

Informe final* del Proyecto R116
Estructura poblacional, variación genética y conservación de tres especies del género
Pinus, endémicas de México

Responsable: M en C. Patricia Delgado Valerio

Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ecología
Departamento de Ecología Evolutiva

Dirección: Apartado Postal 70-275, Copilco-Universidad, México, DF, 04510 , México

Correo electrónico: pdelgado@miranda.ecologia.unam.mx

Teléfono/Fax: 622 9001 Fax: 616 1976

Fecha de inicio: Septiembre 30, 1998

Fecha de término: Julio 31, 2002

Principales resultados: Informe final, Hoja de cálculo

Forma de citar el informe final y otros resultados:** Delgado Valerio, P. y D. Piñero, 2001. Estructura poblacional, variación genética y conservación de tres especies del género Pinus, endémicas de México. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ecología. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. R116.** México D. F.

Forma de citar hoja de cálculo Delgado Valerio, P. y D. Piñero, 2001. Estructura poblacional, variación genética y conservación de tres especies del género Pinus, endémicas de México. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ecología. **Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. R116.** México D. F.

Resumen: En este proyecto se pretende estudiar la distribución, estructura y variación genética de tres especies de Pinus que están catalogadas como raras y en peligro de extinción; Pinus rzedowskii, P. maximartinezii y P. netsonii, con base al uso de microsatélites de ADN de cloroplasto y nuclear. También se estimará el flujo genético entre las poblaciones y los tiempos de divergencia de los diferentes holotipos o alelos. las frecuencias de los haplotipos permitirán hacer reconstrucciones filogenéticas de las poblaciones de las diferentes especies y con ello analizar diferentes índices jerárquicos de conservación (filogenéticos, demográficos y genéticos) para seleccionar a las poblaciones que sean prioritarias de conservar e implementar estrategias de rescate a corto plazo.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

Informe final presentado a la CONABIO

2 de julio del 2002

Proyecto R116 “Estructura poblacional, variación genética y conservación de cinco especies del género *Pinus*, endémicas de México”.

Responsables: M. en C. Patricia Delgado Valerio Dr.

Daniel Piñero Dalmau

INTRODUCCION

Pinus es uno de los géneros más diversos de árboles en el mundo, y México representa el principal centro de diversificación de este género (Styles 1993). De acuerdo con Perry (1991) en México existen 72 especies y variedades con 34 endemismos, constituyendo una riqueza, no solo para nuestro país sino para todo el mundo. Cada una de estas especies es el resultado de millones de años de evolución biológica que ha moldeado y producido entidades con diversas composiciones genéticas y adaptaciones ecológicas. Sin embargo, los mayores esfuerzos de investigación forestal en México se han destinado únicamente a la explotación de especies comerciales y escasos estudios han sido enfocados al conocimiento de la dinámica evolutiva, conservación y taxonomía del género (Delgado *et al.*, 1999; Quijada *et al.*, 1998; Liston *et al.*, 1999; Ledig *et al.*, 1998;2001; Molina *et al.*, 2001). El manejo forestal inadecuado de especies maderables y resineras, las altas tasas de destrucción de los bosques por plagas e incendios y la transformación de áreas de la vegetación nativa en agrícola y de pastoreo, han sido determinantes en la acelerada reducción de algunas poblaciones de *Pinus* con el peligro de desaparecer localmente. Además, algunas de las especies amenazadas son endémicas de México y corren el peligro de desaparecer globalmente. En este trabajo se realizó un estudio relacionado con la dinámica evolutiva de poblaciones de cinco especies de pino que dados sus rangos de distribución, habitats, morfologías uso y estatus de conservación, nos permitieron, por un lado, hacer estimaciones de la estructura y variación genética de las poblaciones y especies de estudio, y por otro lado definir criterios filogenéticos, demográficos y genéticos de conservación.

Las especies de estudio están ubicadas taxonómicamente dentro de dos subgéneros del género *Pinus* que son: *Pinus maximartinezii*, *P. pinceana*, *P. nelsonii* y *P. rzedowskii* del subgénero *Strobus* o pinos blandos y *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* del subgenero *Pinus* o pinos duros (Little y Crichfiel 1969). Se seleccionó a estas seis especies por varias razones (i) las cuatro especies de pino blandos (*P. maximartinezii*, *P. pinceana*, *P. nelsonii* y *P. rzedowskii*) son de distribución restringida, endémicas, raras y consideradas en peligro de extinción. En contraste, las especies de pinos duros (*P. pseudostrobus* y *P. montezumae*) son endémicas, pero también son dos de las especies de mayor distribución geográfica en México, ii) Para las especies del subgénero *Strobus* (pinos blandos) no se ha logrado definir con certeza su ubicación taxonómica, ya que presentan características morfológicas, químicas, anatómicas y moleculares compartidas entre los dos subgéneros (Martínez 1947; Perry 1991, Delgado *et al.*, 1999; Liston *et al.*, 1999). Aunado a esto, a su rareza morfológica, y a estudios previos que se han hecho sobre su origen y distribución, han sido catalogadas como especies raras y que probablemente contienen mucha de la historia evolutiva que dio origen al género *Pinus* (Martínez 1948, Mirov 1967; Ledig *et al* 1998), y (iii) *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* son dos de las especies de mayor importancia económica en México y han sido severamente explotadas para su comercialización dentro y fuera del país. Debido a esto, actualmente encontramos zonas que han sido drásticamente deforestadas con el riesgo de que se presenten extinciones locales de poblaciones representativas de estas especies. Por tanto, está claro que este es un grupo de especies ideal para analizar escenarios evolutivos contrastantes sobre la dinámica de la especiación del género *Pinus* y consecuentemente para el planteamiento de criterios específicos de conservación.

Objetivo general: Obtener información sobre la distribución geográfica, variación y estructura genética de cinco especies del género *Pinus* con estatus poblacional contrastante.

Objetivos particulares.

- Realizar estimaciones de la variación y distribución genética de cinco especies de pino de distribución amplia y restringida utilizando microsatélites (SSR).
- Hacer estimaciones del flujo genético entre las especies y poblaciones en estudio.
- Detectar posibles núcleos de mayor diversificación genética, señalando puntos estratégicos de conservación a través de su área de distribución natural.

- Diseñar estrategias para obtener germoplasma que sea representativo de la variación genética de las especies para su conservación *ex situ* y para evaluar su utilidad potencial en estudios de mejoramiento genético.

Metodología general

Trabajo de campo

La inspección de las poblaciones se realizó con base a literatura preexistente (Perry 1991; Price 1998). Se visitaron poblaciones de las seis especies en estudio (*P. pseudostrobus*, *P. montezumae*, *P. nelsonii*, *P. rzedowskii*, *P. pinceana* y *P. maximartinezii*) en los diferentes estados donde se distribuyen naturalmente (ver Tabla 1). Para las especies colectadas se tomaron datos de ubicación geográfica con la ayuda de un geoposicionador marca Magellan (modelo ProMARKV'GPS). Estos fueron útiles para la elaboración de los mapas geográficos de las diferentes poblaciones y especies (Figura 1a, b, c, d y e).

Análisis demográfico para *P. nelsonii*

Las estimaciones de la densidad de cada población se llevaron a cabo con un método con o sin área, basado en recorridos y observaciones preliminares en cada una de ellas. Para algunos de los árboles se tomaron datos de edad y altura, con el uso de un taladro de Pressley y con una Forcípula (ver base de datos).

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, para el total de individuos 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 [(Valor máximo – Valor mínimo)/ 5logN].

Genética

Se colectó material foliar de las partes terminales de las ramas (20 gm), y de 20 a 30 conos por población (esto para iniciar con el banco de semillas) de *P. nelsonii*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*. Para *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* se colectó muestra de acículas de 320 árboles. Para *P. nelsonii* se colectaron muestras de acículas de 256 individuos. Para *P. maximartinezii*, se colectaron acículas de 40 individuos adultos, 40 juveniles y 2 conos maduros por árbol. Para *P. rzedowskii* 70 muestras y para *P. pinceana* 154 muestras. Para esta última especie ya se contaba con las muestras y se anexaron los análisis y datos en este trabajo.

Selección de microsatélites polimórficos:

Después de la extracción y cuantificación de ADN genómico se continuó con la selección y amplificación de los microsatélites de cloroplasto polimórficos. Se ensayaron de 12 a 18 microsatélites y se obtuvieron datos de 6 microsatélites polimórficos para *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, 4 para *P. pinceana*, y *P. nelsonii*, 3 para *P. maximartinezii* y *P. rzedowskii*.

Por otra parte, también se ensayaron 12 microsatélites nucleares (SSRn) en todas las especies. Se obtuvo un total de tres microsatélites polimórficos para cada una de las especies, excepto para *P. rzedowskii*, especie para la cual las amplificaciones no fueron reproducibles y por tanto no se trabajó con microsatélites nucleares. La tabla 2, muestra la relación de microsatélites ensayados, tanto de cloroplasto como nucleares. Cabe mencionar que el total de SSRcl que se han detectado en coníferas son 19 (Vendramin et al., 1996). Así mismo, aunque existen alrededor de 50 SSR nucleares aislados en coníferas, muchos de ellos son específicos para los diferentes géneros, incluso para cada subgénero del género *Pinus*, por lo que fue difícil amplificar y estandarizar los fragmentos en pinos blandos, como es el caso de *P. rzedowskii*.

Obtención de fragmentos:

Una vez que se concluyó con los PCR, se hicieron geles de agarosa al 2% para observar los fragmentos amplificados. Se continuó con el montaje de los geles de

poliacrilamida con el uso de cámaras verticales manuales, por lo que se ensayaron diferentes buffers o sistemas de corrida y de diferentes concentraciones de geles de poliacrilamida, hasta que la resolución fue clara y se logró estandarizar para las 6 especies.

Protocolos de geles de poliacrilamida:

Para microsatelites de cloroplasto

Gel de poliacrilamida al 6%, con 7M de Urea

Acrilamida/Bis-Acrilamida (19:1) 40%	40 ml
10X TBE buffer	12 ml
Urea	67.2 gm

Llevar a 160 ml con H₂O destilada

Para microsatelites nucleares

Gel de poliacrilamida al 40%

Acrilamida/Bis-Acrilamida (19:1)	40 ml
20X TBE buffer	12.5 ml

Llevar a 250 ml con H₂O destilada

En 45 ml del stock de acrilamida se agregaron reactivo que permitieron la polimerización del gel en 20 minutos (APS al 10% y TMD Pharmacia). Inmediatamente de agregar dichos componentes, la acrilamida se vació en una cámara de cristal previamente preparada. Se agregaron 15 µl de reacción y 15 µl de loading dye (marcador), utilizando marcadores externos e internos (de 50 pb) para reconocer el tamaño de los fragmentos y posteriormente cuantificar con exactitud los polimorfismos. Los geles fueron corridos a 1400 V., durante 2:50 hrs.

Tinción de geles:

La tinción se ha realizado por dos métodos 1) con radioactividad y 2) con el uso de Nitrato de Plata. La técnica de marcaje con radioactividad permitió obtener datos de dos de las especies, sin embargo es una técnica muy tardada y requiere de por lo menos de 24 horas para concluir con el trabajo. Esta técnica esta basada en tres etapas fundamentales; 1) marcaje de los dNTPs con radioactividad (P^{32}), 2) secado del gel y 3) revelado del gel. Conjuntamente se estuvo trabajando con Nitrato de Plata, técnica que permite obtener resultados en solo una

hora, los pasos fundamentales son; 1) fijación con Ac. Acético 2) impregnación de Nitrato de Plata y 3) revelado. Los geles se fotografiaron y posteriormente se cuantificaron los polimorfismos.

Obtención y lectura de datos:

Cada microsatélite está formado de un número determinado de pares de bases por ejemplo el microsatélite de cloroplasto 7195, tiene una variación en su tamaño de 145 a 148 pb (cuatro alelos). Cada alelo de cada diferente individuo y microsatélite es ordenado de tal manera que forman haplotipos, que son la suma de los diferentes fragmentos para cada individuo. Por ejemplo, el individuo uno presenta un alelo 145 del microsatélite 1, un alelo 67 del microsatélite 2 y un alelo 160 del microsatélite 3, estos alelos forman el haplotipo : 145, 67, 160. Los haplotipos formaron la base de los análisis genéticos y filogenéticos de dichas especies.

Análisis de la información

Todas las estimaciones se obtuvieron con base a las frecuencias de los haplotipos, que resultan de la combinación de alelos de todos los SSR (loci) bajo el modelo de mutación paso a paso (SMM). Se obtuvieron dos estimadores de la diversidad genética dentro de las poblaciones (*HE*, Slatkin 1995a) y la media del número de diferencias para pares de haplotipos (*ir*, Tajima 1993). Además, para los SSR nucleares se estimó la Heterocigosis

(*Ho*). La divergencia entre poblaciones fue calculada con el modelo IAM (*FST*) y SMM (*RST*.) Un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA, Escoffier et al., 1992), fue aplicada a una estructura de tres grupos: entre grupos OCT, entre poblaciones dentro de

grupos 2SC y dentro de poblaciones OST. La significancia de los valores fue obtenida por 1000 permutaciones no paramétricas (Escoffier et al., 1992). Para determinar algún patrón de aislamiento por distancia se usó un método propuesto por Slatkin (1995) basado sobre un modelo de islas: se usó el estadístico $M = (1 - RST) / 2RST$ que analiza la relación entre pares de poblaciones y su distancia geográfica. Para la significancia de la relación entre *M* (tasas de dispersión) y las distancias geográficas (*D*) se usó una prueba de Mantel con 2000 permutaciones (Raymond y Rousset 1995). Los haplotipos obtenidos fueron usados para la matriz de distancias genéticas (*DA*) de acuerdo a Nei et al., (1978). El análisis de filogenia molecular se realizó a partir de las distancias genéticas (*DA*) se realizó un análisis de

Neighbor-joining con base al modelo SMM (Slatkin 1995a). Su significancia se estimó a través de una prueba de 1000 permutaciones (Takezaki y Nei 1996). Para la obtención de los parámetros y estadísticos estimados se usó el programa Arlequín (Schneider et al., 2000). El programa Tools For Population Genetic Analyses (TPFGA) ver 1.3 (Miller 1997) para obtener el análisis del aislamiento por distancia y la prueba de Mantel. Para la reconstrucción del dendrograma (Neighbor-joining) se usó el programa NJBAFD (Naoko Takezaki. Instituto Nacional de Japón).

Análisis de conservación

Utilizando el índice de diversidad táxica de Vane-Wright *et al.*, (1991) obtuvimos los valores de importancia filogenética de las poblaciones. El índice de diversidad táxica se basa en la cuantificación del número de linajes que surgen de cada nudo o puntos de ramificación para cada taxa o población. Se usaron medidas de similitud que mide las distancias genéticas (*DA*) entre pares de poblaciones (Nei *et al.*, 1978). Se dieron los pesos más altos a las poblaciones que se encontraron más separadas del resto y cerca de la raíz del dendrograma. Para obtener este índice de diversidad filogenética se estimaron dos parámetros 1) las agrupación táxicas (*AT*) y 2) los pesos taxonómicos básicos (*PTB*). La terminología de estos parámetros también fue modificada para su uso a nivel de poblaciones, pero sin alterar su contenido teórico. Los parámetros que se modificaron para este propósito fueron: -*Agrupación de poblaciones (AP)*; es el número de poblaciones presentes en el dendrograma. - *Pesos poblacionales básicos (PPB)*: se refiere a la división del total de la agrupación de poblaciones entre el valor de cada una.

Para facilitar los cálculos se estandarizaron los valores de *PPB* dividiéndolos entre el valor más bajo (*E*), lo que le dio a la población de menor categoría el valor de uno, donde encontramos que las poblaciones más diferentes son las más ancestrales en el dendrograma, mientras que las más parecidas evolutivamente a otras son las que se encuentran después de muchas bifurcaciones. Posteriormente, se usó el método de Vane-Wright *et al.*, (1991) adecuándolo a datos demográficos (número y tamaño de las poblaciones) y genéticos (cantidad de variación genética, (*HE*) y la heterocigosis observada (H_o), con ello se obtuvieron índices de conservación, donde, en lugar de usar el número de ramificaciones entre nodos se usó 1) el número de individuos por población y 2) los valores promedio de la diversidad genética (H_E) por población y los valores promedio de las heterocigosis (H_o). Para darle un

valor mayor al tamaño más pequeño de población (que son los tamaños de las poblaciones que nos interesa conservar) se usó su inverso y se estandarizó entre el más pequeño, así la población más chica dio de 1. En el caso de la diversidad genética (HE) y la heterocigosis (Ho) estandarizamos con el valor más alto ya que queremos dar prioridades de conservación a las poblaciones de mayor número de heterocigos y de mayor diversidad genética, nuevamente se obtuvieron valores de 1 (la más variable) y 0. Una vez obtenidos los valores de los tres criterios de conservación (demográfico, genético y filogenético) se integraron realizando una sumatoria de promedios por población, donde las poblaciones que presentaron valores más altos se consideraron las poblaciones con prioridades de conservar.

Los análisis y resultados se anexan como apartados por especie, los cuales incluyen todos los análisis realizados tanto con microsatélites de cloroplasto como nucleares (ver Anexos: I Análisis y resultado de *P. nelsonii*, Anexo II: Análisis y resultados de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, Anexo III: Análisis y resultados de *P. rzedowskii*, Anexo IV: Análisis y resultados de *P. maximartinezii*, Anexo V: análisis y resultados de *P. pinceana*) Así como un anexo con los análisis y resultados de criterios biológicos de conservación (Anexo VI). La discusión general de los resultados obtenidos para las especies estudiadas, resaltando la importancia evolutiva de los resultados obtenidos, así como de conservación para las poblaciones en particular de cada especie y la literatura general. También, se incluye un anexo con la clave de la base de datos (VII: Diccionario de variables), así como un último anexo con la propuesta de uso y criterios concretos de conservación que incluye a las 6 especies de pinos estudiadas (Anexo VIII: Propuesta de uso y criterios concretos de conservación).

Es importante mencionar que el proyecto fue realizado con la participación de cuatro estudiantes de licenciatura en Biología: Argelia Cuenca (estudio SSR de cloroplasto de *P. nelsonii*), Ana Elena Escalante (estudio SSR de cloroplasto de *P. pinceana*), Alejandra Moreno (estudio SSR nucleares de *P. maximartinezii*) y Mirosława Rentería Alcántara (estudio SSR nucleares de *P. nelsonii*) y con apoyo logístico y de campo de la Biol. Alejandra Vázquez-Lobo y de la técnico Biol. Rocío Esteban. En general, el apoyo otorgado por la CONABIO formó parte de la generación de 4 tesis de Licenciatura en Biología y una de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Tabla 1. Sitios de colecta de las poblaciones de las especies de 5 especies de pino en estudio

No	Sitio Altitud (msnm)	Especie	Estado	Ubicación Geográfica	
1	V	híbridos	Malacatepec Estado de México	100°09'43'' 19°21'16''	3100
2	A	<i>Híbrido</i>	Anganqueo Michoacán	100°22'45'' 19°32'22''	2850
3	T	<i>Híbrido</i>	Temascalpepec Estado de México	100°42'03'' 19°28'13''	3100
4	E	<i>Híbrido</i>	Zitácuaro Michoacán	100°38' 19°60'	1700
5	SUH	<i>P. pseudostrobus</i>	Tuxtepec Oaxaca	96°26'31'' 17°19'59''	2144
6	D.A	<i>P. pseudostrobus</i>	Aguililla Michoacán	102°55'36'' 18°49'17''	2370
7	MaI	<i>P. montezumae</i>	Puebla	92°52'08'' 19°50'30''	2100
8	MaII	<i>P. montezumae</i>	Puebla	98°32' 19°51'	2800
9	SIII	<i>Híbrido</i>	San Cristobal Chiapas	92°25'60'' 16°44'25''	2440
10	H	<i>P. montezumae</i>	Ixmiquilpan Hidalgo	96°45' 20°06'	2100
11	T	<i>P. montezumae</i>	Totonicapan Guatemala	91° 24' 08" 14° 55' 60"	2374
12	G	<i>P. pseudostrobus</i>	Caoqué, Jalpa Guatemala	90° 41' 66" 14° 38' 23"	2043
13	C	<i>P. montezumae</i>	Cuernavaca Morelos	19 20' 19' 03'	2800
14	Tula	<i>P. nelsonii</i>	Tamaulipas	99°40'68'' 23°15'89''	2265
15	Miquihuana	<i>P. nelsonii</i>	Tamaulipas	99°45'01'' 23°35'15''	1731
16	Las Antonias	<i>P. nelsonii</i>	Tamaulipas	94°51'20'' 23°24'03''	1791
17	Peña Nevada	<i>P. nelsonii</i>	Nuevo León	99°54'01'' 23°48'14''	2244
18	San Lázaro	<i>P. nelsonii</i>	Tamaulipas	99.33.92 23°48'42''	2179
19	Palmillas	<i>P. nelsonii</i>	Coahuila	99°07'.36'' 23°17'81''	1597
20	La Tapona	<i>P. nelsonii</i>	San Luis Potosí	100°37'05'' 22°49'39''	2191
21	Los Duraznillos	<i>P. nelsonii</i>	San Luis Potosí	100°26.32	2168

22	Pto Membrillo	<i>P. nelsonii</i>	San Luis Potosí	22°47'89'' 100°26'32'' 22°41'38''	2168
23	Varaloso	<i>P. rzedowskii</i>	Michoacán	102°59'34'' 18°40'59''	2480
24	El Fresno	<i>P. rzedowskii</i>	Michoacán	102°59'15'' 18°40'18''	2450
25	Alberca	<i>P. rzedowskii</i>	Michoacán	103°00'23'' 18°39'15''	2340
26	Chiqueritos	<i>P. rzedowskii</i>	Michoacán	102°55'36'' 18°49'17''	2380
27	Juchipila	<i>P. maximartinezii</i>	Pblo Viejo Zacatecas	103°21'22'' 21°21'15''	2380
28	Sierra Parras	<i>P. pinceana</i>	Coahuila	102°10'42'' 25°21'22''	1737
29	Cuauhtemoc	<i>P. pinceana</i>	Coahuila	100°57'22'' 25°16'35''	2250
30	Huizache	<i>P. pinceana</i>	San Luís Potosí	100°29'20'' 22°53'05''	1480
31	Guadalcázar	<i>P. pinceana</i>	San Luís Potosí	100°30'00'' 22°40'00''	3000
32	San Joaquín	<i>P. pinceana</i>	Querétaro	99°38'22'' 20°55'00''	2080
33	Tolantongo	<i>P. pinceana</i>	Hidalgo	98°59'00'' 20°38'15''	1800

Figura 1a. Distribución geográfica de *P. nelsonii* México



Figura 1b. Distribución geográfica de las poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* y sus híbridos, México Guatemala

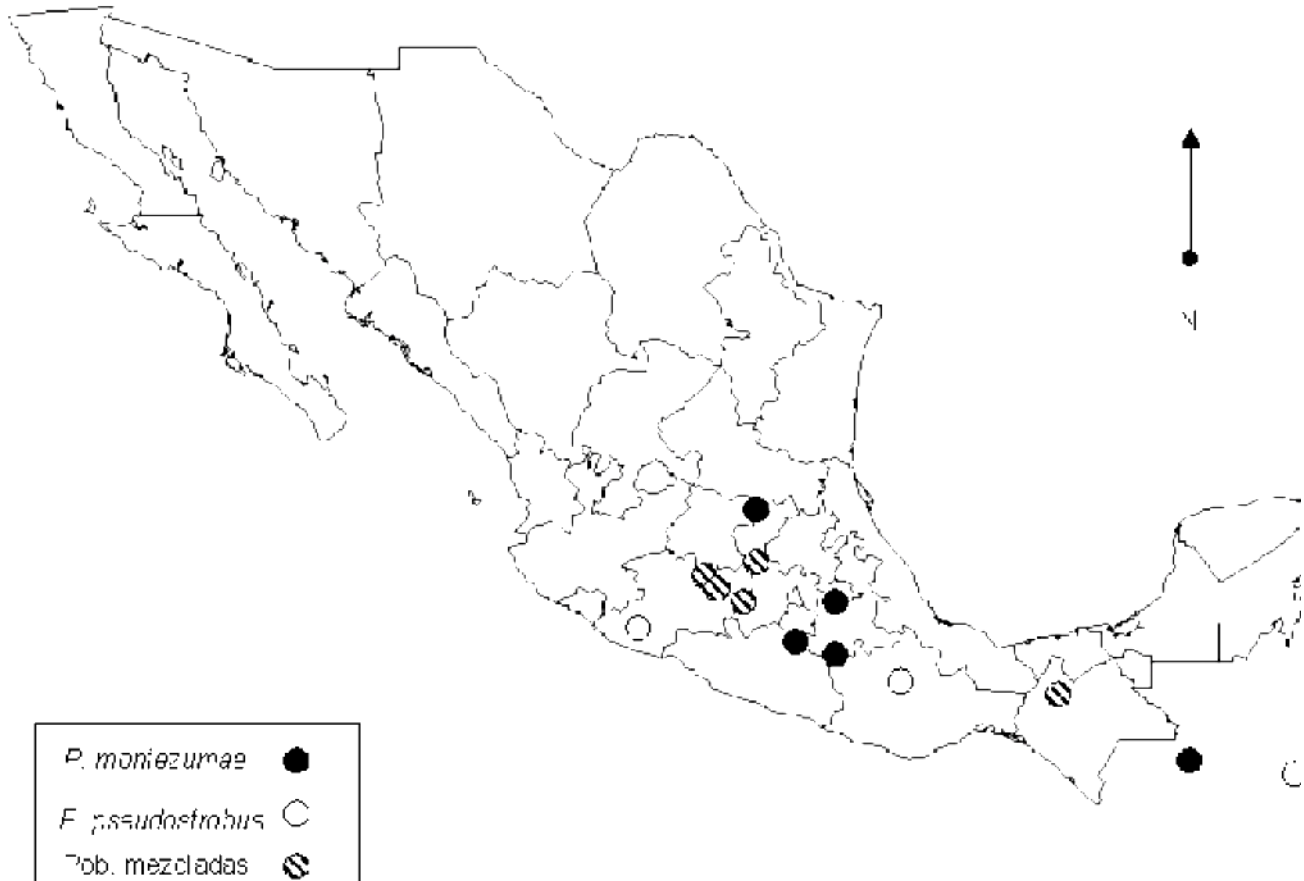


Figura 1c. Distribución geográfica de *P. maximartinezii*, Zacatecas México

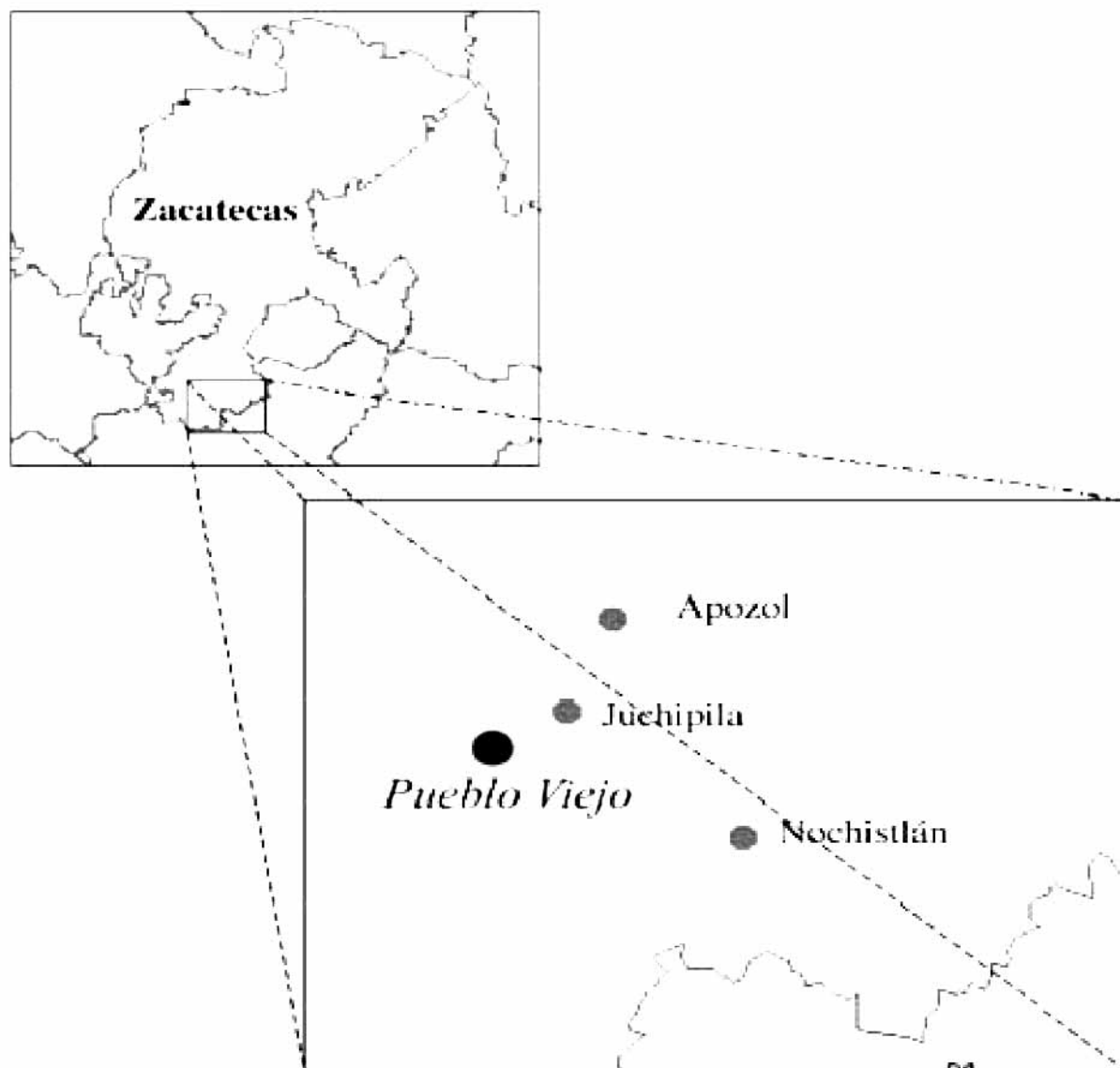


Figura 1d. Distribución de 4 poblaciones naturales de *P. rzedowskii*, Michoacán México

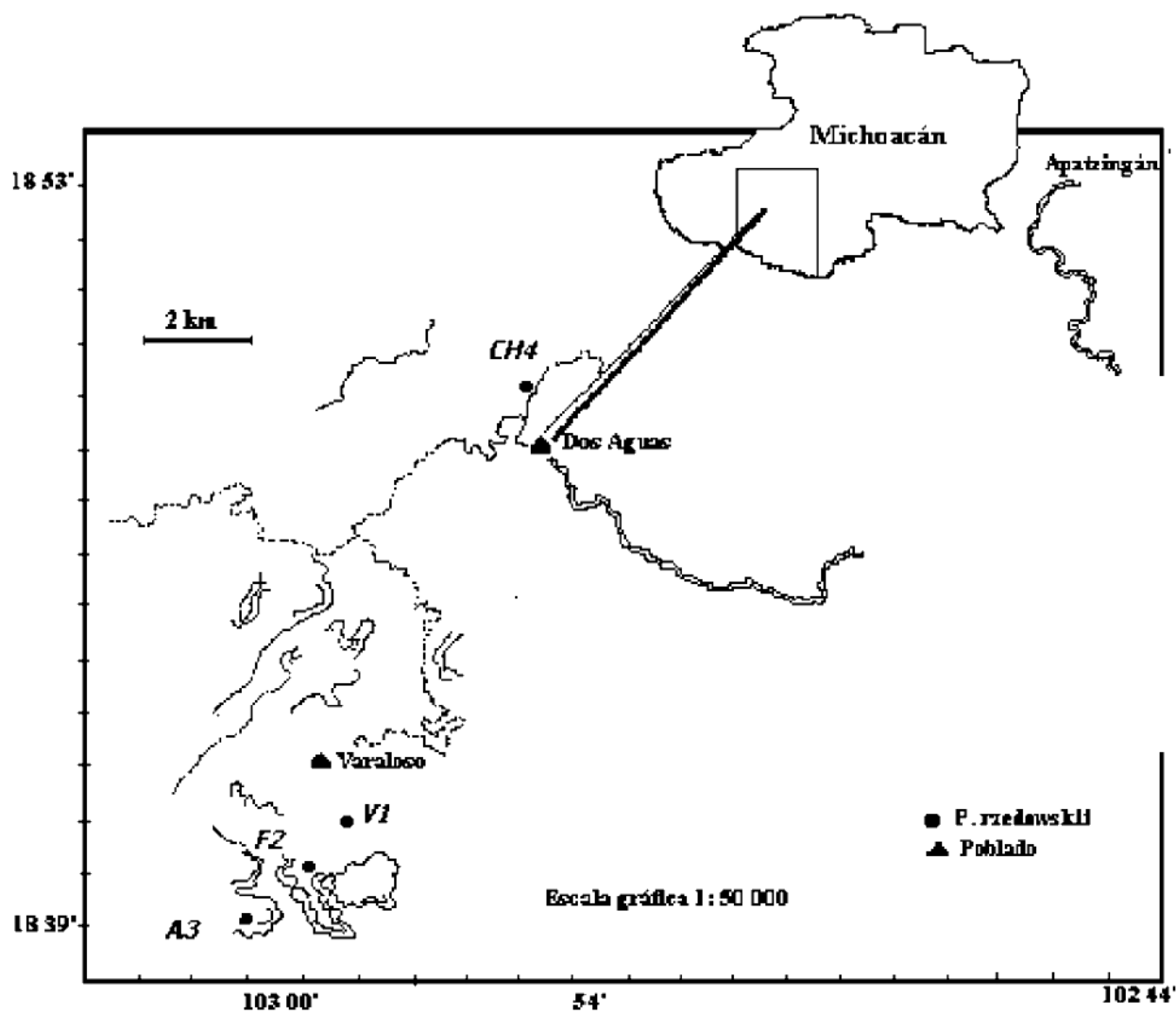


Figura 1e. Distribución geográfica de 6 poblaciones naturales de *P. pinceana*, México

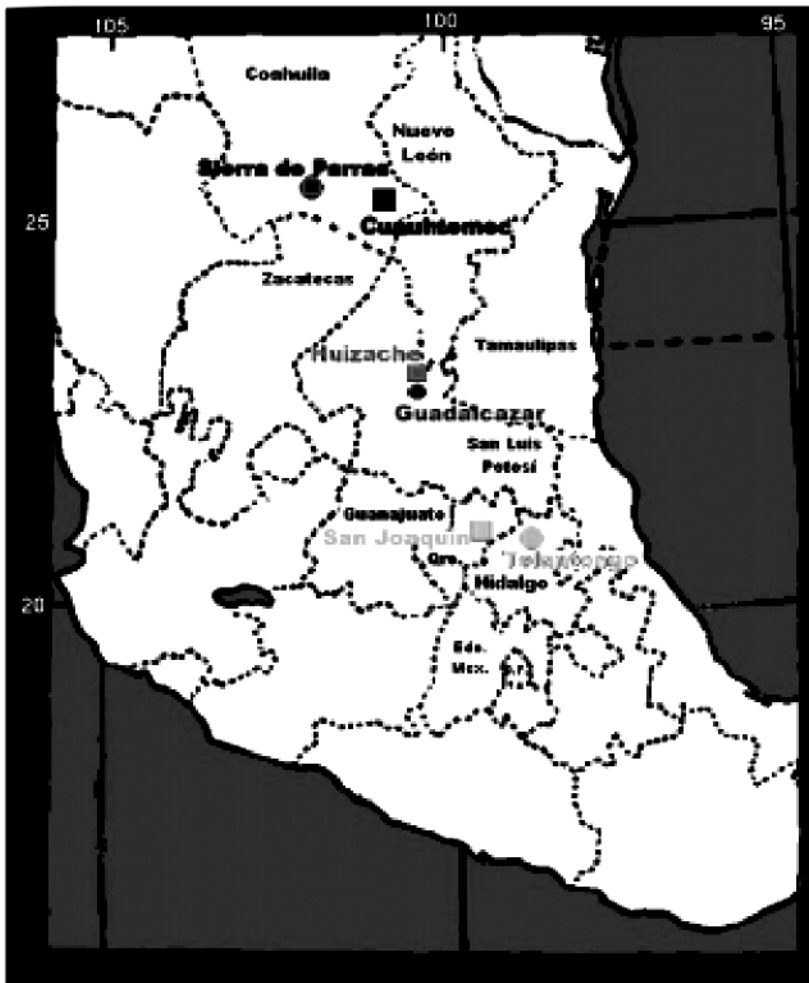


Tabla 2. Primers ensayados para la amplificación de microsatelites de cloroplasto y nucleares en 5 especies de pino, endémicas de México.

Microsatelites	Localización	Especie	Tamaño del fragmento (Pb)
De Cloroplasto (T-A)n			
Pt1254*	psbA-trnK (UUU) espaciador	<i>P. pseudostrobus</i>	66-69 Pol.
		<i>P. montezumae</i>	67-69 Pol
		<i>P. nelsonii</i>	66-68 Pol
		<i>P. rzedowskii</i>	66-68 Pol
		<i>P. maximartinezii</i>	66 Mon
		<i>P. pinceana</i>	66 Mon
Pt9400*	trnG(UCCC) intron	<i>P. pseudostrobus</i>	90-92 Pol
		<i>P. montezumae</i>	89-92 Pol
		<i>P. nelsonii</i>	84-90 Pol
		<i>P. rzedowskii</i>	85-90 Pol
		<i>P. maximartinezii</i>	90 Mon
		<i>P. pinceana</i>	90 Mon
Pt1520*	rps2	<i>P. pseudostrobus</i>	125-126 Pol
		<i>P. montezumae</i>	125-127 Pol
		<i>P. nelsonii</i>	132, 130 Pol
		<i>P. rzedowskii</i>	132-129 Pol
		<i>P. maximartinezii</i>	132 Mon
		<i>P. pinceana</i>	132 Mon
Pt26081	rpoB	<i>P. pseudostrobus</i>	112 Mon
		<i>P. montezumae</i>	112 Mon
		<i>P. nelsonii</i>	111 Mon
		<i>P. rzedowskii</i>	114 Mon
		<i>P. maximartinezii</i>	114 Mon
		<i>P. pinceana</i>	112-114 Pol
Pt3025*	clpP	<i>P. montezumae</i>	140-144 Pol

		<i>P. pseudostrobis P.</i>	140-142 Pol
		<i>nelsonii P.</i>	139-144 Pol
		<i>rzedowskii</i>	138-140 Pol
		<i>P. maximartinezii</i>	138 Mon 138
		<i>P. pinceana P.</i>	Mon 145
Pt3650	psbJ-petA espaciador	<i>pseudostrobis P.</i>	Mon 150
		<i>montezumae P.</i>	Mon 144
		<i>nelsonii P.</i>	Mon 144
		<i>rzedowskii P.</i>	Mon 144
		<i>maximartinezii P.</i>	Mon 144-146
		<i>pinceana P.</i>	Pol 78 Mon
		<i>pseudostrobis P.</i>	78 Mon 78
Pt4109	ORF119	<i>montezumae P.</i>	Mon 78 Mon
		<i>nelsonii P.</i>	78 Mon 78
		<i>rzedowskii P.</i>	Mon 89 Mon
		<i>maximartinezii P.</i>	89 Mon 88
		<i>pinceana P.</i>	Mon 88 Mon
		<i>montezumae P.</i>	88 Mon 88
Pt4821	ORF64a	<i>pseudostrobis P.</i>	Mon 86 Mon
		<i>nelsonii P.</i>	86 Mon 84
		<i>rzedowskii P.</i>	Mon 84 Mon
		<i>maximartinezii P.</i>	84 Mon 84
		<i>pinceana P.</i>	Mon 93 Mon
		<i>pseudostrobis P.</i>	93 Mon 93
Pt5187	trnS (GCU)	<i>montezumae P.</i>	Mon 93 Mon
		<i>nelsonii P.</i>	
		<i>rzedowskii P.</i>	
		<i>maximartinezii P.</i>	
		<i>pinceana P.</i>	
		<i>pseudostrobis P.</i>	
		<i>montezumae P.</i>	
Pt6372	rpl2	<i>nelsonii P.</i>	
		<i>rzedowskii</i>	

		<i>P. maximartinezii</i>	93 Mon
		<i>P. pinceana</i>	93 Mon
Pt7195*	IRFI69	<i>P. pseudoastrobus</i>	146-148 Pol
		<i>P. montezumae</i>	145-148 Pol
		<i>P. nelsonii</i>	145-147 Pol
		<i>P. rzedowskii</i>	145-148 Pol
		<i>P. maximartinezii</i>	147-148 Pol
		<i>P. pinceana</i>	146-150 Pol
Pt7995	trnS(CGA)	<i>P. pseudoastrobus</i>	145 Mon
		<i>P. montezumae</i>	145 Mon
		<i>P. nelsonii</i>	145 Mon
		<i>P. rzedowskii</i>	145 Mon
Pt8730	trnI(GAU)-trnV(GAC)	<i>P. pseudoastrobus</i>	159-162 Pol
		<i>P. montezumae</i>	160-163 Pol
		<i>P. rzedowskii</i>	157-160 Pol
		<i>P. nelsonii</i>	155-160 Pol
		<i>P. maximartinezii</i>	160 Mon
		<i>P. pinceana</i>	160 Mon
Pt1007	ORF11756	<i>P. pseudoastrobus</i>	113 Mon
		<i>P. montezumae</i>	110 Mon
		<i>P. nelsonii</i>	No amp
		<i>P. rzedowskii</i>	No amp
		<i>P. maximartinezii</i>	No amp
		<i>P. pinceana</i>	No amp
Pt1025	ndh-I ndhE espaciador	<i>P. pseudoastrobus</i>	129 Mon
		<i>P. montezumae</i>	129 Mon
		<i>P. rzedowskii</i>	129 Mon
		<i>P. nelsonii</i>	129 Mon
		<i>P. maximartinezii</i>	129 Mon
		<i>P. pinceana</i>	129 Mon
Pt1072	rp132	<i>P. pseudoastrobus</i>	122 Mon
		<i>P. montezumae</i>	122 Mon
		<i>P. nelsonii</i>	No se ensayo

		<i>P. rzedowskii</i>	No se ensayo
		<i>P. maximartinezii</i>	No se ensayo
		<i>P. pinceana</i>	No se ensayo
Pt1095	rps12	<i>P. pseudostrobus</i>	113 Mon
		<i>P. montezumae</i>	113 Mon
		<i>P. nelsonii</i>	113 Mon
		<i>P. rzedowskii</i>	113 Mon
		<i>P. maximartinezii</i>	No se ensayo
		<i>P. pinceana</i>	No se ensayo

Microsatélites Nucleares (AG-AC) _n	Localización	Especie	Tamaño del Fragmento (Pb)
---	--------------	---------	---------------------------

PR 4.6	Pinos duros	<i>P. pseudostrobus</i>	200-230 Pol
		<i>P. montezumae</i>	200-250Pol
		<i>P. nelsonii</i>	mulibandas
		<i>P. maximartinezii</i>	mulibandas
		<i>P. pinceana</i>	no se ensayo
		<i>P. rzedowskii</i>	no amplifico
NZP1	Pinos duros	<i>P. pseudostrobus</i>	miltibandas
		<i>P. montezumae</i>	multibandas
		<i>P. nelsonii</i>	multibandas
		<i>P. maximartinezii</i>	multibandas
		<i>P. pinceana</i>	multibandas
		<i>P. rzedowskii</i>	multibandas
PtTX 3019	Pinos duros	<i>P. pseudostrobus</i>	multibandas
		<i>P. montezumae</i>	multibandas
		<i>P. nelsonii</i>	multibandas
		<i>P. maximartinezii</i>	multibandas
		<i>P. pinceana</i>	multibandas
		<i>P. rzedowskii</i>	multibandas
PtTX 3013	Pinos duros	<i>P. pseudostrobus</i>	135 Pol
		<i>P. montezumae</i>	135 Pol

		<i>P. maximartinezii</i>	134 Pol
		• <i>pinceana</i>	No se ensayo
		• <i>zedowskii</i>	No amplifico
		• <i>nelsonii</i>	135 Pol 264-
		• <i>pseudostrobus</i>	274 Pol 268-
		• <i>montezumae</i>	270 Pol 268-
		• <i>nelsonii</i>	272 Pol 264-
		• <i>maximartinezii</i>	269 Pol No se
		• <i>pinceana P.</i>	ensayo No
		<i>zedowskii</i>	amplifico 200-
		• <i>pseudostrobus</i>	210 Pol 196-
		• <i>montezumae</i>	208 Pol 196-
		• <i>nelsonii</i>	200 Pol 196-
		• <i>maximartinezii</i>	200 Pol No se
		• <i>pinceana P.</i>	ensayo No
		<i>zedowskii</i>	amplifico 160-
		• <i>pseudostrobus</i>	200 Pol 160-
		• <i>montezumae</i>	200 Pol no
		• <i>zedowskii</i>	amplifico
		• <i>nelsonii</i>	multibandas
		• <i>maximartinezii</i>	multibandas
		• <i>pinceana</i>	no se ensayo
		• <i>pseudostrobus</i>	no amplifico
		• <i>montezumae</i>	no amplifico
		• <i>nelsonii</i>	no se ensayo
		<i>P. maximartinezii</i>	no amplifico
		<i>P. pinceana P.</i>	No amplifico
		<i>zedowskii P.</i>	No amplifico
		<i>pseudostrobus P.</i>	140 Mon 135-
		<i>montezumae P.</i>	140 Pol no se
		<i>nelsonii P.</i>	ensayo
		<i>maximartinezii P.</i>	
		<i>pinceana</i>	
PtTX 3025	Pinos duros		
PtTX3023	Pinos duros		
21 46	Pinos duros		
9.1	Pinos duros		
RPS34	Pinos blandos		

RPS18	Pinos blandos	<i>P. rzedowskii</i>	no	amplifico
		• <i>pseudostrobus</i>	No	resolución
		• <i>montezumae</i>	No	resolución
		• <i>rzedowskii</i>	No	resolución
		• <i>nelsonii</i>	No	resolución
		• <i>maximartinezii</i>	No	resolución
RPS18B	Pinos blandos	• <i>pinceana</i>	No se ensayo	
		• <i>pseudostrobus</i>	No	amplifico
		• <i>montezumae</i>	No	amplifico
		• <i>nelsonii</i>	No	amplifico
		• <i>maximartinezii</i>	No	amplifico
		• <i>pinceana P.</i>	No	amplifico
RPS20	Pinos blandos	<i>rzedowskii</i>	No	amplifico
		• <i>pseudostrobus</i>	No	resolución
		• <i>montezumae</i>	No	resolución
		• <i>rzedowskii</i>	No	resolución
		• <i>nelsonii</i>	No	resolución
		• <i>maximartinezii</i>	No	resolución
RPS39	Pinos blandos	• <i>pinceana</i>	Np	resolución
		• <i>pseudostrobus</i>	No	resolución
		• <i>montezumae</i>	No	resolución
		• <i>rzedowskii</i>	No	resolución
		• <i>nelsonii</i>	No	resolución
		<i>P. maximartinezii</i>	No	resolución
RPS25b	Pinos blandos	<i>P. pinceana P.</i>	No	resolución
		<i>pseudostrobus P.</i>	No	resolución
		<i>montezumae P.</i>	No	resolución
		<i>rzedowskii P.</i>	No	resolución
		<i>nelsonii P.</i>	No	resolución
		<i>maximartinezii P.</i>	No	resolución
RPS127	Pinos blandos	<i>pinceana P.</i>	No	resolución
		<i>pseudostrobus P.</i>	No se ensayo	
		<i>montezumae</i>	No	resolución
			No	resolución

RPS60	Pinos blandos	<i>P. rzedowskii</i>	No amplifíco
		• <i>nelsonii</i>	No resolución
		• <i>maximartinezii</i>	No resolución
		• <i>pinceana</i>	No se ensayo
		• <i>pseudostrobus</i>	No resolución
		• <i>montezumae</i>	No resolución
		• <i>rzedowskii</i>	No resolución
		• <i>nelsonii</i>	No resolución
		• <i>maximartinezii</i>	No resolución
		• <i>pinceana</i>	No resolución

Mon= Monomórfico; Pol= Polimórfico.

Anexo I

Análisis y resultados demográficos y de la estructura y variación genética de *P. nelsonii* con base al uso de cuatro SSR de cloroplasto

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, de las cuales fueron colectados un total de 256 individuos (Tabla 1). 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 logró colectar a 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. El promedio de las distancias geográficas entre poblaciones es de 64.9 Km.

Tabla 1 Localización geográfica de las 9 poblaciones encontradas en México de *P. nelsonii* y número de individuos colectados en cada población.

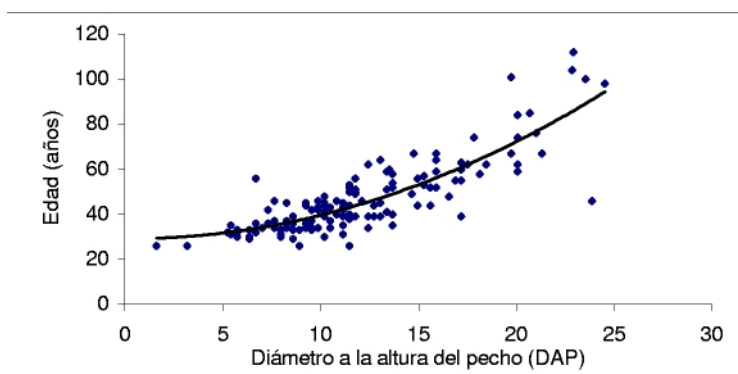
Estado	Población	Latitud	Longitud	Altitud	Individuos
Tamaulipas	Tula	23°15.89 N	99°40.68 W	2265 msnm	30
		23°17.39 N	99°39.43 W	1747 msnm	
Tamaulipas	Miquihuana	23°35.15 N	99°45.01 W	1731 msnm	30
Tamaulipas	Las Antonias	23°24.03 N	99°51.2 W	1791 msnm	46
		23°28.20 N	99°49.29 W	2174 msnm	34 plántulas
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 Potosí	La Tapona	22°49.39 N	100°37.5 W	2191 msnm	27
		22°47.80 N	100°36.21 W	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 demográfico

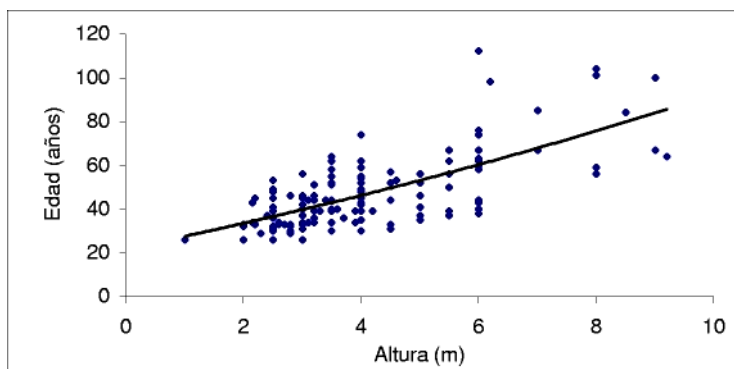
Tanto la correlación de edad contra diámetro, como la de edad contra altura fueron estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), con un coeficiente de correlación $r = 0.8412$ para el diámetro y de $r = 0.7056$ para la altura (Figuras 1 y 2), encontrándose que la ecuación que mejor se ajusta en ambos 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 1. Correlación entre la edad medida en años y el diámetro a la altura del pecho (DAP) para 177 individuos



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



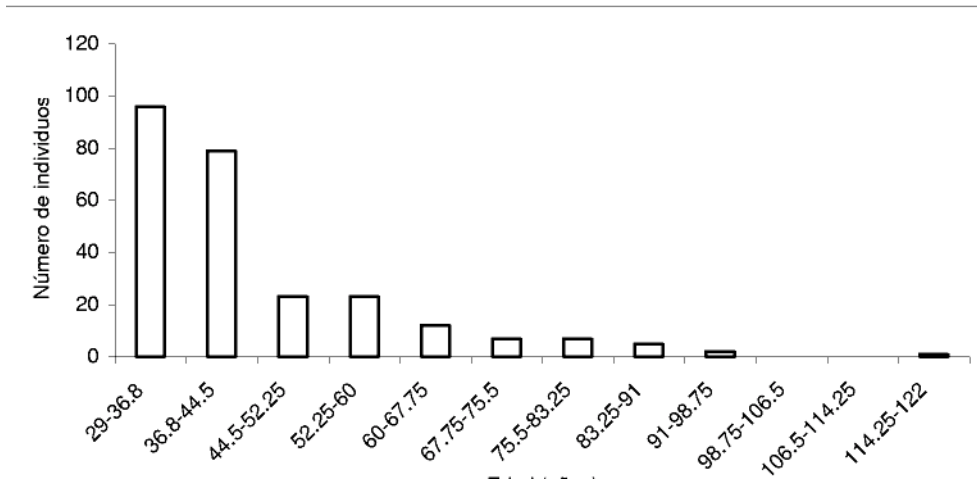


Figura 3. Distribución de edades para 256 individuos de *P. nelsonii* encontrados en 9 poblaciones de México (Media= desviación estándar = 14.94).

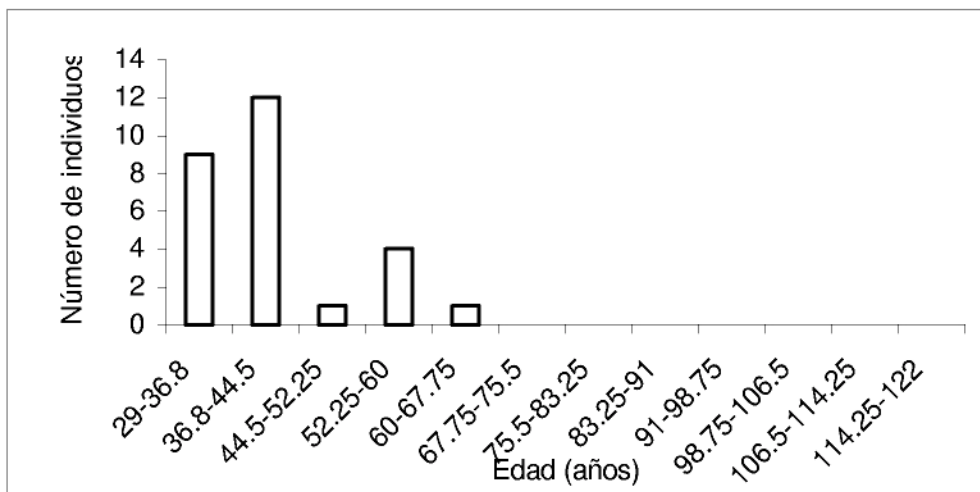


Figura 4 Distribución de edades para 27 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Tula (Media 41.03, desvia estándar – 8.38).

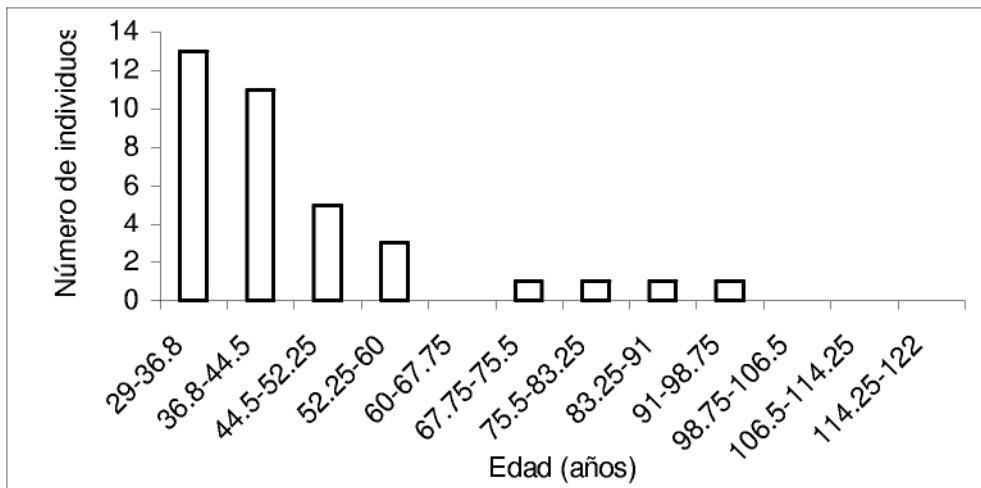


Figura 5. Distribución de edades para 37 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Miquihuana (Media = 43.29 desviación estándar = 15.76).

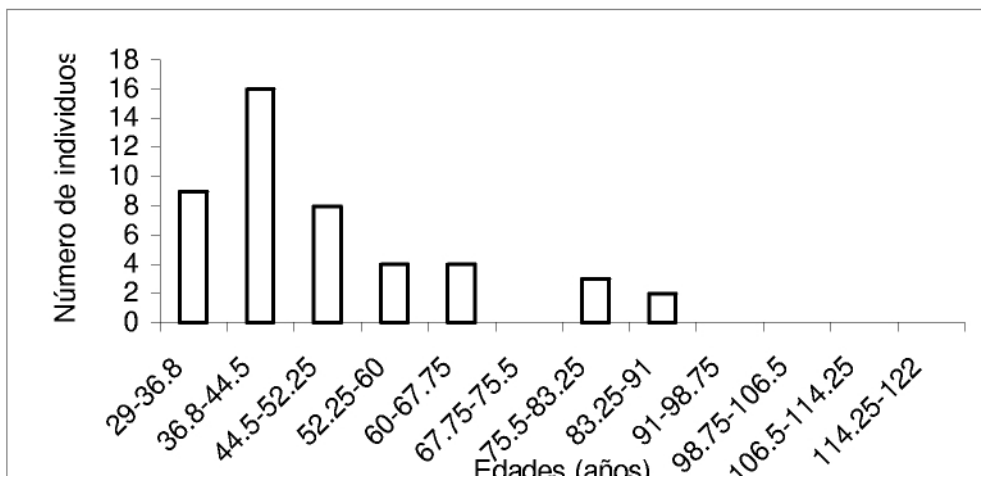


Figura 6. Distribución de edades para 45 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Las Antonias (Media = 46.76, desviación estándar = 13.87).

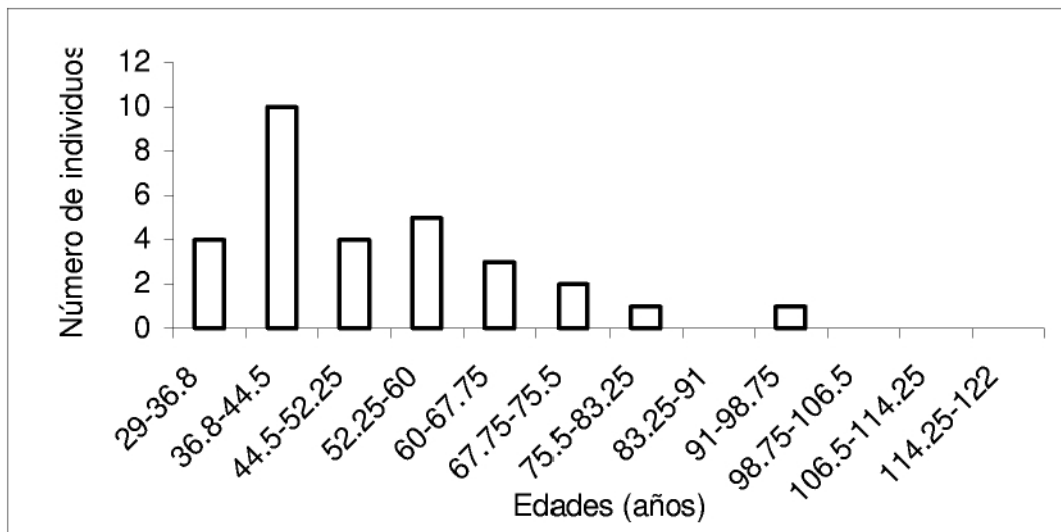


Figura 7. Distribución de edades para 30 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de Peña Nevada (Media = 48.75, desviación estándar = 14.86).

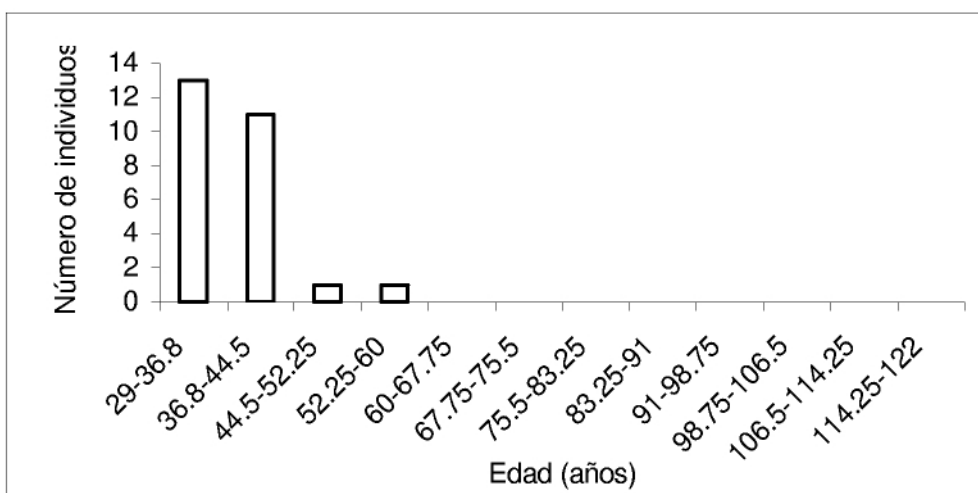


Figura 8. Distribución de edades para 27 individuos de *P. nelsonii* encontrados en la población de La Tapona (Media = 37.77, desviación estándar = 6.16).

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 (Figura 3). 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 (Figuras 4, 5 y 6). En ninguna de las poblaciones se pueden observar representantes de todas las categorías de edad encontradas en el total de la muestra (10) (Figura 5); 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, Figuras 5 y 7), 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 (Figura 8).

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 y estructura 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 2), distribuidos en las nueve poblaciones, siendo las Antonias la población que presenta el mayor número de haplotipos (12 en total) y Los Duraznillos, La Tapona 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. 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, 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 %, 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, con frecuencias desde 50 % en Miquihuana a el 100 % en Los Duraznillos. Este locus presento un alelo privado, con un tamaño de 148 pb en Las Antonias. En el locus Pt36480 el alelo más frecuente fue el 153 pb, y solo en San Lázaro (91.6 %) se encuentra la menor frecuencia. Finalmente, en el locus Pt63718 el alelo más común es el de 93 pb siendo monomórfico en la población de La Tapona, mientras que en Miquihuana sólo el 70 % de los individuos poseen dicho alelo.

Tabla 2. 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 14 153 93	114	0.4871	H14	159 146 153 95	1	0.0043
H2	158 14 153 95	3	0.0129	H15	159 147 153 93	3	0.0129
H3	158 14 153 92	2	0.0086	H16	158 146 152 93	2	0.0086
H4	159 14 153 93	23	0.0991	H17	157 145 154 93	1	0.0043
H5	159 14 153 93	3	0.0129	H18	157 147 153 93	3	0.0129
H6	158 14 153 93	13	0.0560	H19	158 147 153 94	1	0.0043
H7	157 14 153 95	2	0.0086	H20	160 146 153 93	5	0.0216
H8	157 14 153 93	30	0.1293	H21	160 146 153 94	1	0.0043
H9	158 14 153 93	12	0.0517	H22	157 146 152 93	1	0.0043
H10	159 14 153 95	1	0.0043	H23	158 146 153 94	2	0.0086
H11	157 14 153 95	1	0.0043	H24	158 145 153 94	1	0.0043
H12	158 14 153 95	2	0.0086	H25	158 148 153 93	1	0.0043
H13	158 14 154 93	2	0.0086	H26	157 146 154 93	1	0.0043
				H27	159 147 153 94	1	0.0043

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, mientras que el número promedio de diferencias nucleotídicas entre todos los pares de haplotipos (n) 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 3). 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.

Tabla 3. Diversidad genética (H_e) para cada uno de los loci.

Primer	No. de alelos	Durazn	Tapona	Membr	Miquih	Nevad	Lázaro	Palmill	Tula	Anton	He total
30204	4	0.0667 ± 0.061 3	0.1660 ± 0.097 6	0.4510 ± 0.117 4	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 ± 0.102 5	0.1111 ± 0.096 4	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 ± 0.082 1	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

Estructura Genética

Los resultados del análisis de AMOVA difieren dependiendo del modelo de mutación que se utilice 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_{STt}) es de 0.04662 (Tablas 4). 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.

Tabla 4. 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	($ya = 0.04891$)	4.66 %
Dentro de las poblaciones	$ab = 1.0003$	95.34 %
Índice de fijación (R_{st})	0.04662*	

* significativamente diferente de cero después de 1023 permutaciones.

Distancias genéticas

En las matrices de distancia de Nei, se puede observar que los resultados obtenidos para ambos modelos de mutación difieren considerablemente (Tabla 5). 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. Ninguno de ambos coeficientes de correlación entre distancia genética y geográfica fue estadísticamente significativo después de 1000 permutaciones en la prueba de Mantel.

Tabla 5. Matriz del promedio corregido del número de diferencias nucleotídicas (DA) entre 9 poblaciones de *P. nelsonii*. Bajo la diagonal DA calculada con base en alelos infinitos. Arriba de la diagonal. DA 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	0.46590	0.43259	0.26497		0.21376	0.27550	0.77984	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.

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. Como era de esperarse, las poblaciones con menor intercambio de migrantes (R_{st}) 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).

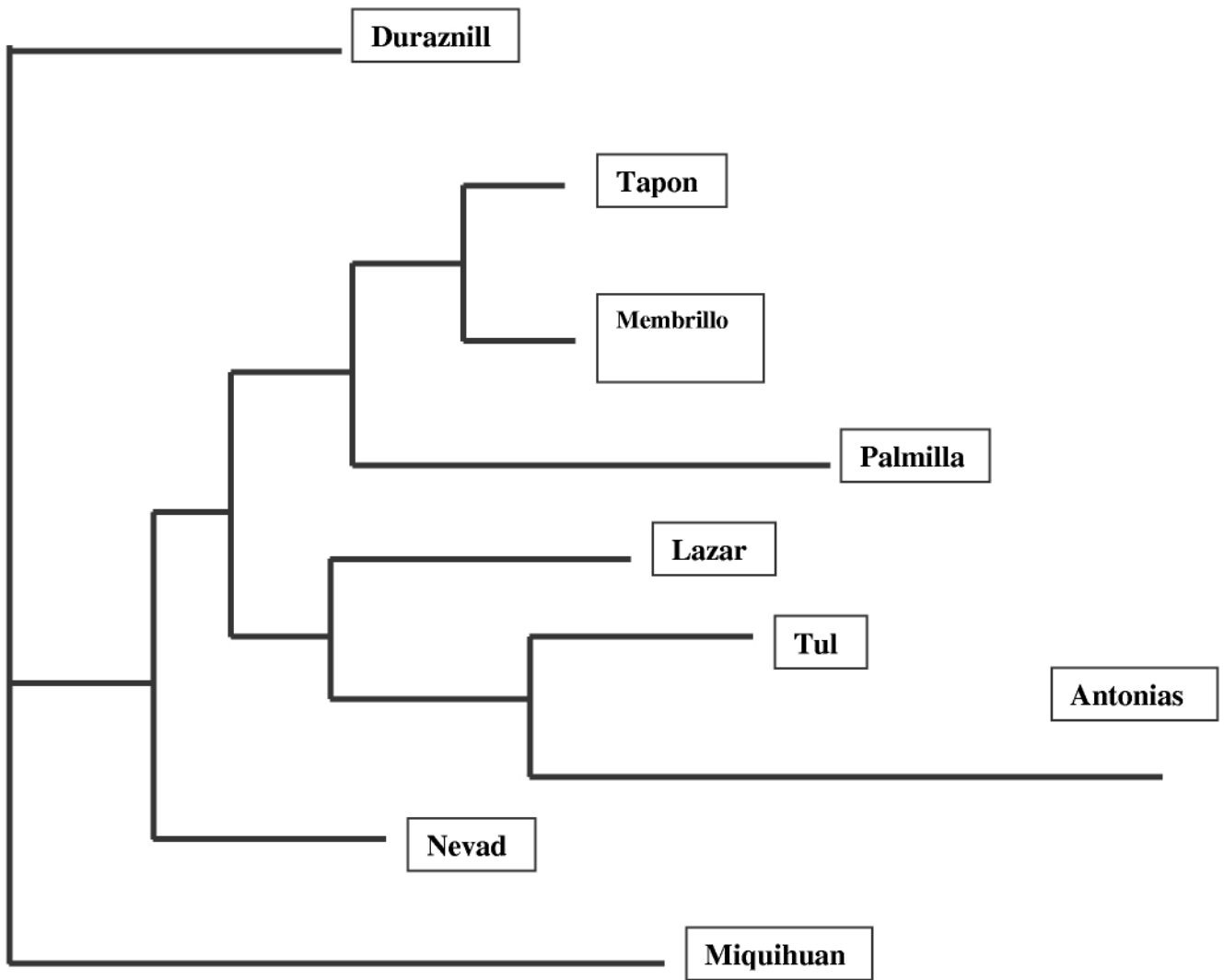


Figura 9. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre poblaciones (Dmyu) con base a 4 SSR de cloroplasto Bootstrap basadi eb 1000 replicas (porcentajes).

Filogenia molecular

En cuanto a el fenograma realizado con los distintas poblaciones, no se encontró ningún patrón claro entre grupos, las poblaciones más diferentes genéticamente fueron Miquihuana y Duraznillos: Se forma un grupo con el resto de las poblaciones quedando más ancestral la población de Nevada (Figura 10).

Análisis y resultados de la estructura y variación genética de *P.nelsonii* con base al uso de tres SSR nucleares

Todos los análisis se realizaron con un total de 205 individuos, 23 individuos en promedio por población, 9 poblaciones y 3 microsatélites polimórficos: PtTX3025: 270 pb, RPS34b: 135 pb: PtTX2123: 200 pb. Se encontraron 9 alelos en total, con tamaños que van de 2 a 4 pb, (PtTX3025:246, 250, 255, 269 pb, PtTX3013: 129, PtTX2123:190, 201, 207, 210 pb. Se obtuvieron 16 diferentes haplotipos, siendo el (h1,h3) los más predominantes, el (h3) con 125pb aparece en mayor número en la población de Tapona y el (h1) es el haplotipo más frecuente en todas las poblaciones, los siguientes haplotipos más abundantes son (h2) y el (h11) este último con 200pb encontrándose más frecuentemente en la población de Miquihuana. También encontramos haplotipos únicos como (h6) en Las Antonias, (h10) en Duraznillo, (h12) en Membrillo, (h15) en Tula y (h16) y en Peña Nevada. La Población que presentaron el mayor número de haplotipos fueron Las Antonias con un total de 18 (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las poblaciones de *Pinus nelsonii*

	Haplotipo			Nº de individuo	Frecuencia
H1	270	125	200	348	1.69
H2	*	125	200	10	0.048
H3	270	129	200	11	0.054
H4	270	125	*	9	0.044
H5	270	129	*	2	0.0097
H6	255	125	*	1	0.0048
H7	250	125	200	3	0.0146
H8	246	125	200	5	0.0244
H9	270	125	210	2	0.0097
H10	270	125	207	1	0.0049
H11	270	125	190	10	0.0488
H12	270	129	210	1	0.0048
H13	*	129	200	2	0.0097
H14	255	125	200	5	0.0244
H15	269	125	200	1	0.0048
H16	270	125	195	1	0.0048

Para calcular la diversidad genética se utilizo el estimador HE , dando una variación total de 0.075393, siendo Las Antonias la que tuvo la más alta diversidad ($HE = 0.130021$, seguido de Tapona (H_E 0.116586) y Duraznillo (H_E 0.106678). Para San Lázaro la

diversidad genética fue nula y para el resto de las poblaciones la diversidad se mantuvo por debajo de 0.1 (Tabla 7). Además de los estimadores de diversidad mencionados, se obtuvieron valores de heterocigosis para cada población, donde encontramos que las poblaciones con mayor heterocigosis fueron las poblaciones Las Antonias ($H_e = 0.2306$), Nevada ($H_e = 0.1313$) y Tapona ($H_e = 0.1304$) (ver Tabla 8).

Tabla 7. Valores de diversidad genética y tamaño poblacional

<i>Población</i>	<i>Diver. Genética</i>	<i>Nº de haplotipos</i>	<i>N</i>	<i>O=2un para el modelo RST</i>
Las Antonias	0.130021+/-	18	22	2.4418
Los Duraznillos	0.106678+/-	9	24	0.5350
Miquihuana	0.063534+/-	5	23	0.2632
Membrillo	0.084058+/-	5	23	0.2926
San Lázaro	0.000000+/-	0	20	0
Tula	0.041546+/-	2	23	0.1525
La tapona	0.116586+/-	9	23	0.6348
Palmillas	0.054106+/-	4	23	0.2125
Peña Nevada	0.082004+/-	12	24	1.2210
Total	0.075393+/- 0.083525	16	205	0.6393

Tabla 8. Observada y esperada heterocigosis en *P. nelsonii*, México

Locus	PtT3025		RPS34b		PtX2123		Promedio	promedio
	He obs.	He esp.	He obs.	He esp.	He obs.	He esp.	Obs.	Esp.
Población								
Antonias	0.5556	0.50952	0.1364	0.5148	0	0	0.2306	0.3414
Duraznillo	0.2083	0.5789	0.0416	0.4814	0.0833	0.5079	0.1111	0.5227
Miquihuana	0	0	0	0	0.2083	0.1906	0.0694	0.0635
Membrillo	0	0	0.1304	0.5691	0.0435	0.5266	0.0579	0.3652
San Lázaro	0	0	0	0	0	0	0	0
Tula	0.1304	0.5691	0	0	0	0	0.0435	0.1897
Tapona	0	0	0.3043	0.6116	0.0869	0.5063	0.1304	0.3726
Palmillas	0.1739	0.5845	0	0	0	0	0.0579	0.1948
Nevada	0.0833	0.1604	0.0833	0.1596	0.2272	0.5803	0.1313	0.3001
promedio	0.1279	0.2669	0.0773	0.2596	0.0721	0.2568		

En cuanto a los estimadores indirectos de tamaños poblacionales ($\theta=2Nu$), tienen una relación directa con la diversidad que se presenta en las poblaciones lo cual se puede observar en la tabla 6, donde los valores relativamente mas altos de asi como de diversidad genética los encontramos en Las Antonias ($\theta=2.442$; $HE= 0.130021$ respectivamente). En contraste, las poblaciones con variación pequeña como en San Lázaro o Tula, tenemos valores de cero en ambos estimadores (ver Tabla 7).

Estructura genética y aislamiento por distancia

El análisis jerárquico de AMOVA consistió de una estructura de 9 poblaciones. El valor de estructura genética (R_{ST}) que se obtuvo entre las 9 poblaciones fue bajo. El mayor

porcentaje de la variación se encuentra dentro de las poblaciones ($6^{c2} = 97.93\%$) y el menor porcentaje entre las poblaciones ($6^{a2} = 2.07\%$) (Tabla 9).

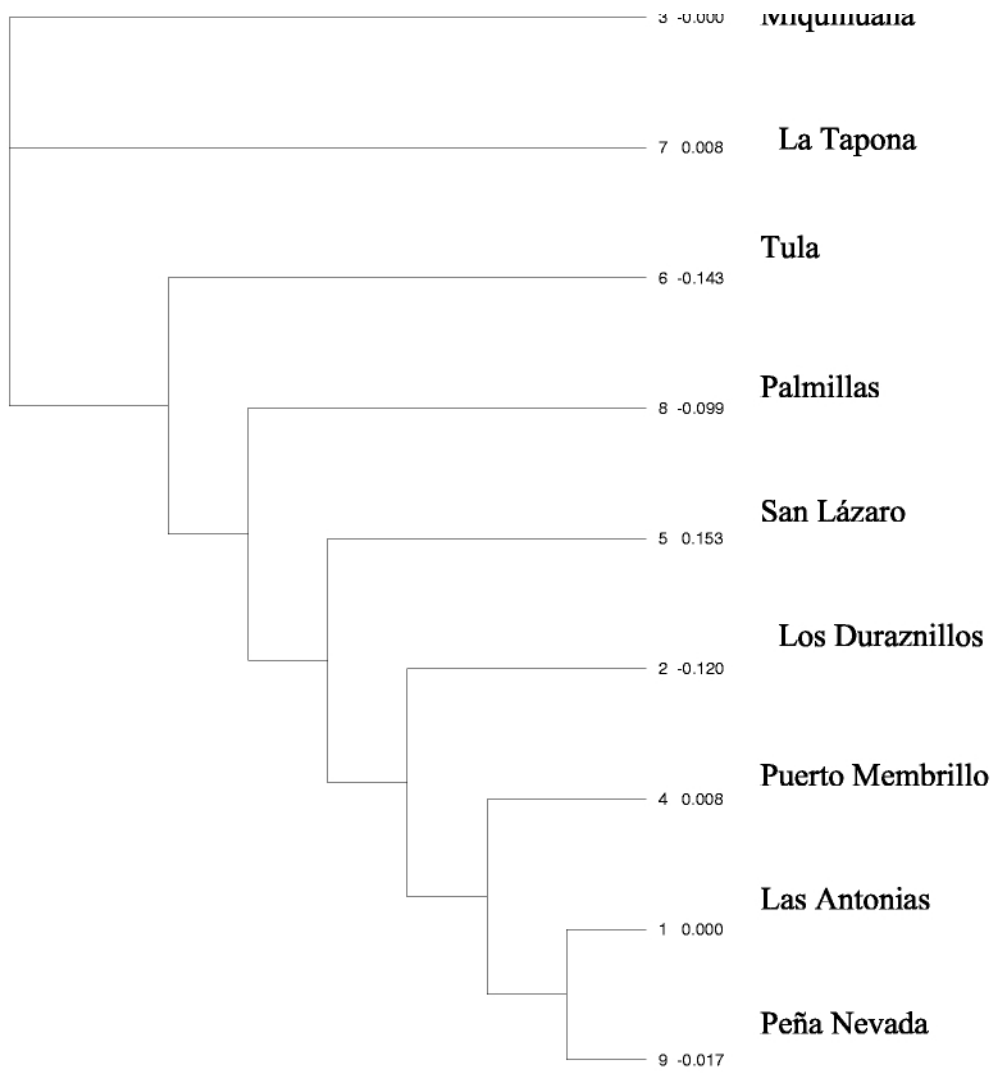
Tabla 9. Resultados de la prueba de AMOVA con el método de distancia correspondiente a la suma de las diferencias de los cuadrados del tamaño de haplotipos R_{ST} , aplicado a una estructura de 9 poblaciones.

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	% de varianza
Entre poblaciones	8	$6^{a2}=0.33703$	2.07
Dentro de las poblaciones	403	$6^{c2} 15.91239$	97.93
Total	411	16.24942	
Índices de fijación			
$F_{ST}: 0.02074$ $P = 0.0000$			

Filogenia molecular

El dendrograma obtenido para el total de las poblaciones muestra a dos de las poblaciones como las mas diferentes geneticamente (Miquihuana, La Tapona) y al resto de las poblaciones en un grupo, siendo las poblaciones que se parecen más geneticamente (Tula, Palmillas, San Lázaro, Los Duraznillos, Pto Membrillo, Las Antonias y Peña Nevada). Estos resultados sugieren: al igual que los resultados con cloroplasto que las poblaciones más ancestrales son Miquihuana y la Tapona.

Fig 11. Árbol obtenido a partir de las distancias genéticas (D_A) entre poblaciones de *Pinus nelsonii* bajo el modo mutación paso a paso (RST).



Anexo II

Resultados de la estructura y variación genética de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*,

Variación y estructura genética con base al uso de seis SSR de cloroplasto

Las ^{amplificaciones} de PCR de 18 microsatélites cloroplasto confirman la presencia de los fragmentos en las especies de estudio. De 18 cISSR ensayados solo 6 fueron polimorficos. El tamaño de los fragmentos varió de 2 a 8 pb. Se obtuvo un total de 30 alelos (de 4 a 6 alelos por locus) y 142 haplotipos. Se presentó un alelo único en la población D6 (7195:143 pb) y en las poblaciones SU5 y GUA11 de *P. pseudostrobus*. (8730:159 pb). En *P. montezumae* se encontró solo un alelo único en las poblaciones MI7 y MII8 (1254: 64 pb). En algunas de las poblaciones mezcladas se encontraron alelos únicos como en las poblaciones TEM3, ENT4 y SIII (7195: 144 pb) y en las poblaciones AN2 y TE3 (1520:124). Los alelos diagnóstico que se presentaron en haplotipos únicos para cada especie fueron para *P. pseudostrobus* el 66, 146, 163, 125, 141 y 90, para *P. montezumae* el 145, 127, y 140. Los haplotipos más frecuentes fueron el haplotipo tipo: 67,147,160,126,141, 89, tanto en poblaciones puras como mezcladas. Los haplotipos más frecuentes para las poblaciones puras de *P. montezumae* fueron : 67, 147, 161, 126, 141, 89., el 67, 147, 161, 126, 140, 89., 67, 147, 161, 126, 140, 88 y el 67, 146, 161, 127, 141, 89. Para *P. pseudostrobus* los haplotipos tipo: 67, 147, 160, 126, 141, 89 y el tipo: 67, 147, 159, 126, 141, 89 y para las poblaciones mezcladas el haplotipo: 67 146 163 126 141 89.

Considerando las frecuencias de los haplotipos para el análisis, se encontró que en todos los parámetros estimados las poblaciones más diversas genéticamente (H_E) fueron TEM3 ($H_E = 0.5404$) y ENT4 ($H_E = 0.5115$). Dichas poblaciones han sido identificadas como mezcladas por lo que están representadas por individuos de las dos especies en estudio. (Tabla 1). Para *P. montezumae* se obtuvieron valores altos en dos poblaciones M7 ($H_E = 0.4752$) y M8 ($H_E = 0.448$) seguido de dos poblaciones de *P. pseudostrobus* la población S5 ($H_E = 0.4571$) y la 6D ($H_E = 0.4130$). Los valores más bajos se presentaron en las poblaciones distribuidas en Guatemala, la población G11 ($H_E = 0.0779$) y la población T12 ($H_E = 0.0616$) para *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* respectivamente.

Tabla 1. Estimación de la variación y estructura genética en 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudoastrobus* y las poblaciones mezcladas, México Guatemala (la estimación de la estructura genética fue basada con los modelos de IAM y SMM).

Especie	N	A	Población		IAM SMM	
			H	HE	n	FST
<i>Híbridos</i>						
V1	24	10	11	0.2723 (0.1856)		
ANG2	24	14	15	0.2977 (0.1987)		
TEM3	24	21	19	0.5404 (0.3217)	3.0680 (0.5115)	
ENT4	24	2	20	0.5115 (0.3072)		
SIII9	24	15	15	0.3448 (0.2228)	2.0688 (1.1996)	
Media		16.2	16	0.3933 (0.2482)		0.273 0.449
P. pseudoastrobus						
SUH5	24	15	17	0.4571 (0.2798)	2.7427 (1.5063)	
DA6	24	15	19	0.4130 (0.2575)	2.4782 (1.3864)	
GUA11	24	13	14	0.0779 (0.0923)	1.4384 (0.9075)	
Media		14.3	16.6	0.3160 (0.2098)		0.146 0.166
<i>P. montezumae</i>						
MI7	24	16	18	0.4752 (0.2890)	2.8514 (1.5554)	
MII8	24	17	17	0.4486 (0.2756)	2.6920 (1.4833)	
HID10	24	18	12	0.2397 (0.1686)	1.4384 (0.9075)	
TOT12	24	13	9	0.0616 (0.0734)	0.3079 (0.3291)	
CUE13	24	8	11	0.1787 (0.1362)	1.0725 (0.7330)	
Media		14.4	13.4	0.2807 (0.2098)		0.270 0.258
Media general		15	66	0.33 (0.21)		0.23 0.291
TOTAL		45	197	4.32 (3.49)		0.700 0.873

N= Tamaño de muestra

A= número de alelos

H= número de haplotipos

HE = Diversidad genética

n= Media de diferencias entre pares de haplotipos

FST= diferenciación genética entre poblaciones de acuerdo al modelo de mutación paso a paso

(SMM) RST= diferenciación genética de acuerdo al modelo de mutación de alelos infinitos (IAM)

Similarmente, para la divergencia genética entre poblaciones los valores más altos se presentaron en las poblaciones híbridas tanto con el modelo SMM e IAM ($RST = 0.449$; $FST = 0.273$) seguido de las poblaciones puras de *P. montezumae* ($RST = 0.258$; $FST 0.270$). La menor diferenciación entre poblaciones se presentó en *P. pseudoastrobus* ($RST = 0.166$; $FST = 0.146$).

0.146 (ver Tabla 1). El análisis jerárquico de la varianza molecular fue relativamente alto entre poblaciones ($RST = .4037$; $P < 0.000$) y entre poblaciones dentro de grupos ($RSC = 0.3483$; $P < 0.000$). Mientras que la diversidad media entre grupos (RCT) fue de 0.0844 ($P = 0.05$). El porcentaje de la variación total que corresponde a la diversidad entre grupos fue de 8.44 %, entre poblaciones dentro de grupos de 31.93%, dejando el mayor porcentaje de haplotipos dentro de las poblaciones con 59.63% (Tabla 2). Las estimaciones del flujo genético oscilaron entre 1.272 y 3.52 con una media de 1.45. lo cual sugiere que existe un alto intercambio genético entre las poblaciones de ambas especies analizadas.

Tabla 2. Análisis jerárquico de la variación genética detectada con una prueba de AMOVA aplicada a una estructura de 13 poblaciones en 3 grupos (Poblaciones híbridas (5) poblaciones puras de *P. Montezumae* (5) poblaciones puras de *P. pseudostrobis* (3). La prueba fue basada en el modelo de mutación paso a paso (RST).

Fuente de Variación	Grados De libertad	Suma de cuadrados	Componentes de Variación	% de Variación
Entre grupos	2	138.755	0.34793	8.44
Entre poblaciones dentro de grupos	10	340.489	1.31628	31.93
Dentro de Poblaciones	299	735.000	2.45819	59.63
Total	311	1214.244	4.12240	

Indices de Fijación

FSC : 0.34873 (P= 0.000) (entre poblaciones dentro de grupos) FST : 0.40370 (P= 0.000) (entre poblaciones) FCT : 0.08440 (P= 0.05) (entre grupos)

Distancias genéticas y aislamiento por distancia

Las poblaciones más alejadas genéticamente (*Dmyu*), fueron dos población híbrida A2 y T3. Las poblaciones más cercanas genéticamente fueron las poblaciones puras de *P. montezumae* (0.582-0.131), y una mezcla entre las poblaciones híbridas y puras de *P. pseudostrobus* (0.876-0.357). Estos resultados sugieren un claro patrón entre las relaciones genéticas entre poblaciones puras de *P. montezumae* y una clara mezcla de haplotipos entre *P. pseudostrobus* y las poblaciones híbridas. Aunado a lo anterior se hizo un análisis de

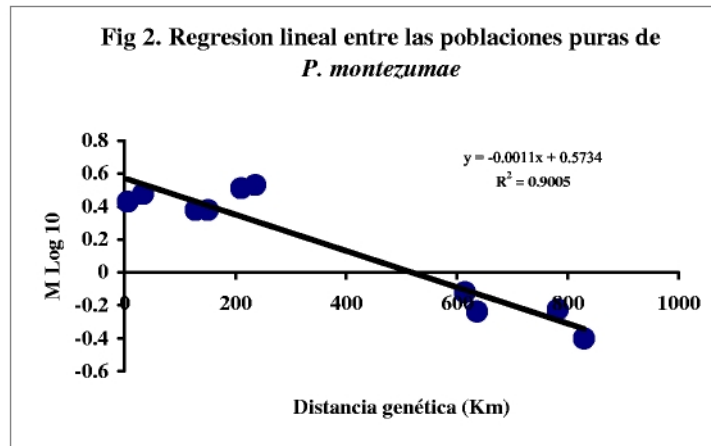


Figura 1. Regresión lineal obtenida para las poblaciones puras de *P. montezumae* con base a las tasas de dispersión (M) y la distancia geográfica entre pares de poblaciones

aislamiento por distancia para ver si se presentaba algún patrón geográfico que influyera en la dispersión de genes entre pares de poblaciones. El análisis indica que no existe ninguna relación significativa entre el flujo genético y la distancia geográfica en el total de las poblaciones ($r = 0.126$, $P = 0.333$). Sin embargo, al hacer el análisis con las poblaciones puras de *P. montezumae* se encontró una relación altamente significativa ($r = 0.0005$; $P < 0.000$) (ver Figura 1). En este caso, se presenta un patrón de dispersión de genes claramente asociado a la distribución geográfica de la especie. Para *P. pseudostrobus* el análisis no fue significativo.

Filogenia molecular

El dendrograma basado sobre las distancias genéticas de Nei (*DA*) que incluye las poblaciones puras de cada especie revela dos grupos definidos conformados por las poblaciones de cada especie (Figura 2). Resultado que sirvió como control de clasificación de las especies para los análisis posteriores. El dendrograma obtenido para el total de las poblaciones muestra tres grupos; El primer grupo esta formado por las poblaciones mezcladas como las poblaciones puras de *P. pseudostrobis* . Mientras que el segundo, esta representado por las poblaciones puras de *P. montezumae* y el tercer grupo que es el más alejado genéticamente incluye a dos poblaciones híbridas (A2 y T3) (Figura 3). Estos resultados sugieren: por un lado, que las poblaciones híbridas son filogenéticamente mas relacionadas a las poblaciones puras de *P. pseudstrobis* que con las poblaciones de *P. montezumae*, y por el otro lado, que la introgresión es unidireccional, con introgresión de material citoplasmático de *P. Montezumae* hacia las poblaciones híbridas y de *P. pseudostrobis*.

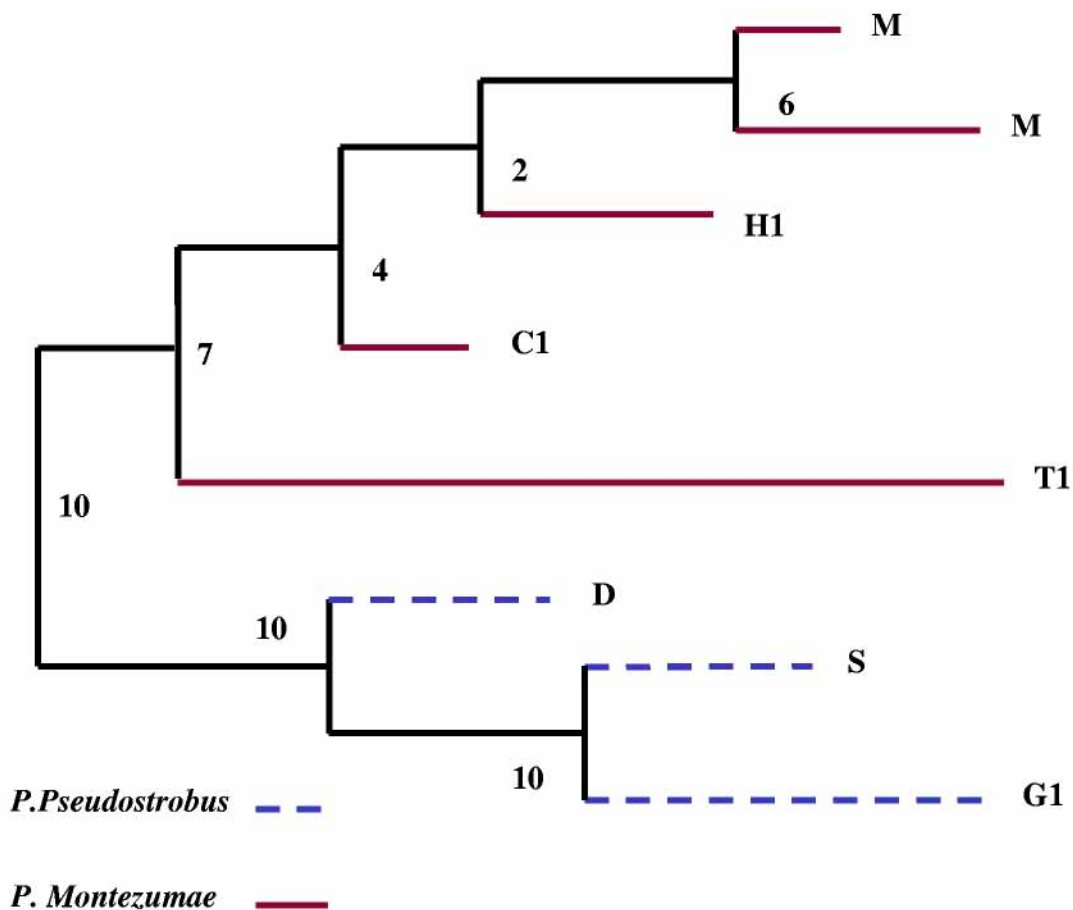


Figura 2. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre poblaciones puras de *P. montezumae* y *P. pseudostrobis* México

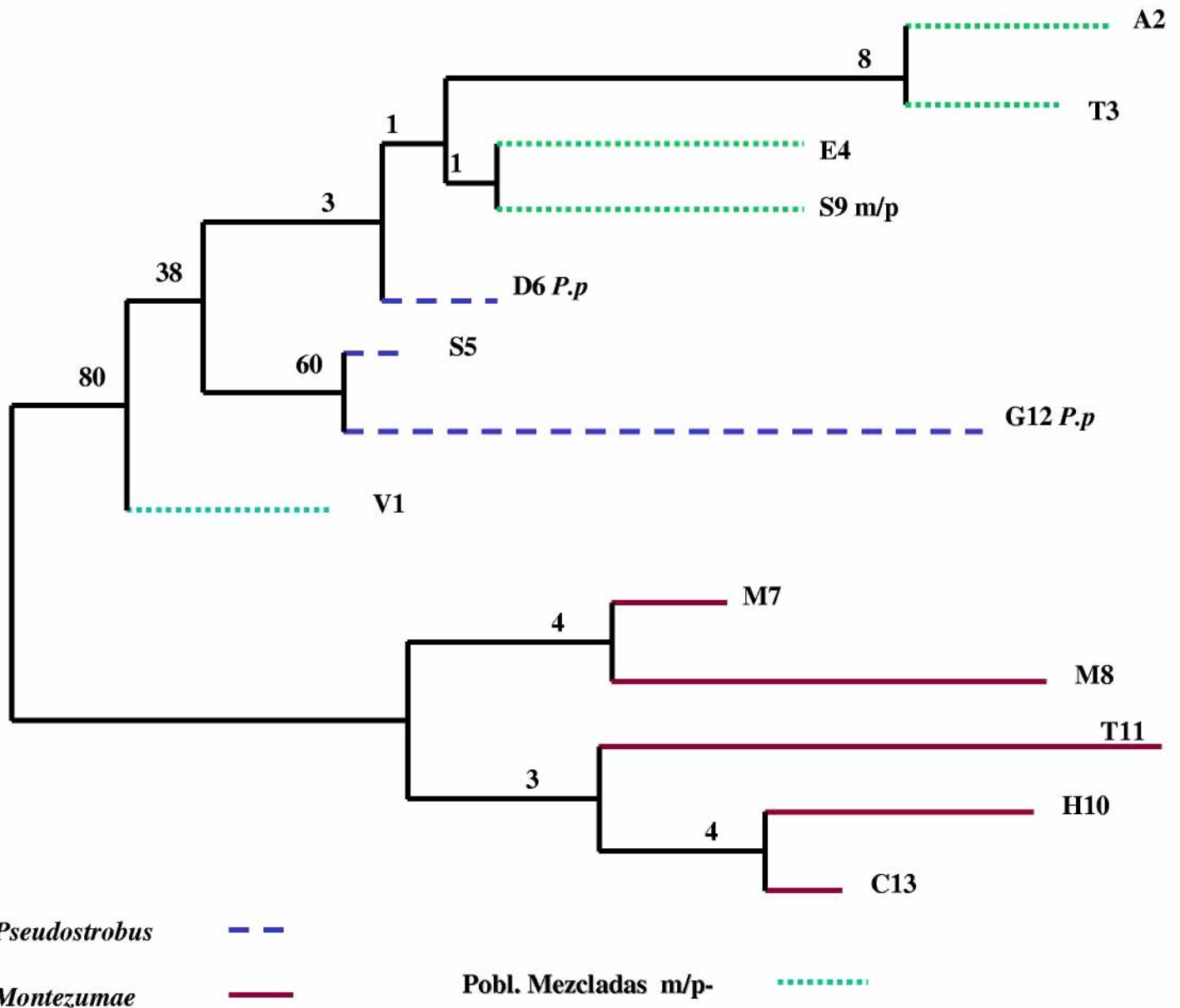


Figura 3. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre poblaciones (Da) con base a 6 SSR de cloroplasto. Bootstrap basado en 1000 replicas (porcentajes).

Variación y estructura genética con base al uso de tres SSR nucleares

Se ensayaron 15 microsatélites nucleares de los cuales 4 fueron monomórficos, 6 no amplificaron para todos los individuos, 3 no amplificaron y solo 3 fueron polimórficos y repetibles. El tamaño de los fragmentos varió de 2 a 10 pb. Se obtuvo un total de 22 alelos (de 4 a 8 alelos por locus) y 49 haplotipos. Se presentó un alelo único en la población S5 de *P. pseudostrobus* (3013:125 pb, 3025:274) y en las poblaciones S9 y T3, poblaciones híbridas (3013:126, 2123:192). (3013:138). En *P. montezumae* no se encontraron alelos únicos (ver Tabla 3). Los haplotipos más frecuentes fueron el tipo: 270,135,200, tanto en poblaciones puras como híbridas. El haplotipo más frecuente para las poblaciones puras de *P. montezumae* fue el tipo: 270,135, 198. Para *P. pseudostrobus* el haplotipo: 270, 136, 200 y para las poblaciones mezcladas el haplotipo: 67270, 135, 206 y el 270, 135 208.

Tabla 3. Frecuencias alélicas para *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* y sus híbridos en México y Guatemala.

Haplotype	PtTX3025	PtTX3013	PtTX2123	Frequency
H1	270	135	200	364
H10	270	135	198	32
H9	270	135	206	25
H4	270	130	200	21
H15	270	135	*	16
H12	268	135	200	15
H7	270	137	200	14
H6	272	135	200	13
H23	270	135	194	10
H18	270	135	190	9
H13	278	135	200	8
H30	270	135	208	8
H11	270	135	204	7
H40	270	136	200	7
H3	270	135	196	6
H32	270	135	192	6
H5	270	*	200	4
H31	264	135	200	4
H42	270	138	200	4
H17	269	135	198	3
H25	*	135	200	3
H33	270	126	200	3
H8	274	130	200	2
H21	272	135	198	2
H22	278	135	198	2
H27	269	135	200	2
H35	269	135	194	2

Considerando las frecuencias de los haplotipos para el análisis, se encontró que en todos los parámetros estimados las poblaciones más diversas genéticamente (H_E) fueron dos poblaciones puras de *P. montezumae* M7 ($H_E = 0.289$), M8 ($H_E = 0.280$) y una población Híbrida S ($H_E = 0.309$) (Tabla 1-4). Los valores más bajos se presentaron en las poblaciones distribuidas en Guatemala, la población G11 ($H_E = 0.084$) y la población T12 ($H_E = 0.107$) para *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* respectivamente. Además de los estimadores de diversidad mencionados, se obtuvieron valores de heterocigosis para cada población, donde encontramos que las poblaciones con mayor heterocigosis fueron las poblaciones M7 ($H_e = 0.401$), M8 ($H_e = 0.318$) de *P. montezumae* y la E4 ($H_e = 0.400$) compuesta por individuos híbridos (Tabla 5).

Tabla 4. Estimación de la diversidad genética de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* y sus híbridos en México and Guatemala. La desviación estandar se muestra en paréntesis.

Population	Haplotype Div.	# Haplotypes	# Pairwise Difference	
	0.694 (0.056)	Ave. Gene	0.749 (0.563)	
	0.746 (0.059)	0.249 (0.208) _{M7}	0.868 (0.622)	
	0.694 (0.071)	0.289 (0.230) _{M8}	0.840 (0.608)	
	0.619 (0.066)	0.280 (0.225) _{C13}	0.652 (0.513)	
	0.524 (0.087)	0.217 (0.190) _{T11}	0.215 (0.263)	
	0.587 (0.076)	0.107 (0.146) _{A2}	0.736 (0.557)	
	0.681 (0.067)	0.246 (0.206) _{T3}	0.733 (0.555)	
	0.705 (0.065)	0.244 (0.205) _{S9}	0.927 (0.651)	
	0.826 (0.037)	0.309 (0.241) _{E4}	0.425 (0.393)	
	0.161 (0.070)	0.213 (0.218) _{V1}	0.164 (0.227)	
	0.830 (0.044)	0.055 (0.084) _{S5}	1.048 (0.709)	
	0.457 (0.093)	0.349 (0.262) _{D6}	0.527 (0.448)	
	0.207 (0.079)	0.176 (0.166) _{G12}	0.253 (0.289)	
	0.642 (0.023)	0.084 25 Total	0.736 (0.548)	0.245 (0.202)

Tabla 5. Observada y esperada heterocigosis en *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* y sus híbridos, México Guatemala.

	PtTX3025		PtTX3013		PtTX2123		PROMEDIO
	Observed	Expected	Observed	Expected	Observed	Expected	Ovserved
H10	0.291	0.299	0.348*	0.513	0.042	0.082	0.227
M7	0.291	0.303	0.125	0.159	0.609	0.523	0.401
M8	0.333*	0.402			0.304*	0.506	0.318
C13	0.042	0.082	0.042	0.082	0.417**	0.569	0.17
T11	0.150*	0.345	0.227	0.255			0.188
A2	0.250	0.268	0.125	0.160	0.458	0.385	0.277
T3	0.083	0.122	0.042	0.082	0.583	0.613	0.236
S9	0.125**	0.268	0.250	0.267	0.250**	0.502	0.208

E4	0.130	0.165	0.348	0.300	0.706	0.622	0.400
V1	0.083	0.121			0.083	0.122	0.083
S5	0.333	0.329	0.565	0.670	0.167	0.198	0.354
D6	0.173	0.208	0.087	0.168	0.273	0.293	0.177
G12	0.130	0.167			0.130	0.127	0.0866

Para la estructura genética entre poblaciones los valores más altos se presentaron en las poblaciones de *P. montezumae* ($RST = 0.122$) seguido de las poblaciones híbridas ($RST = 0.082$). La menor diferenciación entre poblaciones se presentó en *P. pseudostrobis* ($RST = 0.022$). El análisis jerárquico de la varianza molecular fue bajo entre poblaciones ($RST = 0.06$; $P < 0.000$) y entre poblaciones dentro de grupos ($RSC = 0.06$; $P < 0.000$). Mientras que la diversidad media entre grupos (RCT) fue de 0.004 ($P = 0.05$). El porcentaje de la variación total que corresponde a la diversidad entre grupos fue de .04 %, entre poblaciones dentro de grupos de 5.83%, dejando el mayor porcentaje de haplotipos dentro de las poblaciones con 93.67% (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis jerárquico de la variación genética detectada con una prueba de AMOVA aplicada a una estructura de 13 poblaciones en 3 grupos (Poblaciones híbridas (5) poblaciones puras de *P. Montezumae* (5) poblaciones puras de *P. pseudostrobis* (3). La prueba fue basada en el modelo de mutación paso a paso (RST).

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	% de variación
Entre grupos	2	$\sim a^2 = 0.4649$	0.46
Entre poblaciones dentro de grupos	10	$\sim b^2 = - 0.59356$	5.87
Dentro de poblaciones	148	$a c^2 = 9.4747$	93.67
Total	153	$\sigma^2 = 10.1147$	
Indíces de fijación			
$F_{sc} = - 0.05895$			
$F_{st} = 0.06328$			
$F_{ct} = 0.00460$			
Valores de significancia			
$\sim c^2$ y F_t ($P = 0.00000$)			
$\sim b^2$ y F_{sc} ($P = 0.00000$)			
$\sim a^2$ y F_{ct} ($P = 0.34018 + 0.01353$)			

Distancias genéticas y aislamiento por distancia con SSRnuclear

Las poblaciones más alejadas genéticamente (*Dmyu*), fueron dos población híbrida V1 y E4 (0.250-0.168). Sin embargo, las poblaciones más cercanas genéticamente fueron las poblaciones puras de *P. montezumae* (0.005), y una mezcla entre las poblaciones híbridas y puras de las dos especies. Estos resultados sugieren que tanto poblaciones híbridas como puras presentan distancias genéticas muy similares por lo que no se observan diferencias significativas entre las distancias genéticas de las diferentes poblaciones. Aunado a lo anterior se hizo un análisis de aislamiento por distancia para ver si se presentaba algún patrón geográfico que influyera en la dispersión de genes entre pares de poblaciones. El análisis indica que no existe ninguna relación significativa entre el flujo genético y la distancia geográfica en el total de las poblaciones ($r = 0.128$, $P = 0.333$).

Filogenia molecular

El dendrograma obtenido para el total de las poblaciones muestra dos grupos; El primer grupo esta formado por poblaciones mezcladas, de *P. pseudostrobis* y una de *P. montezumae*. Mientras que el segundo, esta representado por las poblaciones puras de *P. montezumae* y dos poblaciones híbridas (S9 y E4) (Figura 4). Estos resultados sugieren: al igual que los resultados con cloroplasto que las poblaciones híbridas son filogenéticamente mas relacionadas a las poblaciones puras de *P. pseudostrobis* que con las poblaciones de *P. montezumae*, y por el otro lado, que la introgresión es unidireccional, con introgresión de material citoplasmático en mayor grado de *P. montezumae* hacia las poblaciones híbridas y en menor grado de *P. pseudostrobis* hacia las poblaciones de *P. montezumae*.

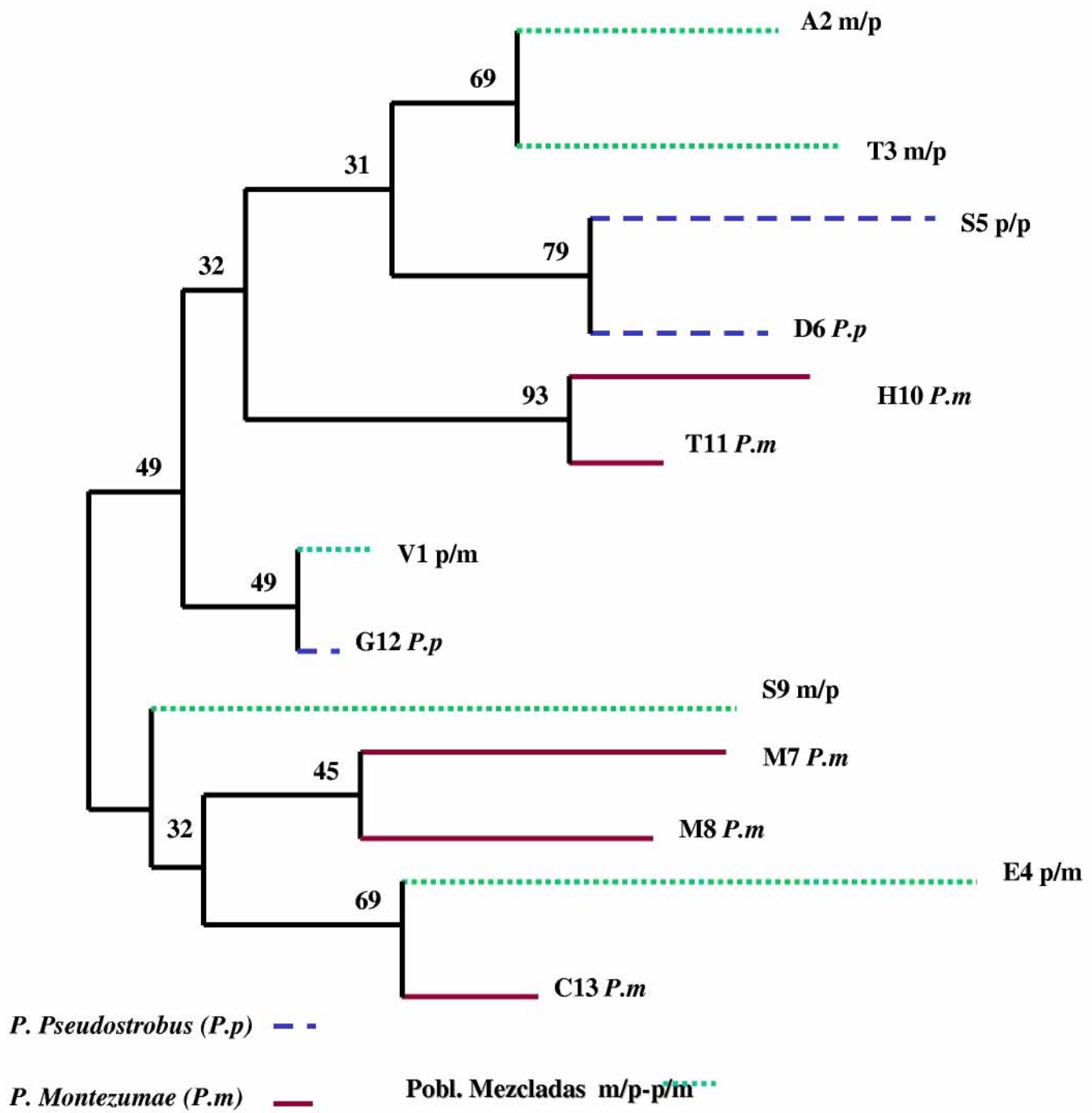


Figura 4. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre poblaciones (*Da*) con base a 3 SSR nucleares. Bootstrap basado en 1000 replicas (porcentajes).

Anexo III

Resultados de la estructura y variación genética de *P. rzedowskii* con base a tres SSR de cloroplasto

De 11 clSSR ensayados solo 3 fueron polimórficos. El tamaño de los fragmentos varió de 2 a 4 pb. Se obtuvo un total de 7 alelos (de 2 a 3 alelos por locus) y 7 haplotipos. La mayoría de los alelos fueron detectados en todas las poblaciones en mayor o menor grado. La población F2 presentó un alelo único (1520:126 pb). Las poblaciones CH4 y V1 comparten un alelo (8730:152 pb) (ver Tabla 1). Los haplotipos más frecuentes fueron el haplotipo tipo: 148, 151, 125 y el tipo 149, 151, 125 (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias alélicas para 4 poblaciones de *P. rzedowskii*,

Michoacán México.

Haplotype	Pt7195	Pt3025	Pt1520	Frequency
H1	148	151	125	41
H6	149	151	125	3
H2	148	151	126	2
H3	148	152	125	2
H4	147	152	125	2
H5	147	151	125	1
H7	147	151	126	1

Considerando las frecuencias de los haplotipos para el análisis, se encontró que en todos los parámetros estimados las poblaciones más diversas genéticamente (HE) fueron F2 ($HE = 0.216577$) y CH4 ($HE = 0.130159$). Los valores más bajos se presentaron en la población A3 ($HE = 0.06666$) (ver Tabla 2).

Para la estructura genética entre poblaciones se obtuvo un valor bajo ($RST = 0.054$). Resultado que sugiere homogenización genética entre las poblaciones. El análisis jerárquico de la varianza molecular indica que el porcentaje de variación entre poblaciones fue bajo de 5.45 %. Mientras que el porcentaje de la diversidad media dentro de las poblaciones (RCT) fue de 94.55% (Tabla 3).

Tabla 2. Estimación de la variación y estructura genética en 4 poblaciones de *P. rzedowskii*, Michoacán México (la estimación de la estructura genética fue basada con el modelo de mutaciones paso a paso (SMM).

<i>P.rzedowskii</i> N	Población					SMM
	A	H	HE	<i>7t</i>	RST	
V1	18	5	3	0.106754 (0.126934)	0.320261 (0.340526)	
F2	23	6	5	0.255999 (0.216577)	0.766798 (0.216577)	
A3	10	4	2	0.066666 (0.101457)	0.200000 (0.269133)	
CH4	15	6	3	0.130159 (0.144514)	0.390476 (0.386670)	
Media	16.5	5.25	4.33	0.13989 (0.14737)	0.30322 (0.30322)	0.054
TOTAL	66	21	13	0.5595 (0.58948)	1.21290 (1.21291)	

N= Tamaño de muestra
A= número de alelos
H= número de haplotipos
 H_E = Diversidad genética
n= Media de diferencias entre pares de haplotipos
RST= diferenciación genética de acuerdo al modelo de mutación de alelos infinitos (SMM)

Tabla 3. Análisis jerárquico de la variación genética detectada con una prueba de AMOVA aplicada a 4 poblaciones naturales de *P. rzedowskii*. La prueba fue basada en el modelo de mutación paso a paso (RST).

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	% de variación
Entre poblaciones	3	$\sim a^2 = - 0.0146$	5.45
Dentro de poblaciones	62	$\sim b^2 = 0.25440$	94.55
Total	153	$6^2 = 0.26907$	
Indices de fijación			
$F_{st} = 0.05451$ (0.0000)			

Distancias genéticas y aislamiento por distancia

Las poblaciones más alejadas genéticamente (Da), fueron dos población F2 y A3 (0.1142). Las poblaciones más cercanas genéticamente fueron la V1 y CH4 y la A3, CH4 (0.04958 y 0.04167 respectivamente). Aunado a lo anterior se hizo un análisis de aislamiento por distancia para ver si se presentaba algún patrón geográfico que influyera en la dispersión de genes entre pares de poblaciones. El análisis indica que no existe ninguna relación significativa entre el flujo genético y la distancia geográfica.

Filogenia molecular

El dendrograma obtenido para las 4 poblaciones agrupa a las poblaciones V1 y F2 como las más diferentes genéticamente y a las poblaciones A3 y CH4 como las más parecidas genéticamente. Estos resultados sugieren que las poblaciones A3 y CH4 son mas novedosas filogenéticamente que las poblaciones 1V y 2F las cuales son poblaciones más ancestrales (Figura 1).

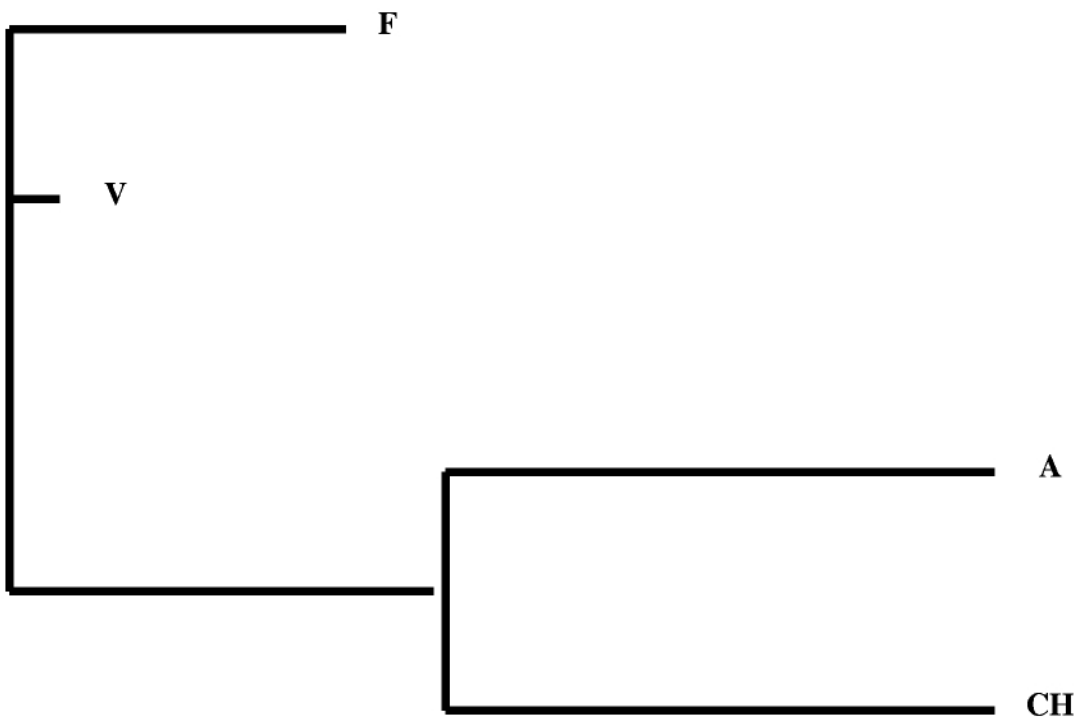


Figura 1. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre 4 poblaciones de *P. rzedowskii* con base a 3 SSR de cloroplasto.

Anexo IV

Resultados de la estructura y variación genética de *P. maximartinezii* con base a tres SSR

nucleares.

De 15 SSRn ensayados solo 3 fueron polimórficos. El tamaño de los fragmentos vario de 2 a 4 pb. Para todos los individuos analizados (embriones, juveniles y adultos), se obtuvo un total de 13 alelos (de 2 a 6 alelos por locus) y 14 haplotipos. La mayoría de los alelos fueron detectados en todas las poblaciones en mayor o menor grado. El grupo de Adultos presentó un alelo único del microsatélite PtTX3013 (140 pb) y un alelo único del microsatélite PtTX3025 (120 pb). La los gripos de Juveniles y Embriones no presentaron alelos únicos (ver Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias alélicas para *P. maximartinezii*, Zacatecas, México.

Locus	Alelo	Frecuencias		
		Adultos	Juveniles	Embriones
PtTX3013	115	0	0	0.014
	119	0	0	0.014
	121	0	0.12	0.049
	125	0.053	0	0.253
	130	0.105	0	0.028
PtTX2123	134	0.829	0.988	0.641
	140	0.013	0	0
	165	0.962	0.940	1.0
	168	0.025	0.048	0
PtTX3025	170	0.012	0	0
	120	0.012	0	0
	123	0.287	0.051	0.384
	125	0.700	0.949	0.616

Considerando las frecuencias de los alelos para el análisis, se encontró que en todos los parámetros estimados el grupo más diversa genéticamente (H_o) es el de Adultos ($H_o = 0.322$), valor que tiene diferencia altamente significativas, con relación a los embriones ($H_o = 0.16$) y juveniles ($H_o = 0.05$) (ver Tabla 2). En contraste, la heterocigosis esperada es mayor en Embriones ($H_e = 0.1750$), que en Juveniles ($H_e = 0.1750$), y Adultos ($H_e = 0.1750$). (Ver Tabla 2). Esto aunado al análisis de equilibrio Hardy- Weinberg, donde se encontró que los embriones se desvían significativamente en los tres loci por un exceso de homocigotos. Solo un locus se desvía significativamente en los tres grupos estudiados (PtTX2123).

Las tasas de entrecruzamiento multilocus para todos los embriones muestra que *P. maximartinezii* presenta entrecruzamiento predominante aunque la desviación estandar indica

que hay cierta variación en la tasa de entrecruzamiento entre familias (Tabla 3). Estos resultados indican que la endogamia dada por apareamiento entre parientes es baja y no es significativamente diferente de 0 ($P > 0.05$). Sin embargo, rp nos muestra que la mayoría de los miembros de una misma familia son hermanos completos, y puede sugerir que el número de árboles fuente de polen es reducido.

Table 2. **Observada** y esperada hetrosigosis en *P. maximartinezii*, México.

	PtTX3025		PtTX3013		PtTX2123		Promedio	
	Observada	Esperada	Observada	Esperada	Observada	Esperada	Observada	Esperada
Embriones	0.134	0.476	0.352	0.525	0	0	0.160	0.334
Juveniles	0.102	0.098	0.024	0.024	0.024	0.114	0.050	0.079
Adultos	0.6	0.43	0.342	0.303	0.025	0.074	0.322	0.269

Tabla 3. **Estimados de tasas de entrecruzamiento multilocus, para un solo locus y de apareamiento correlacionados (s.d)**

tm	0.964 (0.489)
ts	0.874 (0.329)
tm-ts	0.09 (0.167)
rt	0.09 (0.866)
rp	0.950 (0.279)

tm = tasa de entrecruzamiento

ts = tasa de entrecruzamiento por locus

tm-ts = indicador de apareamiento entre parientes

rp = probabilidad de que dos hermanos sean hermanos completos

rt = correlación de entrecruzamiento entre dos miembros de una familia

Para la estructura genética entre poblaciones se obtuvo un valor bajo ($RST = 0.031$). Resultado que sugiere alto flujo genético entre las poblaciones. El análisis jerárquico de la varianza molecular indica que el porcentaje de variación entre poblaciones fue bajo de 3.15 %. Mientras que el porcentaje de la diversidad media entre individuos dentro de las poblaciones (RCS) fue de 18.75% y de 78.07% para la diversidad promedio dentro de individuos (RCT) (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis jerárquico de la variación genética detectada con una prueba de AMOVA aplicada a 2 subpoblaciones (juveniles y adultos) naturales de *P. maximartinezii*. La prueba fue basada en el modelo de mutación paso a paso (RST).

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	% de variación
Entre poblaciones	1	$\sim a^2 = -0.15790$	3.15
Entre individuos dentro De poblaciones	80	$\sim b^2 = 0.94022$	18.78
Dentro de individuos	82	$\sim c^2 = 3.90854$	78.07
Total	173	5.0066	
Índices de fijación			
Fst = 0.03154 (0.0000)			
Fis = 0.19391 (0.00098)			
Fit = 0.21933 (0.00098)			

En cuanto al análisis con microsatélites de cloroplasto, no se encontró variación genética: de 7 SSR de cloroplasto ensayados solo en un locus se detectó un alelo diferente al resto de los individuos analizados (N=89) (Pt7195: 147). Resultado que podría sugerir muy baja variación genética y que para la especie se ha presentado un cuello de botella reciente.

Anexo V

Análisis y resultados de la estructura y variación genética de *P. pinceana* con base al uso de cuatro SSR de cloroplasto

Los análisis de variación genética, estructura genética y demografía histórica se realizaron con un total de 154 individuos, 25.7 individuos en promedio por población, 6 poblaciones (Tabla 1), y 4 microsatélites de cloroplasto polimórficos. En total, se probaron 11 primers. Los cebadores utilizados fueron: Pt30204, Pt71936, Pt63718 y Pt110048 (Vendramín *et al.* 1996). Todos los análisis se realizaron a partir de los diferentes haplotipos compuestos por los alelos en los cuatro diferentes loci mencionados.

Tabla 1. Poblaciones analizadas de *Pinus pinceana* en México.

Población	Estado	Latitud	Longitud	Altitud	# ind. este estudio	Ho (Molina-Freaner <i>et al.</i> 2001)	Ho (Ledig <i>et al.</i> en)
Sierra de	Coahuila	25°21.425' N	102°10.819' W	1737 m	31		0.137 a 0.156
Cuauhtémoc	Coahuila	25°16.35' N	100°57.77' W	2250 m	32	0.027 a 0.198	0.135 a 0.172
Huizache	San Luis Potosí	22°53.92' N	100°29.20' W	1480 m	30	0.196	—
Guadalcázar	San Luis Potosí	22°40.00' N	100°30.00' W	3000 m	20	0.193	0.143
San Joaquín	Querétaro	20°55.00' N	99°38.00' W	2080 m	15	0.328	0.103
Tolantongo	Hidalgo	20°38.108' N	98°59.11' W	1800 m	26		
Todas						0.216	0.144

Variación y estructura genética

Los alelos encontrados para cada locus, se distinguieron por su peso molecular como función del número de pares de bases. Los diferentes loci presentaron diferente número y tamaño de alelos. Como expresión de la variación genética se reportan a continuación las frecuencias alélicas (Tabla 2) para cada locus en cada población. Los alelos de cada microsatélite presentan una frecuencia diferente en cada población, incluso existen alelos privados para algunas poblaciones, esto es, alelos que sólo se encuentran en una población. Por ejemplo los alelos 157 del microsatélite Pt30204 y 95 del microsatélite Pt110048 sólo están presentes en la población de Cuauhtémoc y el alelo 93 del microsatélite Pt110048 sólo está en la población de Sierra de Parras (Tabla 2). Se encontramos 2 haplotipos predominantes

(1 y 5), los cuales a su vez son los que aparecen en un mayor número de poblaciones (3). En el caso del haplotipo 1, las poblaciones que lo presentan son las que se encuentran más hacia el norte del país (Sierra de Parras y Cuauhtémoc) junto con una de las poblaciones centrales (Huizache); mientras que el otro haplotipo más frecuente se encuentra en las poblaciones más sureñas (San Joaquin y Tolantongo), así como en la misma población central que comparte el haplotipo 1 (Huizache). Además en cualquiera de los dos casos, el haplotipo en cuestión es el más frecuente en cada población o incluso el único (Tolantongo).

Tabla 2. Frecuencias alélicas encontradas para cada locus de cpSSR en las poblaciones de *Pinus pinceana* en México (SP=Sierra de Parras; C=Cuauhtémoc; H=Huizache; HG=Guadalcázar; SJ=San Joaquin; T=Tolantongo).

	Microsatélites														
	Pt 30204					Pt 71936			Pt 63718		Pt 110048				
Alelos	157	156	154	151	150	152	148	147	95	93	95	93	92	91	# ind
Pob.															
SP	0.26	0.74	-----	-----	-----	-----	-----	1.00	1.00	-----	-----	0.07	0.03	0.90	31
C	0.31	0.66	0.03	-----	-----	-----	-----	1.00	0.97	0.03	0.03	-----	-----	0.97	32
H	0.27	0.67	-----	-----	0.07	0.07	0.17	0.77	0.03	0.97	-----	-----	0.03	0.97	30
HG	0.3	0.65	-----	0.05	-----	-----	0.3	0.7	-----	1.00	-----	-----	0.05	0.95	20
SJ	-----	-----	-----	0.07	0.93	1.00	-----	-----	-----	1.00	-----	-----	1.00	-----	15
T	-----	-----	-----	-----	1.00	1.00	-----	-----	-----	1.00	-----	-----	1.00	-----	26
Total														154	

Además de los datos anteriores contamos con el estimador *HE* (Tabla 3) utilizado para determinar la diversidad genética, el cual muestra que, en el caso del análisis con todos los loci, la variación total es alta (0.8237 +0.0140), a pesar de que en algunas poblaciones (San Joaquín y Tolantongo) es prácticamente nula (0.1333 y 0.0000). Por otro lado, la diversidad por locus, en el caso de Pt30204 es muy similar a la de todos juntos, pues se mantiene el mismo patrón anterior en donde las poblaciones con menor diversidad son San Joaquín y Tolantongo (0.1333 y 0.0000), lo mismo sucede para Pt110048 (0.0000 y 0.0000). En el caso de Pt63718 y Pt71936, la diversidad total se explica sólo gracias a 2 poblaciones, en el caso de Pt71936 sólo hay diversidad en Huizache y Guadalcázar (0.3931 y 0.4789) y en el caso de Pt63718 la diversidad se concentra en Cuauhtémoc y Huizache (0.0625 y 0.0667).

La diversidad genética total considerando todos los loci o uno por uno, no llega a variaciones de un orden de magnitud como en el caso de la diversidad por poblaciones, que va de 0.4435 para el locus Pt110048 a 0.8237 para todos los loci (Tabla 3).

En el caso del estimador de variación n , los valores de diversidad mantienen más o menos el mismo patrón que se registra con HE , (Tabla 3). La diversidad de haplotipos también coincide con los valores de H , pues los valores altos de diversidad por ejemplo en Huizache (0.6966) se encuentran junto con los valores más altos de diversidad de haplotipos (7), en el caso de Tolantongo, con diversidad de 0.00, sólo se encuentra 1 haplotipo (Tabla 3). Los estimados indirectos de tamaños poblacionales ($N = 2Nu$), tienen una relación directa con la diversidad que se presenta en las poblaciones, lo cual es de esperarse, pues los cálculos de θ se hacen a partir de la homocigosis esperada, así es que las poblaciones más diversas tiene tamaños poblacionales relativamente grandes (Guadalcázar con $H=0.7579$, y $\theta=8.03$), lo contrario sucede con las poblaciones con variación relativamente pequeña (Tabla 3). En general las poblaciones que mantienen los valores de diversidad más altos son Huizache y Guadalcázar.

Estructura genética

La estructura genética que se analizó con el AMOVA, tanto con el método que se refiere a F_{st} como el que se refiere a R_{st} (Tablas 4 y 5), consistió en una estructura de tres grupos con dos poblaciones cada uno, los cuales se determinaron a partir de la distribución geográfica de las poblaciones. Usando este criterio, la estructura fue la siguiente: grupo 1 (al norte), con las poblaciones Cuauhtémoc y Sierra de Parras; grupo 2 (al centro), con las poblaciones Huizache y Guadalcázar; y grupo 3 (al sur), con las poblaciones San Joaquín y Tolantongo.

Tabla 3. Valores de diversidad genética y tamaño poblacional estimado para las poblaciones de Pinusinceana en México.

Población	Diversidad genética (H ; π)					No.de Haplo- N tipos	$\sim=2Nu$ (estimado del tamaño de la población)
	(el valor superior corresponde a H y el inferior a π)						
	Todos los loci	Pt30204	Pt71936	Pt63718	Pt110048		
Sierra de Parras	0.5677 (+0.0783)	0.3957 (+0.0781)	0	0	0.2409 (+0.0975)	4	31 2.175986
	0.63656 (+0.5108)	0.3957 (+0.3791)	0	0	0.2409 (+0.2834)		
Cauhtémoc	0.5343 (+0.0447)	0.5343 (+0.0447)	0	0.0625 (+0.0577)	0.0625 (+0.577)	3	32 1.805204
	0.5968 (+0.489)	0.5343 (+0.456)	0	0.0625 (+0.1367)	0.0625 (+0.1367)		
Huizache	0.6966 (+0.0694)	0.4966 (+0.799)	0.3931 (+0.0985)	0.0667 (+0.0613)	0.0667 (+0.0613)	7	30 4.930011
	1.023 (+0.7041)	0.4966 (+0.4363)	0.3931 (+0.378)	0.0667 (+0.1416)	0.0667 (+0.1416)		
Guadalcázar	0.7579 (+0.0495)	0.5105 (+0.0907)	0.4789 (+0.0720)	0	0.1 (+0.088)	5	20 8.030247
	1.0895 (+0.7464)	0.5105 (+0.45)	0.4789 (+0.4324)	0	0.1 (+0.1775)		
San Joaquín	0.1333 (+0.1123)	0.1333 (+0.1123)	0	0	0	2	15 0.165680
	0.1333 (+0.2099)	0.1333 (+0.2099)	0	0	0		
Tolantongo	0	0	0	0	0	1	26 0
Total	0.8237 (+0.0140)	0.6471 (+0.0204)	0.5060 (+0.0327)	0.4866 (+0.0151)	0.4435 (+0.0317)	14	154 15.58649
	2.083185 (+0.5053)	0.64059 (+0.4319)	0.50598 (+0.4215)	0.4866 +0.398	0.4435 (+1.1712)		

Con los resultados obtenidos con el AMOVA a partir de R_{st} (Tabla 12) ese obtuvo un porcentaje alto de la variación entre grupos (93.30%) y el valor de F_{ct} (diferenciación entre grupos) resultó de 0.93295. El índice de fijación entre poblaciones dentro de cada grupo tuvo un valor de -0.03186 (F_{sc}) y el porcentaje de la variación total que corresponde a las poblaciones dentro de los grupos es de -0.21% . El porcentaje de la variación total que corresponde a la diversidad dentro de las poblaciones es de 6.92% . Por último el valor de diferenciación entre todas las poblaciones (F_{st}) expresado en términos de R_{st} es de 0.93082. Todos los estimados son significativos en un 90% o más (Tabla 4). En este caso la estructura propuesta también se acepta.

Tabla 4. Resultados de la prueba de AMOVA con el método de distancia correspondiente a la suma de las diferencias cuadradas del tamaño de haplotipos = R_{st} , aplicada a una estructura de 6 poblaciones en 3 r u os (de 2 poblaciones cada uno) de *Pinus inceana* en México.

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	% de variación
Entre grupos	2	$\sigma_a^2 = 19.73132$	93.30
Entre poblaciones dentro de grupos	3	$\sigma_a^2 = -0.04517$	-0.21
Dentro de poblaciones	148	$\sigma_a^2 = -1.46318$	6.92
Total	153	$\sigma_a^2 = -21.14933$	
Índices de fijación			
$F_{sc} = -0.03186$			
$F_{st} = 0.9382$			
$F_{ct} = 0.93295$			
Valores de significancia			
$\sim c^2$ y F_{st} ($P = 0.00000$)			
$\sim b^2$ y F_{sc} ($P = 0.00000$)			
$\sim a^2$ y F_{ct} ($P = 0.05376 + 0.00726$)			

Los valores de diferenciación genética por pares de poblaciones a partir de R_{st} se presentan en la Tabla 5. los valores más altos (0.99225) se encuentran entre las poblaciones más alejadas geográficamente (Sierra de Parras y Tolantongo). La misma correspondencia encontramos entre las poblaciones más cercanas geográficamente (Huizache y Guadalcázar) con valores de diferenciación de -0.03411 (no significativamente diferente de 0).

Tabla 5. Valores de diferenciación genética entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México obtenidos a partir de la suma de las diferencias cuadradas en el tamaño de los haplotipos entre poblaciones (*Rst*)
 * = valores significativamente diferentes de cero ($P < 0.01$)

Población	Sierra de Parras	Cauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0					
Cauhtémoc	-0.02196	0				
Huizache	0.44623 *	0.41007 *	0			
Guadalcázar	0.66230 *	0.58268 *	-0.03411	0		
San Joaquín	0.98960 *	0.97882 *	0.89828 *	0.96253 *	0	
Tolantongo	0.99225 *	0.98358 *	0.91906 *	0.97271 *	0.03873	0

Flujo genético

Los valores mayores de *M* se encuentren entre las poblaciones más cercanas geográficamente (Huizache y Guadalcázar), siendo tanto *MF* como *MR* determinados como de un valor infinito; así también las poblaciones más lejanas geográficamente (Sierra de Parras y Tolantongo) son las que presentan el menor flujo entre ellas (*MF* = 0.04802 y *MR* = 0.00390. *MF* no es el valor menor pero no es significativamente diferente del menor).

Distancias genética y geográficas

Nuevamente las poblaciones más lejanas geográficamente son las más lejanas genéticamente (Sierra de Parras y Tolantongo), con valores de 3.61720 para el modelo de alelos infinitos y de 68.7979 para el modelo de mutación paso a paso (los valores no son estrictamente los mayores pero no significativamente diferentes de los mayores que son entre Cauhtémoc y Tolantongo 3.63911 y 69.72984 para *Fst* y *Rst* respectivamente); de este mismo modo la relación entre distancia genética y geográfica se mantiene en las poblaciones más cercanas geográficamente (Huizache y Guadalcázar), en donde la distancia genética es cero en ambos modelos. Las distancias geográficas calculadas por pares de poblaciones se muestran en la Tabla 7. Según estos cálculos las poblaciones más cercanas geográficamente son Huizache y Guadalcázar, separadas por sólo 25.76 km y las más lejanas son Sierra de Parras y Tolantongo, separadas por 613.33 km.

Tabla 7. Distancias geográficas en Km. Entre las poblaciones de *Pinus pinceana* en México.

Población	Sierra de Parras	Cauhtémoc	Huizache	Guadalcázar	San Joaquín	Tolantongo
Sierra de Parras	0					
Cauhtémoc	122.10	0				
Huizache	320.90	267.47	0			
Guadalzacar	342.37	292.61	25.76	0		
San Joaquín	554.31	500.92	235.74	212.51	0	
Tolantongo	613.33	550.89	292.45	271.44	71.93	0

La correlación entre el número de migrantes a partir de R_{st} (M_R) y la distancia geográfica presentó una relación inversamente proporcional con un coeficiente de correlación de $r = 0.8304$ ($P < 0.01$). Se aplicó

la prueba de Mantel para verificar la correlación entre la distancia, el coeficiente de correlación fue de 0.638010 ($P < 0.05$). Lo que permite suponer que la estructura genética de *Pinus pinceana* se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia entre poblaciones.

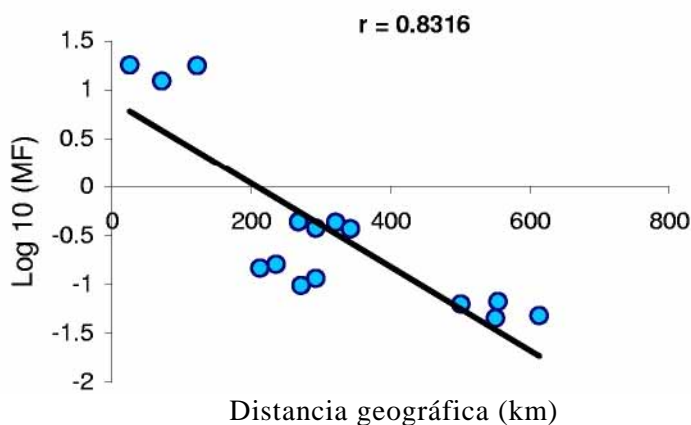


Figura 1. Correlación entre el número de migrantes entre poblaciones calculado a partir de R_{st} (M_R) y la distancia geográfica entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México.

Filogenias moleculares

La figura 2 muestra un fenograma que representan las distancias genéticas entre poblaciones bajo el modo de mutación paso a paso, contruidos con base a los criterios de Neighbor-Joining. En esta representación se observan más o menos agrupados los haplotipos según la población a la que pertenecen y la topología no cambia si se pone un grupo hermano con los haplotipos 6, 8, 9 o 4 (presentes en Huizache).

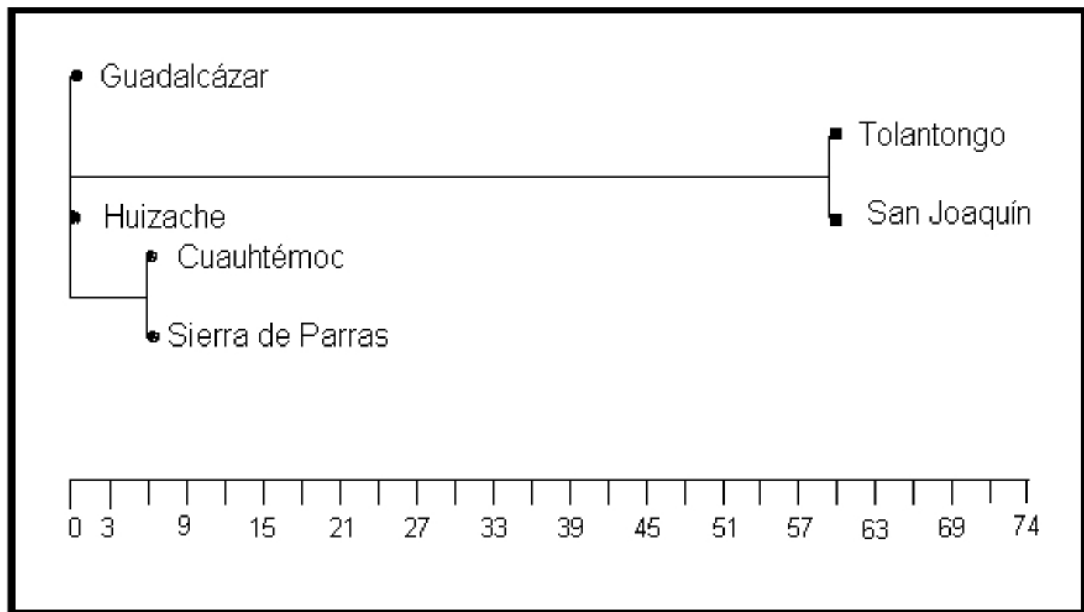


Fig. 2. Árbol de Neighbor-Joining obtenido a partir de las distancias genéticas (D_A) entre poblaciones de *Pinus pinceana* en México bajo el modelo de mutación paso a paso (R_{st}).

Anexo VI

Análisis y resultados de criterios biológicos de conservación

Los resultados sobre los diferentes índices de conservación se muestran en la Tabla 1, y se describen a continuación:

Criterio filogenético- Con el conjunto de poblaciones para cada especie se obtuvieron las siguientes agrupaciones poblacionales (AP); tres AP, para las poblaciones híbridas A2, V1, dos poblaciones de *P. montezumae* H10, T11, y de una población de *P. pseudostrobus* G12. 2 AP, para dos poblaciones híbridas S9, E4, y tres poblaciones de *P. montezumae* M7, M8, C13. 4 AP para las poblaciones T3 (híbrida), y dos de *P. pseudostrobus* S5 y **D6.**, con un total de 37 agrupaciones poblacionales; en *P. nelsonii* dos AP para las poblaciones de Miquihuana y Taponá, tres para Tula y Palmillas, cuatro para S. Lázaro, Duraznillos, Membrillo y Antonias, con un total de 29 agrupaciones poblacionales (AP); en *P. rzedowskii* dos AP en V1 y F2, y tres AP en A3 y CH4, con un total de 10 agrupaciones poblacionales; en *P. pinceana*, dos AP para las poblaciones Guadalcázar y Huizache, cuatro para Tolantongo, S. Joaquín, Cuauhtemoc y Parras, con un total de 20 agrupaciones poblacionales. Para *P. maximartinezii*, una agrupación poblacional. Para facilitar los cálculos los valores se estandarizaron (E) dividiéndolos entre el valor más bajo, así, por ejemplo para la población de Miquihuana o Taponá que tienen dos AP, se dividió entre el valor de 3 que tiene la Taponá, dando un cociente de 0.666 (ver tabla 1). Por tanto, con base al criterio de índice táxico filogenético encontramos que las poblaciones más diferentes son las que quedaron más basales en la filogenia, mientras que las más parecidas evolutivamente a otras son las que se encuentran después de muchas bifurcaciones. Entonces, para *P. nelsonii*, las poblaciones Miquihuana, Duraznillos y Taponá se encuentran en la raíz del filograma, en *P. montezumae* las poblaciones G12 y C13 que están a uno y dos nodos de la raíz, para *P. pseudostrobus* la población 6D que está a un nodo de la raíz. Para *P. rzedowskii* las poblaciones V1 y F2 que nuevamente se encuentran en la raíz del fenograma. Para *P. pinceana* las poblaciones Guadalcázar y Huizache se encuentran a un nodo de la raíz. Como solo existe una población para *P. maximartinezii*, es de extrema importancia para conservar bajo este criterio. En conjunto y de acuerdo con el criterio filogenético este grupo de poblaciones son las más diferentes evolutivamente al resto y por tanto las más valiosas para conservar.

Criterio demográfico - Utilizando los principios teóricos del método de Vane-Wright, analizamos datos demográficos y genéticos como criterios de conservación. Así, encontramos que para *P. nelsonii* las poblaciones más valiosas de conservar de acuerdo al menor tamaño y ordenadas de manera descendente fueron Membrillo (N = 200) y Duraznillo (N = 300). La población T11 de *P. montezumae*, la 12G de *P. pseudostrobilus*, que son poblaciones que se encuentran distribuidas en Guatemala. Las poblaciones híbridas, 1V, 2A, 3T y 4E. Para *P. rzedowskii* las poblaciones prioritarias de conservar fueron la CH4 (N =70) y la V1 (N =200), en *P. pinceana* 6Tolantongo, (N = 700), 5S. Joaquín y 1Parras (ambas con una N = 100). Para *P. maximartinezii*, se debe conservar la única población, tanto semillas, juveniles y adultos.

Criterio genético- Con base a la heterosigocis (H_o) encontramos que para *P. nelsonii* las poblaciones prioritarias de conservar son Antonias y La Tapona ($H_o = 0.23$ y 0.13 respectivamente). En *P. montezumae* las poblaciones M7 y H10 ($H_o = 0.410$ y 0.227 respectivamente). En *P. pseudostrobilus* la población 5SUH ($H_o = 0.354$), y para las poblaciones híbridas la 4E y 3T ($H_o = 0.396$, 0.236 , respectivamente). Para *P. rzedowskii* la población 2F ($H_o = 0.256$). Para *P. maximartinezii*, nuevamente se debe de conservar a toda la población con un énfasis sobre los individuos juveniles ($H_o = 0.050$). Finalmente, para *P. pinceana* las poblaciones de Guadalcazar y Guizache ($H_o = 0.7597$). Criterio genético de conservación que para esta especie se mantuvo igual que el criterio filogenético.

Integración de índices- La suma de los cuatro valores nos indicó cuales poblaciones son prioritarias de conservar, para *P. nelsonii* las poblaciones La Tapona (1.765) y Los Duraznillos (1.648). En *P. montezumae* la 11T(2.124) y 7M (2.066), en *P. pseudostrobilus* la 12G (2.367). Para *P. rzedowskii* las poblaciones 4CH (2.008) y la 2F(2.020). Para *P. maximartinezii*, los tres subgrupos, iniciando con los juveniles (2.155), seguido de los embriones (0.721) y los adultos (0.631). En *P. pinceana* las poblaciones Huizache (2.385) y Guadalcazar (2.233). Este conjunto de poblaciones son las que tienen rarezas en individuos, son más diferentes en la filogenia, y tienen bastante variación genética. El resto de las poblaciones son las menos importantes de conservar, que son moderadamente grandes, con niveles intermedios de variación genética pero con poca importancia filogenética.

DISCUSIÓN GENERAL

El análisis de parámetros genéticos con base a marcadores moleculares como los microsatélites tanto de cloroplasto como nucleares han demostrado ser una herramienta poderosa para obtener información implicada en el conocimiento de procesos evolutivos de poblaciones y especies (Powell *et al.*, 1995a, b; Vendramín *et al.*, 1996; 1998; Echt *et al* 2000; Williams *et al* 2001; Ledig *et al.*, 1998; 2001). Particularmente, en el presente trabajo se demostró: i) que los SSR tienen gran utilidad para detectar la variación genética de las poblaciones, ii) determinar como esta distribuida la variación genética dentro y entre las poblaciones, y iii) la manera en que esta variación genética se distribuye geográficamente en poblaciones de especies tanto de distribución restringida como amplia. Los resultados son relevantes ya que nos permiten seleccionar a poblaciones que deben de tener prioridades de conservación, aun en especies de amplia distribución donde sus poblaciones presentan valores bajos de diversidad genética, como es el caso de las poblaciones de Guatemala, tanto para *P. montezumae*, como *P. pseudostrobus*, Además, nos permiten seleccionar centros de diversificación genética, como en el caso de algunas de las poblaciones híbridas. Sin embargo, para una buena aplicación de SSR se requiere del conocimiento de aspectos teóricos y evolutivos de dichas regiones. En general los SSR nucleares pueden ocasionar complicaciones para obtener los fragmentos entre diferentes especies, es decir pocas veces son homólogos y conservados (Williams *et al* 2001). En contraste, los microsatélites de cloroplasto son excelentes para todo tipo de estudios evolutivos, es decir son conservados y homólogos entre muchas de las especies de coníferas (Vendramín *et al* 1998).

En general, vemos que con el uso de microsatélites los valores que se obtuvieron para los diferentes parámetros y estadísticos genéticos son mayores que los obtenidos en estudios previos con isoenzimas o fragmentos de restricción (Echt *et al.*, 1998; Vendramín *et al.*, 2001). Por ejemplo, en el presente trabajo para *P. pinceana* se logró detectar mayor estructura genética que la obtenida con isoenzimas (Molina *et al.*, 2001). Así mismo se obtuvo una definición más clara de patrones de aislamiento por distancia para *P. pinceana* y *P. rzedowskii* (ver Molina *et al.*, 2001 y Delgado *et al.*, 1999). Resultados que en conjunto permitieron discernir de una manera más clara entre las diferentes fuerzas evolutivas que actúan en la dinámica de las poblaciones de cada especie. Además, al hacer los análisis de conservación los promedios de criterios biológicos de conservación son más altos que los

obtenidos con isoenzimas (Delgado *et al*, sin publicar), y aseguran la real elección de poblaciones prioritarias de conservar.

Estructura genética e inferencias históricas

La estructura genética obtenida tanto para *P. pinceana* como *P. rzedowskii* fue altamente significativa y esta estructurada en tres grupos: para *P. pinceana* el primer grupo esta representado por las poblaciones S. de Parras y Cuauhtemoc al Norte del rango de la distribución geográfica de la especie, Huizache y Guadalucazar en el centro, y Tolantongo y San Joaquín al Sur. La asociación de la estructura genética de las poblaciones con relación a su distribución geográfica se ajusta al modelo de aislamiento por distancia, donde el flujo genético y las distancias genéticas entre poblaciones están fuertemente asociadas a la separación espacial. Este modelo de distribución de la variación genética también esta muy relacionada a la distribución geográfica de las poblaciones de *P. rzedowskii* donde la población más al Norte (4Chiqueritos), es la población más diferente genéticamente con relación a la población más al Sur (1Varaloso). La población central 2Fresno es la que comparte haplotipos de ambas poblaciones. Por tanto, podemos sugerir que para estas especies sus poblaciones se encuentran fragmentadas y que esta fragmentación dio origen a la diferenciación genética obtenida, donde las poblaciones extremas presentan haplotipos únicos fijados probablemente por deriva genética. Además, la fragmentación pudo originar la divergencia de cada parche, los cuales se diferencian más y comparten menos haplotipos del parche o poblaciones del centro en cuanto mayor es la distancia geográfica.

En contrastante, para las poblaciones de *P. nelsonii* se presentó un escenario histórico muy diferente. Para esta especie, las poblaciones no presentan una estructura genética muy marcada, y no se presentó algún patrón de aislamiento por distancia. Por tanto, se considera que las poblaciones mantienen valores de diversidad genética muy similares, donde el flujo genético es alto. Probablemente la dispersión de sus semillas sea muy eficiente, lo cual ha permitido el mantenimiento de la homogenización de la diversidad genética observada. En este caso también se logro detectar poblaciones centrales con mayor diversidad genética como Miquihuana y Las Antonias, poblaciones que probablemente fueron centros de origen del resto de las poblaciones estudiadas.

P. maximartinezii, es un caso único y contrario a lo que se esperaría al estar representada por una sola población y ser endémica a México. Se esperaría obtener valores bajos o nulos de diversidad genética. Sin embargo, presentó valores de diversidad genética iguales a los obtenidos para otras especies de pino de amplia distribución y superiores a los obtenidos con especies de distribución restringida pero representados por más de una población (como *P. pinceana*). Sin embargo, presenta un tamaño efectivo pequeño, por lo que probablemente este sujeta a depresión por endogamia. Este proceso pudo ser activado tanto por incendios periódicos y/o por el pastoreo excesivo. Factores que reducen el número de individuos reproductivos (tamaño efectivo de la población), y ocasionan así la autofecundación o entrecruzamiento con árboles muy emparentados genéticamente (endogamia).

En la literatura existente sobre *P. maximartinezii*, se hace mención en varias ocasiones, a la pobre o nula regeneración de la especie (Perry 1991; Farjon y Styles, 1997). Esta observación se basó en trabajos realizados en 1991 y 1995, sin embargo, en el año 2000, pudimos constatar la presencia de numerosas plántulas e individuos juveniles, así como poca presencia de ganado en la zona y no hubo incendios temporales. Esto puede significar que en temporadas más favorables esta población sí presenta un potencial de regeneración, de establecimiento y de crecimiento. Por tanto, desde el punto de vista evolutivo, podemos sugerir que esta especie es de origen ancestral, y que probablemente sufrió un proceso de cuello de botella, donde actualmente su única población esta incrementando su densidad. Sin embargo, se requiere hacer énfasis en la protección total de esta especie, para que la evolución natural de la especie continúe.

Para *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, se obtuvieron valores significativos de estructura genética y un patrón de aislamiento por distancia de las poblaciones de *P. montezumae* sumamente claro. Sin embargo proponer algún escenario evolutivo es complicado, ya que estas especies son capaces de cruzarse. Este proceso de hibridización introgresiva probablemente se presentó por un contacto secundario entre las poblaciones de ambas especies, representado por el Eje Neovolcánico, ya que es el área geográfica donde se distribuye la mayoría de las poblaciones mezcladas. Dicho supuesto nos puede hablar de la hibridización ancestral, ya que para que se presente un contacto secundario se requiere de un proceso de fragmentación espacial previo entre ambas especies. Esta fragmentación entre

ambas especies puede ser parcialmente sustentada por el patrón de asilamiento por distancia que se presenta en las poblaciones puras de *P. montezumae*, el cual no se mantiene si se incluyen las poblaciones mezcladas y puras de *P. pseudoastrobus*.

Estrategias de conservación

La estrategia de conservación que se propone en este trabajo tiene que ver tanto con la conservación *in situ* como *ex situ* de las poblaciones particulares de cada especie que fueron seleccionadas como prioritarias de conservar bajo los tres índices biológicos de conservación (filogenético, demográfico y genético). La conservación *in situ* se realizaría bajo la protección de estas poblaciones definiendo zonas núcleo excluidas de todo tipo de perturbación. La segunda estrategia de conservación *ex situ* se realizaría a través de la colecta de gametofitos, polen y tejido vegetativo, por lo menos de las poblaciones que se proponen como prioritarias de conservar.

En particular, para *P. rzedoskii* se sugiere proteger a la población 1Varaloso, ya que es la población que representa los valores medios de los tres índices analizados, la población 4Chiqueritos, que es la que tuvo el valor más alto de importancia para conservar debido en gran parte al tamaño de su población y a la contribución de la variación genética, y la población 2Fresno que le sigue en prioridad de conservación debido a su importancia filogenética. Teóricamente, al proteger a las poblaciones 1Varaloso, 4Chiqueritos y 2Fresno, se garantiza el mantenimiento a largo plazo de la riqueza biológica de la especie.

Un caso interesante se presentó en las poblaciones de *P. nelsonii* para las que encontramos que solo 2 poblaciones tienen la mayor importancia de conservación desde el punto de vista filogenético, pero al aplicar los otros índices encontramos que la población 7Taponá es prioritaria de conservar sobre el resto de las poblaciones. Esta población se caracteriza por tener valores medios de tamaño de las poblaciones, de variación genética y de mayor importancia filogenética que el resto de las poblaciones, excepto la población 2Miquihuana, en la cual su importancia de conservación queda en segundo término por tener un tamaño poblacional mayor (ver Tabla 1 del Anexo VI de criterios de conservación).

Para *P. montezumae* la población T11 de Guatemala, es la que debe de ser prioritaria de conservar, esto por el efecto del tamaño de la población que es pequeño, pero en general

todas las poblaciones son de diversidad genética alta, tamaños poblacionales grandes y de importancia filogenética semejante. Situación que se repite con las poblaciones de *P. pseudostrobilus*, siendo nuevamente una población de Guatemala (G12) la prioritaria para conservar. Aunque estas especies se encuentren aparentemente en un equilibrio entre los tres índices de conservación y por tanto no requieran de implementar estrategias de conservación, en México, la presencia de sitios de introgresión entre estas especies implica que estos pueden tener efecto en la extinción de poblaciones locales que sean puras de las especies, como es el caso de *P. pseudostrobilus* para la cual la mayoría de las poblaciones híbridas se traslapan. Por tanto, es de gran importancia la conservación tanto de poblaciones puras de *P. pseudostrobilus* como de poblaciones híbridas, que son centros de diversificación, como es el caso de la población 4E para la que los tres criterios de conservación tuvieron valores de 1, es decir esta población puede ser el principal centro de diversificación de una nueva variedad o subespecie.

En el caso de *P. maximartinezii*, la sugerencia es obvia, se requiere de su conservación tanto *in situ* como *ex situ*: al existir solo una población en todo el mundo, al ser representada por ^z 6000 individuos adultos, tener valores altos de diversidad genética y de única importancia filogenética, nos permite suponer que es una especie ancestral y por tanto se requiere de la implementación a corto plazo de estrategias para su conservación totalmente exenta de todo tipo de perturbación antropogénica.

Para *P. pinceana* se sugiere proteger *in situ* a las poblaciones 3 Huizache y 4 Guadalcázar, las dos poblaciones contienen iguales valores de importancia filogenética (de 1), pero la segunda población contiene los valores más altos de variación genética por lo que su mayor contribución se debió a dos índices, de diversidad genética y de importancia filogenética. Nuevamente, si se analiza cada índice de diversidad de manera aislada la información que nos proporcionan tiende a dispersarse y se podrían hacer propuestas erróneas, por ejemplo, si solo se tomara en cuenta al tamaño de las poblaciones, seleccionaríamos a la población 6Tolantongo que es la población de menor tamaño (700 individuos), pero perderíamos elementos representativos de la especie que se encuentran en otras poblaciones. Entonces, vemos que al unir varios índices de diversidad la selección de las poblaciones es más confiable. Consideramos que proponer a las poblaciones 3Huizache y 4Guadalcazar como prioritarias de conservar podrían representar la riqueza genética y filogenética de la especie.

Perspectivas

Actualmente las reconstrucciones filogenéticas forman parte de una herramienta poderosa no solo para conocer la sistemática de las especies, sino para proyectar patrones de distribución, ecológicos etológicos, genéticos y adaptativos como bases para el planeamiento de criterios de conservación. Hecho que se demostró en el presente escrito ya que por un lado, se logró aplicar métodos desarrollados para taxa supraespecíficos a datos de nivel infraespecífico, y por otro lado, se logró adecuar datos demográficos y genéticos a un método filogenético. El potencial de esta herramienta metodológica nos brinda toda una gama de posibilidades para desarrollar estimadores o índices que incluyan información básica de la biología (genética de poblaciones) y ecología (demográfica) de las especies, hasta el desarrollo de índices que tengan que ver con la problemática socioeconómica y cultural que involucren la conservación de las especies. Noss (1990), menciona que la biodiversidad puede estudiarse en múltiples niveles de organización y en múltiples escalas espaciales y temporales, de tal forma que a futuro se logre desarrollar un método que integre la mayor cantidad de información intrínseca y extrínseca de las especies para que en conjunto accionen como un mosaico jerárquico de la conservación.

LITERATURA GENERAL

- Delgado et al., D. Piñero., A. Chaos., N. Perez and 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.
- Elsik, C. G., M. T. Minihan., E. Sarah., Ann M. Scarpa and Claire G. Williams. 2000. Low copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*, 43: 550-555.
- Echt, C. S., P. May Marquardt., M. Hsieh. and Zahorchak, R. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 39: 1102-1108.
- Excoffier, L. 2000. Manual Arlequin ver. 2000.
- Gernandt, S. D., A. Liston and D. Piñero. Variation in the nrDNAITS of *Pinus* Subsection *Cembroides*: Implications of molecular systematic studies of pine species complexes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21:449-467.
- Hamrick, J. L. and L. R. Holden. 1979. Influence of microhabitat heterogeneity on gene frequency distribution and gametic phase disequilibrium in *Avena barbata*. *Evolution*, 33: 521-533.
- Kutil B. L and C. G. Williams. 2001. Triplet-repeat Microsatellites shared among hard and soft pines. *The Journal of Heredity*, 92 (4): 327-332.
- Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241: 1455-1459.
- Ledig, F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In Ecology and Biogeography of *Pinus*. Richardson, D. M. (ed). Cambridge University Press. UKM pp 251-280
- Little, E. L. and Critchfield W. B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (Pines). United States Department of Agriculture Misc. Publ. No 1144.
- Liston A., W. A. Robinson., D. Piñero and E. Alvarez-Buylla. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1: 95-109.
- Martínez M. 1948. Los pinos Mexicanos. Segunda edición, Ediciones botas. México, D. F. 361 pp.
- Miller M. P. 1997. Tools for populations genetic analyses (TFPGA), version 1.3.
- Miller C. 1993. Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus L.* *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80: 471-498.
- Mirov N. T. 1967. The genus *Pinus*. Ronald Press Co., New York.

- Molina, F., P. Delgado., D. Piñero., N. N. Pérez, and E. Alvarez-Buylla. 2001. Do rare pine need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botanic*, 79: 131-138.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, 90: 589-590.
- Noss, R. F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology*, 4: 355-364.
- Price, R. A., A. Liston. and S. H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of pines. In Ecology and biogeography of *Pinus*. Edited by D. M. Richardson. Cambridge University Press. Cambridge, U.K. pp. 49-68.
- Perry J. L. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon Powell, W., M. Morgante. And C. Andre. 1995a. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 5: 1023-1029.
- Quijada, A., A. liston., P. Delgado., A. Vázquez-Lobo. and E. Alvarez-Buylla. 1998. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of *Pinus rzedowskii* revealed by PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 539-544.
- Raimond M. and F Rousset. 1995. GENEPOP (ver. 1.2): Population genetic software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Slatkin, M. 1995a. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Styles, B. T. 1993. Studies of variation in Central American pines. *Turrialba*, 32:229-242.
- Takesaki, N. and M. Nei. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetics tree from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.
- Tajima F. 1993. Measurement of DNA polymorphism In: Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to molecular paleopopulation biology, Edited by Takahata. N. and Clark A. G., Tokio. Sunderland, M. A: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., p. 37-59.
- Vane-Wright, R. I., C. J. Humphries and P. H. Williams. What to protect?- Systematics and the agony of choice. *Biological Conservation*, 55: 235-254.

- Vendramín, G. G., L. Lelli., P. Rocci., M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5: 595-598.
- Williams C. G., CH. G. Elsil. And R. D. Barnes. 2000. Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. in Zimbabwe. *Heredity*, 89: 261-268.

Anexo VII. Diccionario de Variables

Nombre de las variables	Descripción
1- Clave	Número de referencia del número total de datos de cada campo.
2- Familia	Categoría taxonómica en las que se
3- Género	incluyen las especies (<i>Pinaceae</i>).
4- Especie	Categoría taxonómica en la que se incluyen las especies (<i>Pinus</i>). de las especies en estudio (<i>P.nelsonii</i> , <i>P.rzedowskii</i> , <i>P. maximartinezii</i> , <i>P.pseudostrobus</i> , <i>P. montezumae</i> y <i>P.pinceana</i>)
5- Ambiente	Terrestre
6- Estado	Lugar donde habita la especie.
7- Municipio	Lugar donde habitan las especies.
8- Latitud grados	Ubicación.
9- Latitud minutos	Ubicación.
10- Latitud segundos	Ubicación.
11- Longitud grados	Ubicación.
12- Longitud minutos	Ubicación.
13- Longitud segundos	Ubicación.
16- Tipo_Lec	Tipo de lectura (2)
17- Fuente (GPS)	Toma de datos georeferenciados.
18- Precisión escala	Precisión del geoposicionador que se use.
19- Altitud	Altura de las localidades a nivel del
20- Taxónomo	^{mar} Quien hará la descripción
21- Identificación	Quien identifica la especie
22- Col Ref	Herbario MEXU
23- Población	Nombre del sitio
24- Individuo	Número de individuo
25- Edad (años)	Edad del individuo
26- Altura (m)	Altura del individuo
27- LOCUS1C	Locus de cloroplasto núm 1.
28- LOCUS2C	Locus de cloroplasto núm 2.
29- LOCUS3C	Locus de cloroplasto núm 3.
30- LOCUS4C	Locus de cloroplasto núm 4.
31- LOCUS5C	Locus de cloroplasto núm 5.
32- LOCUS6C	Locus de cloroplasto núm 6.
33- LOCUS1N	Locus nuclear número 1, alelo 1.
34- LOCUS1N	Locus nuclear número 1, alelo 2.
35- LOCUS2N	Locus nuclear número 2, alelo 1.
36- LOCUS2N	Locus nuclear número 2, alelo 2.
37- LOCUS3N	Locus nuclear número 3, alelo 1.

38- LOCUS3N

Locus nuclear número 3, alelo 2.

Nota: Los campos posteriores al 38 son resultados de los análisis de la variación y estructura genética por lo que no se incluyeron en la base de datos, pero se encuentran descritos para cada población y especie en el informe final (*ej. HE*).

PROPUESTAS DE USO Y CRITERIOS CONCRETOS DE CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS CON BASE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Tanto la demografía como la genética son aspectos necesarios para plantear criterios de conservación de especies, particularmente aquellas representadas por tamaños poblacionales pequeños o consideradas en peligro de extinción. La genética de poblaciones por un lado, proporciona información acerca de los procesos históricos y evolutivos que dan lugar a la estructura poblacional de las especies, y la demográfica permite conocer como ha sido su dinámica poblacional. Los resultados de la genética de poblaciones son muy importantes para diseñar planes de manejo de germoplasma ya que en general los genotipos de las poblaciones no se encuentran al azar sino que presentan una estructura espacial y temporal (Hamrick y Holden, 1979). La estructura genética de las especies es el resultado conjunto de la acción de las fuerzas de mutación, selección, migración y deriva genética.

La mayoría de los estudios de genética realizados con especies de pinos sugieren que este grupo de especies, en general presenta una variación genética alta, siendo mayor la variación genética que se ha encontrado dentro de las poblaciones. Nuestros resultados no fueron del todo iguales a los reportados, ya que para varias de las especies se presentaron valores altos de estructura genética, esto es mayor variación genética entre las poblaciones. Los patrones de distribución de la variación genética fueron semejantes a los obtenidos con isoenzimas. Por ejemplo, para *P. rzedowskii* (Delgado *et al.*, 1999), *P. pinceana* (Molina *et al.*, 2000) y *P. maximartinezii* (Ledig 2001). Sin embargo, el uso de microsatélites permitió obtener patrones más claros acerca de la distribución de dicha variación, y por tanto obtener información más fina de la genética de poblaciones para plantear criterios de uso y de conservación particulares y concretos para cada especie estudiada.

Con base a la información disponible podemos proponer dos estrategias específicas de conservación para cada especie, la primera que tiene que ver con la conservación *in situ* que puede ser definida dentro de las poblaciones particulares de cada especie que fueron prioritarias de conservar. Es decir, con base a los tres índices de conservación analizados; demográficos (tamaño poblacional), genéticos (mayor variación genética) y

filogenéticos(mayor importancia evolutiva). La propuesta concreta sería la protección de estas poblaciones definiendo zonas núcleo excluidas de todo tipo de perturbación.

La segunda estrategia de conservación es *ex situ* donde se propone coleccionar germoplasma, polen y tejido vegetativo, por lo menos de las poblaciones que se proponen como prioritarias de conservar. En *P. rzedowskii* existe un problema fuerte en la producción de conos, es mínima a la comparada a la producción de conos que tienen otras especies de pino mexicanas (400 a 700 conos por árbol) (Delgado *et al.*, 1999). Aspecto que también se observó en las poblaciones de *P. nelsonii*. Para esta especie, solo las poblaciones más grandes, como 2Miquihuana, 4Peña Nevada, 3Las Antonias y San Lázaro presentaron producción de conos pero mínima (10 a 20 conos por árbol). Desafortunadamente, para *P. rzedowskii* solo se logró rescatar 10 semillas, y 502 de *P. nelsonii*, de esta última se colectaron 70 conos en total pero el 80% de sus semillas eran abortadas (no terminaron su desarrollo). Por tanto, es esencial rescatar la mayor cantidad de semillas de estas dos especies haciendo inspecciones anuales para recolecta de semillas en los meses de Febrero a Marzo. También sería conveniente tratar de cultivar en vivero y posteriormente establecer sitios de experimentación, hacer pruebas de introducción en otras áreas y ver posteriormente si se logran reincorporar a su hábitat natural.

Como se mencionó en la discusión general, para *P. rzedowskii* se sugiere proteger “*in situ*” a las poblaciones 1Varaloso, ya que es la población que representa los valores medios de los tres índices analizados, la población 4Chiqueritos, que es la que tuvo el valor más alto de importancia para conservar debido en gran parte al tamaño de su población y a la contribución de la variación genética, y la población 2Fresno, que le sigue en prioridad de conservación debido a su importancia filogenética. Afortunadamente, para esta especie ya existe un convenio formal para su conservación “*in situ*”, por parte de la SEMARNAP (antes CEDESOL) y de los dueños de los predios. El criterio de conservación está basado en la exclusión de todo tipo de perturbación antropogénica. Al no explotar o perturbar estos sitios, los dueños de los predios pueden adquirir concesiones para explotar otras especies de árboles, pero con el compromiso de reforestar dichas áreas taladas (por ejemplo, de otras especies de *Pinus* u *Quercus*). Este criterio general que ellos están manejando desde 1993, puede ser complementado con la información obtenida en el presente estudio, donde la estrategia concreta de conservación “*in situ*” para esta especie sería, excluir de toda perturbación a las

poblaciones 1 Varaloso, 4 Chiqueritos y 2 Fresno, ya que fueron las poblaciones más importantes de conservar por su densidad, mayor variación genética y mayor importancia filogenética y por tanto tratar de obtener germoplasma de dichas poblaciones. Al aplicar esta medida de conservación (por lo menos para esas tres poblaciones) se garantiza teóricamente el mantenimiento a largo plazo de la riqueza biológica de la especie.

P. nelsonii esta representada por un mayor número de poblaciones que *P. rzedowskii* y tiene tamaños poblacionales mayores por lo cual las estrategias de conservación deberían ser menos rigurosas. Sin embargo, esta especie tiene gran relevancia filogenética, al ser una de las especies que forman la base del origen del subgénero *Strobus* o pinos blandos (Liston *et al.*, 21999; Gerald *et al.*, 2001). Lo que implica que deben de conservarse tanto poblaciones grandes como pequeñas. Con base a los índices de conservación encontramos dos poblaciones que son las más prioritarias de conservar que son 7Taponá, que tiene valores medios de variación genética y de mayor importancia filogenética que el resto de las poblaciones, y la población 2Miquihuana, en la cual su importancia de conservación queda en segundo término por tener un tamaño poblacional mayor. Con la conservación “*in situ*” mínima de estas dos poblaciones se podría rescatar a la especie. Sin embargo, las posibilidades de conservar a la mayoría de las poblaciones es muy factible, debido a que las personas dueñas de los predios donde habita la especie tienen gran disposición para trabajar en la conservación y uso de este recurso. *P. nelsonii* es una especie que produce semillas comestibles llamadas “piñones”, por lo que los lugareños requieren de apoyo técnico y económico para explotar este recurso. Es decir, se puede implementar una estrategia de uso de las semillas para su comercialización y paralelamente conservar estos sitios con base a la producción de planta en vivero y reforestación de dichos sitios.

En concreto el criterio de uso y conservación para *P. nelsonii* sería, la implementación de un banco de germoplasma central, ubicado en la población 2Miquihuana en el estado de Tamaulipas, lugar en donde se encontró el mayor número de poblaciones de esta especie. Aunado a la implementación de un vivero para cada sitio. Esta estrategia podría ser aplicada bajo un convenio entre la SEMARNAP y los lugareños, donde los dueños de los predios se comprometerían a realizar la colecta de semillas, producción de planta y reforestación de los sitios, y por parte de la SEMARNAP, se requeriría de apoyo técnico y económico para que los lugareños trabajen en los viveros y para la comercialización de semillas a largo plazo.

Para *P. montezumae* la población T11 que se distribuye en Guatemala, es la que debe de ser prioritaria de conservar, esto por el efecto del tamaño de la población que es pequeño, pero en general todas las poblaciones son de diversidad genética alta, tamaños poblacionales grandes y de importancia filogenética semejante. Situación que se repite con las poblaciones de *P. pseudostrobus*, siendo nuevamente una población de Guatemala (G12) la prioritaria de conservar. Sin embargo, la presencia de sitios de introgresión entre estas especies implica que estos pueden tener efecto en la extinción de poblaciones locales que sean puras de las especies, como es el caso de *P. pseudostrobus* para la cual la mayoría de las poblaciones híbridas se traslapan. Este proceso de introgresión muy probablemente ha sido acelerado por la alta deforestación de los bosques donde habita la especie, ya que *P. pseudostrobus* es la principal especies de pino explotada en México para su comercialización dentro y fuera del país. Por tanto, es de gran importancia la conservación tanto de poblaciones puras de *P. pseudostrobus* como de poblaciones híbridas, que son centros de diversificación importantes, como es el caso de la población 4E para la que los tres criterios de conservación tuvieron valores de 1, es decir esta población puede ser el principal centro de diversificación de una nueva variedad o subespecie.

En el caso de la única población de *P. maximartinezii*, se requiere de su conservación tanto *in situ* como *ex situ*: al existir solo una población en todo el mundo, al ser representada por ^z 6000 individuos adultos y juveniles, tener valores altos de diversidad genética y de única importancia filogenética, nos permite suponer que es una especie de reciente formación y por tanto se requiere de la implementación a corto plazo de estrategias para su conservación. Aparentemente, existe un programa de conservación “*in situ*” de esta especie, donde no se otorgan concesiones para la tala de estos árboles ni para la colecta de semillas. Sin embargo, aunque esta estrategia podría permitir el mantenimiento y crecimiento de esta población, se requiere de la prohibición de pastoreo, ya que se observó ganado por toda la zona y esto puede estar destruyendo plántulas o árboles pequeños (menores de 10 años). Además, debe de regularse la colecta de semillas, ya que esta si se presenta de manera incontrolada lo que permite la venta de semilla sin autorización.

Aunado a lo anterior, además de que *P. maximartinezii*, es una especie rara y única en el mundo, es un pino de uso ornamental llamado “pino azul”, sus acículas primarias le

inferen esa tonalidad única. Esto implica que se puede plantear una estrategia de uso y conservación “ex situ”, como sería la colecta de semillas para la formación de plantaciones experimentales. También se pueden hacer pruebas de introducción en otras áreas donde esta especie pueda establecerse, y producir árboles de ornato. Con esto, se podrían cubrir dos aspectos centrales para su conservación 1) terminar con la extracción clandestina o incontrolada de semillas, y 2) permitir que de forma natural se continúe con la dinámica evolutiva de la única población que representa a esta especie.

Para *P. pinceana* se sugiere proteger in situ a las poblaciones 3 Huizache y 4 Guadalcazar, las dos poblaciones contienen iguales valores de importancia filogenética (de 1), pero la segunda población contiene los valores más altos de variación genética por lo que su mayor contribución se debió a dos índices, de diversidad genética y de importancia filogenética. Además en este caso particular, al presentaron grupos de poblaciones finamente estructuradas de acuerdo a su distribución geográfica se sugiere proteger al menos una de las dos poblaciones de cada parche, preferentemente las que representan la mayor variabilidad genética. Entonces, consideramos que proponer a las poblaciones 3Huizache, 4Guadalcazar 1Sierra de Parras y 5San Joaquín, como prioritarias de conservar podrían representar la riqueza genética y filogenética de la especie. La conservación *ex situ*, se basaría en la colecta de semillas de las poblaciones seleccionadas como prioritarias de conservar y de ser posible formar parte de un banco de germoplasma, que anteriormente se propuso implementar en el estado de Tamaulipas para *P. nelsonii*.

La implementación de un banco de germoplasma central es de suma importancia tanto para el rescate de semillas de diversas especies de pinos (muchas de las cuales son únicas y endémicas de nuestro país), así como para generar gran cantidad de trabajos de investigación pura y aplicada (sobre aspectos de viabilidad, germinación y calidad de las semillas, de la fenología de las especies, análisis de plagas, perturbación, asociaciones biológicas, etc), que permitan plantear estrategias de manejo múltiple y sustentable para la conservación a largo plazo de esta riqueza biológica.