



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE
Pinus cembroides DE LA REGIÓN CENTRO DE MÉXICO**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

SANDRA LUZ FUENTES AMARO



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Bajo la dirección de:

Dr. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

Chapingo, Estado de México, Marzo 2018



Instituto de Horticultura

“Diversidad y estructura genética en poblaciones de *Pinus cembroides* de la región centro de México”

Tesis realizada por Sandra Luz Fuentes Amaro, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



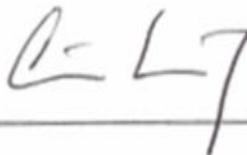
Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR:



Dr. Carlos Ramírez Herrera

ASESOR:



Dr. César Luna Morales

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ANEXOS	vii
DEDICATORIAS	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Características de <i>P. cembroides</i>	4
2.2. Diversidad genética y su importancia	5
2.3. Medidas de diversidad genética	6
2.3.1. Parámetros dentro de las poblaciones	7
2.3.2. Parámetros entre poblaciones	8
2.4. Medidas de asociación	13
2.4.1. Similitud	13
2.4.2. Análisis de agrupamiento	14
2.4.3. Análisis de Coordenadas Principales	15
2.5. Aislamiento por Distancia	15
2.6. Marcadores moleculares: ISSR	16
2.7. Factores que determinan la diversidad genética	17
2.7.1. Mutación	17
2.7.2. Selección	17
2.7.3. Deriva génica	18
2.7.4. Flujo genético	19

2.7.5. Otros factores que influyen en los niveles de diversidad genética en especies de plantas.....	19
2.8. Estudios de diversidad genética del género <i>Pinus</i>	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Colecta del material vegetal de <i>P. cembroides</i>	23
3.2. Extracción de ADN	25
3.3. Condiciones de PCR	26
3.4. Electroforesis y obtención de datos	28
3.5. Análisis de datos.....	29
3.5.1. Huella genética de las poblaciones	29
3.5.2. Diversidad genética	29
3.5.3. Estructura genética, diferenciación e individuos migrantes	30
3.5.4. Análisis de agrupamiento de individuos	30
3.5.5. Prueba de Mantel	30
4. RESULTADOS	32
4.1. Huella genética de las poblaciones	32
4.2. Diversidad genética	36
4.3. Análisis de agrupamiento de los individuos	38
4.4. Diferenciación entre las poblaciones	41
4.4.1. Distancia genética	41
4.4.2. Estructura genética entre las poblaciones.....	42
4.4.3. Modelo de aislamiento por distancia	43
V. DISCUSIÓN.....	45
5.1. Huella genética de las poblaciones	45
5.2. Diversidad genética	45
5.2. Estructura y diferenciación genética	48
5.3. Análisis de Agrupamiento	49
5.4. Aislamiento por distancia.....	50
VI. CONCLUSIONES.....	51
VII. LITERATURA CITADA	52
VIII. ANEXOS.....	61

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Componentes del Análisis de Varianza Molecular.	13
Cuadro 2. Sitios de colecta de material vegetal de <i>P. cembroides</i>	24
Cuadro 3. Iniciadores para obtener huellas genéticas de las poblaciones.	27
Cuadro 4. Características de los iniciadores ISSR utilizados en los individuos. 28	
Cuadro 5. Distancia geográfica entre las poblaciones de <i>P. cembroides</i> , en Km.	31
Cuadro 6. Número de bandas que se generaron con los iniciadores y porcentaje de polimorfismo.....	33
Cuadro 7. Matriz de Similitud entre las poblaciones utilizando el índice de Dice.	34
Cuadro 8. Iniciadores utilizados para el análisis de los individuos de poblaciones de <i>P. cembroides</i>	37
Cuadro 9. Parámetros de diversidad genética evaluados en las poblaciones de <i>P. cembroides</i>	38
Cuadro 10. Distancia genética de Nei (bajo la diagonal) e Identidad Genética de Nei (sobre la diagonal) para las ocho poblaciones de <i>P. cembroides</i> evaluadas.	41
Cuadro 11. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las ocho poblaciones de <i>P. cembroides</i> evaluadas.....	43
Cuadro 12. Valores obtenidos de la prueba de Mantel.	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Poblaciones de <i>P. cembroides</i> que se incluyeron en la presente investigación.	23
Figura 2. Calidad de ADN de cuatro muestras de <i>P. cembroides</i> . M, marcador de peso molecular; 1,2,3,4 muestras analizadas.	25
Figura 3. Patrones de bandas que se obtuvieron para las ocho poblaciones de <i>P. cembroides</i> con el iniciador P1.	32
Figura 4. Dendrograma generado a partir de la matriz de similitud de las poblaciones de <i>P. cembroides</i> , mediante el método UPGMA.	35
Figura 5. Gráfica de las dos principales coordenadas derivada del análisis de huella genética con ISSR.	36
Figura 6. Patrones de bandeo para todos los individuos de las ocho poblaciones de <i>P. cembroides</i> con el iniciador 7941.	37
Figura 7. Gráfico de las dos Coordenadas Principales derivada del análisis con ISSR de ocho poblaciones de <i>P. cembroides</i>	40
Figura 8. Dendrograma basado en la Distancia Genética de Nei (1972), usando el método UPGMA para ocho poblaciones de <i>P. cembroides</i>	42
Figura 9. Prueba de Mantel que muestra la correlación entre distancia genética y distancia geográfica para las poblaciones de <i>P. cembroides</i>	44

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. PURIFICACIÓN DE ADN CON EL MÉTODO CTAB	61
ANEXO B. DENDROGRAMA MOSTRANDO LAS RELACIONES ENTRE LOS INDIVIDUOS DE OCHO POBLACIONES DE <i>P. CEMBROIDES</i>	63

DEDICATORIAS

A mi madre, por ser una gran inspiración y una admirable persona.

A mi familia, a quien agradezco el apoyo que me han dado siempre.

A Víctor, con quien estoy agradecida por el apoyo que me ha brindado en todo este tiempo.

A Caro, quien alegra mis días.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para los estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Fitotecnia por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Juan Porfirio Legaria Solano por toda la paciencia y apoyo para realizar el presente trabajo.

Al Dr. Carlos Ramírez Herrera por las observaciones y sugerencias al presente trabajo y por la donación del material vegetal de La Amapola, S.L.P.

Al Dr. César Luna Morales por las observaciones y sugerencias al presente documento.

A las autoridades ejidales de las comunidades donde se recolectó el material vegetal, por otorgar el permiso para realizar la colecta del follaje.

RESUMEN

Diversidad y estructura genética en poblaciones de *Pinus cembroides* de la región centro de México

Con el objetivo de evaluar los niveles y patrones de variación genética de *P. cembroides* Zucc., ocho poblaciones de la región centro de México, fueron analizadas mediante marcadores ISSR. Los iniciadores utilizados generaron un total de 154 bandas, de las cuales el 94 % fueron polimórficas, considerando a todos los individuos de las poblaciones. Se encontró alta diversidad genética ($H_e = 0.22$), un porcentaje de polimorfismo promedio de 59.2 % y un grado de diversidad de 33.0 % medido por el índice de Shannon. Las poblaciones en donde se detectó una mayor diversidad fueron las que se distribuyen en la Sierra Madre Oriental. La mayor parte de la variación se encontró dentro de las poblaciones (74 %), por lo que sólo el 26 % de la variación se halló entre las poblaciones. Además se encontró diferenciación entre las poblaciones ($G_{ST} = 0.28$) estudiadas y flujo génico reducido ($N_m = 1.27$). No hubo correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética.

Palabras clave: marcadores, iniciadores, polimorfismo, flujo génico, distancia genética.

ABSTRACT

Diversity and genetic structure in populations of *Pinus cembroides* of the central region of México

With the objective of evaluating the levels and patterns of genetic variation of *P. cembroides* Zucc., eight populations of the central region of Mexico, were analyzed by ISSR markers. The primers used generated a total of 154 bands, of which 94 % were polymorphic, considering all the individuals. High genetic diversity was found ($H_e = 0.22$), an average polymorphism percentage of 59.2 % and as well as 33 % degree of diversity measured by the Shannon index. The populations distributed in Sierra Madre Oriental showed the greatest genetic diversity. Most of the variation was found within the populations (74 %), so that only 26 % of the variation was found among the populations. In addition, there is differentiation between the populations ($G_{ST} = 0.28$) studied and low gene flow between the populations ($N_m = 1.27$). No correlation was found between geographic distance and genetic distance.

Key words: markers, primers, polymorphism, genetic flow, genetic distance.

1. INTRODUCCIÓN

En México el género *Pinus* es relevante debido a que se considera el país con mayor diversidad de especies de éste género, al contar con el 42 % de las especies que existen en el mundo (Sánchez-González, 2008). Una de las especies ampliamente distribuidas es *Pinus cembroides* Zucc., la cual es la especie de pino piñonero de mayor importancia económica en México (Luna-Cavazos, 2008).

En México se requiere un mayor número de trabajos que evalúen la diversidad genética con la que cuentan las especies. En lo que respecta al género *Pinus*, la mayoría de los trabajos se han enfocado sobre especies en alguna categoría de riesgo, como *P. rzedowski* Madrigal & Caball., *P. maximartinezii* Rzedowski, y *P. pinceana* Gordon; sin embargo es importante estimar estos parámetros para las especies de importancia económica y social , ya que se considera que estimar la diversidad y estructura genética en las especies es esencial para definir las estrategias de mejora genética, conservación y manejo de los recursos genéticos (Furnier, 2004; Loo, 2011).

Actualmente se prefieren los análisis genéticos para estimar el polimorfismo presente en el ADN, debido a la abundancia y a que no son afectados por el ambiente (Valadez *et al.*, 2002). El marcador molecular se elige con base, entre otros, en el objetivo de la investigación y de los recursos disponibles (De Vicente *et al.*, 2004). Los ISSR son marcadores dominantes, son altamente polimórficos, de bajo costo, no se requiere información sobre la secuencia de la especie en cuestión y son reproducibles (Rocha *et al.*, 2014).

Para *P. cembroides* se tiene información de diversidad genética medida a nivel de cloroplasto (Cuenca, 2003) y también de poblaciones del Norte del país usando AFLP (Wehenkel, 2015), por lo que el presente trabajo pretende complementar la información genética de la especie, al evaluar la diversidad genética en ADN nuclear y en poblaciones del centro del país.

De acuerdo a trabajos previos se espera que las coníferas muestren altos niveles de diversidad genética, debido entre otras cosas, a que tienen varios mecanismos que promueven el apareamiento cruzado (Ledig and Conkle, 1983), lo que permite un flujo genético más eficiente entre las distintas poblaciones (Delgado *et al.*, 1999). En cuanto a la estructura genética, las especies de pino que se distribuyen como poblaciones aisladas dispersas tienen una mayor diversidad genética entre las poblaciones, mientras que los pinos distribuidos más extendidos y continuos tienen menos diversidad entre las poblaciones (Hamrick *et al.*, 1992, Ledig *et al.*, 2001). Los pinos piñoneros muestran estimados de diferenciación altos ($F_{st} \geq 0,15$), asociado probablemente con bajas densidades, dispersión de semillas por aves y resistencia a sequía (Delgado *et al.*, 2002).

1.1. Objetivos

- Evaluar la diversidad y estructura genética en poblaciones de *P. cembroides* de la región central de México con los marcadores ISSR.
- Determinar la relación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas.

1.2. Hipótesis

- Se espera encontrar una alta diversidad genética, distribuida principalmente dentro de las poblaciones debido a la amplia distribución de la especie, el sistema de apareamiento, y la dispersión por animales.
- Se espera que las poblaciones geográficamente cercanas presenten mayor relación genética debido a un mayor flujo de genes entre las mismas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Características de *P. cembroides*

P. cembroides pertenece al subgénero Haploxylon, sección Paracembra, Subsección Cembroides. Ésta sección incluye a los taxa de piñoneros mexicanos, que se caracterizan por tener verticilos de 1 a 5 agujas con una longitud de 2 a 9 cm, generalmente enteras, y grandes semillas no aladas (Perry, 1991). *P. cembroides* es un árbol perennifolio de 5 a 15 metros de altura, de copa redondeada o piramidal. El tronco suele ser corto y el ramaje raro. Las ramas grandes comienzan desde poca altura y son extendidas y en su mayoría verticiladas (Martínez, 1948).

P. cembroides está ampliamente distribuido en México. En la Sierra Madre Occidental, su rango va desde Estados Unidos (Arizona y Nuevo México), hacia el sur en los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes y Jalisco. También se distribuye hacia el oeste en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Querétaro e Hidalgo. En la Sierra Madre Oriental su distribución se extiende desde la frontera de Estados Unidos (Texas) hacia el sur en los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Perry, 1991).

Los piñoneros ocupan una zona climática característica, semiárida y cálido-templada. Esta zona está comprendida entre pinares arriba y el desierto de zonas áridas abajo, y forma el límite más bajo del bosque (Vázquez, 1977).

Los pinos piñoneros son de gran relevancia para las zonas áridas del país, ya que algunas veces constituyen el único recurso forestal presente, del cual los pobladores locales obtienen madera para leña o construcción, alimento y ganancias económicas por el aprovechamiento del piñón (Villarreal *et al.*, 2009).

P. cembroides se considera una especie con un alto valor económico, social y ecológico en México, incluida en la lista de especies prioritarias del bosque de coníferas, de las cuales es prioridad caracterizar la diversidad genética y desarrollar paquetes tecnológicos, que permitan el uso eficiente de la especie e influir en su conservación (FAO, 2011).

P. cembroides es la especie de pino piñonero de mayor importancia en México y el más ampliamente distribuido. Ocupa casi siempre zonas de transición entre la vegetación xerófila de climas áridos y la boscosa de las montañas más húmedas (Rzedowski, 1978; Luna-Cavazos, 2008).

2.2. Diversidad Genética y su importancia

La diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Piñero, 2008); dicha variación entendida como los cambios en la secuencia de los cuatro pares de bases del ADN que conforman el código genético de los individuos (De Vicente *et al.*, 2004).

La importancia de la variación genética que existe entre y dentro de las especies radica en que ésta determina en gran medida patrones estacionales de crecimiento y mecanismos fisiológicos de resistencia a la sequía o heladas, los cuales son producto de la evolución de las especies y procedencias a las condiciones ambientales de sus sitios de origen (Zobel y Talbert, 1992).

Además, dentro de las poblaciones, la cantidad y distribución de la variación genética es crucial para la estabilidad a largo plazo de los ecosistemas forestales (Loo, 2011). Hughes y colaboradores (2008) encontraron que la diversidad genética tiene efectos significativos sobre procesos ecológicos tales

como la productividad primaria, la recuperación de las poblaciones ante el disturbio, estructura de la comunidad, entre otras.

En las poblaciones naturales se encuentra la principal (y en algunos casos la única) fuente de variación genética para satisfacer las necesidades de los programas de reforestación, plantación y de mejoramiento genético forestal. Estimar la diversidad y estructura genética en las especies es un requisito previo para definir las estrategias de mejora genética, conservación y manejo de los recursos genéticos (Furnier, 2004; Loo, 2011).

Se considera que las especies con amplia distribución como lo es *P. cembroides*, son comúnmente una colección de poblaciones. Las poblaciones locales están regularmente adaptadas a su ambiente. Estos recursos genéticos locales contribuyen a la productividad del bosque que, por supuesto, es un valor económico básico. A sí mismo, los recursos genéticos forestales son necesarios para enfrentar los nuevos ambientes (cambio climático), nuevos mercados, nuevas amenazas, nuevos productos y un nuevo entorno económico (Ledig, 2004).

2.3. Medidas de diversidad genética

Los parámetros que miden la diversidad genética pueden ser estimados a tres niveles: dentro de las especies, dentro de las poblaciones y entre las poblaciones. Las medidas de diversidad dentro de las especies estiman el total de la diversidad genética presente en las especies. La diversidad genética dentro de las poblaciones está en función de la diversidad genética total dentro de las especies y la proporción de la diversidad genética total encontrada entre sus poblaciones. Dado que dos especies con la misma cantidad de variación genética pueden tener muy diferentes niveles de diversidad genética

intrapoblacional, dependiendo de cómo esté distribuida la variación entre las poblaciones (Berg and Hamrick, 1997).

2.3.1. Parámetros dentro de las poblaciones

Diversidad alélica

La diversidad alélica de un locus es el número de alelos por locus (A) considerando tanto *loci* monomórficos como polimórficos. Una medida más restrictiva y más informativa es el número promedio de alelos por locus polimórfico (AP), en el cual solo se cuenta el número de alelos en *loci* polimórficos. Las medidas de AP son siempre mayores o iguales que A, debido a que *loci* monomórficos tienen solo un alelo. AP es más informativo que A, debido a que AP es independiente de la proporción de *loci* polimórficos (Berg and Hamrick, 1997).

Proporción de *loci* polimórficos

La proporción de *loci* polimórficos se define como la proporción de *loci* que son polimórficos respecto del total de *loci* evaluados en una muestra. Se calcula con la fórmula siguiente (Hedrick, 2011):

$$P = \frac{x}{m}$$

Donde x es el número de *loci* polimórficos en una muestra de m *loci*. El porcentaje de *loci* polimórficos es un parámetro heurístico útil para comparar especies o poblaciones. La utilidad de este parámetro depende del número de

loci encuestados y está en función del tamaño de muestra de la población porque se pueden observar alelos de baja frecuencia en muestras de población más grandes (Berg and Hamrick, 1997).

Heterocigosidad promedio esperada (Diversidad genética de Nei)

La heterocigosidad promedio esperada “ H_e ” (o Diversidad genética de Nei) es la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí. La heterocigosidad promedio es una de los mejores parámetros para evaluar la diversidad genética por las propiedades con las que cuenta. La heterocigosidad en un locus se define como (Nei, 1975):

$$h = 1 - \sum x_i^2$$

Donde:

h = la heterocigosidad por locus;

x_i^2 = frecuencia del i -th alelo;

2.3.2. Parámetros entre poblaciones

Distancia genética

Las medidas de distancia genética se pueden clasificar en 2 grupos: las basadas en un modelo geométrico (distancias de Cavalli-Sforza y de Rogers) y las basadas en modelos con consideraciones biológicas (Distancias de Nei) (Winzer *et al.*, 2010).

Una de las medidas de distancia genética más usada es la distancia de Nei. Para un locus en particular con n alelos, la identidad genética está dada por (Nei, 1975):

$$I_N = \frac{J_{xy}}{(J_x J_y)^{1/2}}$$

Donde:

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^n p_{ix} p_{iy}$$

$$J_x = \sum_{i=1}^n p_{ix}^2$$

$$J_y = \sum_{i=1}^n p_{iy}^2$$

y p_{ix} y p_{iy} son las frecuencias del i-th alelo en la población X y Y. La distancia genética entre dos poblaciones es entonces definida como:

$$D_N = -\ln(I_N)$$

D_N toma valores de cero cuando las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, a infinito, para poblaciones que no comparten ningún alelo (Hedrick, 2005)

Diferenciación genética (G_{ST})

Una de las medidas de diferenciación poblacional es G_{ST} , que se denomina coeficiente de diferenciación genética, donde (Nei, 1975):

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

D_{ST} = promedio de la diversidad genética en las subpoblaciones,

$$D_{ST} = \sum_i \left[\sum_k p_{ik}^2 - \sum_k \left(\sum_i p_{ik} / n \right)^2 \right]$$

H_T = diversidad genética en el total de la población

$$H_T = 1 - \sum_k \left(\sum_i p_{ik} / s \right)^2$$

El estimador G_{ST} es una buena medida de la diferenciación entre las poblaciones, es altamente dependiente de la cantidad de variación que hay dentro de las poblaciones y del total de la población (Nei, 1975).

Estructura Genética

La estructura genética es definida como las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. Cuando se habla de una especie con alta estructura genética, significa que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. En contraste, en una especie con baja estructura genética, las poblaciones que la constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas. Aunque existen varios métodos para estimar la estructura genética es importante señalar que están relacionados entre sí, y simplemente se basan en analizar las diferencias en las frecuencias alélicas (Eguiarte *et al.*, 2010).

Estadísticos F

Las medidas más antiguas y más utilizadas para la diferenciación genética son los estadísticos F, que engloba F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} , los cuales se describen a continuación (Allendorf *et al.*, 2013).

F_{IS} es una medida de desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg (H-W) dentro de las subpoblaciones locales.

$$F_{IS} = 1 - (H_o/H_s)$$

Donde H_o es la heterocigosidad promedio observada a través de las subpoblaciones; y H_s es la heterocigosidad promedio observada a través de las subpoblaciones.

F_{ST} es una medida de la divergencia de la frecuencia de alelos entre subpoblaciones; $F_{ST} = 1 - (H_s/H_T)$

Donde: H_s es la heterocigosidad promedio observada a través de las subpoblaciones. H_T es la diversidad génica total o la heterocigosidad H-W esperada en la población total si fuera panmíctica.

F_{IT} es una medida de la desviación general de las proporciones de HW en toda la población base (o especie) debido tanto al apareamiento no aleatorio dentro de las subpoblaciones locales (F_{IS}), como a la divergencia de frecuencias de alelos entre subpoblaciones (F_{ST}), por lo que se define como (Allendorf *et al.*, 2013):

$$F_{IT} = 1 - (H_o/H_T)$$

Análisis de varianza molecular (AMOVA)

La estimación de la diversidad entre poblaciones es generalmente estimada con un AMOVA (Φ_{ST}) y/o Nei's G_{ST} en estudios basados en marcadores dominantes (Nybom, 2004). Para el AMOVA se tiene:

Para i = individuos, j = alelos, k = poblaciones:

$$Y_{ki(j)} = \mu + A_k + B_{k(i)} + W_{ki(j)}$$

Donde:

$Y_{ki(j)}$ = un valor entre 0 y 1 para el j -ésimo alelo del i -ésimo individuo de la k -ésima población.

A_k = el efecto de la k -ésima población.

$B_{k(i)}$ = el efecto del i -ésimo individuos dentro de la k -ésima población, con varianza σ^2_a .

$W_{ki(j)}$ = el efecto del j -ésimo locus del i -ésimo individuos de la k -ésima población, con varianza σ^2_w .

n = el producto de i , j y k ; es decir, el número total de observaciones.

En el Cuadro 1 se muestran algunos de los componentes a obtener del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

Cuadro 1. Componentes del Análisis de Varianza Molecular.

Fuente de variación	GI	SC	CME
Entre poblaciones	(k-1)	$\sum X...K^2/ij - X...^2/ijk$	$\sigma^2w+2 \sigma^2b+2n$ σ^2a
Entre individuos/pobl.	k(i-1)	$\sum \sum Xi...k^2/j - \sum ...k^2/ij$	$\sigma^2w+2 \sigma^2b$
Dentro de individuos	ki(j-1)	$\sum \sum \sum Xijk^2 - \sum \sum Xi...k^2/j$	σ^2w
Total	kij-1	$\sum \sum \sum Xijk^2 - X...^2/ijk$	

GI= grados de libertad. SC = Suma de Cuadrados. CME = Cuadrados Medios del Error.

2.4. Medidas de asociación

2.4.1. Similitud

Un objetivo frecuente suele ser la descripción del grado de parecido que hay entre las OTUs. Para ello será necesario medir ese grado de similitud, cuanto más parecidas sean dos muestras, mayor será su asociación. Para datos binarios es usual trabajar con medidas de asociación. Entonces, para caracterizar a dos OTUS existen 4 valores a considerar (Winzer *et.al.*, 2010):

a = N° de caracteres donde ambas muestras coinciden en el «1»;

b = N° de caracteres donde la primera muestra tiene un «1» y la otra un «0»;

c = N° de caracteres donde la primera muestra tiene un «0» y la otra un «1»;

d = N° de caracteres donde ambas muestras coinciden en el «0». La suma de estos 4 valores dará el total de caracteres medidos.

Si los datos son de presencia/ausencia, un criterio válido es considerar que dos muestras son más parecidas cuantos más «unos» compartan. Uno de los índices más usados son el de Jaccard y el índice de Dice (Winzer *et.al.*, 2010):

- Índice de Dice:

$$D_{12} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

Es la proporción de caracteres co-presentes respecto al promedio de los caracteres presentes en cada OTU.

- Índice de Jaccard

$$J_{12} = \frac{a}{a+b+c}$$

Es la proporción de caracteres presentes que comparten, respecto al total de caracteres presentes en las dos OTUS.

2.4.2. Análisis de agrupamiento

Esta técnica tiene como objetivo formar grupos de muestras, poblaciones, individuos u OTUs que sean similares entre sí y diferentes a los elementos de los otros grupos (Winzer *et al.*, 2010). Los tres métodos principales de agrupamiento son (De Vicente *et al.*, 2004):

-Ligamiento simple (o del 'vecino más cercano'): este método minimiza la distancia entre grupos al tomar la distancia al vecino con el que presenta mayor similitud.

-Ligamiento completo (o del 'vecino más lejano'): con éste procedimiento se maximiza la distancia entre grupos al tomar la distancia al vecino con el que presenta menor similitud.

-Ligamiento promedio (o UPGMA): con este método se minimiza la distancia entre grupos, ya que toma la distancia promedio de todos los pares entre los individuos de la muestra.

2.4.3. Análisis de Coordenadas Principales

El análisis de Coordenadas Principales (ACOP) es un método de ordenación. La ordenación es la disposición o 'arreglo' de las unidades de muestra en sistemas de coordenadas. Este análisis complementa el análisis de agrupamiento y casi siempre se le considera como una estrategia que más se aproxima a la realidad biológica. El análisis de coordenadas principales pretende representar las distancias entre muestras y puede dar cabida a matrices de diferentes medidas de disimilitud. Maximiza la correlación lineal entre distancias de muestras. (De Vicente *et al.*, 2004).

2.5. Aislamiento por Distancia

Cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia, generalmente se espera que las poblaciones más cercanas geográficamente también sean las más parecidas genéticamente, ya que se supone que el flujo génico debe ser más probable entre las poblaciones contiguas que entre las más lejanas. A esta idea se le conoce como "aislamiento por distancia" (Wright, 1943) y nos dice que los individuos tienden a aparearse más con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría si los cruzamientos fueran al azar en toda la distribución de la especie. Si existe una correlación positiva significativa entre la distancia geográfica y la genética, existe evidencia de aislamiento por

distancia, esto es, que el flujo génico es limitado y localizado (Eguiarte *et al.*, 2010).

Con el fin de saber si una especie sigue un modelo de aislamiento por distancia, se puede hacer una comparación formal con, por ejemplo, una prueba de Mantel (1967). La distancia genética puede ser directamente la distancia genética de Nei, o con las estimaciones de Nm pareadas (Piñero, 2008).

2.6. Marcadores moleculares: ISSR

Un marcador es una secuencia de ADN, una molécula identificable o incluso una característica morfológica que puede ser asociada con un locus particular (Loo, 2011). Se considera que un buen marcador debe ser: • Polimórfico, es decir, variable en un grupo de individuos. • Reproducible • Codominante • Distribuido de manera uniforme en todo el genoma. • Discriminante, o sea, capaz de detectar diferencias entre individuos estrechamente relacionados. • No sujeto a influencias ambientales. • Neutral, el alelo presente en el locus del marcador es independiente de la presión de selección que se ejerce sobre el individuo y no tiene ningún efecto sobre ella (suele ser una suposición) y • De bajo costo (De Vicente *et al.*, 2003).

Los ISSR (Inter Simple Sequence Repeat, por sus siglas en inglés) son marcadores dominantes, lo que quiere decir que bajo el modelo de un locus con dos alelos, la presencia de una banda representa al genotipo dominante (tanto homócigo como heterócigo), mientras que una ausencia de la banda representa al genotipo homócigo recesivo. Los ISSR amplifican fragmentos que se ubican entre las repeticiones de secuencias simples, también llamadas microsatélites. Los iniciadores de ISSR suelen ser de 16 a 25 pares de bases (pb) y están conformados por una secuencia repetida de un di- o tri-nucleótido complementario al microsatélite (Rocha, 2014).

Las principales ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad. Así también, no son necesarias altas concentraciones de ADN. Aunado a lo anterior, son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos. Una de sus principales desventajas es que, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterocigos de los homocigos debido a que son marcadores dominantes (González y Aguirre, 2007).

2.7. Factores que determinan la diversidad genética

2.7.1. Mutación

La mutación se refiere al proceso de alteración de un gen o cromosoma y su producto, el estado alterado de un gen o cromosoma (Futuyma, 2005). Se considera la fuente original de variación genética en una población (Hedrick, 2005). Las mutaciones pueden ser favorables o desfavorables. Muchas serán desfavorables y desaparecerán. No obstante, si son convenientes para el individuo, entonces las frecuencias de ese alelo aumentarán de generación en generación. Además, esta mutación puede migrar hacia otras poblaciones y propagarse (De Vicente *et al.*, 2004).

Es importante reconocer que las tasas de mutación son a menudo muy bajas y los cambios de frecuencia de los gametos causados por la mutación son inversamente proporcionales al tamaño de la población, por lo que la mutación generalmente hace una contribución modesta a los niveles generales de desequilibrio gamético (Hamilton, 2009).

2.7.2. Selección

La cantidad y naturaleza de la variación fenotípica a su vez determinan el grado de variación en la supervivencia, la fecundidad, la capacidad de

apareamiento y otros factores que determinan si los alelos de un individuo particular pasaran a las generaciones futuras. Por lo que la selección se puede definir como la habilidad relativa de diferentes genotipos para transmitir sus alelos a las generaciones futuras (Hedrick, 2005). Es un mecanismo evolutivo que genera un cambio en las frecuencias relativas de los fenotipos/genotipos, de acuerdo a su adaptación relativa dentro de la población. La selección positiva balanceadora promueve la diversidad genética y la selección negativa disminuye o purga esta diversidad eliminando las variantes de la población (Castillo, 2007).

2.7.3. Deriva génica

La deriva genética es un cambio aleatorio en las frecuencias de los alelos de generación en generación debido a un error de muestreo. Es decir, el número finito de genes transmitidos a la progenie será una muestra imperfecta de las frecuencias de los alelos en los progenitores (Allendorf, 2013). El efecto del tamaño de la población tiene implicaciones importantes para el caso de la deriva genética, ya que ésta actúa más rápido en poblaciones pequeñas que en grandes poblaciones. Cuando una población experimenta un cuello de botella, es decir el tamaño de la población es pequeño, muchos alelos se fijan y otros se pierden. Como consecuencia mucha de la variación genética de la población se pierde (Nielsen and Slatkin, 2013).

La deriva genética y la selección son las dos más importantes causas de la sustitución de alelos en las poblaciones. Las fluctuaciones al azar en la frecuencia de los alelos pueden resultar en el reemplazo de alelos viejos por alelos nuevos resultando en adaptación no adaptativa. La deriva genética tiene muchas consecuencias importantes, especialmente a nivel genético molecular: parece ser la causa de gran parte de la diferencia en las secuencias de ADN entre las especies (Futuyma, 2005).

2.7.4. Flujo genético

El flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra. Las poblaciones de una especie pueden intercambiar genes en mayor o menor grado, ya sea genes nucleares o genomas uniparentales como la mitocondria o el cloroplasto, debido al movimiento de gametos, semillas, individuos juveniles o adultos. Aunque cabe mencionar que los migrantes que no se reproducen en la población a la que migraron no contribuyen al flujo génico. (Aguirre, 2007).

Cuando una población se subdivide, la cantidad de conectividad entre las partes de la población puede diferir. Esta conexión genética depende en primera instancia de la cantidad de flujo genético efectivo que existe entre las subpoblaciones. Si la cantidad de flujo génico entre las subpoblaciones es alto, esto tiende a homogeneizar la variación genética de las subpoblaciones. Cuando el flujo genético es bajo, la deriva génica, la selección o aun la mutación en grupos separados pueden estar interviniendo en la diferenciación genética (Hedrick, 2005).

2.7.5. Otros factores que influyen en los niveles de diversidad genética en especies de plantas.

Se ha documentado poco acerca de otros factores que influyen en los niveles de diversidad genética de las plantas. Los trabajos más accesibles son los de Hamrick and Godt (1996) y Hamrick *et al.* (1992). A partir de estos trabajos se describen otros de los factores que influyen en el nivel de diversidad y la estructura genética de las plantas:

Forma de vida

Las especies leñosas longevas tienen más alta diversidad genética que otras formas de vida, además de que mantienen una mayor diversidad genética dentro de las poblaciones que entre las poblaciones, en comparación con otras

formas de vida. Además tales especies tienen menores valores de diferenciación entre las poblaciones que otras formas de vida.

Rango de distribución

Las especies con distribución restringida tienen menores valores de diversidad genética que las especies que tienen amplios rangos de distribución. Además las especies leñosas con distribución Boreal-templada tienden a tener tasas más altas de polimorfismo en comparación con especies que se distribuyen en latitudes más bajas.

Sistema de reproducción

Las especies que combinan el sistema de reproducción sexual y asexual presentan más altos niveles de diversidad genética que las especies que se reproducen sólo de manera sexual. Además las especies en las que las semillas son consumidas por animales tienen alta diversidad genética a nivel de población, en comparación con otras especies en las que la dispersión de las semillas es diferente.

Aunque la historia de vida y las características ecológicas explican una parte significativa (34 %) de la variación en los parámetros genéticos entre especies, una gran parte de la variación interespecífica es inexplicada.

2.8. Estudios de diversidad genética del género *Pinus*

En México se han evaluado las características genéticas de especies de piñoneros, sobre todo de especies de distribución restringida como *P. rzedowski*, *P. maximartinezzi*, *P. pinceana*, *P. cembroides* var. *lagunae*, entre otros, y se ha abordado a pocas especies de importancia comercial como lo es *P. cembroides* (FAO, 2011).

Las coníferas presentan altos niveles de diversidad genética, debido entre otras cosas, a que presentan varios mecanismos que promueven el apareamiento cruzado (Ledig and Conkle, 1983), como es que la semilla y el polen son básicamente dispersados por el viento, lo que permite un flujo genético más eficiente entre las distintas poblaciones (Delgado *et al.*, 1999). Además se considera que las especies leñosas con amplia distribución, sistemas de apareamiento cruzado y dispersión por viento o animales tienen la mayor parte de la diversidad genética dentro de las especies y poblaciones, pero menos variación entre las poblaciones (Hamrick *et al.*, 1992).

La heterocigosis esperada para especies de pinos es particularmente constante entre 0.19 y 0.23 en las especies que se han estudiado utilizando aloenzimas. Hay una proporción significativa de especies (9/41) que muestran estimados de diferenciación altos ($F_{ST} \geq 0.15$). De ellos, cinco especies tienen semillas grandes y sin alas asociadas probablemente con bajas densidades, dispersión de semillas por aves y resistencia a sequía. Estas especies incluyen a los pinos piñoneros de Norteamérica (Delgado *et al.*, 2002).

En trabajos de diversidad genética realizados en el género *Pinus*, usando microsatélites, en especies como *P. pseudostrobus* ($H_o = 0.290$, $H_e = 0.277$), *P. montezumae* ($H_o = 0.246$, $H_e = 0.274$), y otros piñoneros como *P. maximartinezii*, *P. rzedowski*, *P. nelsoni* y *P. pinceana*, se ha encontrado alta variación genética, la mayoría distribuida dentro de las poblaciones (Delgado *et al.*, 2013; Piñero, 2005).

Se considera que las especies de pino que se distribuyen como poblaciones aisladas dispersas tienen una mayor diversidad genética entre las poblaciones, mientras que los pinos distribuidos más extendidos y continuos tienen menos diversidad entre las poblaciones (Hamrick *et al.*, 1992; Ledig *et al.*, 2001; Molina-Freaner *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque *P. cembroides* es una

especie de amplia distribución, esta no es continua, es decir algunas de las poblaciones están separadas espacialmente.

Según Ledig y colaboradores (2000) las poblaciones de coníferas en México y América Central muestran niveles más elevados de diferenciación genética en comparación con lo encontrado en poblaciones de latitudes más al norte, probablemente debido a que estas poblaciones se encuentran más fragmentadas, lo que pudo haber ocasionado una reducción de los niveles de flujo genético y por ende haberse favorecido ya sea la deriva genética en las poblaciones aisladas de menor tamaño o la diferenciación por selección.

Además de acuerdo con estudios filogenéticos previos, Piñero (2005) asevera que puede esperarse que tenga menos variación genética que otros piñoneros como *P. maximartinezii* o *P. pinceana* (especies de distribución restringida), debido a que el tamaño histórico de la población de *P. cembroides* ha sido muy pequeña, pero que en los últimos 10 o 12 000 años ha habido una explosión demográfica, y la variación genética no ha tenido suficiente tiempo para acumularse en la gran población.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colecta del material vegetal de *P. cembroides*

Las ocho localidades en donde se colectó el material vegetal, se encuentran en el estado de Hidalgo, Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí (Figura 1). Las poblaciones se distribuyen en dos Provincias Fisiográficas: la Sierra Madre Oriental y la Mesa del Centro (INEGI, 2008) (Cuadro 2).

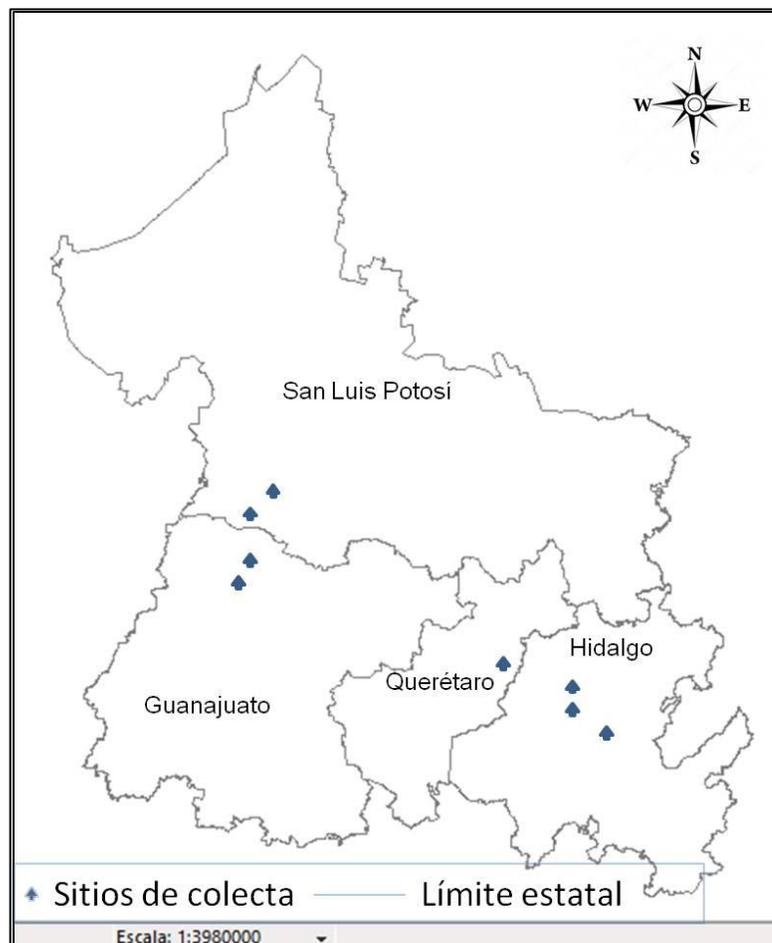


Figura 1. Poblaciones de *P. cembroides* que se incluyeron en la presente investigación.

En cada localidad se eligieron 20 árboles al azar. La distancia mínima entre los árboles cercanos fue de 30 metros, para evitar en lo posible recolectar material de arboles emparentados. La muestra fue de aproximadamente 10 gramos, de follaje de cada uno de los individuos en cada población. El follaje de cada árbol se depositó en bolsas plásticas con cierre hermético, debidamente identificadas.

Cuadro 2. Sitios de colecta de material vegetal de *P. cembroides*.

Localidad	Ubicación geográfica	Municipio/Estado	Provincia Fisiográfica*
La Florida	20°31'26.4", 98°58'57.4"	Cardonal, Hidalgo	Sierra Madre Oriental
El Pinalito	20°39'19.1" 99°06'0.3"	Cardonal, Hidalgo	Sierra Madre Oriental
Santiago de Anaya	20°26'14.7"	Santiago de Anaya, Hidalgo	Sierra Madre Oriental
Los Juárez	20°51'58.3" 99°38'39.5"	Cadereyta, Querétaro	Sierra Madre Oriental
El Cubo	21°29'56.5" 101°05'20.5"	San Felipe, Guanajuato	Mesa del Centro
Ojo de Agua	21°39'05.2" 101°11'55.0"	San Felipe, Guanajuato	Mesa del Centro
La Amapola	22°08'23.3" 101°08'39.0"	San Luis Potosí, San Luis Potosí	Mesa del Centro
Bledos	21°48'34.7" 101°08'16.7"	Villa de Reyes, San Luis Potosí	Mesa del Centro

*La Provincia Fisiográfica corresponde a la clasificación del INEGI (2008).

Las muestras se mantuvieron sobre una capa de hielo, en una hielera para mantener en frío hasta su traslado al laboratorio, en donde se mantuvieron en

un ultracongelador hasta que se extrajo el ADN. Cabe señalar que dos de las muestras de la población de Bledos se perdieron por lo que para esta población se incluyeron 18 individuos. Por lo que en total se evaluaron 158 individuos.

3.2. Extracción de ADN

Se probaron tres métodos, el protocolo CTAB 1X, SDS y CTAB 2X con 1 % de Polivinilpirrolidona (PVP) para la extracción de ADN (Anexo A). El método CTAB 2X con 1% de PVP fue el mejor para obtener ADN de calidad. La calidad del ADN se confirmó en electroforesis en gel de agarosa. En cada pozo se colocó 12 µl de muestra en un gel de agarosa al 0.8 % (p/v), que se corrió en amortiguador Tris-Acetate-EDTA (TAE 0.5 X) (Tris-Base, ácido acético y EDTA 0.5 M, pH 8.0). Las muestras corrieron durante aproximadamente 40 minutos con un voltaje de 100 Volts. Posteriormente, el gel se tiñó con Bromuro de etidio al 0.1 % (p/v).

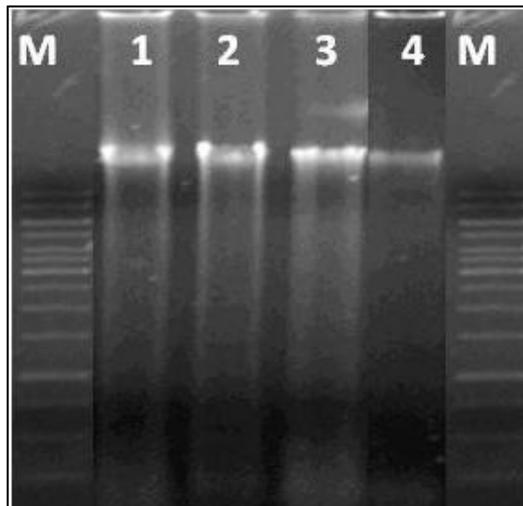


Figura 2. Calidad de ADN de cuatro muestras de *P. cembroides*. M, marcador de peso molecular; 1,2,3,4 muestras analizadas.

Inmediatamente después el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y un fotodocumentador KODAK EDAS-290, para documentar la imagen. Se definió ADN de calidad, al obtener una banda uniforme y de alto peso molecular (Figura 2). La cantidad de ADN se cuantificó en una dilución 1:10, en cada una de las muestras en un espectrofotómetro marca GENESYS 10uv. La lectura se hizo a 260 nm. La concentración del ADN utilizado en las reacciones de PCR tuvo una concentración de 10 ng/μl.

3.3. Condiciones de PCR

Las reacciones se realizaron en dos fases. En la primera se obtuvo la huella genética de las poblaciones, mientras que en la segunda se estimó la diversidad y estructura genética.

- Huella genética de poblaciones: ADN de 10 árboles (5 μl por árbol) seleccionados al azar, se mezcló para determinar la huella genética de cada una de las poblaciones. El ADN se diluyó a una concentración de 10 ng/ μl.
- Diversidad y estructura genética de las poblaciones: ADN de cada uno de los árboles que se incluyeron en la muestra se analizó para estimar la diversidad genética y estructura genética de las poblaciones. La concentración del ADN fue de 10 ng/ μl.

Los componentes de reacción se colocaron en tubos Eppendorf de 200 μl. En cada tubo se agregó: 4 μl de ADN (10 ng/μl), 0.3 μl enzima Taq ADN polimerasa, 10 μl de dNTPs (500 μM), 2.5 μl de amortiguador (10X), 2 μl de MgCl₂ (50 mM), 3 μl de iniciador y 3.2 μl de H₂O bidestilada. Las reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se realizaron en un termociclador Techne TC-512 (Bibby Scientific, U.S.A.). Las condiciones de las reacciones

fueron: a) un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; b) 30 ciclos a 94 °C por un minuto, 50 °C por un minuto, 72 °C por dos minutos; y c) un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min.

Para determinar la huella genética de las poblaciones se probaron veinte iniciadores ISSR. Sin embargo solo 13 iniciadores se consideraron para el análisis porque fueron los que generaron patrones de bandas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Iniciadores para obtener huellas genéticas de las poblaciones.

Núm.	Nombre	Secuencia (5' – 3')
1	7939	AGGAGGAGGAGGAGGAGG
2	7941	GAGAGAGAGAGAGAGAC
3	7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG
4	7945	GAGAGAGAGAGAGAGAT
5	7949	GAGAGAGAGAGAGAGA
6	7955	AGAGAGAGAGAGAGAGA
7	7959	CTCTCTCTCTCTCTRC
8	7963	CACACACACACACART
9	A8	AGAGAGAGAGAGAGAGT
10	P1	GAGCAACAACAACAACAA
11	P2	CTGAGAGAGAGAGAGAGAG
12	P3	AGAGAGAGAGAGAGAGTG
13	P5	AGAGAGAGAGAGAGAG

Para el análisis de los individuos se eligieron, a partir de los patrones obtenidos en la huella genética de las poblaciones, los iniciadores en los que se identificó una mejor separación de las bandas y que generaron el mayor número de éstas, con el fin de obtener la mayor información posible. Por lo que se eligieron nueve iniciadores ISSR para el análisis (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características de los iniciadores ISSR utilizados en los individuos.

Núm.	Nombre	Secuencia (5' – 3')
1	7939	AGGAGGAGGAGGAGGAGG
2	7941	GAGAGAGAGAGAGAGAC
3	7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG
4	7949	GAGAGAGAGAGAGAGA
5	7955	AGAGAGAGAGAGAGAGA
6	A8	AGAGAGAGAGAGAGAGT
7	P1	GAGCAACAACAACAACA
8	P3	AGAGAGAGAGAGAGAGTG
9	P5	AGAGAGAGAGAGAGAG

3.4. Electroforesis y obtención de datos

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa a una concentración de 1.2 % mediante electroforesis. Para correr las muestras se utilizaron 12.5 µl del producto de la reacción de PCR de cada una de las muestras, agregando 1 µl de amortiguador de carga. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular (GeneRuler™, 0.1µg/µl, Fermentas).

El amortiguador que se utilizó para la electroforesis fue TAE 0.5X, a 120 voltios, por aproximadamente 2 horas. Después de este tiempo los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio. Se utilizó el sistema Kodak High Performance Ultraviolet Transilluminator EDAS-290 para obtener las imágenes y documentar los patrones de bandas de ADN.

3.5. Análisis de datos

3.5.1. Huella genética de las poblaciones

A partir de los geles se generó una matriz binaria con 1 y 0; donde el 1 indicó la presencia de una banda de ADN en una muestra y el 0 representó la ausencia de banda. La matriz se analizó con el programa NTSYS (Numerical Taxonomic Analysis System) versión 2.2 (Rohlf, 2002), para calcular las similitudes entre pares de poblaciones utilizando el coeficiente de Dice. El análisis de agrupamiento de las poblaciones se realizó tomando como base la similitud generada con el coeficiente de Dice, considerando a cada población como una unidad taxonómica operacional (OTU) y utilizando el método UPGMA. Lo anterior mediante el programa NTSYS (Numerical Taxonomic Analysis System) versión 2.2 (Rohlf, 2002).

3.5.2. Diversidad genética

Se generó una matriz binaria con los individuos que se muestrearon en cada población. Para el análisis intra e interpoblacional se usó el programa PopGen 1.31 (Yeh *et al.*, 1999), considerando a los individuos de cada población. Se estimó para cada población y para cada iniciador, el porcentaje de *loci* polimórficos (P), índice de diversidad genética de Nei (H), índice de diversidad genética de Shannon (Lewontin, 1972).

3.5.3. Estructura genética, diferenciación e individuos migrantes

Para describir la estructura genética se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa Gen Alex (Peakall and Smouse, 2006) versión 6.5 (2012). Además con el uso del programa PopGen 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) se estimó el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}) y el número de individuos migrantes (Nm), parámetro que mide de manera indirecta el flujo génico entre las poblaciones.

3.5.4. Análisis de agrupamiento de individuos

Se utilizaron dos métodos de agrupamiento para los individuos. El primer agrupamiento se hizo en base al índice de Dice, en el programa NTSYS (Numerical Taxonomic Analysis System) versión 2.2 (Rohlf, 2002).

El segundo agrupamiento de los individuos de las ocho poblaciones fue mediante el Análisis de Coordenadas Principales (ACOP), para el cual se utilizó la matriz binaria resultante de la lectura de los geles y se analizó mediante el programa Gen Alex (Peakall and Smouse, 2006) versión 6.5, usando el método de Covarianza-estandarizada con 1000 permutaciones.

3.5.5. Prueba de Mantel

Se aplicó una Prueba de Mantel para evaluar la correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética mediante el programa XLSTAT 19.5 (Addinsof, 2017), para lo que se utilizaron las respectivas matrices de distancias. Para medir la distancia geográfica entre las poblaciones se utilizó el programa R 3.4.0., que a partir de la ubicación geográfica calcula una matriz de distancias entre todas las parejas de datos, utilizando para ello el método Harvesine. La matriz de distancias geográficas se presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Distancia geográfica entre las poblaciones de *P. cembroides*, en Km.

	La Florida	El Pinalito	Bledos	Los Juárez	El Cubo	Ojo de Agua	Santiago	La Amapola
La Florida	0							
El Pinalito	21.8	0						
Bledos	242.8	227.5	0					
Los Juárez	91.2	70.5	167.3	0				
El Cubo	246.6	228.7	43.2	161.9	0			
Ojo de Agua	264.8	246.0	64.9	177.4	24.7	0		
Santiago	104.0	88.5	253.3	92.5	238.9	248.8	0	
La Amapola	275.8	255.5	107.4	185.0	64.6	43.5	242.7	0

4. RESULTADOS

4.1. Huella genética de las poblaciones

La huella genética de las poblaciones se conformó por un total de 117 bandas, con los trece iniciadores que se evaluaron (Figura 3). Como era de esperarse, algunos de los iniciadores resultaron ser más informativos que otros, por ejemplo el iniciador A8 generó 15 bandas, en comparación con el iniciador 7959 que generó sólo dos. En promedio se generaron 9 bandas por iniciador. El porcentaje de *loci* polimórficos fue de 65.8 %. El polimorfismo que mostraron los cebadores fue muy variable (25 % - 100 %) (Cuadro 6).

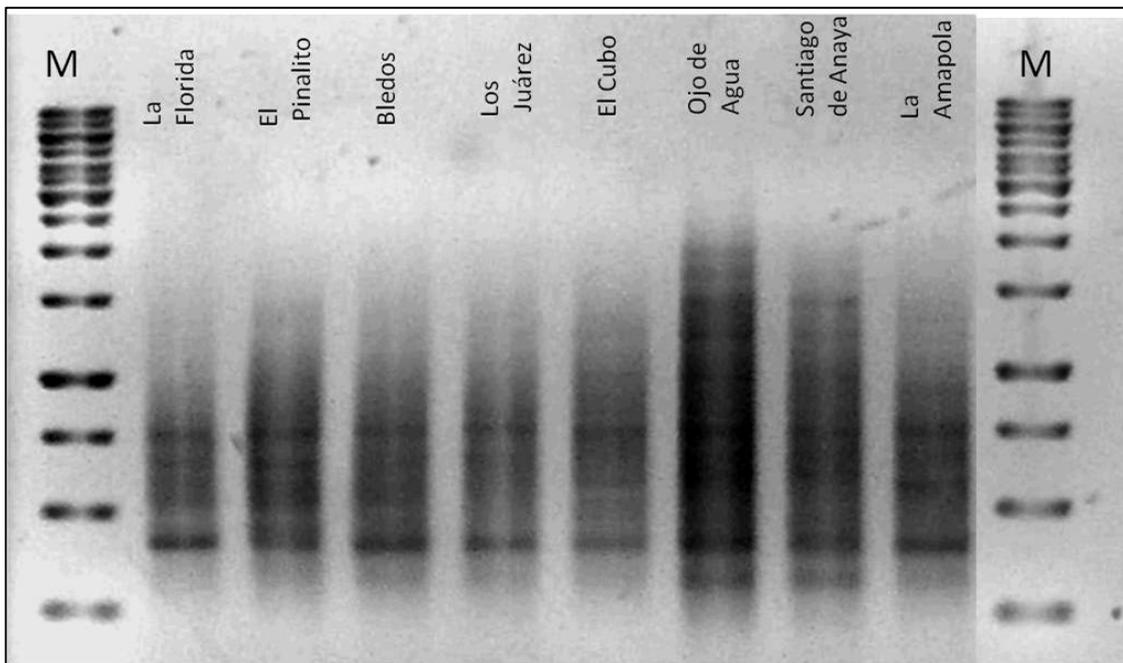


Figura 3. Patrones de bandas que se obtuvieron para las ocho poblaciones de *P. cembroides* con el iniciador P1.

Cuadro 6. Número de bandas que se generaron con los iniciadores y porcentaje de polimorfismo.

Núm.	Nombre	Secuencia (5' - 3')	N. B.	% B.P.
1	7939	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	13	53.8
2	7941	GAGAGAGAGAGAGAGAC	6	66.6
3	7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG	7	42.8
4	7945	GAGAGAGAGAGAGAGAT	8	50.0
5	7949	GAGAGAGAGAGAGAGA	11	81.8
6	7955	AGAGAGAGAGAGAGAGA	9	33.3
7	7959	CTCTCTCTCTCTCTRC	2	50.0
8	7963	CACACACACACACART	13	38.4
9	A8	AGAGAGAGAGAGAGAGT	15	100
10	P1	GAGCAACAACAACAACAA	11	81.8
11	P2	CTGAGAGAGAGAGAGAGAG	4	25.0
12	P3	AGAGAGAGAGAGAGAGTG	14	57.1
13	P5	AGAGAGAGAGAGAGAG	4	100.0
Promedio			9	65.8

N.B.= Número de Bandas, %B.P.= Porcentaje de Bandas Polimórficas.

La similitud resultante que se generó a partir del índice de Dice, fue alta (Cuadro 7). El rango de similitud varió de 0.752 a 0.932. Las poblaciones con más caracteres en común fueron las poblaciones de La Florida y El Pinalito. Por el contrario la similitud más baja fue entre las poblaciones de El Cubo y la Amapola.

La Amapola resultó ser la población que se diferencia en mayor medida de las demás poblaciones ya que con ninguna población obtuvo una similitud de 0.80 o mayor; comportamiento que si presentaron el resto de las poblaciones.

Cuadro 7. Matriz de Similitud entre las poblaciones utilizando el índice de Dice.

	Florida	Pinalito	Bledos	Los Juárez	El Cubo	O. Agua	Santiago	Amapola
Florida	1							
Pinalito	0.932	1						
Bledos	0.849	0.893	1					
Los Juárez	0.854	0.864	0.841	1				
El Cubo	0.860	0.878	0.872	0.866	1			
O. Agua	0.830	0.851	0.835	0.786	0.848	1		
Santiago	0.763	0.811	0.798	0.772	0.798	0.805	1	
Amapola	0.780	0.791	0.797	0.768	0.752	0.797	0.766	1

No se identificó algún patrón en los valores de similitud que se obtuvieron. Lo que se identificó es que aunque las poblaciones se distribuyen en dos regiones geográficas diferentes, tienen mucho en común. Por ejemplo la población de Santiago de Anaya presentó el valor más altos de Similitud con la población de Pinalito, la población geográficamente más cercana a ella (80 km) (Cuadro 5); pero su segundo valor más alto de similitud se encontró con la población de Ojo de Agua, que es una de las poblaciones que se encuentra más alejada geográficamente de ésta. En varias de las poblaciones se encuentra este comportamiento.

El dendrograma que se obtuvo a partir de la matriz de similitud (Figura 4) separó a las poblaciones en dos grupos. El primero se conformó por la población de La Florida y El Pinalito, como era de esperarse dado el alto valor de similitud que se encontró entre este par de poblaciones. El segundo grupo se integró por las seis poblaciones restantes.

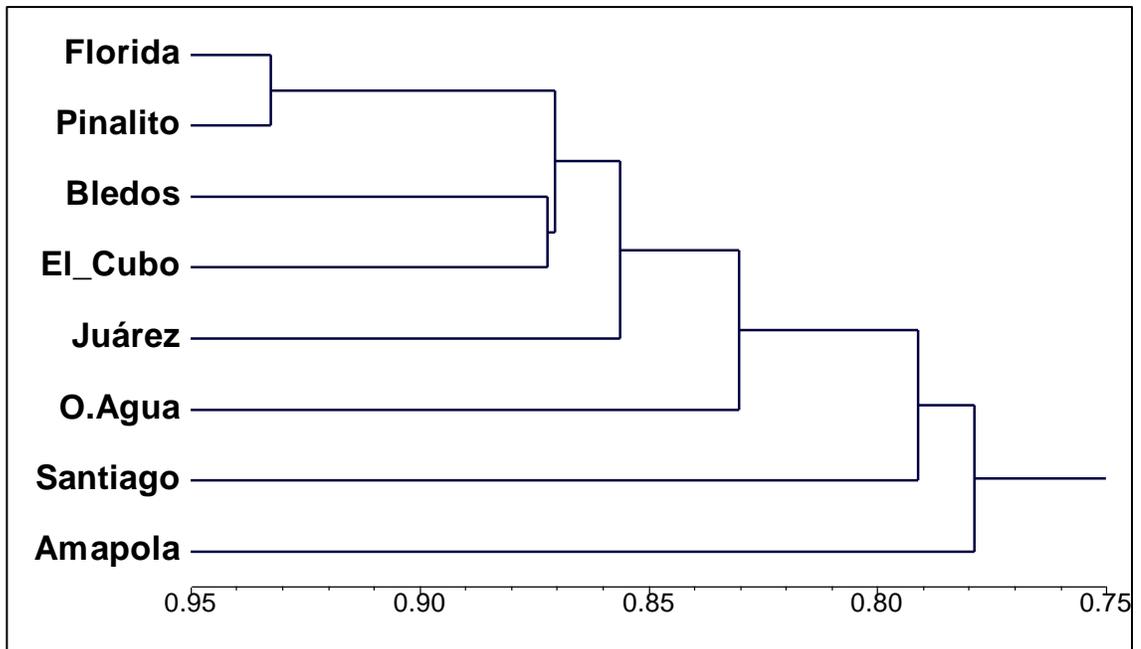


Figura 4. Dendrograma generado a partir de la matriz de similitud de las poblaciones de *P. cembroides*, mediante el método UPGMA.

Uno de los aspectos a resaltar es que la población de Bledos y el Cubo resultaron ser más similares a la Florida y Pinalito, y no las poblaciones más cercanas geográficamente a ellas. La Amapola es la población que se diferencia en mayor medida del resto de las poblaciones.

El segundo agrupamiento que se generó fue mediante el Análisis de Coordenadas Principales (Figura 5), el cual aglomero a las poblaciones en tres grupos bien definidos. A diferencia del Dendrograma generado a partir de la similitud (Figura 4), el ACOP separa claramente a la población de la Amapola del resto de las poblaciones. Pinalito y la Florida son las poblaciones más estrechamente relacionadas. En este análisis las dos coordenadas principales describen el 57.4 % de la variación.

Análisis de Coordenadas Principales

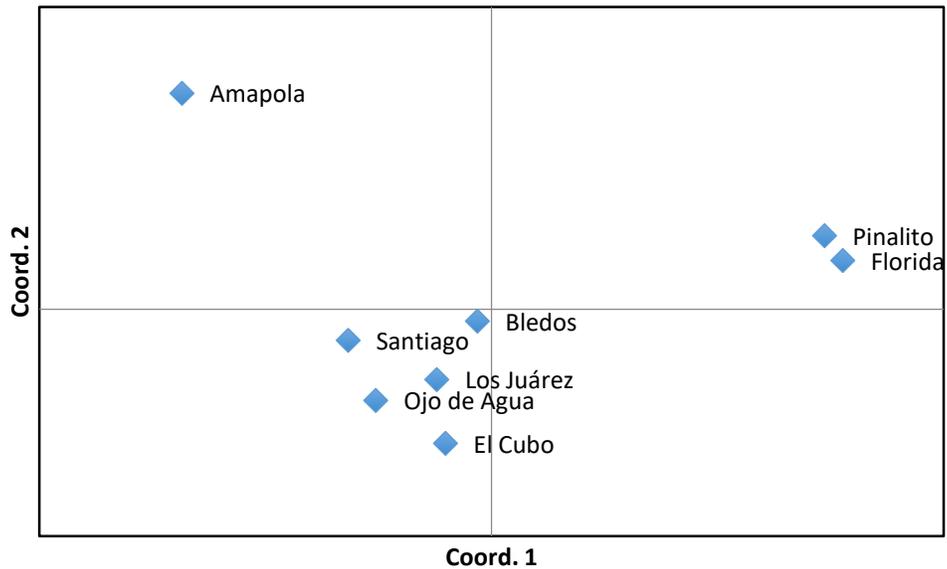


Figura 5. Gráfica de las dos principales coordenadas derivada del análisis de huella genética con ISSR.

4.2. Diversidad Genética

Los nueve iniciadores que se utilizaron generaron 154 bandas, 17 bandas por iniciador en promedio (Figura 6). El número de bandas que se generó por iniciador fue variable, de 14 con el iniciador 7944, a 21 con el iniciador 7941. El polimorfismo vario de 50 a 86.6 %, siendo el iniciador A8 con el que se identificó un mayor porcentaje de *loci* polimorficos (Cuadro 8).

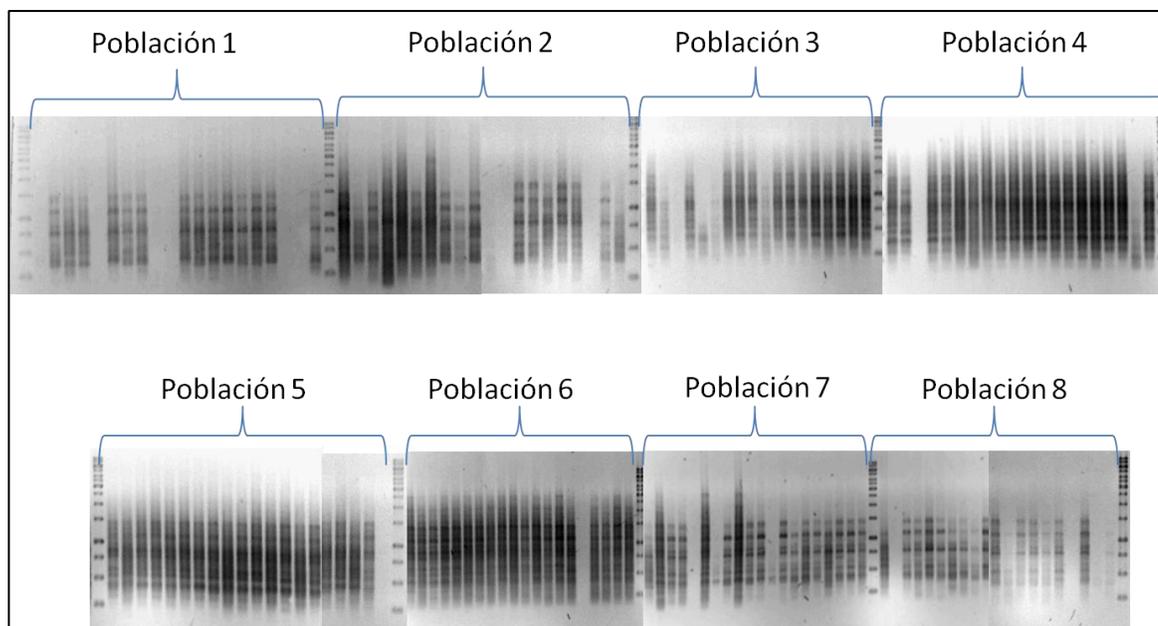


Figura 6. Patrones de bandeo para todos los individuos de las ocho poblaciones de *P. cembroides* con el iniciador 7941.

Cuadro 8. Iniciadores utilizados para el análisis de los individuos de poblaciones de *P. cembroides*.

Núm.	Nombre	Secuencia (5' – 3')	N.B.	% B. P.
1	7939	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	15	80
2	7941	GAGAGAGAGAGAGAGAC	21	71.4
3	7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG	14	50
4	7949	GAGAGAGAGAGAGAGA	18	77.7
5	7955	AGAGAGAGAGAGAGAGA	18	80
6	A8	AGAGAGAGAGAGAGAGT	15	86.6
7	P1	GAGCAACAACAACAACA	19	78.9
8	P3	AGAGAGAGAGAGAGAGTG	17	54.5
9	P5	AGAGAGAGAGAGAGAG	17	82.3
Promedio			17.1	73.4

N.B.= Número de Bandas. % B. P.= Porcentaje de Bandas Polimórficas.

Con los tres parámetros de diversidad se identificó un nivel de moderado a alto para las ocho poblaciones que se evaluaron (Cuadro 9). Para los tres parámetros de diversidad que se midieron, los valores fueron más altos en las poblaciones de la Sierra Madre Oriental (SMO) (Cuadro 1). Por ejemplo el rango de polimorfismo de las poblaciones que se distribuyen en la Sierra Madre Oriental fue de 61 a 63.9 %; mientras que el rango para las poblaciones de la Mesa Central (MC) que fue de 45.5 a 61.7 %. En lo que se refiere a la diversidad genética varió de 0.22 a 0.24 para las poblaciones de la SMO, y de 0.18 a 0.22 en las de la MC. El índice de diversidad de Shanon promedio fue de 0.294. Para este índice se encontró el mismo patrón que se halló con el Porcentaje de Polimorfismo y la diversidad genética, en cuanto a los valores más altos y más bajos.

Cuadro 9. Parámetros de diversidad genética evaluados en las poblaciones de *P. cembroides*.

Localidad	P	Div. Gen. (Nei)	S
La Florida	61.0	0.23	0.35
El Pinalito	63.9	0.24	0.36
Bledos	58.0	0.21	0.32
Los Juárez	63.2	0.22	0.33
El Cubo	45.5	0.18	0.26
Ojo de Agua	58.8	0.21	0.32
Santiago de Anaya	61.7	0.23	0.34
La Amapola	61.7	0.22	0.33
Promedio	59.28	0.22	0.33

P= % de polimorfismo, **Div. Gen.**= Diversidad Genética de Nei, **S**= índice de diversidad de Shanon.

4.3. Análisis de agrupamiento de los individuos

El primer agrupamiento que se hizo generó un Dendrograma basado en la similitud entre los individuos (Anexo B). La mayor parte de los individuos de las ocho poblaciones se agrupó conforme a la población a la que pertenecían. El

mayor número de individuos que se entremezclaron corresponden a la población de Ojo de Agua, Santiago de Anaya y La Amapola.

El segundo agrupamiento se derivó del Análisis de Coordenadas Principales (Figura 7), que aglomero a las poblaciones en tres grupos. El agrupamiento más numeroso incluyó a las poblaciones de Bledos, El Cubo, Los Juárez, Ojo de Agua y Santiago. La población de La Amapola se separó de manera independiente y de acuerdo a la gráfica, es la población más alejada genéticamente del resto de las poblaciones. El tercer grupo lo conforman La Florida y El Pinalito, que son el par de poblaciones más cercanas geográficamente, y que como se observa en la gráfica, los individuos se solapan, están muy relacionadas. Las dos principales coordenadas explican el 15.3 % de la variabilidad total encontrada en los individuos.

Además se identificó que las poblaciones de Bledos, El Cubo y Ojo de Agua, están menos relacionadas genéticamente con La Amapola (la población geográficamente más cercana a estas), y más relacionadas con Santiago de Anaya y Los Juárez. Incluso, de acuerdo al gráfico, se puede suponer que la población de Bledos tiene caracteres genéticos en común con Pinalito y La Florida.

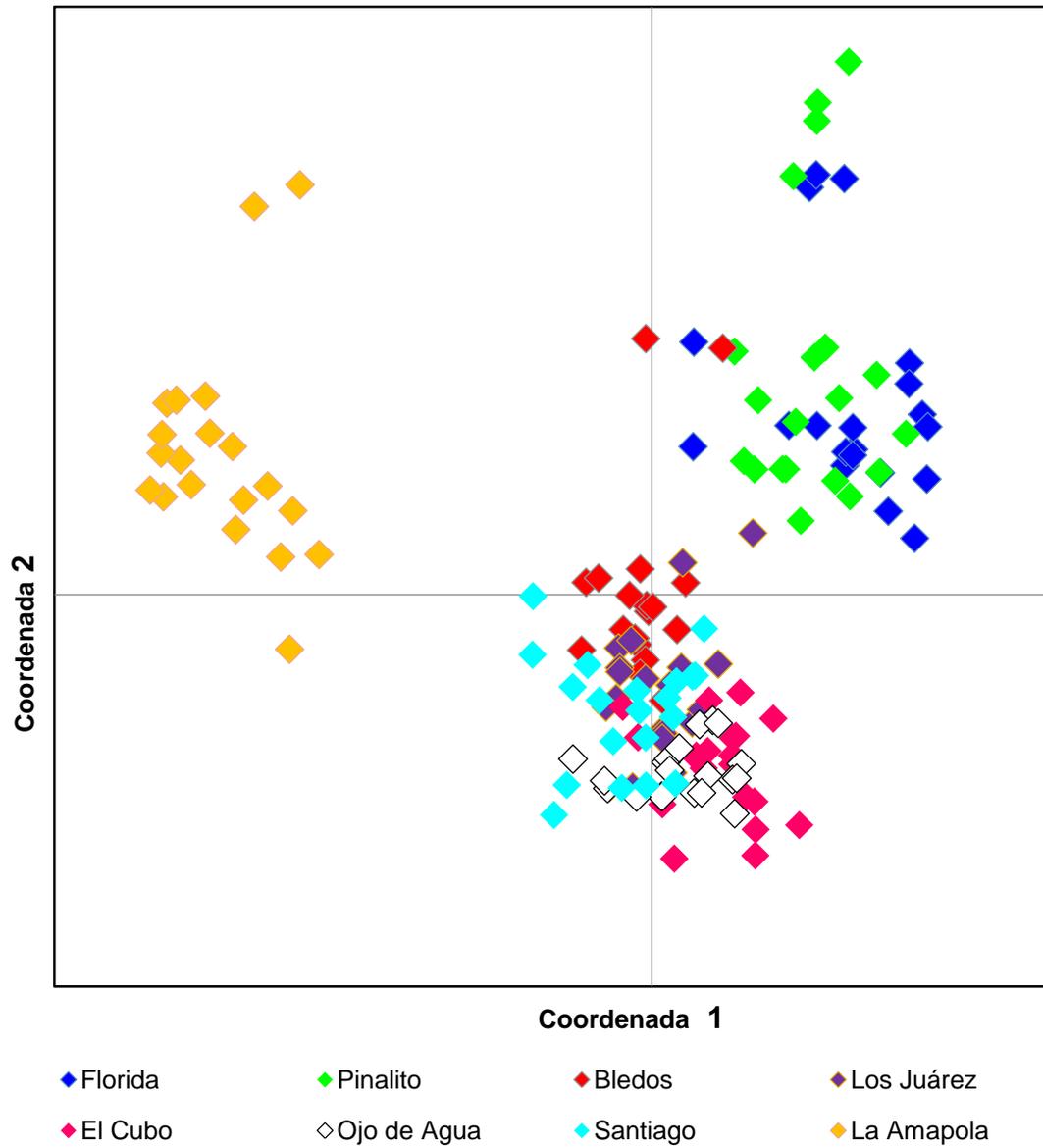


Figura 7. Gráfico de las dos Coordenadas Principales derivada del análisis con ISSR de ocho poblaciones de *P. cembroides*.

4.4. Diferenciación entre las poblaciones

4.4.1. Distancia genética

Los valores de distancia genética “D” que se encontraron entre las ocho poblaciones varió de 0.075 a 0.206 (Cuadro 10). Las poblaciones más alejadas genéticamente fueron La Florida y La Amapola, lo que coincidió con que son las poblaciones geográficamente más lejanas (Cuadro 5). Sin embargo este patrón no se presentó para todas las poblaciones. Por ejemplo Santiago de Anaya y Los Juárez fueron las poblaciones más cercanas genéticamente, pero no son las poblaciones geográficamente más cercanas. Por otro lado, la población más cercana geográficamente a la población de Santiago de Anaya, El Pinalito presentó con ésta, la mayor diferenciación genética.

Cuadro 10. Distancia genética de Nei (bajo la diagonal) e Identidad Genética de Nei (sobre la diagonal) para las ocho poblaciones de *P. cembroides* evaluadas.

	Florida	Pinalito	Bledos	Juárez	El Cubo	O. Agua	Santiago	Amapola
Florida	0	0.902	0.869	0.874	0.845	0.843	0.865	0.814
Pinalito	0.103	0	0.862	0.867	0.871	0.842	0.859	0.815
Bledos	0.140	0.148	0	0.918	0.905	0.902	0.903	0.876
Juárez	0.134	0.142	0.085	0	0.912	0.918	0.927	0.868
El Cubo	0.168	0.137	0.100	0.092	0	0.919	0.910	0.848
O. Agua	0.170	0.171	0.103	0.085	0.084	0	0.918	0.847
Santiago	0.145	0.151	0.102	0.075	0.094	0.085	0	0.880
Amapola	0.206	0.204	0.132	0.141	0.164	0.165	0.127	0

De acuerdo a los valores de distancia genética (D), las poblaciones de La Florida y El Pinalito fueron las que se diferenciaron en mayor medida de las otras poblaciones, al presentar los valores más altos de D . El Dendrograma que se generó a partir de la distancia genética (Figura 8), concentró a las poblaciones en tres grupos.

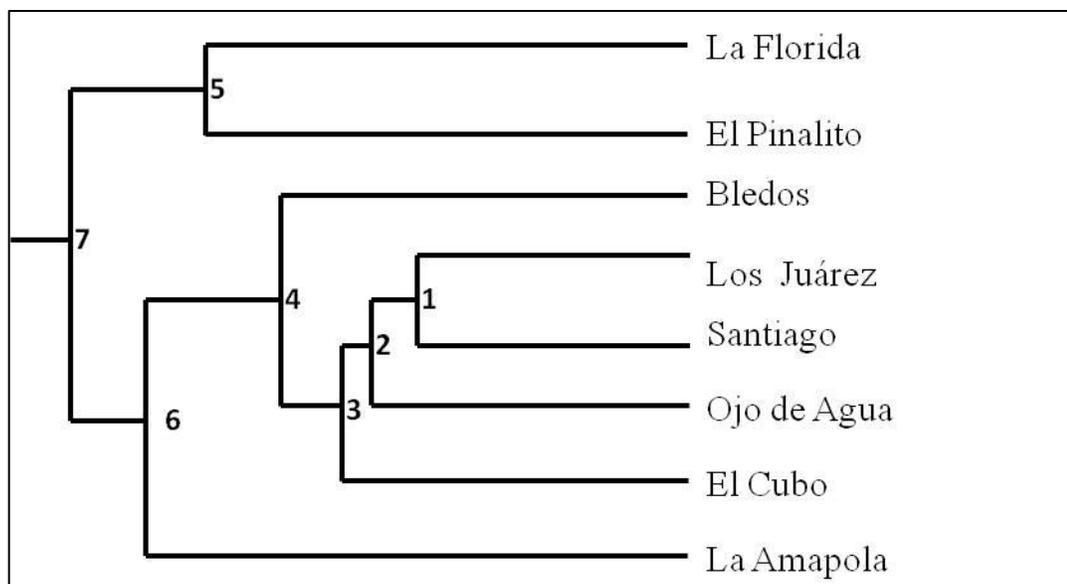


Figura 8. Dendrograma basado en la Distancia Genética de Nei (1972), usando el método UPGMA para ocho poblaciones de *P. cembroides*.

Como se puede apreciar en el dendrograma, en primer término, se agruparon las poblaciones de la Sierra Madre Oriental, ya que entre estos dos pares de poblaciones (La Florida-Pinalito y Los Juárez-Santiago) se encontró la menor distancia genética.

4.4.2. Estructura genética entre las poblaciones

El valor de diferenciación (G_{ST}) que se encontró fue de 0.28, un valor que nos indica que las poblaciones están diferenciadas entre sí. El número estimado de migrantes por generación (N_m) fue de 1.27, que se considera un valor bajo.

En cuanto a la estructura genética de *P. cembroides*, el 74% de la variación genética se distribuyó dentro de las poblaciones, y solo el 26% entre las poblaciones. El Cuadro 11 desglosa los resultados obtenidos a partir del AMOVA realizado.

Cuadro 11. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las ocho poblaciones de *P. cembroides* evaluadas.

Fuente de variación	G.L.	SS	MS	%
Entre poblaciones	7	923.6	131.9	26
Dentro de poblaciones	150	2497.1	16.6	74
Total	157	3420.78		100

G.L. = Grados de Libertad. SS = Suma de Cuadrados. MS = Cuadrados Medios.

4.4.3. Modelo de aislamiento por distancia

Aunque para algunos pares de poblaciones se encontró que a menor distancia genética, menor distancia geográfica, como en el caso de la Florida- Pinalito y Santiago-Pinalito, la prueba de Mantel que se aplicó, reveló que en las poblaciones de *P. cembroides* no existe correlación significativa entre la distancia geográfica y la distancia genética (Figura 9). El valor obtenido de la correlación entre las variables ($r(AB) = 0.313$) no fue significativo (Cuadro 12).

Cuadro 12. Valores obtenidos de la prueba de Mantel.

r(AB)	0.313
p-valor	0.105
Alpha	0.05

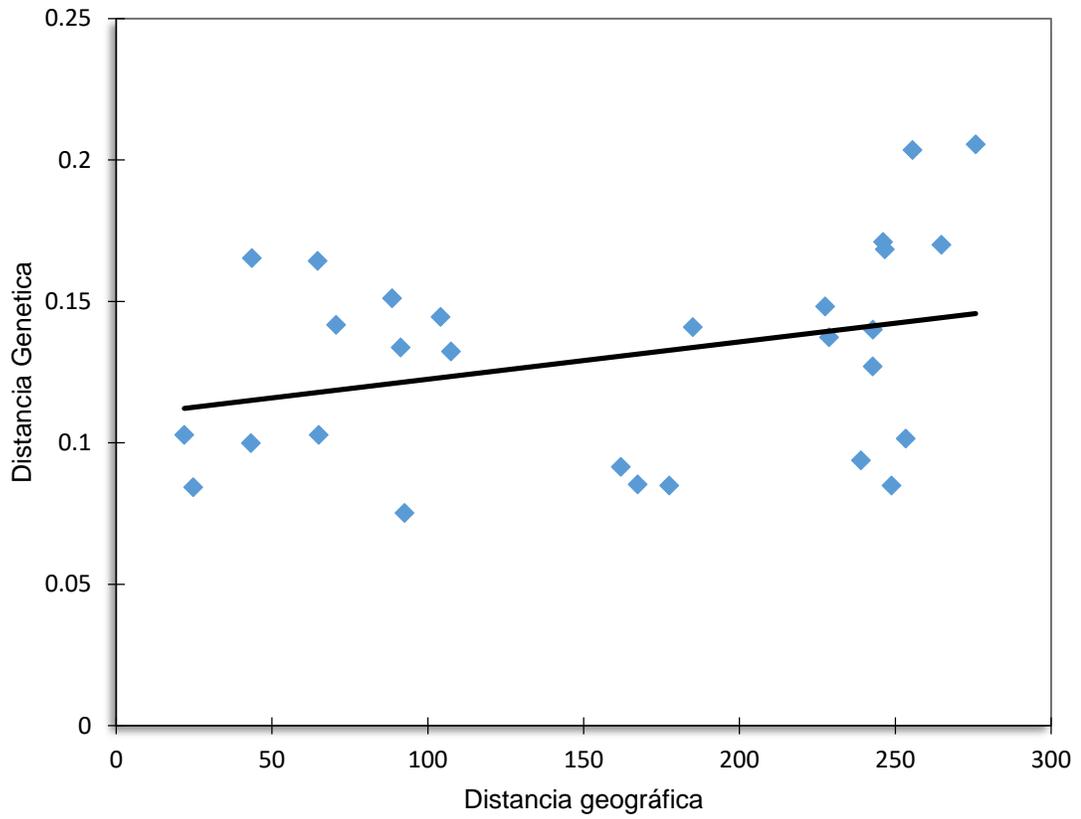


Figura 9. Prueba de Mantel que muestra la correlación entre distancia genética y distancia geográfica para las poblaciones de *P. cembroides*.

V. DISCUSIÓN

5.1. Huella genética de las poblaciones

Aunque para algunas poblaciones el polimorfismo que se encontró fue bajo (iniciador p2, Cuadro 2), el polimorfismo promedio fue alto. Los valores de similitud son altos, es decir no se percibe mucha diferencia entre las poblaciones. Este comportamiento podría ser consecuencia de que se incluyó sólo el ADN de 10 individuos de cada población en las mezclas de ADN que se usó para obtener la huella genética. El Dendrograma que se generó a partir de la Similitud agrupó a las poblaciones en dos grupos. El primer grupo que se formó, La Florida y Pinalito, coincide en ser las poblaciones más cercanas geográficamente, por lo que probablemente estén compartiendo características ecológicas, geológicas y microclimáticas muy similares, en comparación con las otras poblaciones, lo que pudiera estar favoreciendo la similitud.

Dados los altos valores de Similitud se puede decir que las ocho poblaciones tienen mucho en común. Tal comportamiento puede estar relacionado con lo que identificó Cuenca (2003), quien reporta para poblaciones de *P. cembroides* del Norte del país, cierta homogeneidad, debido a que identificó una alta frecuencia del alelo más común en esta especie, a diferencia de las poblaciones de otras especies como *P. johanis* y *P. discolor*, que presentaron una mayor heterogeneidad separándose en varios grupos.

5.2. Diversidad genética

El polimorfismo que se encontró a través de los individuos fue alto (94 %), como era de esperarse, ya que las coníferas presentan alta diversidad (Delgado *et al.*, 2002). Este polimorfismo es similar al encontrado con RAPD en *P. pinceana*, en donde el 94.7 % de las bandas fueron polimórficas considerando al conjunto de individuos (Aguirre-Limón *et al.*, 2017). Sin embargo es más alto que el

encontrado, también con RAPD en *P. culminicola* que fue de 72.2% (Favela, 2010). Esto probablemente asociado con el mayor polimorfismo que son capaces de detectar los ISSR. El porcentaje de polimorfismo en otras especies de *Pinus* no piñoneros, en donde se utilizó marcadores ISSR, también fue alto; por ejemplo en *P. roxburghii* (100 %, Parasharami, 2012) y en *P. tabulaeformis* f. *shekanensis* (74.1 %, Liu *et al.*, 2015).

La tasa de polimorfismo promedio poblacional que se halló es menor que el reportado *P. maximartinezii* (86.3 %; Hernández, 2012) y *P. culminicola* (65 %; Favela, 2010), con marcadores RAPD, debido probablemente a que en estos trabajos se incluyó a un mayor número de individuos para el análisis.

La diversidad genética (H_e) promedio que se detectó mediante ISSR fue alta. En concordancia con la hipótesis planteada ya que al ser *P. cembroides* una conífera, se esperan altos niveles de diversidad genética, según lo afirmado por Ledig y Conkle (1983) y Delgado *et al.* (1999), que sostienen que éstos niveles de diversidad genética, se deben entre otras cosas, a que portan varios mecanismos que promueven el apareamiento cruzado. Lo que según Ledig (1998, citado por Ledig *et al.*, 2001) podría compensar los efectos de la fragmentación, característica de los piñonares de Norteamérica.

Para otras especies de pinos piñoneros como *P. maximartinezii*, con marcadores RAPD, se encontró un valor más bajo de diversidad genética ($H = 0.162$; Hernández, 2012), que el encontrado en este trabajo para *P. cembroides*, atribuible probablemente a que dicha población presenta una distribución restringida. Para otras especies de pinos como *P. ayacahuite* ($H=0.25$; Castro-Félix, 2006) con el mismo tipo de marcador se encontró un valor parecido al reportado en el presente trabajo.

Las poblaciones que presentaron la mayor diversidad genética fueron las que se distribuyen en la Sierra Madre Oriental, es decir las poblaciones del estado de Hidalgo y Querétaro. Lo anterior podría apoyar la teoría de Farjon (1996, citado por Cuenca, 2003) que plantea que los pinos llegaron a México a través de dos invasiones. La primera durante el Cretácico Tardío o principios del terciario a lo largo de la Sierra Madre Occidental. La segunda invasión provenía del este de los Estados Unidos, entrando a México por la Sierra Madre Oriental, y de aquí los pinos irradiaron hacia las Mesetas Centrales y el Istmo de Tehuantepec. Considerando lo anterior, es congruente suponer que las poblaciones de *P. cembroides* de la Mesa Central sean más recientes y por consiguiente muestren valores menores de diversidad.

La diversidad genética promedio medida con el índice de Shanon fue moderada, inferior a lo encontrado en otras especies de piñoneros con marcadores RAPD, como *P. pinceana* ($S = 0.48$; Aguirre-Limón *et al.*, 2017) y *P. culminicola* ($S = 0.56$; Favela, 2010).

En comparación con lo encontrado para *P. cembroides* ($H_e = 0.59$), por Cuenca (2003), con microsatélites de cloroplasto, la diversidad encontrada en el presente trabajo con marcadores ISSR fue menor, como era de esperarse, debido a que los microsatélites tienen el más alto grado de polimorfismo y son codominantes. Con AFLP, marcador dominante, Wehenkel (2015) evaluó las características genéticas de *P. cembroides* en unidades productoras de germoplasma en Chihuahua, en donde encontró altos niveles de polimorfismo, el cual varió entre los rodales evaluados de 72 % a 98 %. Estos valores también son más altos, probablemente, debido a que los AFLP son capaces de detectar una mayor cantidad de *loci* que los ISSR.

5.2. Estructura y diferenciación genética

De acuerdo al AMOVA, la mayor parte de la variación se encontró dentro de las poblaciones, de acuerdo a lo planteado en la hipótesis conforme al patrón que describió Hamrick y colaboradores (1992) en el que especies de leñosas con amplia distribución, sistemas de apareamiento cruzado y dispersión por animales tienen la mayor parte de la diversidad genética dentro de las poblaciones, pero menos variación entre las poblaciones.

Éste patrón es consistente con la mayoría de los resultados reportados en otros trabajos de coníferas (Delgado, *et al.*, 2002; Flores-Rentería *et al.*, 2013), y específicamente del género *Pinus* como *P. pinceana* (Aguirre-Limón, *et al.*, 2017), *P. ayacahuite* (Castro-Félix, 2006), *P. culminicola* (Favela, 2010), *P. maximartinezii* (Hernández, 2012), *P. johanis* (García-Gómez, 2014), *P. greggii* (Parraguirre, 2002), solo por citar algunos.

En lo que respecta a la diferenciación, el valor de G_{ST} (0.281) que se encontró indica que las poblaciones están diferenciadas, lo que puede ser resultado de la distribución discontinua de *P. cembroides*, por la fragmentación que presentan éstas poblaciones o por ambas. La distribución discontinua implica que las poblaciones están separadas espacialmente, y que es poco el intercambio genético que existe entre las poblaciones.

Por otro lado, la fragmentación de las poblaciones fue considerada por Ledig y colaboradores (2000) quienes afirman que los niveles elevados de diferenciación genética de las coníferas en México y América Central se deben a que estas poblaciones se encuentran fragmentadas, lo que puede ocasionar una reducción de los niveles de flujo genético y por ende haberse favorecido ya sea la deriva genética en las poblaciones aisladas de menor tamaño. Lo anterior fue apoyado también por Delgado y colaboradores (2002) quienes

atribuyeron la alta diferenciación entre las poblaciones de los pinos piñoneros de América del Norte a que estas presentan bajas densidades, están relativamente aisladas y además la semilla es dispersada por aves.

El número estimado de migrantes por generación ($N_m = 1.27$) fue bajo, lo que indica escaso flujo génico entre las poblaciones. La distribución geográfica de *P. cembroides* no presenta un patrón continuo en todo el rango de su distribución (Manzanares *et al.*, 1996). Las poblaciones que se incluyeron en este trabajo se localizan en el área discontinua de la distribución, por lo que era esperado que existiera poco flujo génico entre las poblaciones. El valor de N_m fue bajo en comparación con los valores estimados en otras especies de *Pinus*, como *P. johannis* ($N_m = 4$, García-Gómez, 2014) u otras consideradas por Ledig (1998, citado por Ledig *et al.*, 2001) quien encontró valores altos de N_m (el rango fue de 4.6 a 17.2).

Se considera que si N_m es alto (al menos igual a 4), el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local. Si N_m es pequeño (menor a 1), entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones (Eguiarte, 2010). De acuerdo al valor de $N_m = 1.27$, cercano a 1 podemos decir que el flujo no supera los efectos de la deriva génica en las poblaciones. Cuenca (2003) también encontró flujo genético restringido entre algunas de las poblaciones de *P. cembroides* con las que trabajo, además encontró también falta de equilibrio entre migración y deriva génica.

5.3. Análisis de Agrupamiento

El agrupamiento generado a partir del índice de Similitud fue capaz de separar la mayoría de los individuos por población (ANEXO B). Por otro lado, de acuerdo al Análisis de Coordenadas Principales (Figura 8) se puede inferir que

las poblaciones de La Florida y Pinalito podrían tener un mismo origen ya que están estrechamente relacionadas genéticamente. El grupo más numeroso estuvo conformado por poblaciones de las dos provincias fisiográficas, en el cual se identifica sobre posición de los individuos, lo que evidencia la estrecha relación genética entre estas poblaciones.

Otro aspecto a considerar es el de la Amapola, la población menos relacionada genéticamente con el resto de las poblaciones. Este patrón lo identificó también Cuenca (2003) para *P. johanis*; en este trabajo incluyó tres poblaciones de dicha especie, dos en San Luis Potosí y una en Zacatecas. Y lo que encontró fue que la población de la Amapola S.L.P., fue la más distante genéticamente respecto a las otras dos poblaciones, aun cuando una de las poblaciones era cercana geográficamente. Por lo que infiere que existe en esta localidad alguna barrera que impide el intercambio genético entre las poblaciones.

5.4. Aislamiento por distancia

Dado que no existió correlación significativa entre la matriz de distancia genética y distancia geográfica, se puede suponer que las poblaciones de *P. cembroides* de la Región Centro de México no siguen un patrón de aislamiento por distancia. Para *P. rzedowskii* (Delgado *et al.*, 1999) y *P. pinceana* (Aguirre-Limón *et al.*, 2017), pinos piñoneros, tampoco se encontró correlación entre estas variables. Para otros pinos no piñoneros, por ejemplo, *P. greggi* (Parraguirre *et al.*, 2002), se halló correlación significativa solo para algunas de las poblaciones.

Lo anterior podría sugerir que existen otras características que determinan los patrones de variación genética como la historia de vida de las especies, entre otros.

VI. CONCLUSIONES

La diversidad genética encontrada en las poblaciones de *P. cembroides* de la región centro de México fue alta en correspondencia con la hipótesis planteada, encontrándose los valores más altos en las poblaciones que se distribuyen en la Sierra Madre Oriental.

La mayor parte de la diversidad genética se encontró dentro de las poblaciones. Existe una alta diferenciación genética entre las poblaciones, y escaso flujo génico entre ellas.

En las poblaciones evaluadas no existió correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética.

VII. LITERATURA CITADA

AddinSoft. (2017). *XLSTAT* (versión 19.5) [Software]. Addinsoft, Inc. Bro N. Y., U. S. A.

Allendorf, F., Luikart, G. & Aitken, S. (2013). Conservation and the genetics of populations. Wiley-BlackWell. Massachusetts, U.S.A. 602 p.

Aguirre-Limón, V., Alanís-Flores, G., González-Rojas, J. I., Flores-Suárez, A. & Favela-Lara, S. (2017). Variación genética de *Pinus pinceana* Gordon evidencia de conectividad en poblaciones fragmentadas. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8, 39-63.

Aguirre, P. E. (2007). Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En Eguiarte L., Souza, V. & Aguirre X. (Comps). *Ecología molecular*. (pp. 49-62) Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México.

Berg, E. E. & Hamrick, J. L. (1997). Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal Forest Research*, 27, 415–424.

Castillo, C. A. (2007). La selección natural a nivel molecular. En Eguiarte, E. L., Souza, V. & Aguirre, X. (Comps). *Ecología Molecular*. (pp. 11-48) Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Castro-Félix, P., Ramos, N. C., Pérez de la Rosa, J., Vargas, A. G. & Villalobos-Arámbula, A. (2006). Diversidad genética de *Pinus ayacahuite* utilizando marcadores RAPDs en genoma diploide y haploide. *Scientia Cucba*, 8, 193-202. Consultada en: <http://www.cucba.udg.mx/new/publicaciones>.

Cuenca, N., A. (2003). *Evidencia de dos linajes genéticos en Pinus cembroides revelada por microsatélites de cloroplasto*. (Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.). Consultada en: <http://www.remeri.org.mx/tesis/INDIXE-TESES.jsp?id=oai:tesis.dgbiblio.unam.mx>.

De Vicente, M. C. y Fulton, T. (2003). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma, Italia. Consultado en: https://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx_news/Molecular_Markets_Volume_1_es_04.pdf

De Vicente, M.C., López, C. y Fulton, T. (2004). Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma, Italia. Consultado en: www.biodiversityinternational.org/e-library/publications/detail/modulos-de-aprendizaje-sobre-marcadores-moleculares-vol-1-y-2/.

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

- Delgado, P., Cuenca, A., Escalante, A., Molina-Freaner, F. & Piñero, D. (2002). Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 27-32.
- Eguiarte, L., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., González, A. & Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de evolución molecular y experimental. Consultado en: <http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/>.
- Favela, L. S. (2010). Population variation in the endemic *Pinus culminicola* detected by RAPD. *Polibotánica*, 30, 55-67.
- Flores-Rentería, L., Wegier, A., Ortega, D., Ortiz-Medrano, A., Piñero, D., Whipple, A., Molina-Freaner, F. & Domínguez, C. (2013). Genetic, morphological, geographical and ecological approaches reveal phylogenetics relationships in complex groups, an example of recently diverged pinyon pine species (Subsection Cembroides). *Molecular Phylogenetics and evolution*, 69, 940-949.
- Furnier, G. (2004). Métodos para medir variación genética en plantas. En Vargas, H. J., Bermejo, B.† & Ledig, T. (Eds.). *Manejo de Recursos Genéticos Forestales* (2^a ed.) (pp. 2-19). Colegio de Postgraduados, Texcoco, México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco.
- Futuyma, J. D. (2005). *Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U. S. A. 603 p.

- García-Gómez, V., Ramírez-Herrera, C., Flores-López, C. & López-Upton, J. (2014). Diversidad y estructura genética de *Pinus johannis*. *Agrociencia*, 48, 863-873.
- González, A. & Aguirre, X. (2007). Inter Simple Sequences Repeats. En Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. (Comps.). *Ecología molecular*. (pp. 567-571). Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Hamilton, B. M. (2009). Population Genetics. Wiley-BlackWell. N. J., U.S.A. 407 p.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J., Sherman-Broyles, S. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. *New Forests*, 6, 95-124.
- Hamrick, J. L. & M. J.W. Godt. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 351: 1251-1258.
- Hernández, R. M. (2012). Diversidad y grado de aislamiento genético en dos poblaciones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski, utilizando RAPD. (Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila). 63p. Consultada en: <http://www.repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1045/62490s.pdf>.
- Hollingsworth, P. M. & Ennos, R. A. (2004). Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity*, 92, 490-498.

Hughes, R. A., Inouye, B. D., Jhonson, T. J., Underwood, N. & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11, 609–623.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (2008). Características edafológicas, fisiográficas, climáticas e hidrográficas de México. Consultado en: http://www.inegi.org.mx/inegi/spc/doc/internet/1-geografiademexico/manual_carac_eda_fis_vs_enero_29_2008.pdf

Ledig, F.T. & Conkle, T. M. (1983). Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution*, 37, 79-85.

Ledig, F. T., Capó-Arteaga, M., Hodgskiss, P., Sbay, H., Flores-López, C., Conkle, T. & Bermejo-Velázquez, B. (2001). Genetic Diversity and the mating system of a rare Mexican pinion, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (PINACEAE). *American Journal of Botany*, 88, 1977-1987.

Ledig, F. T. (2004). Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. En Vargas, H. J., Bermejo, B.† & Ledig, T. (Eds.). *Manejo de Recursos Genéticos Forestales* (2ª ed.) (pp. 2-19). Colegio de Postgraduados, Texcoco, México, y Comisión Nacional Forestal, Jalisco, México.

Lewontin, R. C. (1972). The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 6, 381–398. Consultado en: <http://www.philbio.org/wp-content/uploads/2010/11/Lewontin-The-Apportionment-of-Human-Diversity.pdf>.

- Liu, H. Z., Xie, Q. & Li, Z. Q. (2015). Genetic diversity and taxonomic status of *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* revealed by ISSR markers. *Genetics and molecular Research*, 14, 1034-1043.
- Loo, J. (2011). Manual de Genética de la conservación. Secretaria del Medio ambiente y recursos naturales. Comisión Nacional Forestal. Jalisco, Mex. 192 p.
- Luna-Cavazos, M., Romero-Manzanares, A. & García, M. E. (2008). Afinidades en la flora genérica de piñonares del norte y centro de México: un análisis fenético. *Revista Mexicana de biodiversidad*, 79, 449-458.
- Manzanares, R. A., García, M. E. & Passini, M. F. (1996). *Pinus cembroides* s. l. y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano: una síntesis. *Acta Botánica Gallica*, 143, 681-693. Consultado en: <http://dx.doi.org/10.1080/12538078.1996.10515368>.
- Martínez, M. (1948). Los pinos mexicanos. Ed. Botas. México. 361 p.
- Nei, M. (1975). Molecular population genetics and evolution. North-Holland Publishing Company. New York, U. S. A. 288 p.
- Nielsen, R. & Slatkin, M. (2013). An introduction to Population Genetics: Theory and applications. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U. S. A. 287 p.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143-1155.

- Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). (2011). Situación de los Recursos Genéticos Forestales en México. México. Consultado en: <http://www.fao.org/3/a-be793s>.
- Parraguirre, L. C., Vargas, H. J., Ramírez, V. P., Azpíroz, R. H. & Jasso M. J. (2002). Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de de *P. greggii*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25, 279-287.
- Parasharami, V. A. & Thengane, S. (2012). Interpopulation genetic diversity analysis using ISSR markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian provenances. *Journal of Biodiversity and Conservation*, 4, 219-227. Consultado en: www.academicjournals.org/journal/IJBC/article.../964B6C49883.
- Peakall, R. & Smouse, P. (2006). GENALEX (Versión 6.5) [Software]. The Australian National University, Australia and Rutgers University, U.S.A.
- Perry, J. P. (1991). *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Inc. U. S. A. 231 p.
- Piñero, D. (2005). Estructura genética y conservación. El caso de los pinos de México. CONABIO. *Biodiversitas*, 61, 8-11.
- Piñero, D. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. (pp. 437-494). Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.

- R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing (Versión 3.4.0) [Software]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rohlf, F.J. (2002). NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.1. Exeter Publishing, Setauket, N.Y., U. S. A.
- Rocha, M. M., González, G. A. & Aguirre, X. (2014). ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas. En Cornejo, R. A., Serrato, A., Rendón, B. & Rocha, M. (Comps). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 101-126). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Romero, M. A., García, M. E. & Passini, M. F. (1996). *Pinus cembroides* s. l. y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano: una síntesis. *Acta Botánica Gallica*, 143, 681-693. DOI: 10.1080/12538078.1996.10515368. Consultado en: <http://dx.doi.org/10.1080/12538078.1996.10515368>. Consultado en: www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/12538078.1996.10515368.
- Rzedowski, J. (1978). Vegetación de México. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. México. 432 p.
- Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques*, 14, 107-120.
- Vázquez, S. J., Martínez, M. F. & Hernández E. X. (1977). Botánica Forestal. Comisión Forestal del Estado de Michoacán. México. 250 p.

- Valadez, M. E., Kahl, G., Ramser J., Hüttel B. & Rubluo, I. A. (2001). Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24,103-120. Consultado en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61024113>.
- Villarreal, Q. J. A., Mares, A. O., Cornejo, O. E. & Capó, A. M. (2009). Estudio florístico de los piñonares de *Pinus pinceana* Gordon. *Acta Botánica Mexicana*, 89, 97-124.
- Wehenkel, C. (2015). Establecimiento y Manejo de Unidades Productoras de Germoplasma Forestal en la UMAFOR 0802 “El Largo-Madera”, Chihuahua. Informe Técnico Final. Instituto de Silvicultura e Industria de la madera. Secretaría del Medio Ambiente. 98 p. Consultado en: www.cnf.gob.mx:8090/snif/seif_chihuahua/.../2-sistemas-biometricos?.
- Winzer, N., Di Renzo, M., Olmos, S. & Ibañez, M. (2010). Métodos multivariados para estimar la variabilidad genética. En Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (eds.). *Bioteconología y mejoramiento Vegetal II*. (pp. 283-294). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
- Yeh, F., Yang, R. & Boyle, T. (1999). Popgene 32 (Versión 1.31) [Software]. University of Alberta, Canada.
- Zobel, B. J. & Talbert, J. (1992). Técnicas de Mejoramiento Genético de árboles Forestales. Ed. Limusa, México, D.F. 545 p.

VIII. ANEXOS

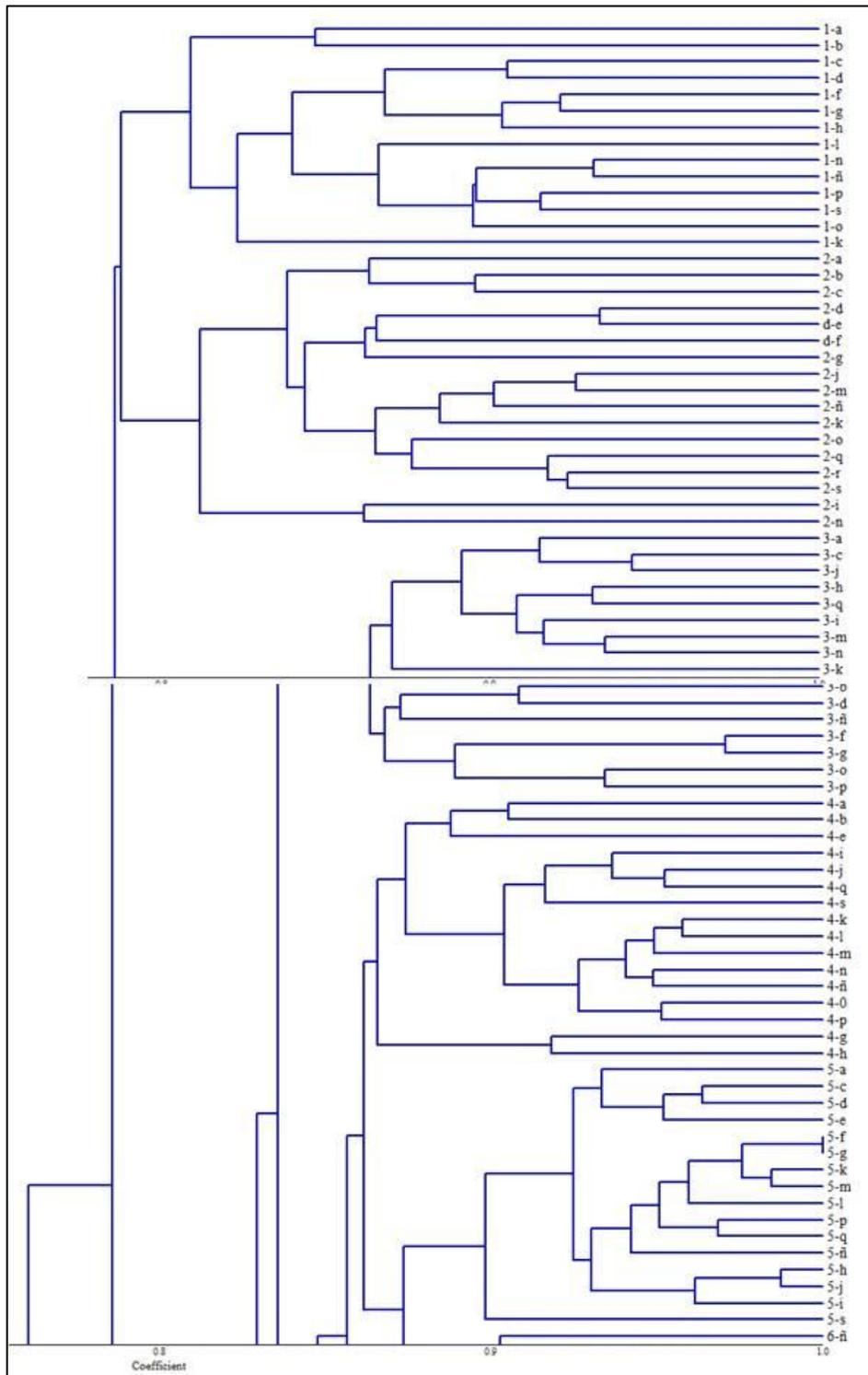
PURIFICACIÓN DE ADN CON EL MÉTODO CTAB

1. Macerar con nitrógeno líquido 0.3 g de tejido vegetal empleando un mortero.
2. Colocar el tejido vegetal macerado en un microtubo con 750 uL de CTAB más 0.3 % de mercaptoetanol previamente colocado a 65 °C durante 15 minutos.
3. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C.
4. Agregar 300 uL de Acetato de Potasio 5M, mezclar suavemente e incubar en hielo por 15 minutos.
5. Centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm y transferir el sobrenadante a otro tubo nuevo.
6. Agregar 500 uL de cloroformo : octanol (24:1), mezclar suavemente por inmersión del tubo y centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf que contenga 500 uL de isopropanol frio para precipitar.
8. Incubar en hielo durante 30 minutos.
9. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos y decantar el sobrenadante.
10. Resuspender en 200 uL de solución de disolución.
11. Eliminar el ARN con 2 uL ARNasa A durante 1 hora a 37 °C.
12. Precipitar adicionando 20 uL de acetato de sodio 3 M y 200 uL de isopropanol frio, mezclar suavemente y dejar incubar 1 hora a -20°C.
13. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos y decantar el sobrenadante
14. Lavar la pastilla de ADN en 200 uL de etanol frio al 70 %, dejar secar durante 30 minutos.
15. Resuspender en 100 uL de TE, cuantificar y guardar a 4 °C.

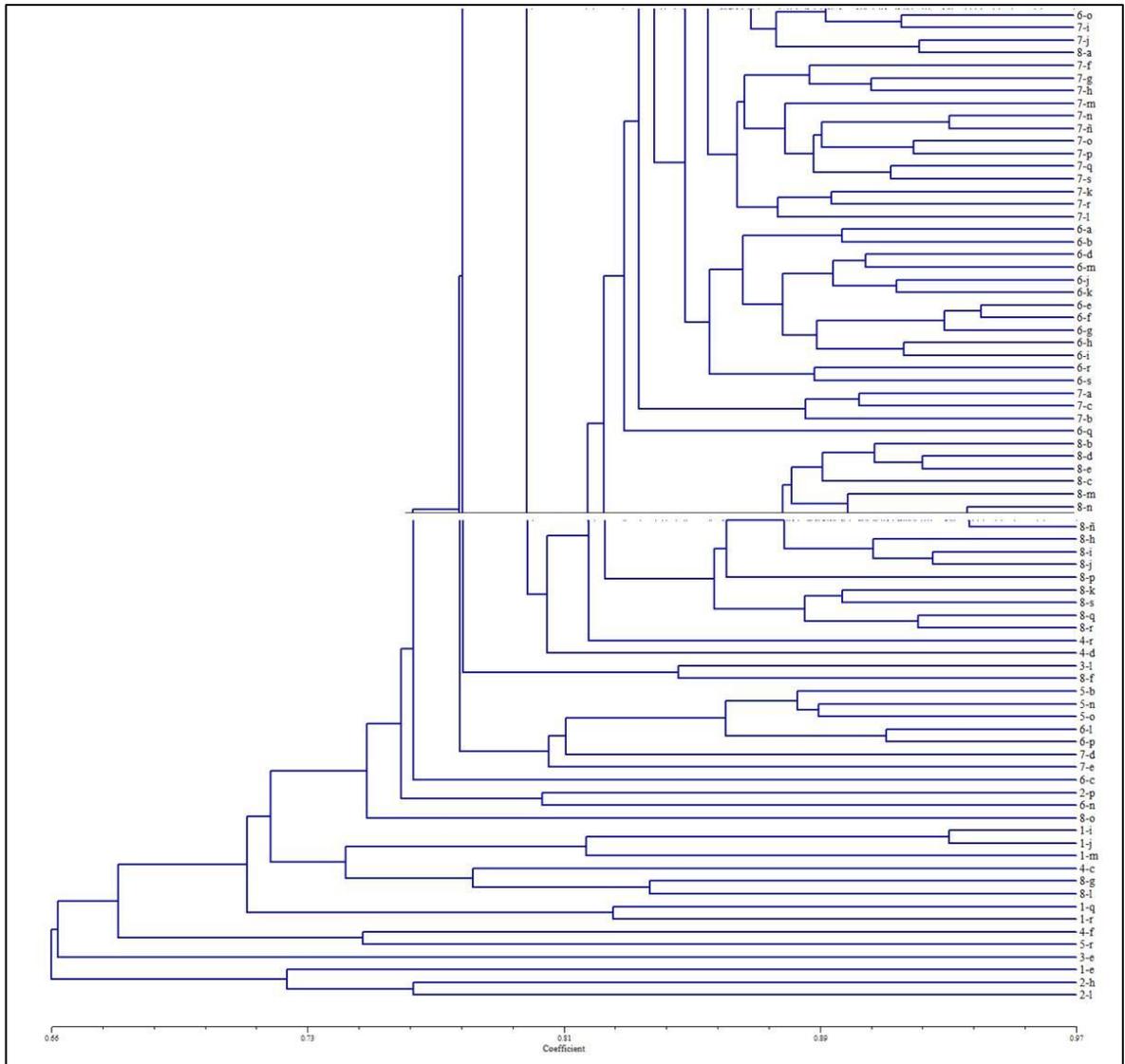
Reactivos

- Amortiguador de extracción CTAB: Tris 7.5 100 mM, NaCl 700 mM, EDTA 8.0 50 mM, CTAB 1%, BME, 1% de PVP.
- Acetato de Potasio 5M
- Solución para diluir: Tris-HCL 50 mM, EDTA-Na₂ 10 mM, pH 8.0
- Amortiguador TE: Tris-HCL 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8.0
- Acetato de sodio 3 M
- Isopropanol frio (-20 °C)
- Etanol 70 %
- ARNasa: 10 mg/mL en Tris-HCL 10mM, CaCl₂ 5 mM, glicerol 50 %, pH7.0. Antes de usar, hervir en baño de agua por 30 minutos.

DENDROGRAMA MOSTRANDO LAS RELACIONES ENTRE LOS INDIVIDUOS DE OCHO POBLACIONES DE *P. CEMBROIDES*.



...



*Los individuos que inician con el número 1, pertenecen a la población de La Florida, 2= Pinalito, 3= Bledos, 4= Los Juárez, 5= El Cubo, 6= Ojo de Agua, 7= Santiago y 8= Amapola.