

## ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Pinus cembroides* DE LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO

### GENETIC STRUCTURE OF *Pinus cembroides* POPULATIONS FROM CENTRAL MEXICO

Sandra L. Fuentes-Amaro<sup>1</sup>, Juan P. Legaria-Solano<sup>1\*</sup> y Carlos Ramírez-Herrera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Chapingo, Texcoco, México. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Programa Forestal, Montecillo, Texcoco, México.

\*Autor para correspondencia (legarias.juan@yahoo.com)

#### RESUMEN

*Pinus cembroides* es el pino piñonero con la más amplia distribución e importancia económica y social en México. El objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles y patrones de variación genética de ocho poblaciones de *P. cembroides* de la región central de México mediante marcadores ISSR (Inter-secuencias simples repetidas). Las poblaciones se distribuyen en dos provincias fisiográficas, la Sierra Madre Oriental y la Mesa del Centro. Los iniciadores utilizados generaron un total de 154 bandas, de las cuales 88.3 % fueron polimórficas a nivel de especie. La diversidad genética promedio en las poblaciones fue alta ( $H_e = 0.22$ ), el porcentaje de polimorfismo promedio fue 59.2 %. Los parámetros de diversidad genética fueron más altos en las poblaciones de la Sierra Madre Oriental. La mayor parte de la diversidad genética se encontró dentro de las poblaciones (74 %) y sólo el 26 % entre éstas. De acuerdo con el valor de  $G_{ST} = 0.28$ , existe alta diferenciación entre las poblaciones. El nivel de flujo génico, considerado como el número de individuos migrantes, fue bajo ( $N_m = 1.27$ ) entre las poblaciones en las dos regiones. Se encontró baja pero significativa correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética de las poblaciones en las dos regiones.

**Palabras clave:** Distancia genética, iniciadores, flujo génico, marcadores, polimorfismo.

#### SUMMARY

*Pinus cembroides* is the pinyon pine with the widest distribution and the greatest economic and social importance in México. The objective of this study was to evaluate the levels and patterns of genetic variation of eight populations of *P. cembroides* from the central region of Mexico by using ISSR (Inter-simple sequence repeat) markers. The populations are distributed in two physiographic provinces, the Sierra Madre Oriental and the Central Plateau. The primers used generated a total of 154 bands, of which 88.3 % were polymorphic, at the level of species. The average genetic diversity in the population was high ( $H_e = 0.22$ ), the average polymorphism percentage was 59.2 %. The parameters of genetic diversity were higher in the populations of the Sierra Madre Oriental. Most of the genetic diversity was found within the populations (74 %) and only 26 % among them. According to the value of  $G_{ST} = 0.28$ , there is high differentiation between populations. The gene flow level, considered as the number of migrating individuals, was low ( $N_m = 1.27$ ) between the population in the two regions. A low, yet significant correlation was found between the geographical distance and the genetic distance of populations in the two regions.

**Index words:** Genetic distance, primers, gene flow, markers, polymorphism.

#### INTRODUCCIÓN

México se considera el país con mayor diversidad de especies del género *Pinus*, al contar con 42 % de las especies que existen en el mundo (Sánchez-González, 2008). Una de las especies ampliamente distribuidas es *Pinus cembroides* Zucc., calificado como el pino piñonero (*Pinus cembroides*) de mayor importancia económica en el país (Luna-Cavazos *et al.*, 2008); además, está incluido en la lista de especies prioritarias con fines de conservación, reforestación y restauración (CONABIO, 2011). Caracterizar la diversidad genética es útil en la definición de estrategias de mejora genética, conservación y manejo de los recursos genéticos (Furnier, 2004; Loo, 2011).

Actualmente se utilizan los análisis genéticos con marcadores moleculares para estimar el polimorfismo presente en el ADN, debido a su abundancia y a que no son afectados por el ambiente (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001). Los ISSR (Inter-secuencias simples repetidas) son marcadores dominantes, altamente polimórficos, de bajo costo, no requieren información sobre la secuencia de la especie en cuestión y son reproducibles (Rocha *et al.*, 2014).

Las coníferas tienen varios mecanismos que promueven el apareamiento cruzado, lo que genera un flujo genético eficiente entre poblaciones de una especie (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 que tienen usualmente una distribución continua presentan menos diversidad entre las poblaciones, a pesar de tener amplia distribución, lo que es atribuible a un flujo genético importante (Hamrick *et al.*, 1992, Ledig *et al.*, 2001). Según Ledig y Conkle (1983), se espera que *P. cembroides* tenga altos niveles de diversidad genética, dadas las características

biológicas de la especie (leñosa, de amplia distribución y alógama). Por otro lado, se ha observado que los pinos piñoneros muestran elevada diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{st} \geq 0.15$ ), asociado probablemente con bajas densidades, dispersión de semillas por aves y resistencia a sequía (Delgado *et al.*, 2002).

Se tiene información de diversidad genética en ADN nuclear en poblaciones del norte del país de *P. cembroides* mediante AFLP (Wehenkel, 2015, Com. Pers.)<sup>1</sup>, quien encontró hasta 98 % de polimorfismo. Aunque se ha estudiado la diversidad genética medida a nivel de cloroplasto en poblaciones del norte del país, no hay reportes publicados (Cuenca, 2002, Com. Pers.)<sup>2</sup>; por lo que el presente trabajo pretende complementar la información genética de la especie, al evaluar la diversidad genética presente en ADN nuclear en poblaciones del centro del país.

La información sobre la magnitud y distribución de la diversidad genética entre poblaciones de las especies es fundamental para proponer estrategias de conservación y programas de manejo sustentable a largo plazo (Frankham *et al.*, 2002). En estos programas se deben incluir poblaciones con componentes genéticos representativos y únicos para disminuir problemas relacionados con los efectos de endogamia, exogamia, flujo génico reducido y mutaciones deletéreas, que influyen en la habilidad de las especies para su evolución (Frankham *et al.*, 2002). Estos efectos pueden conducir a la extinción de especies que crecen en poblaciones pequeñas y aisladas y en las cuales se esperarían una diversidad genética baja por la acción de la deriva genética y la endogamia.

Considerando lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la diversidad y estructura genética de poblaciones de *P. cembroides* de la región central de México mediante marcadores ISSR y determinar la relación de las distancias genéticas con las distancias geográficas. Las hipótesis panteadas fueron que se esperaba encontrar una alta diversidad genética en *P. cembroides*, distribuida principalmente dentro de las poblaciones debido a la amplia distribución de la especie, polinización cruzada, ciclo de vida largo y la dispersión por animales; además, que las poblaciones geográficamente cercanas presentarán mayor relación genética que las lejanas, debido a un mayor flujo de genes entre las mismas.

<sup>1</sup>Wehenkel C. A. (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. Ciudad Madera, Chihuahua. 99 p.

<sup>2</sup>Cuenca N. A. (2002) Evidencia de dos linajes genéticos en *Pinus cembroides* revelada por microsátélites de cloroplasto. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 96 p.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de material vegetal

Se estudiaron ocho poblaciones de *Pinus cembroides* de la región central de México (Cuadro 1). Se recolectaron hojas jóvenes de 20 árboles seleccionados al azar en cada población, dejando una distancia de por lo menos 30 m entre ellos para evitar recolectar material de árboles emparentados. Se tomaron muestras de 10 g de hoja de cada uno de los individuos, éstas se depositaron en bolsas plásticas con cierre hermético y se mantuvieron sobre una capa de hielo hasta depositarlas en un ultracongelador (Thermo Scientific ULT2586, Waltham, Massachusetts, U.S.A.) a -80 °C durante una semana.

### Extracción y calidad del ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método CTAB 2X con 1 % de polivinilpirrolidona (PVP). La calidad del ADN se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v), que se corrió en amortiguador Tris-Acetato-EDTA (TAE 0.5 X) (Tris-Base, ácido acético y EDTA 0.5 M, pH 8.0). El gel fue teñido con bromuro de etidio al 0.1 % (p/v) y posteriormente se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y un fotodocumentador KODAK EDAS-290. Se definió al ADN de calidad al obtener una banda uniforme y de alto peso molecular. En cada una de las muestras se cuantificó la cantidad de ADN con un espectrofotómetro marca GENESYS 10uv. El ADN se diluyó a una concentración de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para ser utilizado en las reacciones de PCR.

### Amplificación de fragmentos

Los componentes de reacción fueron los siguientes: 4  $\mu\text{L}$  de ADN (10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  de la enzima Taq ADN polimerasa, 10  $\mu\text{L}$  de dNTPs (500  $\mu\text{M}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador (10X), 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 3  $\mu\text{L}$  de iniciador y 3.2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne TC-512 (Bibby Scientific, Vernon Hills, Illinois, U.S.A.). Las condiciones de las reacciones fueron: a) un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; b) 30 ciclos con temperaturas de 94 °C durante 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 2 min; y c) un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 min. Se probaron 14 iniciadores ISSR, de los cuales se eligieron los nueve que generaron la mayor cantidad de bandas (Cuadro 2).

### Electroforesis y obtención de datos

Los productos amplificados de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1.2 %. Los geles se corrieron

**Cuadro 1. Ubicación geográfica, temperatura y precipitación media anual de las localidades de procedencia de las poblaciones de *Pinus cembroides* estudiadas en la región central de México.**

Localidad	Municipio, Estado	Provincia Fisiográfica <sup>†</sup>	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Temp. media anual (°C)	Precip. Media anual (mm)
La Amapola	San Luis Potosí, SLP	Mesa del Centro	22° 08' 23.3"	101° 08' 39.0"	2369	17.9	341.0
Bledos	Villa de Reyes, SLP	Mesa del Centro	21° 48' 34.7"	101° 08' 16.7"	1960	19.5	360.0
Ojo de Agua	San Felipe, Gto	Mesa del Centro	21° 39' 05.2"	101° 11' 55.0"	1840	16.7	473.4
El Cubo	San Felipe, Gto	Mesa del Centro	21° 29' 56.5"	101° 05' 20.5"	2073	16.7	473.4
Los Juárez	Cadereyta, Qro	Sierra Madre Oriental	20° 51' 58.3"	99° 38' 39.5"	2699	17.3	506.0
El Pinalito	Cardonal, Hgo	Sierra Madre Oriental	20° 39' 19.1"	99° 06' 0.3"	2178	16.0	430.0
La Florida	Cardonal, Hgo	Sierra Madre Oriental	20° 31' 26.4"	98° 58' 57.4"	1933	16.0	430.0
Santiago de Anaya	Santiago de Anaya, Hgo	Sierra Madre Oriental	20° 26' 14.7"	98° 58' 6.4"	2038	16.0	550.0

<sup>†</sup>La Provincia Fisiográfica corresponde a la clasificación del INEGI (2008).

**Cuadro 2. Iniciadores utilizados para el análisis de poblaciones de *Pinus cembroides* de la región central de México.**

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Número de bandas	% de bandas polimórficas	Temperatura de alineamiento (°C)
7939	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	15	80.0	50
7941	GAGAGAGAGAGAGAGAC	21	71.4	50
7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG	14	50.0	50
7949	GAGAGAGAGAGAGAGA	18	77.7	50
7955	AGAGAGAGAGAGAGAGA	18	80.0	50
A8	AGAGAGAGAGAGAGAGT	15	86.6	50
P1	GAGCAACAACAACAACA	19	78.9	50
P3	AGAGAGAGAGAGAGAGTG	17	54.5	50
P5	AGAGAGAGAGAGAGAG	17	82.3	50
Promedio		17.1	73.4	50

en amortiguador TAE 0.5X, a 120 V. El teñido y la documentación del gel se hicieron de la misma manera en que se verificó la calidad del ADN.

**Análisis de los datos**

**Diversidad genética**

A partir de los patrones de bandeo en 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 la ausencia de dicha banda. Para el análisis intra e interpoblacional se usó el programa Popgene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) con

la inclusión de todos los individuos de cada población. Los parámetros estimados fueron el porcentaje de loci polimórficos (frecuencia del alelo más común  $\leq 0.95$ ) de acuerdo con Hedrick (2011) y el índice de diversidad génica de Nei o heterocigosidad promedio esperada  $H_e$  (Nei, 1987).

**Diferenciación genética**

La distancia genética ( $D_N$ ) se estimó con base en lo señalado por Nei (1975).  $D_N$  toma valores de cero cuando las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas y tiende a uno en poblaciones que no comparten ningún alelo (Hedrick, 2005).

El coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{ST}$ ) se calculó con base en Nei (1975). Este estimador es altamente dependiente de la cantidad de variación que hay dentro de las poblaciones y del total de la población.

### Tasa de migración y estructura genética

El número de individuos migrantes por generación ( $N_m$ ) se obtuvo de acuerdo con McDermott y McDonald (1993) y para describir la estructura genética se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

### Análisis de agrupamiento

A partir de la matriz binaria se obtuvo una matriz de distancias entre los individuos muestreados, misma que sirvió para realizar un análisis de coordenadas principales. El método que se utilizó para dicho análisis fue el de covarianza-estandarizada, con 1000 permutaciones, mediante el programa GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

### Aislamiento por distancia

Para evaluar la existencia de correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética se aplicó una prueba de Mantel con el programa XLSTAT versión 19.5 (AddinSoft, Inc. New York), utilizando las respectivas matrices de distancias para cada una de las regiones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diversidad Genética

Los nueve iniciadores que se utilizaron generaron un total de 154 bandas, dando como resultado un promedio de 17 bandas por iniciador. El número de bandas que se generó por iniciador fue variable, desde 14 con el iniciador 7944, hasta 21 con el iniciador 7941. El polimorfismo detectado por iniciador varió de 50 a 86.6 %, donde el iniciador A8 fue el que mostró un mayor porcentaje de *loci* polimórficos (Cuadro 2).

A nivel de especie se encontró alto polimorfismo (88.3 %), tal como se esperaba dadas las características de la especie y los iniciadores utilizados. En otras especies como *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* Carr. (Liu *et al.*, 2015) y *Pinus roxburghii* Roxb. Ex. Lamb (Parasharami y Thengane, 2012) se encontraron de igual forma, altas tasas de polimorfismo (74.1 y 100 %, respectivamente) con el mismo tipo de marcadores. El polimorfismo en *P.*

*cembroides* encontrado en el presente trabajo es mayor que el reportado para otros pinos piñoneros, como 65 % en *Pinus culminicola* Andresen et Beaman (Favela, 2010) con marcadores RAPD (también dominantes y polimórficos). Probablemente las diferencias estén relacionadas con el hecho de que en dicho trabajo se evaluaron sólo dos poblaciones.

A nivel poblacional, con los parámetros estimados se identificó un nivel de diversidad genética de moderado a alto en las ocho poblaciones que se evaluaron (Cuadro 3). Estos parámetros fueron más altos en las poblaciones de la Sierra Madre Oriental; por ejemplo, la amplitud de polimorfismo de las poblaciones que se distribuyen en la Sierra Madre Oriental fue de 61.0 a 63.9 %, mientras que dicho intervalo para las poblaciones de la Mesa Central fue de 45.5 a 61.7 %. La diversidad génica varió de 0.22 a 0.24 para las poblaciones de la Sierra Madre Oriental, y de 0.18 a 0.22 en las de la Mesa Central. Con el porcentaje de polimorfismo y la diversidad génica se encontró un patrón con la existencia de valores ligeramente más altos en las poblaciones de la Sierra Madre Oriental que en las de la Mesa del Centro (Cuadro 3).

La diversidad génica ( $H_e$ ) promedio que se detectó mediante ISSR fue alta (0.22) de acuerdo con el criterio de Lowe *et al.* (2004). Al ser *P. cembroides* una conífera, se esperan altos niveles de diversidad genética, según lo señalado por Ledig y Conkle (1983) y Delgado *et al.* (1999), quienes sostienen que estos niveles de diversidad genética se deben entre otras cosas, a que poseen varios mecanismos que promueven el apareamiento cruzado, lo que podría compensar los efectos de la fragmentación, característica de los piñoneros en México (Ledig, 1998).

En comparación con lo encontrado para *P. cembroides* ( $H_e = 0.59$ ) por Cuenca (2002, Com. Pers.)<sup>2</sup> con microsatélites de cloroplasto, la diversidad encontrada en el presente estudio con marcadores ISSR fue menor. Los microsatélites en general revelan más alto nivel de polimorfismo que los ISSR y además son codominantes (Höglund, 2009). Con AFLP, marcador dominante, Wehenkel (2015, Com. Pers.)<sup>1</sup> evaluó las características genéticas de *P. cembroides* en unidades productoras de germoplasma en Chihuahua, donde encontró hasta 98 % de polimorfismo, lo que se puede atribuir a que los AFLP son capaces de detectar una mayor cantidad de variantes que los ISSR.

### Análisis de agrupamiento de los individuos

Las poblaciones no se agruparon por región, sino que se concentraron en tres grupos de acuerdo con sus relaciones genéticas (Figura 1). Uno de los grupos lo

**Cuadro 3. Parámetros de diversidad genética observados en las poblaciones de *Pinus cembroides* en la región central de México.**

Localidad	% de polimorfismo	Diversidad génica (He)
El Pinalito	63.9	0.24
Los Juárez	63.2	0.22
Santiago de Anaya	61.7	0.23
La Florida	61.0	0.23
Promedio región Sierra Madre Oriental	62.4	0.23
La Amapola	61.7	0.22
Ojo de Agua	58.8	0.21
Bledos	58.0	0.21
El Cubo	45.5	0.18
Promedio Región Mesa Central	56.0	0.20
Promedio General	59.28	0.22

conformaron las poblaciones de La Florida y El Pinalito. Los individuos se traslaparon, por lo que se puede inferir que estas poblaciones están muy relacionadas genéticamente, e incluso, por la cercanía geográfica, es probable que tengan un mismo origen. El grupo más numeroso estuvo conformado por poblaciones de las dos provincias fisiográficas (Bledos, Los Juárez, Santiago, Ojo de Agua y El Cubo), en el cual se observa sobreposición de los individuos, lo que evidencia también la estrecha relación genética entre estas poblaciones.

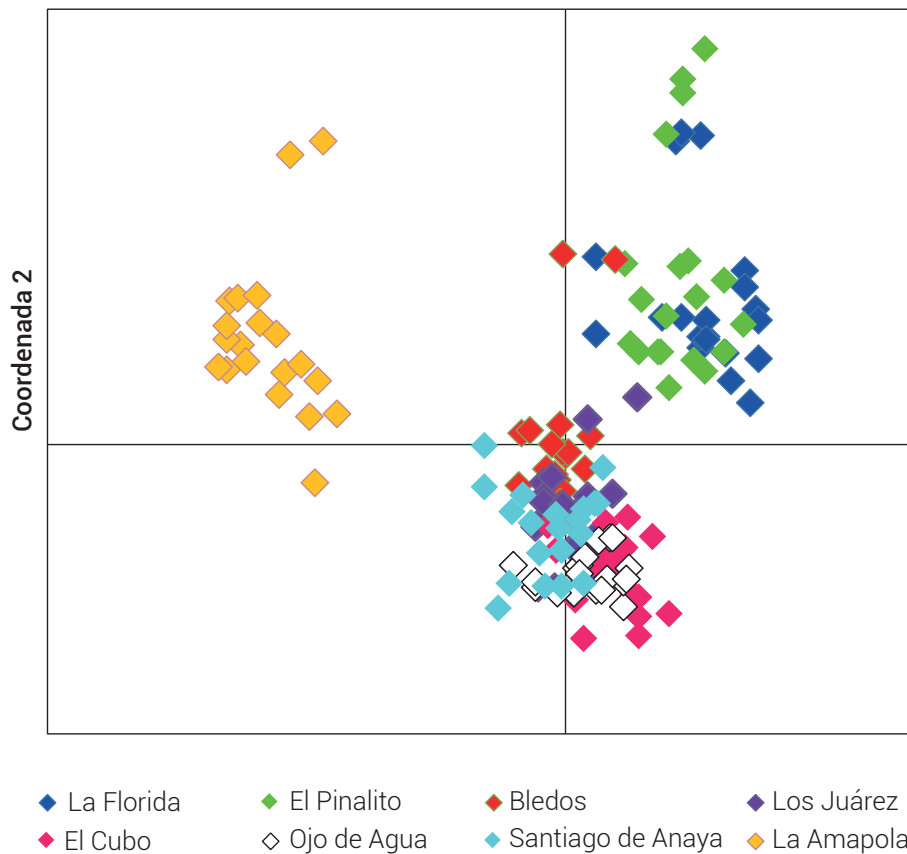
La población de La Amapola fue la más alejada genéticamente del resto. Un patrón semejante fue identificado por Cuenca (2002, Com. Pers.)<sup>2</sup> para *Pinus johannis* Rob., quien reportó que la población de La Amapola S.L.P. fue la más distante genéticamente con respecto a otras dos poblaciones evaluadas, aun cuando una de las poblaciones fue muy cercana geográficamente, por lo que se puede inferir que existe en esta localidad alguna barrera que restringe el intercambio genético entre las poblaciones, o que la población se originó por un evento demográfico extremo que tuvo un efecto genético de cuello de botella.

#### Estructura y diferenciación genética

Los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) (Cuadro 4) indicaron que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (74 %) y sólo 26 % entre las mismas. Esto concuerda con lo planteado por Hamrick *et al.* (1992), quienes sugieren que las especies 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 menor variación entre las poblaciones. Este patrón es consistente también con la mayoría en los resultados reportados en otros trabajos de coníferas (Delgado *et al.*, 2002; Flores-Rentería *et al.*, 2013), y específicamente para el género *Pinus* como *P. pinceana* Gordon (Aguirre-Limón *et al.*, 2017), *P. culminicola* (Favela, 2010), *P. maximartinezii* Rzedowski (Ledig *et al.*, 2001), *P. johannis* (García-Gómez *et al.*, 2014), *P. greggii* Engelm ex Parl (Paraguirre *et al.*, 2002) y *P. ayacahuite* Ehreimb ex. Schlecht (Castro-Félix *et al.*, 2006). Lo anterior es válido para caracteres neutrales o casi neutrales a la selección, dado que autores como Rehfeldt (1985, 1986) indican importante diferenciación genética entre poblaciones de coníferas a lo largo de gradientes ambientales para caracteres cuantitativos con valor adaptativo como resistencia a heladas, potencial de crecimiento, dinámica y temporalidad de la elongación de la yema principal y otros.

En cuanto a la diferenciación genética existente entre las poblaciones de *P. cembroides* según las regiones, los valores de  $G_{ST}$  que se encontraron para cada región indican que las poblaciones están diferenciadas (0.25 para la Sierra Madre Oriental y 0.22 para la Mesa Central) (White *et al.*, 2007). Al respecto, Ledig *et al.* (2000) 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 haber favorecido, ya sea, la deriva genética en las poblaciones aisladas de menor tamaño o la diferenciación por la presión de selección por factores ambientales. Lo anterior es apoyado también por Delgado



**Figura 1. Gráfico construido con las dos primeras coordenadas derivadas del análisis de coordenadas principales con ISSR de ocho poblaciones de *Pinus cembroides* de la región central de México.**

*et al.* (2002), quienes atribuyen la alta diferenciación entre las poblaciones de los pinos piñoneros de América del Norte a que éstas presentan bajas densidades y están relativamente aisladas.

Aunado a lo anterior, las poblaciones que se evaluaron se ubican en la parte discontinua de la distribución de *P. cembroides*, lo que implica que las poblaciones están separadas espacialmente y que el intercambio genético entre estas poblaciones se dificulta.

El número estimado de individuos migrantes por generación ( $N_m$ ) entre las poblaciones de la Sierra Madre Oriental fue de 1.52 y de 1.75 en las poblaciones de la Mesa Central, lo que indica escaso flujo génico entre ellas (White *et al.*, 2007). La distribución geográfica de *P. cembroides* no presenta un patrón continuo en todo el rango de su distribución (Romero *et al.*, 1996). Las poblaciones que se incluyeron en este trabajo se localizan en el área discontinua de la distribución de la especie, lo que aunado a la posible fragmentación de las poblaciones podría explicar el reducido flujo génico entre ellas. El valor

de  $N_m$  fue bajo en comparación con los valores estimados en otras especies de *Pinus*, como en *P. johannis* Rob. ( $N_m = 4$ ) (García-Gómez *et al.*, 2014) u otras consideradas por Ledig (1998), quien encontró valores altos de  $N_m$  en un rango de 4.6 a 17.2. *P. johannis* pertenece al mismo subgrupo (Haploxylon) que *P. cembroides* (Styles, 1998).

Se considera que si el  $N_m$  es alto (al menos igual a 4), el flujo génico supera los efectos de la deriva genética y evita la diferenciación local. Si  $N_m$  es pequeño ( $< 1$ ), entonces se considera que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2010, Com. Pers.)<sup>3</sup>. De acuerdo con el valor de  $N_m$  que se encontró en este trabajo, el flujo génico supera ligeramente los efectos de la deriva genética en las poblaciones. Cuenca (2002, Com. Pers.)<sup>2</sup> también encontró flujo génico restringido entre algunas de las poblaciones de *P. cembroides* que examinó; además, encontró también falta de equilibrio entre migración y deriva genética.

<sup>3</sup>Eguiarte L. E., E. Aguirre-Planter, E. Scheinvar, A. González G. y V. Souza (2010) Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 30 p.

**Cuadro 4. Componentes del análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de *Pinus cembroides* de la región central de México.**

Fuente de variación	gl	SC	CM	CV	%
Entre poblaciones	7	923.657	131.951	5.839	26 % **
Dentro de poblaciones	150	2497.128	16.648	16.648	74 % **
Total	157	3420.785		22.487	100 %

gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrados Medios, CV: componentes de varianza, \*\*:  $P \leq 0.001$ . %: porcentaje de contribución a la variación.

**Distancia genética**

Los valores de distancia genética de Nei que se encontraron entre las poblaciones de las dos regiones variaron de 0.075 a 0.206 (Cuadro 5). Las poblaciones más alejadas genéticamente fueron las de La Florida y La Amapola, lo que coincidió con que son las poblaciones geográficamente más lejanas; sin embargo, este patrón no se presentó para todas las poblaciones; por ejemplo, las de Santiago de Anaya y Los Juárez fueron las poblaciones más cercanas genéticamente, pero no son las poblaciones geográficamente más cercanas.

De acuerdo con los valores de distancia genética, las poblaciones de La Florida y El Pinalito fueron las que se diferenciaron en mayor medida del resto de las poblaciones. El dendrograma que se generó a partir de la distancia genética de Nei (Figura 2) separó a las poblaciones en tres grupos, el primero integrado por las poblaciones de La Florida y El Pinalito, el segundo por la población de La Amapola y el tercero formado por el resto de las poblaciones, lo que concuerda con el arreglo de los individuos en el análisis de agrupamiento representado en la Figura 1.

**Modelo de aislamiento por distancia**

De acuerdo con la matriz de distancias geográficas y distancias genéticas (Cuadro 5), para algunas poblaciones con una menor distancia geográfica se tiene una menor distancia genética, como es el caso de las poblaciones de La Florida - El Pinalito, por citar un ejemplo, pero en otros casos no se tiene este comportamiento; por ejemplo, la población de Santiago de Anaya que es cercana a las de La Florida y El Pinalito muestra una mayor distancia genética con estas poblaciones que con las otras cuatro, que son más lejanas geográficamente.

La prueba de Mantel indicó que existe poca correlación entre distancia genética y distancia geográfica en las poblaciones de *P. cembroides* ( $r = 0.31$ ) (Figura 3). Lo que sugiere que probablemente hay poblaciones cercanas con escaso flujo génico y otras más lejanas con niveles de flujo más altos. Al parecer, en las poblaciones de *P. cembroides* evaluadas el aislamiento por distancia no juega un papel importante en la diferenciación genética. En *P. rzedowskii* Madrigal et. Caballero (Delgado *et al.*, 1999) y *P. pinceana* Gordon (Aguirre-Limón *et al.*, 2017), ambos pinos piñoneros, no se encontró correlación entre estas variables. Por otro lado, para *P. greggii* Engelm. ex Parl, pino del otro subgénero de *Pinus*, Paraguirre *et al.* (2002) sí encontraron correlación significativa, aunque sólo para

**Cuadro 5. Distancia genética de Nei (bajo la diagonal) y distancia geográfica (km, sobre la diagonal) para las ocho poblaciones estudiadas de *Pinus cembroides* de la región central de México.**

Población	La Florida	El Pinalito	Juárez	Santiago	Bledos	El Cubo	Ojo de Agua	La Amapola
La Florida	0	21.8	91.3	104.1	242.8	246.6	264.8	275.8
El Pinalito	0.113	0	70.5	88.5	227.5	228.7	246.0	255.5
Juárez	0.148	0.158	0	92.5	167.3	161.9	177.4	185.0
Santiago	0.159	0.168	0.077	0	253.3	238.9	248.8	242.7
Bledos	0.157	0.168	0.091	0.109	0	43.2	64.9	107.4
El Cubo	0.192	0.155	0.100	0.101	0.110	0	24.7	64.6
Ojo de Agua	0.194	0.196	0.091	0.090	0.114	0.092	0	43.5
La Amapola	0.235	0.233	0.156	0.138	0.147	0.186	0.187	0

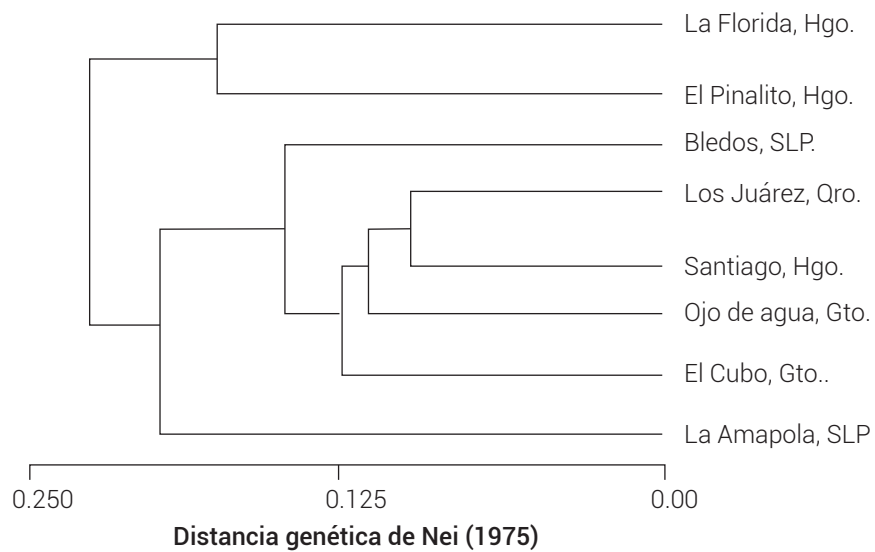


Figura 2. Dendrograma generado con base en la distancia genética de Nei (1975), mediante el método UPGMA para ocho poblaciones de *Pinus cembroides* de la región central de México.

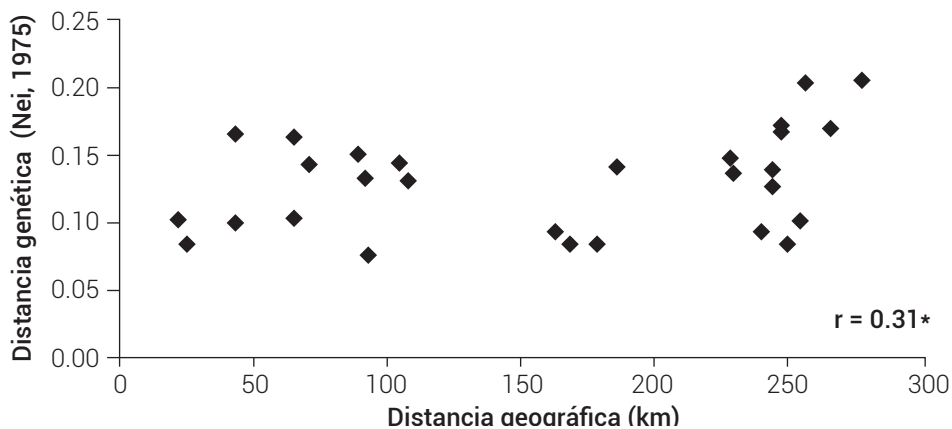


Figura 3. Relación entre las distancias geográficas y distancias genéticas para las poblaciones de *Pinus cembroides*.  $r$ : coeficiente de correlación de Pearson.

algunas de las poblaciones, lo que podría sugerir que son otros fenómenos los que determinan los patrones de variación genética entre las poblaciones evaluadas.

En cuanto a las aplicaciones que pueden tener los resultados de esta investigación en el al manejo o conservación de las poblaciones, se encontró que, por ejemplo, la población de La Amapola parece ser única en su constitución genética y merecería por tanto alguna protección especial.

Finalmente, los resultados del presente estudio indican que probablemente la fragmentación de las poblaciones genera una falta de continuidad en la distribución de la especie, lo que impide el flujo génico y, por tanto, facilita la diferenciación por deriva genética. Esto presenta un

mayor reto para la conservación de la diversidad genética, ya que hace necesaria la conservación activa de un mayor número de poblaciones.

### Conclusiones

La diversidad genética encontrada en las poblaciones de *P. cembroides* fue alta, con los valores mayores en las poblaciones de en la Sierra Madre Oriental. La mayor parte de la diversidad genética se encontró dentro de las poblaciones y una menor parte entre poblaciones. Existe alta diferenciación genética entre las poblaciones y escaso flujo génico entre ellas. En las poblaciones evaluadas se determinó baja correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Limón V., G. Alanís-Flores, J. I. González-Rojas, A. Flores-Suárez y S. Favela-Lara (2017) Variación genética de *Pinus piniceana* Gordon evidencia de conectividad en poblaciones fragmentadas. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 8:39-63.
- Castro-Félix P., C. Ramos N., J. A. Pérez R., G. Vargas A. y A. R. Villalobos-Arámbula (2006) Diversidad genética de *Pinus ayacahuite* utilizando marcadores RAPDs en genoma diploide y haploide. *Scientia-Cucba* 8:193-202.
- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2011) La Biodiversidad en Puebla. Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Gobierno del Estado de Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. 440 p.
- Delgado P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser and E. R. Álvarez-Buylla (1999) High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86:669-676, <https://doi.org/10.2307/2656576>
- Delgado P., A. Cuenca, A. E. Escalante, F. Molina-Freaner and D. Piñero (2002) Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural* 75:27-37.
- Favela L. S. (2010) Population variation in the endemic *Pinus culminicola* detected by RAPD. *Polibotánica* 30:55-67.
- Flores-Rentería L., A. Wegier, D. Ortega V., A. Ortíz-Medrano, D. Piñero, A. V. Whipple, F. Molina-Freaner and C. A. Domínguez (2013) Genetic, morphological, geographical and ecological approaches reveal phylogenetic relationships in complex groups, an example of recently diverged pinyon pine species (Subsection Cembroides). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69:940-949, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.06.010>
- Frankham R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, U. K. 617 p.
- Furnier G. R. (2004) Métodos para medir variación genética en las plantas. In: Manejo de Recursos Genéticos Forestales. 2ª edición. J. J. Vargas H., B. Bermejo V. y F. T. Ledig (eds.). Colegio de Postgraduados, Comisión Nacional Forestal. Montecillo, Edo. de México y Zapopan, Jalisco, México. pp:20-30.
- García-Gómez V., C. Ramírez-Herrera, C. Flores-López y J. López-Upton (2014) Diversidad y estructura genética de *Pinus johannis*. *Agrociencia* 48:863-873.
- Hamrick J. L., M. J. W. Godt and S. L. Sherman-Broyles (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6:95-124, <https://doi.org/10.1007/BF00120641>
- Hedrick P. W. (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59:1633-1638.
- Hedrick P. W. (2011) Genetics of Populations. Fourth edition. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury MA, USA. 675 p.
- Höglund J. (2009) Evolutionary Conservation Genetics. Oxford University Press. New York, USA. 189 p.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2008) Características edafológicas, fisiográficas, climáticas e hidrográficas de México. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Aguascalientes, Ags. 31 p. [http://www.inegi.org.mx/inegi/spc/doc/internet/1-geografiademexico/manual\\_carac\\_eda\\_fis\\_vs\\_enero\\_29\\_2008.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/spc/doc/internet/1-geografiademexico/manual_carac_eda_fis_vs_enero_29_2008.pdf) (Enero 2019).
- Ledig F. T. (1998) Genetic variation in *Pinus*. In: Ecology and Biogeography of *Pinus*. D. M. Richardson (ed.). Cambridge University Press. Cambridge, U. K. pp:251-280.
- Ledig F. T. and M. T. Conkle (1983) Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution* 37:79-85, <https://doi.org/10.2307/2408176>
- Ledig F. T., B. Bermejo-Velázquez, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson, C. Flores-López and V. Jacob-Cervantes (2000) The mating system and genetic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of Mexico's Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Canadian Journal of Forest Research* 30:1156-1164, <https://doi.org/10.1139/x00-052>
- Ledig F. T., M. A. Capó-Arteaga, P. D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. T. Conkle and B. Bermejo-Velázquez (2001) Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus piniceana* and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88:1977-1987, <https://doi.org/10.2307/3558425>
- Liu Z. H., Q. Xie and Z. Q. Li (2015) Genetic diversity and taxonomic status of *Pinus tabulaeformis* f. *shekanensis* revealed by ISSR markers. *Genetics and Molecular Research* 14:1034-1043, <https://doi.org/10.4238/2015.February.6.7>
- Loo J. A. (2011) Manual de Genética de la Conservación. Principios Aplicados de Genética para la Conservación de la Diversidad Biológica. Comisión Nacional Forestal. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Zapopan, Jalisco, México. 192 p.
- Lowe A., S. Harris and P. Ashton (2004) Ecological Genetics. Design, Analysis and Application. Blackwell Publishing. Malden, Massachusetts, USA. 326 p.
- Luna-Cavazos M., A. Romero-Manzanares y E. García-Moya (2008) Afinidades en la flora genética de piñonales del norte y centro de México: un análisis fenético. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79:449-458.
- McDermott J. M. and B. A. McDonald (1993) Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 31:353-373, <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.002033>
- Nei M. (1975) Molecular Population Genetics and Evolution. North Holland Publishing Company. New York, USA. 288 p.
- Nei M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York, USA. 512 p.
- Paraguirre L. C., J. J. Vargas H., P. Ramírez V., H. S. Azpíroz R. y J. Jasso M. (2002) Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *P. greggii* Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25:279-287.
- Parasharami V. A. and S. R. Thengane (2012) Inter population genetic diversity analysis using ISSR markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian provenances. *International Journal of Biodiversity and Conservation* 4:219-227, <https://doi.org/10.5897/IJBC11.234>
- Peakall R. and P. E. Smouse (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Rehfeldt G. E. (1985) Genetic variances and covariances in *Pinus contorta*: estimates of genetic gains from index selection. *Silvae Genetica* 34:26-33.
- Rehfeldt G. E. (1986) Adaptive variation in *Pinus ponderosa* from intermountain regions. I. Snake and Salmon River Basins. *Forest Science* 32:79-92.
- Rocha M. M. G., A. González G. y X. Aguirre D. (2014) ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas. In: Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos. A. Cornejo R., A. Serrato D., B. Rendón A., M. G. Rocha M. (comps.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F. pp:101-125.
- Romero M. A., E. García M. y M. F. Passini (1996) *Pinus cembroides* s. l. y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano: una síntesis. *Acta Botanica Gallica* 143:681-693, <https://doi.org/10.1080/12538078.1996.10515368>
- Sánchez-González A. (2008) Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques* 14:107-120.
- Styles B. T. (1998) El género *Pinus*: su panorama en México. In: Diversidad Biológica de México. Orígenes y Distribución. T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (comps.) Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. pp:385-408.
- Valadez-Moctezuma E., G. Kahl, J. Ramser, B. Hüttel y A. Rubluo-Islas (2001) Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Revista Fitotecnia Mexicana* 24:103-120.
- White T. L., W. T. Adams and D. B. Neale (2007) Forest Genetics. CABI Publishing International. Wallingford, UK. 682 p.
- Yeh F. C., R. C. Yang and T. Boyle (1999) Popgene version 1.31. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Alberta, Canada. 29 p.

