites de cloroplasto para varias especies de pinos.

Primer	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. pinaster</i>	<i>P. resinosa</i>	<i>P. halepensis</i>	<i>P. torreyana</i>	<i>P. nelsonii</i>	<i>P. pinceana</i>	Promedio
Pt1254** PCP1289*	5	-	-	-	1	1	1	1 5
Pt9383** PCP9434*	1	2	3	2	1	1	1	1.6 1.5
Pt26081** PCP26106*	3	1	3	8	1	1	1	2.8 2
Pt30204** PCP30277*	7	6	3	3	1	4	5	3.2 6.5
Pt36480** PCP36567*	3	4	2	4	1	3	1	2.2 3.5
Pt41093** PCP41131*	4	2	2	5	1	1	1	2 3
Pt63718** PCP63771*	2	-	-	-	1	4	2	2.3 2
Pt71936** PCP71987*	7	3	3	8	1	4	3	3.8 5
Pt87268** PCP87314*	5	3	3	7	1	-	1	3 4
Pt110048	-	-	-	-	-	1	4	2.5
Promedio	4.63	3	2.71	5.29	1	2.2	2.2	

**según la nomenclatura de Vendramin *et al.* (1996) para el cloroplasto de *P. thunbergii*.

*según la nomenclatura de Provan *et al.* (1999) para el cloroplasto de *P. sylvestris*.

P. sylvestris (Provan *et al.* 1998)

P. torreyana (Provan *et al.* 1999)

P. pinaster (Vendramin *et al.* 1998)

P. pinceana (Escalante, comunicación personal)

P. resinosa (Echt *et al.* 1998)

P. halepensis (Bucci *et al.* 1998)

En cuanto a los filogramas realizados con los distintos haplotipos, es claro que no se presenta una estructura genética clara, y no podemos identificar un grupo de poblaciones donde se encuentren agrupados los haplotipos que pudieran ser los más antiguos, de modo que no se puede identificar ningún patrón claro de la forma en la cual se encuentra distribuida la variación genética. Sin embargo, cuando se analiza la red de los diferentes haplotipos podemos observar cómo los haplotipos con mayor frecuencia se agrupan juntos, alrededor de H1, que parecería ser el haplotipo más ancestral. Por otro lado, los cladogramas de presencia/ausencia de haplotipos en las distintas poblaciones, así como los dendogramas obtenidos con la distancia genética, parecerían indicar que Miquihuana, Antonias y San Lázaro fueran las poblaciones más antiguas, pues además presentan los haplotipos ancestrales (Figura 16).

Cuando se comparan la diversidad promedio calculada con base en microsatélites de cloroplasto de pino para varias especies, se observa que el índice de diversidad encontrado para *P. nelsonii* ($He = 0.531$) tiene un valor intermedio respecto a los valores observados para otras especies (Tabla 19), sin llegar a ser tan alta como la encontrada en *P. sylvestris* ($He = 0.978$) ni tan baja como la encontrada en *P. leucodermis* ($He = 0.316$). Sin embargo, dicho valor también se encuentra dentro del rango de heterocigosis encontradas utilizando microsatélites nucleares (Tabla 20). Por otro lado, cabe señalar que se encontraron poblaciones donde la diversidad es prácticamente nula, como en Los Duraznillos con una He de 0.1931, el cual es un valor muy bajo considerando la variabilidad de estos marcadores. A pesar de esto, en general se encontraron valores bastante elevados tanto de diversidad genética como de número de haplotipos, lo cual es contrario a lo que se hubiera esperado tomando en cuenta lo restringido de la distribución de *P. nelsonii*, ya que ambos valores son comparables con especies de distribución mucho más amplia. Sin embargo, este mismo patrón se encontró en *P. rzedowskii* utilizando isoenzimas, donde, a pesar de ser un pino microendémico, la variación genética encontrada fue elevada (Delgado, *et al.* 1999), y en *P. washoensis* el cual es una especie en peligro y también presenta altas valores de He para isoenzimas (Niebling and Conkle, 1990).

Cabe resaltar que las poblaciones que menor diversidad genética presentaron fueron las ubicadas en San Luis Potosí, tanto en el número encontrado de haplotipos (cuatro en cada una de ellas) como en la H_e ; mientras las poblaciones que se encuentran cerca de la frontera entre Nuevo León y Tamaulipas (Miquihuana, Antonias y San Lázaro) exhiben heterocigosidades altas siendo estas las poblaciones que poseen mayor tamaño poblacional.

Tabla 19. Valores de diversidad de loci de microsatélites de cloroplasto en distintas especies de pino.

Especie	Referencia	Diversidad (H_e)	Estructura	# Loci
<i>P. leucodermis</i>	Powell <i>et al.</i> (1995)	0.000-0.629 (0.316)	$G_{st} = 0.22$	1
<i>P. halapensis</i>	Morgante <i>et al.</i> (1997)	0.236-0.925 (0.596)		10
	Bucci <i>et al.</i> (1998)	0.034-0.422 (0.222)		9
<i>P. resinosa</i>	Echt <i>et al.</i> (1998)	0.314-0.920 (0.568)	$G_{st} = 0.121$	
<i>P. sylvestris</i>	Provan <i>et al.</i> (1998)	0.950-0.987 (0.978)		17
<i>P. pinaster</i>	Vendramin <i>et al.</i> (1998)	0.500-0.833 (0.727)		
<i>P. nelsonii</i>		0.1931-0.8684 (0.531)	$F_{st} = 0.131$ $R_{st} = 0.05$	4
<i>P. pinceana</i>	Escalante (2001)	0.00 – 0.7579 (0.379)	$F_{st} = 0.785$ $R_{st} = 0.9382$	4

Tabla 20. Valores de diversidad de loci de microsatélites nucleares en distintas especies de pino.

Especie	Referencia	Diversidad (H_e)
<i>Pinus strobus</i>	Echt <i>et al.</i> (1996)	0.515
<i>Pinus radiata</i>	Smith y Devey (1994)	0.625
<i>Pinus sylvestris</i>	Soranzo <i>et al.</i> (1996)	0.85

Por otro lado, es claro que las poblaciones con mayor diversidad genética presentarán valores más elevados de theta ($2N\mu$), debido a que ésta se encuentra relacionada directamente con la homocigosis (Schneider *et al.*, 200); si se supone que la tasa de mutación de los microsatélites es la misma para todas las poblaciones, entonces theta funcionará como un buen estimador del tamaño poblacional, lo cual coincide con lo

encontrado en el campo, pues las poblaciones con mayor valor de theta (Miquihuana y San Lázaro) también son las poblaciones con mayor número de individuos, excepto en el caso de las Antonias, la cual es la población de mayor tamaño y tiene una theta de 19.4 contra 28.3 y 24.5 de Miquihuana y San Lázaro, respectivamente. Sin embargo, cabe resaltar que el valor obtenido de theta es representativo del tamaño poblacional histórico, mientras que los tamaños observados de las poblaciones evidentemente no lo son, y aunque ambos parámetros pueden encontrarse relacionados, el valor de theta no es un estimador directo del tamaño actual de las poblaciones.

Estructura genética

Como se puede observar en los resultados, varios de los estimadores obtenidos difieren dependiendo del modelo de mutación del cual se parta para realizar los análisis, esto nos habla que no existe un modelo simple que pueda describir con precisión la dinámica poblacional de los microsatélites; en el caso del índice de fijación obtenido cuando se utiliza el modelo de alelos infinitos, resulta alrededor de tres veces mayor que en el caso de utilizar un modelo de mutación paso a paso (0.13073 y 0.04662 respectivamente), estos valores son bastante más pequeños que los obtenidos en otras especies. Por ejemplo, en *Picea abies*, Vendramin *et al.* (2000) encontró una R_{st} de 0.1 para 27 poblaciones europeas utilizando tres loci de microsatélites de cloroplasto; por otro lado, Bucci *et al.* (1998) encontró para *Pinus brutia* una R_{st} de 0.3 utilizando nueve loci de microsatélites de cloroplasto; hay que resaltar que ambos estudios fueron con especies de amplia distribución donde la distancia entre poblaciones era alta, mientras que *Pinus nelsonii*, a pesar de presentar una distribución restringida, posee poblaciones separadas por distancias relativamente pequeñas, considerando que en este género la polinización es por viento y las distancias de dispersión del polen pueden llegar a ser muy elevadas. Lo anterior se ve reflejado en las altas tasas de migración entre poblaciones lo cual a su vez origina una homogeneidad genética.

Lo anterior puede diferir dependiendo del marcador que se utilice, ya que la migración claculada es sólo para cloroplasto, y es muy probable que si se utilizara un marcador

nuclear o de mitocondria esto cambiaria considerablemente, ya que la forma y distancias en que estos se dispersan es distinta a la forma y distancia en la cual lo hace el cloroplasto.

Al hacer el análisis de varianza molecular locus por locus, tanto el índice de fijación que se obtuvo para cada locus como los componentes de la varianza, son independientes de los modelos de mutación que se utilicen, ya que en dicho análisis no se calcula la distancia entre haplotipos, siendo este el parámetro donde radican las diferencias entre ambos modelos. Cabe hacer notar que el valor obtenido para el índice de fijación es justo el promedio de los valores obtenidos con ambos modelos de mutación cuando se hace el AMOVA para el conjunto de los loci. La variación encontrada dentro de las poblaciones dependerá del locus que se utilice, pudiéndose encontrar desde el 89.1 % de la variación con el locus Pt30204, hasta el 99.9 % para el locus Pt38480, siendo en ambos casos mucho mayor la variación encontrada dentro de las poblaciones que la que se encuentra entre ellas.

En términos generales, se obtuvo una mayor diferenciación utilizando la F_{st} aunque, independientemente del método que se utilice para estimar el índice de fijación, la estructura genética es pequeña y, por lo tanto, las diferencias entre poblaciones son escasas; sin embargo, dicha diferenciación entre poblaciones aunque pequeña es significativa, por lo cual tampoco es posible decir que no estructura genética.

Slatkin (1995) demostró que, en el caso de los microsatélites, la F_{st} tiende a sobrestimar el número de migrantes entre poblaciones, por lo que el valor esperado de F_{st} tendería a ser menor que el de R_{st} . Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvieron resultados contrarios a lo esperado; es decir, los valores de R_{st} en general fueron más pequeños que los de F_{st} . La estructura detectada por alelos infinitos es mayor que la detectada cuando se utiliza un modelo de mutación paso a paso. En varios estudios realizados se ha encontrado este mismo patrón (Tabla 21). Según Lugon-Moulin *et al.* (1999) esto pudiera deberse a varios factores: a) que el modelo de mutación no se ajuste correctamente a los marcadores utilizados (lo cual sucede en las poblaciones de tortuga verde de Australia según FitzSimmons *et al.* (1997)), b) a que R_{st} tiene una varianza considerablemente mayor que la F_{st} , principalmente si el número de migrantes entre poblaciones es alto.

Tabla 21 Comparación entre algunos estudios donde se ha utilizado simultáneamente los estadísticos basados en alelos infinitos (F_{st}) y en mutación paso a paso (R_{st}) donde los valores obtenidos de R_{st} son bajos ($R_{st} < 0.051$) y menores que los valores obtenidos de F_{st} .

Especie	No. de poblaciones	No. de loci	F_{st}	R_{st}	Referencia
<i>Sorex araneus</i>	17 poblaciones en 13 kilómetros	7	0.027	-0.013	Lugon-Moulin <i>et al.</i> (1999)
Tortuga verde <i>Chelonia mydas</i>	Entre cuatro regiones separadas por 1000-4700 Km.	4	0.014	0.007	FitzSimmons <i>et al.</i> (1997)
<i>Salvelinus fontinalis</i>	26 poblaciones 3-42 Km.	5	0.068	0.036	Angers y Bernatchez (1998)
Oveja doméstica <i>Ovis aries</i>	3 manadas distintas (España, Israel y UK)	8	0.085	0.050	Forbes <i>et al.</i> (1995)
<i>Pinus nelsonii</i>	9 poblaciones 2.5 -129 Km.	4	0.1307	0.0466	Este trabajo

Por otro lado, la matriz de F_{st} y R_{st} pareadas puede ser utilizada como un indicador de distancia genética entre poblaciones y con base en esta matriz se calcularon tanto el número de migrantes como los tiempos de coalescencia, por lo que no es de extrañar que todas estas matrices presenten el mismo patrón donde Miquihuana es la población con mayor diferenciación genética respecto a las otras poblaciones, menor número de migrantes y mayores tiempos de coalescencia.

Como la diferencia genética es mucho mayor cuando se considera un modelo de alelos infinitos, los tiempos de coalescencia entre poblaciones tenderán a ser mayores cuando se

utilice la F_{st} que cuando se hagan los cálculos con base en la R_{st} . Cabe resaltar que, aunque similares, en ambos casos existen ciertas diferencias. Por ejemplo, en el caso de la F_{st} las poblaciones más lejanas genéticamente y, por lo tanto, con tiempos de coalescencia mayores y menor número de migrantes entre ellas son Duraznillos y Miquihuana; mientras que si se utiliza la R_{st} son Taponá y Miquihuana. Sin embargo, no existe distancia genética entre las poblaciones de Taponá y Duraznillos, por lo que ambas pudieran ser una misma población, ya que además comparten una serie de características comunes como ser las que más bajo polimorfismo tienen, encontrarse separadas por sólo un par de kilómetros y ser las poblaciones más jóvenes que se encontraron.

Al utilizar la distancia de Nei, el patrón observado difiere considerablemente de cuando se utiliza como estimador de distancia genética el índice de fijación (F_{st} o R_{st} pareados). Cuando se toma en cuenta la DA todos los valores obtenidos con el modelo de mutación paso a paso son mayores que los obtenidos por alelos infinitos, contrariamente a lo que se observa en las matrices de F_{st} y R_{st} pareadas. En el caso de utilizar alelos infinitos, tanto el método de Nei como las F_{st} pareadas otorgan la mayor distancia genética a Duraznillos y Miquihuana, mientras que cuando se utiliza mutación paso a paso la mayor distancia genética se observa entre Palmillas y Miquihuana para el caso de la distancia de Nei, y entre Taponá y Miquihuana para la R_{st} . Cuando se calcula la distancia de Nei (D_a o diferencias netas entre poblaciones) el patrón no difiere del encontrado con las diferencias brutas o D . Cabe resaltar que la correlación entre D y D_a difiere considerablemente dependiendo del modelo de mutación que se utilice, ajustándose mucho mejor el de mutación paso a paso ($r = 0.92$ contra $r = 0.56$ de alelos infinitos).

Por otro lado, al no haber correlación entre la distancia genética y la geográfica se puede deducir que en esta especie no es aplicable un modelo de aislamiento por distancia, esto es reforzado al no encontrarse correlación entre el número de migrantes y la distancia geográfica. No hay que olvidar que el número de migrantes se calcula con base en el índice de fijación, mientras que la distancia de Nei lo hace con base en las diferencias nucleotídicas, por lo que ambos estimadores son más o menos independientes, con lo cual

se refuerza el que no se puede aplicar un modelo de aislamiento por distancia a esta especie.

A pesar de no encontrarse un patrón claro de estructura genética para esta especie, parecería que las poblaciones ubicadas San Luis Potosí fueran las más recientemente establecidas. Esto puede suponerse por ser las poblaciones con menor número de individuos adultos, así como por su baja variación genética. En estas poblaciones se encuentra de manera casi exclusiva el haplotipo más común, lo cual podría ser consecuencia de la colonización y formación de estas nuevas poblaciones a partir de las encontradas en Tamaulipas y Nuevo León. La baja variación genética puede deberse a algún fenómeno tipo efecto fundador, donde la variación presente en las poblaciones recientemente fundadas es sólo una parte de la variación genética encontrada en las poblaciones originales.

Demografía histórica

La distribución encontrada de las diferencias entre pares de haplotipos parecería ser unimodal, lo cual sugiere una población que se encuentra en expansión demográfica. Sin embargo, la distribución observada es estadísticamente distinta que la distribución *mismatch* que se esperaría encontrar si la población de *P. nelsonii* hubiera sufrido una expansión súbita según el modelo de Rogers (1995). A pesar que las poblaciones de esta especie no han sufrido una expansión repentina propiamente dicha (Rogers plantea que la magnitud de dicha expansión debería de acercarse a un crecimiento de alrededor de 100 veces el tamaño poblacional en un tiempo relativamente corto), los estimadores de la distribución *mismatch* nos indican que se llevo a cabo una expansión poblacional, aunque de una magnitud mucho menor. Según los tiempos obtenidos utilizando la tasa de mutación para microsatélites de cloroplasto estimada por Soranzo y Provan (1999) para *P. torreyana* la expansión de cuatro veces el tamaño de la población le llevó a *P. nelsonii* entre 29,500 y 76,800 años. Por desgracia no existen muchos datos en la literatura respecto a los tiempos de expansión de otras poblaciones de pinos, además de que no se cuenta con datos paleobotánicos que pudieran sustentar o refutar los tiempos de expansión encontrados, de modo que hasta el momento es muy difícil sacar conclusiones al respecto.

En cuanto a la aproximación utilizada para inferir si la población se encuentra en un proceso de expansión, ambos dendogramas difieren considerablemente en la forma en la cual se agrupan las poblaciones (Figuras 26 y 27), esto debido a las diferencias encontradas en el patrón de distancias genéticas obtenido con base en los dos modelos de mutación utilizados, sin embargo, ambos coinciden en que las poblaciones de *P. nelsonii* presentan un dendograma en forma de estrella, lo cual coincide tanto con los cladogramas obtenidos utilizando la presencia/ausencia de haplotipos en cada población, como con el dendograma de las distancias entre haplotipos. Lo anterior es congruente con la relación parabólica encontrada entre el número de linajes y el tiempo de divergencia entre ellos, expresado como la distancia genética entre poblaciones; esto nos indica que las poblaciones de *P. nelsonii* se han incrementado históricamente.

Conservación de *P. nelsonii*

A pesar que las poblaciones de *P. nelsonii* no presentan baja variación genética como muchas especies endémicas y de distribución restringida y que, según los resultados de este estudio, el flujo genético entre poblaciones es suficientemente elevada para contrarrestar de manera efectiva el efecto de la deriva génica, es importante generar estrategias que permitan mantener, dentro de lo posible, la variación genética actual, así como los patrones de migración actuales.

A pesar que las poblaciones de *P. nelsonii* presentan estabilidad demográfica ($\lambda=1$, Suzán-Aspiri, *en prensa*), la tasa de reclutamiento es muy variable, dependiendo de las condiciones ambientales, y el número de juveniles es pequeño, lo cual podría acarrear problemas a futuro en la sobrevivencia de dichas poblaciones. Estas tasas de reclutamiento pueden deberse al uso comercial de las semillas de *P. nelsonii*, pues se considera que esta especie ocupa el segundo lugar, después de *P. cembroides*, en extracción de semillas con usos comestibles (Suzán-Aspiri, *en prensa*).

Debido a los fuertes incendios ocurridos en los últimos años, muchas de las poblaciones de *P. nelsonii* se han visto fuertemente disminuidas (observación personal), lo cual hace

importante delimitar zonas donde la disminución del tamaño poblacional afecte lo menos posible a la especie en su conjunto, en este sentido, se hace prioritario conservar aquellas poblaciones donde se encuentran una gran cantidad de haplotipos privados (Miquihuana, Antonias, San Lázaro) acompañados por una alta variación genética; mientras que poblaciones como Tula donde los haplotipos privados no existen podrían ser más fácilmente prescindibles; por otro lado, las poblaciones de la Tapona y Duraznillos donde alrededor del 97% de los individuos presenta el mismo haplotipo que, además, coincide con ser el haplotipo más común en la especie, también parecen ser menos importantes si lo que nos interesa es mantener la mayor variación genética dentro de la especie: Sin embargo, estas estrategias de conservación sólo se limitan a la conservación de la variación genética detectada en este estudio. Es importante recalcar que, hasta la fecha, este es el único trabajo donde se analizan los patrones genéticos de esta especie; y que, la dinámica que se presenta en la variación encontrada en el cloroplasto no nos habla de otro tipo de procesos importantes, los cuales permitirían tener una idea más completa de los patrones genéticos de *P. nelsonii*, con lo cual se podrían establecer estrategias de conservación mucho más precisas y eficientes.

Por otro lado, hay que resaltar que los estudios genéticos no son suficientes para generar estrategias adecuadas de conservación, por ser este un problema mucho más complejo y donde hay que tomar en cuenta otros factores más allá de la variación genética, como por ejemplo las distintas adaptaciones que puedan presentar las poblaciones al medio, los patrones en las cuales se están regenerando dichas poblaciones, etc.

Conclusiones

- A pesar de que se carece de datos suficientes para las categorías de edad menores de 29 años, se observa para la especie en su conjunto una distribución de jota invertida, donde los individuos menores tienen una frecuencia mayor, mientras esta disminuye conforme aumenta la longevidad. Sin embargo, este patrón es muy variable cuando se toman las poblaciones por separado, presentando en varios casos poblaciones donde con baja frecuencia de individuos jóvenes y quizá bajo reclutamiento.
- Al utilizar como marcador molecular microsatélites de cloroplasto, la variación genética encontrada en *P. nelsonii* es elevada en términos generales, sin dilucidarse ningún patrón claro de estructura genética para ninguno de los dos modelos de mutación utilizados. A pesar que ambos modelos difieren entre sí en cuanto a los estimadores obtenidos, la estructura genética es muy reducida en ambos casos, encontrándose las mayores diferencias genéticas entre las poblaciones de San Luis Potosí y las de Tamaulipas y Nuevo León.
- En todos los casos, el flujo genético mediado por polen es muy elevado, sin barreras aparentes al intercambio de polen entre poblaciones, lo cual permite que las poblaciones estudiadas sean muy homogéneas genéticamente.
- Las poblaciones estudiadas de *P. nelsonii* no se ajustan a un modelo de aislamiento por distancia, debido a que no hay correlación entre la distancia genética y la geográfica.
- Los datos de demografía histórica parecen indicar que las poblaciones de *P. nelsonii* han sufrido una expansión relativamente reciente, la cual pudo haber comenzado entre 29,500 y 78,600 años.
- Debido al patrón de estructura de edades, así como a la frecuencia de los haplotipos presentes en las poblaciones de San Luis Potosí, cabría suponer que dichas poblaciones son más recientes que el resto, originándose quizá por colonización o fragmentación

BIBLIOGRAFIA

- Angers B., L. Bernatchez (1998) Combined use of SMM and nonSMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) population from microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 143-159.
- Anzidei M., A. Madaghiale, C. Sperisen, B. Ziegenhagen, G. Vendramin. (1999) Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of diversity in conifer species. En: Which DNA Marker for Which Purpose? Compendio final del proyecto de investigación Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. Guillet E.M. (ed.). URL: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Barrett S.C. y J.R. Kohn. (1991). Genetic and Evolutionary Consequences of Small Populations in Plants: Implications for Conservation. En: D.A. Falk y K. Holsinger (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Inc. Nueva York. 3-30 pp.
- Betancourt, JI., W.S. Schuster, J.B. Mitton y R.S. Anderson (1991) Fossil and genetic history of an pinyon pine (*Pinus edulis*) isolate. *Ecology*, 72: 1685-1696.
- Bermejo, V (1993) Genetic diversity and the mating system in *Pinus engelmannii* Carr. Ph.D. dissertation. University of Wisconsin. Madison. W.I.
- Bicci, G., G.G. Vendramin, L. Lelli y F. Vicario (1997) Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. Endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 1138-1146.
- Bucci G., M. Anzidei, A. Madaghiale, y G. Vendramin (1998) Detection of haplotypic variation and natural hybridization in *halapensis*-complex pine species using chloroplast simple sequences repeat (SSR) markers. *Molecular Ecology*, 7: 307-316.
- Brown, A.H, y G.F. Moram (1981) Isozymes and the genetic resources of forest trees. En: M.T. Conckle (Ed). *Isozymes in North American forest trees and forest insects*. Technical report number 48: 1-10. Pacific Southwestern Forest Range Experimental Station Berkeley, C. A.
- Cato S. y T. Richardson (1996) Inter and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and the inheritance of plastids in *Pinus radiata* D. Don. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 587-592.
- Charlesworth D. Y B. Charlesworth. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Reviews Ecology and Systematics*, 18: 237-268.
- Conckle M. T. (1992). Genetic diversity-seeing the forest through the trees. *New Forest* 6: 5-22.
- Delgado P. (1997). Estructura demográfica y genética de una especie del género *Pinus* (*Pinus rzedowskii* Madrigal et Caballero) endémica del estado de Michoacán, México. Tesis de Maestría. UNAM. 82p.
- Delgado P, D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser, E. Alvarez-Buylla (1999) High population

- differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 86: 669-676.
- Echt C. S., L. DeVerno, M. Anzidei, G. Vendramin. (1998) Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology*. 7: 307-316.
- Eisen J.A. (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. En: D. Golsdstein y C. Schlotterer (Eds.) *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press, Inc. New York. 34-48 pp.
- Estoup A. y J-M Cornuet. (1999). Microsatellites evolution: inferences from population data. En: D. Golsdstein y C. Schlotterer (Eds.). *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press, Inc. New York. 49-79 pp.
- Excoffier L., P. Smouse y J. Quattro (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- Farjon A. (1996). Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121: 365-384.
- Farjon A. y B. T. Styles (1997) *Pinus* (Pinaceae). Organization for Flora Neotropica. The New York Botanical Garden. N. Y. 219 p.
- FitzSimmons NN, C. Moritz, C.J. Limpus, R. Pope, R. Prince (1997) Geographical structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle population and male-biased gene flow. *Genetics*, 147: 1843-1854.
- Forbes SH, JB. Hogg, FC. Buchanan, A. Crawford, FW. Allendorf (1995) Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and Bighorn sheep. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 1106-1113.
- Foster H.L. (1991). Ecological Implications of Genetic Variation in Plant Populations. En: D.A. Falk y K. Holsinger (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Inc. Nueva York. 31-44 pp.
- Furnier G., y T. W. Adams (1986) Geographic patterns of allozyme variation in Jeffrey pine. *American Journal of Botany*, 73: 1009-1015
- Futuyma D. (1986) *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates Inc. U.S.A. 600p.
- Gaggiotti O.E., O. Lange, K. Rassmann, C. Gliddon (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8: 1513- 1520.
- Ge S., D. Hong, H. Wang, Z. Liu, C. Zhang. (1998) Population genetic Structure and Conservation of an Endangered Conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae). *International Journal of Plant Science*, 159(2): 351-357.
- Guries, R.F., y F.T. Ledig (1982) Genetic diversity and structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill). *Evolution*, 36: 387-402.

- Hamrick J. L. y M.J. Godt (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*. 351, 1291-1298.
- Hamrick J. L., M. J. Godt y S. L. Sherman-Broyles. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.
- Hancock J. M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. . En: D.B. Golsdstein y C. Schlotterer (Eds.) *Microsatellites. Evolution and Applications*. Oxford University Press, Inc. New York. 1-7 pp.
- Jarne P. y J. L. Lagoda. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE*, 11, 424-429.
- Karron J. D. (1991) Patterns of Genetic Variation and Breeding System in Rare Plants Species. En: D.A. Falk y K. Holsinger (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants* Oxford University Press, Inc. Nueva York. 87-98 pp.
- Keeley JE y P Zedler (1998) Evolution of life histories in *Pines*. En: DM. Richardson (Ed). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press. UK
- Kimura, M. y JF. Crow (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49, 725-38.
- Kimura, M. y T. Ohta (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*; 75, 2868-72.
- Ledig T. (1998) Genetic variation in *Pinus*. En: DM. Richardson (Ed) *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press. UK
- Ledig T, y T. Conkle. (1983) Gene diversity and genetic structure an a narrow endemic, torrey pine (*Pinus torreyana* parry ex carr.) *Evolution*, 17: 79-85.
- Ledig T., V. Jacob-Cervantes, P. Hodgskiss, T. Eguiluz-Piedra. (1997) Recent evolution and divergence among populations of a rare mexican endemic, chihuahua spruce, following holocene climatic warming. *Evolution*, 5: 1815-1827.
- Ledig T., T. Conkle, B. Bermejo-Velázquez, T. Eguiluz-Piedra, P. Hodgskiss, D. Johnson, W. Dvorak. (1999). Evidence for an extreme bottleneck an a rare mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution*, 53: 91-99.
- Li W. (1997). Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. 487p.
- Loveless M. D. y J. L. Hamrick (1984). Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 65-95.
- Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* 27:209-220.
- Mathenson A.C., J.C. Bell, y R. D. Barnes (1989) Breeding systems and genetic structure in some

Central American pine populations. *Sylvae genetica*, 38: 108-113.

- Martínez M. (1992) Los pinos mexicanos. Ed. Botas. México. 319 p.
- Menges E.S. (1991). The Application of Minimum Viable Population Theory to Plants. En: D.A. Falk y K. Holsinger (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Inc. Nueva York. 45-61 pp.
- Michalakis Y. y L. Excoffier (1996) A genetic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellites loci. *Genetic* 142: 1061-1064.
- Millar C. (1998) Early evolution of pines. En: D.M. Richardson (Ed). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press. UK. 61-69 pp.
- Millar C. (1993). Impact of the Eocene on the Evolution of *Pinus* L. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 80: 471-498.
- Millar C. Y W. J. Libby. (1991). Strategies for Conserving Clinal, Ecotypic, and Disjunct Population Diversity in Widespread Species. En: Falk y K. Holsinger (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. D.A. Oxford University Press, Inc. Nueva York. 149-170 pp.
- Mitton, J.B. (1995). Genetics and the Physiological Ecology of Conifers. En: W. Smith y Hinckley T. (Eds.) *Ecophysiology of Coniferous Forests*. Academic Press, Inc. San Diego. 1-36 pp.
- Molina-Freaner F., P. Delgado, N. Pérez-Nasser, D. Piñero y E. Alvarez-Buylla (2001) Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from tree mexican species. *Canadian Journal of Botany*, 79: 223-230.
- Morgante M., N. Felice, y G. Vendramin. (1997) Analysis of hypervariable chloroplast microsatellite in *Pinus halapensis* reveals a dramatic genetic bottleneck, En: A. Karp, P. O. Issac, y D. S. Ingrams (Eds). *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. Chapman and Hall, London. pp 407-412.
- Nee S., E. C. Holmes, A. Rambaut, P. H. Harvey (1996) Inferring population history from molecular phylogenies. En: P. Harvey, A. Leigh Brown, J. Maynard Smith y S. Nee (Eds). *New Uses for New Phylogenies*. Oxford University Press. 66 – 80 pp.
- Nei, M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, Nueva York , USA.
- Niebling D, y M. Conkle (1990) Diversity of washoe pine and comparations with allozymes of ponderosa pine races. *Canadian Journal of Forest Researc.*, 20: 298-308.
- Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental-Especies de flora y fauna silvestres de México Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). Diario Oficial 16 de octubre del 2000.
- Ohta T. y M. Kimura (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic research*, 22: 201-204.
- Pérez de la Rosa J., S. A. Harris, A. Farjon (1995). Noncoding chloroplast DNA variations in

Mexican pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 1101-1106.

- Perry, J.P. (1991). *The Pines of Mexico and central America*. Timber Press. Oregon. 231 pp.
- Perry J.P Jr, A. Graham y D.M. Richardson (1998) the history of pines of Mexico and Central America. En: D.M.. Richardson (Ed). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press. UK
- Platt W. J., W. Evans y R. S. Rathbun. (1988). The population dynamics of a long-live conifer (*Pinus palustris*). *American Naturalist*, 131: 491-525.
- Powell W, M. Morgante, R. MacDevitt, G. Vendramin y J. Rafalski. (1995) Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA*, 99: 7759-7763.
- Provan J., N. Soranzo, N.J. Wilson, J.W. McNicol, G.I. Forrest *et al.* (1998) Gene pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple sequences repeats. *Proceedings of the Royal Society of London, Ser. B*. 265:1697-1705.
- Provan J., N. Soranzo, N. Wilson, D. B. Goldstein y W. Powell. (1999). A Low Mutational Rate For Chloroplast Microsatellites. *Genetics*, 153: 943-947.
- Rogers, A. (1995) Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608-615.
- Ross KG., MJ. Krieger, DD. Shoemaker, E. Vargo, L. Keller (1997) Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: results from tree clases of molecular markers. *Genetics*, 147: 643-655.
- Rzedowsky J. (1978) *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México.
- Schaal B., W. Leverich, S. Rogstad. (1991). A Comparison of Methods for Assessing Genetic Variation in Plant Conservation Biology. . En: D.A. Falk y K. Holsinger (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Inc. Nueva York. 123-134 pp.
- Schneider S., D. Roessli y L. Excoffier (2000) Arlequin Ver. 2.000: A software for population genetic data analysis.
URL: <http://anthro.unige.ch/arlequin>
- Schuster, W.S., D.L. Alles, y J.B. Mitton (1989) Gene flow in limber pine: evidence from pollination phenology and genetic differentiation along an elevational transect. *American Journal of Botany*, 76: 1395-1403.
- Scotti I., G. Paglia, F. Magni, M. Morgante (1999) Microsatellite markers as a tool for the detection of intra- and interpopulational genetic structure. En: Which DNA Marker for Which Purpose? Compendio final del proyecto de investigación Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. Guillet E.M. (ed.).
URL: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies.

- Soranzo N., J. Provan, W. Powell (1999) An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome*, 42: 158-181.
- Sperisen C., U. Büchler, G. Mátyás, M. Anzidei, A. Madaghiele, T. Skoppa, G. Vendramin (1998) Polymorphic tandem repeats in the chloroplast and mitochondrial genomes in Norway spruce. En: Skoppa T., L. Paule, D. Gömöri (Eds.). *Genetics and breeding of Norway spruce*. Arbora Publisher, Zvolen, Slovakia, pp. 15-24.
- Strauss, S.H. y F. T. Ledig (1985) Seedling architecture and life history evolution in pines *American Naturalist*, 125: 702-715.
- St. André G., Mooney HA. Y Wright R. (1965) The pinyon woodland zone in White Mountains of California. *American Midland Naturalist*, 73, 225-39.
- Silvertown, J. M. Franco, I. Pisanti, A. Mensoza. (1993) Comparative plant demography – relative importance of life-cycle components to the finite rate of increase in woody and herbaceous perennials. *Journal of ecology*, 81: 465-476.
- Suzán H. (1985) Estudios autoecológicos-dendrocronológicos en *Pinus nelsonii*. En: J. Flores (Ed.) *Memorias. I Simposio nacional de pinos piñoneros*, UANL. México 137-149 pp.
- Suzán-Aspir H., G. Sánchez-Ramos, G. Martínez-Avalos, S. Villa-Melgarejo, M. Franco. Population structure of *Pinus nelsonii*, an endemic pinyon pine in Tamaulipas, México. *Manuscrito*.
- Swofford D. L. y G. J. Olsen. 1990. Phylogenetic reconstruction. En: D. M. Hillis y C. Moritz (Eds). *Molecular systematics*. 411-501. Sinauer, Sunderland, MA.
- Tajima, F. (1983) Evolution relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 123: 437-460.
- Valdes, A.M., M. Slatkin y N. B. Freimer. (1993) Allele frequencies at microsatellites loci: the stepwise model mutation revisited. *Genetics*, 133:737-749.
- Vendramin G., L. Lelli, P. Rossi, M. Morgante (1996) A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology* 5: 111-114.
- Vendramin G. y B. Ziegenhagen. (1997) Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome*, 40:857-864.
- Vendramin G. M. Anzidei, A. Madaghiele, y G. Bucci (1998) Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. As revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 456-463.
- Vendramin G. M., Anzidei, A. Madaghiele, C. Sperisen y G. Bucci (2000) Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.) *Genome*, en prensa.
- Wakasugi T., J. Tsudzuki, S. Ito, M. Shibata, M. Sigiura (1994) A physical map and clone bank of

- the black pine (*Pinus thunbergii*) chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 227-241.
- Weir B. S., y Cockerham C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Woods J., G. Blake y F. Allendorf. (1983). Amount and Distribution of Isozyme Variation in Ponderosa pine from Eastern Montana. *Silvae Genetica*. 32: 151-157.
- Zavarin E. Y. K. Snajberk. (1987). Monoterpene Differentiation in Relation to the Morphology of *Pinus culminicola*, *Pinus nelsonii*, *Pinus pinceana* and *Pinus maximartinezii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15: 307-312.

Apéndice I. Protocolo de Extracción de DNA de Pinos (Vázquez-Lobo 1996)

- Moler en un mortero aproximadamente 1g de tejido (acículas) con nitrógeno líquido.
- Moler en un micromortero el equivalente a una punta de espátula del tejido pulverizado con 1ml de buffer CTAB 2X (Tris-HCl 100mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% y b-ME 0.3%).
- Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10,000 rpm por 8 minutos a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 µl de buffer CTAB 2X. Incubar a 60°C durante 10 minutos.
- Agregar a cada tubo 600 µl de cloroformo-octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7,000 rpm por 12 minutos o hasta que el sobrenadante quede transparente.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y precipitar el DNA con dos tercios del volumen final de isopropanol frío. Dejar reposar de 30 minutos a 12 horas a -20°C.
- Centrifugar a 9,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- El pellet se limpia agregando 1ml de etanol frío al 70 % y centrifugando a 7,000 rpm por 5 minutos a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 200 µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM) ó con agua estéril.

Apéndice II. Marcaje radiactivo del marcador de 10 pb.

- 2 µl de marcador de 10 pb. de Gibco diluido a 0.1 ng/µl
- 1 µl de exchange reaction buffer de Gibco (250 mM Imidazol-HCl pH 6.4, 60 mM de MgCl₂, 5 mM de 2-mercaptoetanol, 350 µl de ADP)
- 1 µl de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (10 µC/µl)
- 1 µl de cinasa T4 de Gibco (10 unidades/µl)

Incubar a 37°C por 10 minutos para activar la cinasa, y posteriormente a 55°C por 5 minutos para detener la reacción.

Apéndice III. Secuenciación del plásmido

a) marcaje del primer se secuenciación M13/pUC (Forward)

- 0.5 µl de agua estéril
- 1 µl de buffer para la cinasa 5X de Gibco [300 mM de Tris-HCl (pH 7.8), 50 mM de MgCl₂, 1 M de KCl]
- 1.5 µl de primer M13/pUC (Forward)
- 1 µl de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (10 µC/µl)
- 1 µl de cinasa T4 (Gibco)
- incubar a 37°C por 10 minutos
- incubar a 57°C por 5 minutos

- b) mezcla pre- reacción
5 μ l de primer M13/pUC (Forward) marcado radiactivamente
16 μ l de agua estéril
4.5 μ l de buffer para la TaqDNA polimerasa 10X [300 mM Tris-HCl (pH 9.0),
50 mM de $MgCl_2$, 300 mM de KCl, 0.5% (p/v) W-1]
10 μ l DNA del plásmido pUC18 (10 μ g/ml)
0.5 μ l de TaqDNA polimerasa (2.5 U/ μ l)
- c) reacción de secuenciación
a 8 μ l de la pre-reaction mix se le agregan 2 μ l de la mezcla de terminación para adenina (2 mM ddATP y 100 μ M de cada uno de los siguientes: dATP, dCTP, 7-deaza dGTP, dTTP)
se hace de esta manera con la mezcla de terminación de adenina, guanina, citosina y timina, obteniéndose un volumen final de 10 μ l para cada una de las bases.
- d) Reacción de PCR
3 minutos a 95°C
20 ciclos de 30 segundos a 90°C, 30 segundos a 55°C y 60 segundos a 70°C
10 ciclos de 30 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C
- e) Agregar 5 μ l de solución de solución de stop a cada tubo [95% (v/v) de formamida, 10mM EDTA (pH 8.0), 0.1% (p/v) de azul de bromofenol, 0.1% (p/v) de xilen cianol.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**