

COMPARACIÓN DE Q_{ST} vs. F_{ST} EN POBLACIONES NATURALES DE *Pinus hartwegii* LINDLCOMPARISON OF Q_{ST} vs. F_{ST} IN *Pinus hartwegii* LINDL. NATURAL POPULATIONS

Héctor Viveros-Viveros^{1,2}, Cuauhtémoc Sáenz-Romero^{3*}, J. Jesús Vargas-Hernández¹,
Blanca L. Tapia-Olivares³, Javier López-Upton¹, Amalio Santacruz-Varela⁴ y Jean Beaulieu⁵

¹Forestal, ⁴Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Texcoco, Edo. de México. ²Instituto de Investigaciones Forestales, Universidad Veracruzana. Parque Ecológico "El Haya". 91070, Colonia Benito Juárez, Xalapa, Veracruz, México. ³Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México. ⁵Centre Canadien Sur la Fibre de Bois, Service Canadien des Forêts, Ressources Naturelles Canada. Quebec, Canada.

*Autor para correspondencia (csaenzromero@gmail.com)

RESUMEN

Debido al cambio climático se esperaba que en los próximos años el hábitat de *Pinus hartwegii* Lindl. disminuya drásticamente. Por ello conviene establecer estrategias de conservación que disminuyan o contrarresten los efectos del cambio climático, y el primer paso consiste en conocer la variación adaptativa de la especie, así como las fuerzas evolutivas que la han moldeado. Con el propósito de conocer las fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones de *P. hartwegii* se comparó el patrón de variación genética mediante rasgos (caracteres) cuantitativos e isoenzimas, en 12 poblaciones naturales distribuidas altitudinalmente en Michoacán, México, a través de la estimación de los estadísticos Q_{ST} y F_{ST} . Aunque se encontró diferenciación genética significativa entre poblaciones, tanto para los rasgos cuantitativos como para las isoenzimas, en la mayoría de los rasgos cuantitativos existió un pronunciado patrón de variación clinal asociado con la elevación, pero no en las isoenzimas. El valor promedio de Q_{ST} (0.200) fue superior al de F_{ST} (0.127), aunque los intervalos de confianza indican que no hay diferencia significativa entre ellos. Los resultados indican que la selección natural, impuesta por el gradiente ambiental altitudinal, está actuando en los rasgos cuantitativos, mientras que en las isoenzimas están actuando otras fuerzas evolutivas como la deriva genética y el flujo génico. La similitud de valores de Q_{ST} y F_{ST} puede atribuirse a la acción conjunta de la selección natural y la deriva genética.

Palabras clave: *Pinus hartwegii*, rasgos cuantitativos, deriva genética, isoenzimas, selección natural.

SUMMARY

Due to climatic change, it might be expected that in the next years, the habitat of *Pinus hartwegii* Lindl. could sharply decrease. It is then convenient to establish conservation strategies that diminish or counteract the effects of the climatic change. However, a first step in establishing conservation measures is to quantify the adaptive variation of the species and the evolutionary forces that may have shaped it. To understand the evolutionary forces acting on *P. hartwegii* populations, patterns of genetic variation, assessed through quantitative traits and isozymes, were compared in 12 natural populations along an altitudinal transect in Michoacán, Mexico, by estimation of Q_{ST} and F_{ST} statistics. Although significant genetic differentiation among populations was found for quantitative traits and isozymes, most of the quantitative traits showed a strong clinal pattern of variation associated with site elevation, but not for isozymes. Average Q_{ST} value (0.200) was higher than F_{ST} value (0.127), but they were not significantly different. Results indicate that natural selection, imposed by the altitudinal

environmental gradient, is acting on quantitative traits, while other evolutionary forces, like genetic drift and gene flow, are acting on isozymes. The similarity of Q_{ST} and F_{ST} values could be attributed to the joint action of natural selection and genetic drift.

Index words: *Pinus hartwegii*, quantitative traits, genetic drift, isozymes, natural selection.

INTRODUCCIÓN

P. hartwegii es una especie que se distribuye en las altas montañas de México y América Central (Perry, 1991), donde predominan bajas temperaturas y relativamente alta humedad (Sáenz-Romero *et al.*, 2010). Sin embargo, ante el aumento de la temperatura y la disminución de la precipitación que se espera para las próximas décadas, se prevé que el hábitat climático propicio para las poblaciones de esta especie, que actualmente se ubican en la parte baja de su distribución altitudinal, sea reemplazado por el hábitat climático propicio para otras especies de pinos que actualmente crecen a menor altitud (Sáenz-Romero *et al.*, 2010), con lo que el hábitat de la especie se vería disminuido hasta en 42 % (Arriaga y Gómez, 2004). Ante esta situación, es de esperarse que la variación genética de la especie se vea disminuida. Por tal motivo es necesario conocer la variación genética de la especie así como las fuerzas evolutivas que están actuando sobre ella, para poder establecer medidas de conservación. La magnitud y distribución de la variación genética entre y dentro de poblaciones se debe al efecto diversificador de la mutación, la deriva génica y la selección natural, mientras que el flujo génico y la selección uniforme tienden a producir homogeneidad genética (Slatkin, 1987; Chan y Arcese, 2003).

Los marcadores moleculares, como isoenzimas o fragmentos de ADN no codificantes, son en general neutrales o casi neutrales a la selección, por lo que el patrón de diferenciación genética que se detecta refleja el efecto combinado del flujo génico, la deriva genética y las mutaciones acumuladas (Hedrick, 1999). Por otra parte, la estructura

genética de rasgos (caracteres) cuantitativos en poblaciones naturales está moldeada en gran medida por la presión de selección impuesta por factores ambientales (Barton y Turelli, 1989; Lynch *et al.*, 1999), por lo que la variación genética en estos rasgos se asocia con el potencial de las especies para adaptarse a cambios ambientales (Hamrick, 1983; Lande y Barrowclough, 1987).

Aunque la variación molecular y la de rasgos cuantitativos pueden estar correlacionados, particularmente si existe ligamiento entre loci de uno y otro tipo de rasgos, existen estudios que revelan patrones discordantes entre ambas (Merilä y Crnokrak, 2001; Waldmann y Andersson, 1998). La identificación del grado de concordancia entre ambos tipos de rasgos permite inferir tanto el papel de éstos en los procesos evolutivos (Edmands y Harrison, 2003), como la relación existente entre ellos (Butlin y Tregenza, 1998; Reed y Frankham, 2001). Estudios empíricos muestran que la diferenciación revelada por marcadores moleculares neutrales predice la diferenciación en rasgos cuantitativos en algunos casos (McKay y Latta, 2002), aunque esto depende de las fuerzas que generan y mantienen la diversidad genética entre las poblaciones (Butlin y Tregenza, 1998). Otros estudios sugieren que los marcadores y los rasgos cuantitativos se comportan en forma diferente en cuanto a la divergencia adaptativa de poblaciones y, por lo tanto, la extrapolación a partir de un tipo de rasgo a otro se debe hacer con cautela (Butlin y Tregenza, 1998; Reed y Frankham, 2001; McKay y Latta, 2002).

El estadístico F_{ST} de Wright se utiliza para caracterizar el grado de la estructura genética existente entre y dentro de poblaciones a nivel de genes simples, al medir la proporción de la variación alélica total que ocurre entre poblaciones (Wright, 1951); por ello, en estudios con varios tipos de marcadores moleculares frecuentemente se utiliza F_{ST} con ese fin (Hedrick, 1999). Con rasgos cuantitativos, la variación genética entre poblaciones se puede estimar con el valor de Q_{ST} , el cual es comparable con el valor de F_{ST} (McKay y Latta, 2002). La magnitud de las diferencias entre Q_{ST} y F_{ST} permite inferir el grado de adaptación local de las poblaciones; es decir, refleja el papel de la selección en la divergencia de poblaciones, con respecto al efecto ocasionado por la deriva genética (Spitze, 1993; Merilä y Crnokrak, 2001).

Al asumir que las isoenzimas son marcadores neutrales o casi neutrales a la selección, para rasgos cuantitativos neutrales a la selección se esperaría que $F_{ST} = Q_{ST}$. En cambio, para rasgos sometidos a presión de selección, se esperaría que $Q_{ST} > F_{ST}$ (Spitze, 1993; Whitlock, 1999), debido a la acción de la selección direccional o disruptiva (Hamrick, 1983; Merilä y Crnokrak, 2001; McKay y Latta, 2002). En ocasiones puede ser que $Q_{ST} < F_{ST}$, lo que sugiere que la selección actúa alrededor de un mismo fenotipo óptimo

en cada población; es decir, la selección estabiliza y homogeneiza a los fenotipos (Spitze, 1993), como se ha reportado en algunas características de hoja en *Cedrela odorata* L. (Navarro *et al.*, 2005).

Existen dos estudios previos establecidos en gradientes altitudinales que indican que *P. hartwegii* presenta diferenciación genética a lo largo de gradientes altitudinales, tanto en características cuantitativas relacionadas con el valor adaptativo (Viveros-Viveros *et al.*, 2009), como en isoenzimas (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). Otros trabajos en esta especie (aunque no realizados en gradientes altitudinales), muestran variación fenotípica significativa entre poblaciones en características de conos, semillas y acículas (Iglesias-Andreu y Tivo-Fernández, 2006; Iglesias *et al.*, 2012).

Lo anterior indica que varias fuerzas evolutivas han estado involucradas en moldear la estructura genética de estas poblaciones a través del tiempo. Sin embargo, queda pendiente una comparación explícita del grado de diferenciación entre poblaciones para rasgos cuantitativos (Q_{ST}) con su correspondiente diferenciación para marcadores neutrales a la selección (F_{ST}), a fin de comprender mejor el papel de las fuerzas evolutivas (selección, migración, deriva génica y mutación) que han actuado en ellas. Esta información es útil para definir estrategias de manejo para la conservación de la variación genética entre y dentro de poblaciones.

Los objetivos del presente estudio fueron: (a) Determinar el nivel de variación genética de rasgos cuantitativos en plántulas de *Pinus hartwegii* Lindl. provenientes de poblaciones distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal; (b) Determinar la variabilidad genética de estas poblaciones mediante marcadores considerados neutrales o casi neutrales a la selección (isoenzimas); y (c) Comparar el grado de diferenciación de las poblaciones estimada con ambos tipos de rasgos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica y material biológico

Se recolectaron muestras de semilla en los bosques del Parque Nacional Pico de Tancitaro, Michoacán, México, a lo largo de una línea imaginaria previamente establecida (transecto) que cubre la distribución altitudinal natural de la especie en la región, desde 3150 m (19° 25.967' N, 102° 16.972' O) hasta 3750 m (19° 25.120' N, 102° 18.750' O) de elevación, mismas procedencias que Viveros-Viveros *et al.* (2009; 2010), pero haciendo una corrección de +150 m de altitud después de visitar los sitios en campo con nuevo instrumental e ingresando las coordenadas a un Sistema de Información Geográfica (Figura 1). En el gradiente altitudinal se establecieron 13

sitios de muestreo, separados entre sí por 50 m altitudinales.

En el estudio, el sitio de muestreo es designado como procedencia y el conjunto de árboles muestreados en cada sitio representa una población. En cada procedencia se seleccionaron al azar 11 árboles sanos para evaluar rasgos cuantitativos y 13 individuos en promedio para isoenzimas, para asegurar que existiera entre sí una distancia mínima de 30 m para reducir posibles efectos de parentesco directo, si bien no es posible tener la certeza de que una distancia de 30 m sea una garantía de ausencia de parentesco. De cada árbol seleccionado se recolectaron de 5 a 10 conos. La población de 3600 m se excluyó del análisis de isoenzimas, y por ende del análisis comparativo de Q_{ST} vs. F_{ST} , por no contar con semilla suficiente.

Si bien algunos autores sugieren que lo ideal es analizar más de 20 poblaciones (O'Hara y Merilä, 2005), en este caso no era viable incluir más poblaciones, ya que habría requerido realizar un segundo transecto altitudinal. Otros autores señalan que el número de poblaciones a analizar debe

ser al menos de 10 (Beaumont y Nichols, 1996) y en este estudio se incluyeron 13. En cuanto al número de individuos por población, de manera semejante a lo anterior, si bien lo ideal sería haber recolectado más individuos no se pudo realizar un muestreo más amplio. Sin embargo, los 11 ó 13 individuos recolectados por población caen en el rango utilizado en otros trabajos con árboles forestales; por ejemplo, en el análisis de rasgos cuantitativos Navarro *et al.* (2005) utilizaron de 4 a 19 individuos por población y en el análisis molecular de 5 a 22 individuos; por su parte, Waldmann *et al.* (2005) utilizaron de 10 a 22 individuos por población.

Análisis de rasgos cuantitativos

Las semillas se pusieron a germinar en cajas de Petri a temperatura ambiente. Una vez germinada se pasaron a envase rígidos de 380 cm³ (Broadway Plastics de Mexico®), con sustrato comercial Creci-root®, en un vivero del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH) en Morelia, Michoacán. El diseño en el vivero fue de bloques

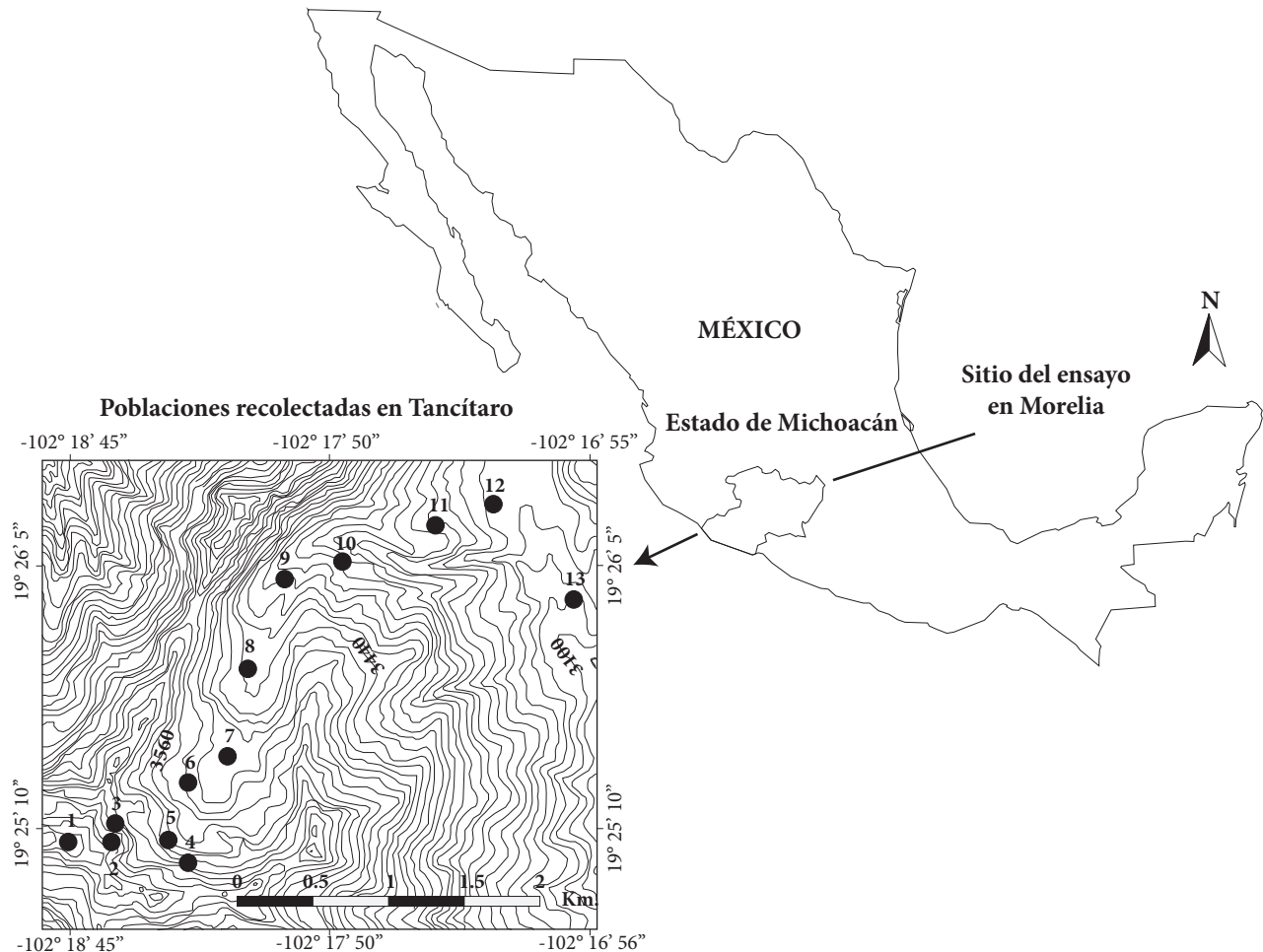


Figura 1. Localización geográfica de 13 poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. en el Parque Nacional Pico de Tancitaro, Michoacán.

completos al azar, con ocho bloques, 13 poblaciones, y nueve familias (progenies) de medios hermanos (elegidas al azar entre las 11 progenies por población recolectada) por cada población en cada bloque; cada familia estuvo representada por una sola plántula por población por bloque. Para más detalles de la siembra, diseño experimental y manejo de las plantas en vivero ver a Viveros-Viveros *et al.* (2009).

A los 20 meses después de la siembra (febrero de 2007) el experimento se trasplantó a envases rígidos de 3 L (Stuewe & Sons Inc., Oregon, USA), exactamente con el mismo diseño experimental que en vivero, mismo sustrato y bajo una malla-sombra (35 %). A los 30 meses después de la siembra (diciembre de 2007) se midieron las siguientes variables: altura de la planta (cm), diámetro basal del tallo (mm) y longitud de la acícula más larga (cm) de cuatro fascículos completamente desarrollados por planta, y se obtuvo el promedio de éstas. La altura de planta y el diámetro basal son variables comúnmente medidas para cuantificar el crecimiento de plantas de especies forestales. La longitud de acículas es una variable en la que se ha encontrado diferenciación genética entre poblaciones y para la que es común encontrar importantes diferencias fenotípicas entre poblaciones (Bermejo-Velázquez y Patiño-Valero, 1981; Sáenz-Romero *et al.*, 2012; Viveros-Viveros *et al.*, 2013).

Para estimar el nivel de variación entre poblaciones se hizo un análisis de varianza con el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute, 1988), con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_j + \beta_i \times \tau_j + \gamma_k(\tau_j) + \varepsilon_{ijk}$$

donde: Y_{ijk} = valor promedio de la ijk -ésima unidad experimental, μ = media general, β_i = efecto del i -ésimo bloque, τ_j = efecto de la j -ésima población, $\beta_i \times \tau_j$ = interacción del i -ésimo bloque con la j -ésima población, $\gamma_k(\tau_j)$ = efecto de la k -ésima familia anidada en la j -ésima población y ε_{ijk} = error experimental. Los componentes de varianza fueron estimados mediante el procedimiento VARCOMP de SAS (SAS Institute, 1988), con el método de máxima verosimilitud restringida. Para determinar el patrón altitudinal de variación genética, se modeló la relación entre los valores promedio por población de las características evaluadas y la elevación sobre el nivel del mar de los sitios, con el procedimiento REG de SAS (SAS Institute, 1988), con el siguiente modelo de regresión:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$$

donde Y_i = media de la población i -ésima, β_0 = ordenada al origen, β_1 = coeficiente de regresión, X_i = altitud (msnm) de la i -ésima procedencia, y ε_i = error.

Análisis de isoenzimas

Si bien actualmente existen otras técnicas para cuantificar la variación genética entre poblaciones, como son los microsatélites y otras que replican fragmentos de ADN (González, 2003), también se ha documentado que en algunos casos particulares, las isoenzimas son más eficientes que los microsatélites para identificar la variación genética entre poblaciones (Karasawa *et al.*, 2012). Por otra parte, estudios previos en gradientes altitudinales con isoenzimas han sido capaces de identificar los patrones de diferenciación genética entre poblaciones (Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2003; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

Con base en lo anterior, se hizo electroforesis de isoenzimas en geles de almidón, de seis megagametofitos por individuo de cada una de las poblaciones. En este análisis no se incluyeron individuos de 3600 m de altitud, ya que los conos de árboles colectados a esa altitud eran muy pocos y con bajo rendimiento de semilla de escasa germinación, por lo que toda la semilla disponible se usó previamente en la producción de planta. Se analizaron ocho poblaciones adicionales a las cuatro evaluadas en Viveros-Viveros *et al.* (2010). Se evaluaron 12 loci, ocho (ACP, G6P, MDH-1, MDH-2, PGI-1, PGI-2, 6PG-1 y 6PG-2) con la metodología de Yamada y Guries (1989), y cuatro (EST, GOT, LAP y PGM) con la metodología de Soltis *et al.* (1983). Las enzimas fosfatasa ácida, glucosa-6-fosfato, esterasa, glutamato oxaloacetato transaminasa, leucina aminopeptidasa y fosfoglucomutasa se asociaron con un locus (ACP, G6P, EST, GOT, LAP y PGM, respectivamente); mientras que las enzimas siguientes se asociaron con dos loci: malato deshidrogenasa con MDH-1 y MDH-2, fosfoglucoisomerasa con PGI-1 y PGI-2, y 6-fosfogluconato con 6PG-1 y 6PG-2. Con base en la migración de las enzimas en el gel se efectuó la interpretación de los alelos presentes y la condición homocigótica o heterocigótica de los individuos para cada locus. Se usaron megagametofitos de *P. resinosa* (especie monomórfica de alelos conocidos) como referencia para la identificación de bandas.

Se estimó la heterocigosidad observada y esperada (Nei, 1978) y los estadísticos F de Wright (1965), que incluyen la endogamia total (F_{IT}), la endogamia dentro de poblaciones (F_{IS}) y la proporción de la diversidad genética entre poblaciones (F_{ST}), con el método descrito por Weir y Cockerham (1984). Se estimaron los intervalos de confianza a 95 % para los estadísticos F mediante la prueba "bootstrapping" (método para estimar intervalos de confianza a partir de una distribución generada por re-muestreo de los propios datos investigados, en el que se elimina un dato a la vez), con 10,000 repeticiones. Los análisis se realizaron con el programa TFPGA (Miller, 1997). Se evaluó el grado de asociación de la heterocigosidad observada y esperada

con la elevación de las procedencias con los procedimientos CORR y REG de SAS (SAS Institute, 1988).

Comparación entre la variación genética de caracteres cuantitativos y de isoenzimas

El grado de diferenciación entre poblaciones para caracteres cuantitativos (Q_{ST}) se calculó con la fórmula propuesta por Spitze (1993), con el uso de valores estandarizados en cada variable:

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_{GB}^2}{\sigma_{GB}^2 + 2\sigma_{GW}^2} = \frac{\sigma_P^2}{\sigma_P^2 + 8\sigma_{F(P)}^2}$$

donde: σ_{GB}^2 = componente de varianza genética entre poblaciones; σ_{GW}^2 = componente de varianza genética dentro de poblaciones; σ_P^2 = varianza entre poblaciones y $\sigma_{F(P)}^2$ = varianza entre familias dentro de poblaciones. El estadístico Q_{ST} para cada variable y su intervalo de confianza se estimaron mediante el programa DIOGENE, desarrollado por Baradat (2008). Los resultados de Q_{ST} se compararon con la variabilidad isoenzimática estimada con el índice F_{ST} de Wright (Jaramillo-Correa *et al.*, 2001), con el programa TFPGA (Miller, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variación genética en características cuantitativas

Todas las características cuantitativas mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre poblaciones y entre familias dentro de poblaciones (Cuadro 1). La contribución promedio de las poblaciones a la varianza total fue cercana a 13 %, y la contribución de la longitud de acículas (22 %) fue casi tres veces mayor que las de altura y diámetro de planta (8 %). La variabilidad encontrada para estas dos últimas variables es similar a la reportada para *Pinus brutia*, en donde la aportación de las poblaciones a la varianza total en la altura de la planta fue de 6 % (Kaya e Isik, 1997).

La contribución promedio de las familias dentro de po-

blaciones a la varianza total fue de sólo 6 %, la longitud promedio de acícula tuvo una mayor variación relativa (8 %) que el diámetro del tallo (3 %, Cuadro 1). La mayor magnitud de la variación presente a nivel de poblaciones que dentro de las mismas, indica que los caracteres evaluados están influenciados por la presión de selección impuesta por el ambiente asociado a cada población (Rehfeldt, 1991). Los resultados anteriores también concuerdan con lo señalado por Zobel y Talbert (1992), referente a que el grado del control genético y el efecto del ambiente varían de rasgo a rasgo en una misma especie.

El diámetro basal de planta y la longitud de acícula mostraron una asociación negativa ($r \geq -0.84$, $P \leq 0.0003$) con la altitud del sitio de origen, lo que refleja un patrón clinal de variación, es decir que hubo cambios graduales en los rasgos fenotípicos a lo largo de un gradiente altitudinal (Figura 2A y 2B). En otras especies de coníferas se han reportado asociaciones similares; por ejemplo, Isik (1986) encontró una correlación negativa entre el diámetro basal de plántulas de *Pinus brutia* Ten. y la elevación de origen de las poblaciones ($r = -0.54$). En el caso de *P. hartwegii*, anteriormente se detectó una asociación negativa entre rasgos cuantitativos de valor adaptativo (altura de plántula; desarrollo del brote terminal; rompimiento del estado cespitoso, que se entiende como bajo o nulo crecimiento inicial en el que las acículas dan a la planta la apariencia de césped; y daños por bajas temperaturas) con la elevación del sitio de origen (Viveros-Viveros *et al.*, 2009). Esto indica que los factores ambientales asociados con la altitud (mayor temperatura y menor humedad a bajas altitudes, menor temperatura y mayor humedad a elevadas altitudes) están imponiendo una presión de selección en estos rasgos, lo que resulta en un menor potencial de crecimiento en las poblaciones originadas a mayor altitud, lo cual está controlado genéticamente (Rehfeldt, 1991).

El valor promedio del estadístico Q_{ST} para las características evaluadas fue de 0.200, pero varió desde 0.117 para la altura de planta hasta 0.262 para la longitud promedio de acículas (Cuadro 1); el promedio es similar al encontrado

Cuadro 1. Porcentaje de la contribución a la varianza total (%), valores de Q_{ST} y sus intervalos de confianza (IC).

Característica	Contribución a la varianza (%)				Q_{ST}	IC	
	σ_P^2	σ_{BXP}^2	$\sigma_{F(P)}^2$	σ_e^2		Inf.	Sup.
Altura a los 30 meses de edad (cm)	7.7***	0.0	6.9**	85.4	0.117	0.001	0.232
Diámetro a los 30 meses de edad (mm)	8.4***	0.0	3.0*	88.6	0.222	0.000	0.534
Longitud promedio de acículas (cm)	21.6***	0.9	8.0***	69.5	0.262	0.110	0.414
Promedio	12.6	0.3	6.0	81.2	0.200		

σ_B^2 = varianza de bloques, σ_P^2 = varianza de poblaciones, σ_{BXP}^2 = varianza de la interacción bloques x poblaciones, $\sigma_{F(P)}^2$ = varianza de familias dentro de poblaciones, σ_e^2 = varianza del error, Inf. = límite inferior, Sup. = límite superior, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.0001$.

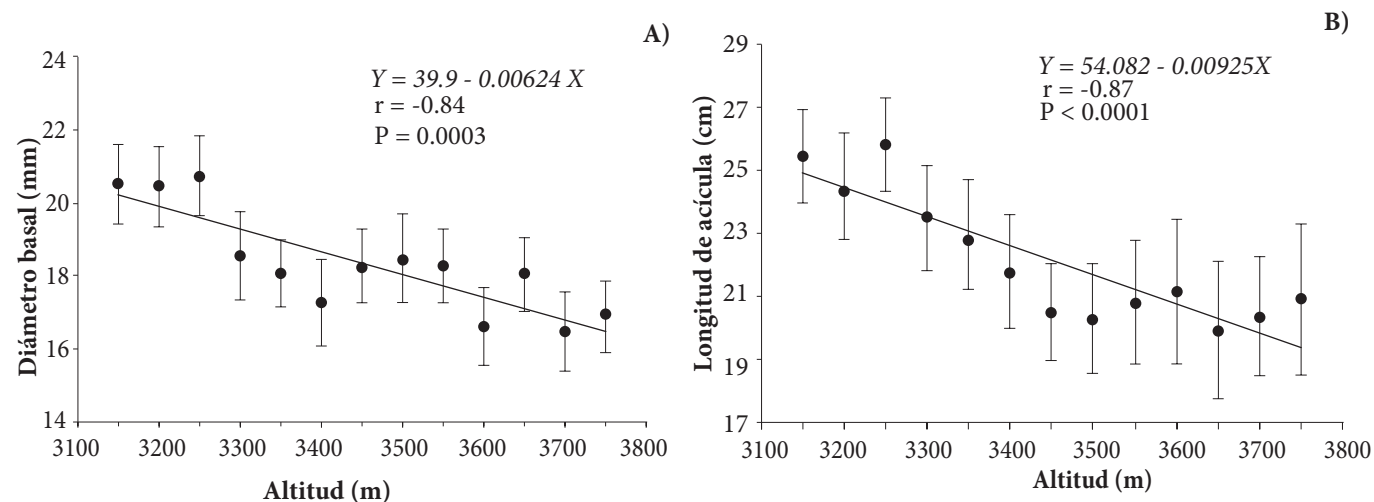


Figura 2. Relación entre el diámetro basal de la plántula a los 30 meses de edad (A) y la longitud promedio de acícula (B) con la altitud de origen de las poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. Las barras verticales representan la desviación estándar.

en *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch (0.26) (Bekessy *et al.*, 2003), mayor al reportado para *Picea glauca* (Moench) Voss (0.100) (Jaramillo-Correa *et al.*, 2001) y *Pinus contorta* ssp. *latifolia* (Engelm. ex S. Wats.) Critchfield (0.120) (Yang *et al.*, 1996), pero menor al encontrado en otras especies, 0.36 en *Pinus sylvestris* L. (Karhu *et al.*, 1996) y 0.83 en *Pinus pinaster* Ait (González-Martínez *et al.*, 2002).

Aunque las poblaciones de *P. hartwegii* presentaron una menor diferenciación en la altura de la planta que la encontrada por Tripián *et al.* (2007) en poblaciones de *E. urophylla* ($Q_{ST} = 0.33$), la diferenciación genética en el diámetro del tallo fue similar en ambas especies (0.22 vs. 0.17). De la misma manera, el valor de Q_{ST} para la longitud de acícula (0.262) fue similar al encontrado para la longitud de hoja en *Cedrela odorata* L. ($Q_{ST} = 0.260$; Navarro *et al.*, 2005), pero difiere de los valores encontrados para esa misma característica en *Scabiosa columbaria* L. y *S. canescens* W. & K (0.526 y 0.088; Waldmann y Andersson, 1998), lo que indica diferencias importantes en el grado de diferenciación y estructura genética de las poblaciones entre estas especies.

Variación isoenzimática

Se encontró una H_e promedio de 0.12 (Cuadro 2), considerada una heterocigosidad moderada dentro del grupo de los pinos (Ledig *et al.*, 1999). Este valor promedio fue idéntico al encontrado cuando sólo se muestrearon cuatro poblaciones dentro del mismo gradiente (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). Esto indica que aun con un número de poblaciones tan reducido como cuatro, es posible detectar patrones de diferenciación genética entre poblaciones, siempre que éstas se encuentren bien distribuidas a lo largo del gradiente ambiental. Los valores de heterocigosidad observada

(H_o) encontrados en cada población son idénticos a los encontrados por Viveros-Viveros *et al.* (2010) en cuatro poblaciones ubicadas en el mismo gradiente altitudinal.

El valor medio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) fue de 0.304 y significativamente ($P \leq 0.05$) diferente de cero (intervalo de confianza de 0.001 a 0.590) (Cuadro 3), lo que sugiere que la mayoría de los loci no están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Este valor fue muy similar al encontrado con sólo cuatro poblaciones del mismo gradiente altitudinal ($F_{IS} = 0.361$) (Viveros-Viveros *et al.*, 2010), con la diferencia de que al aumentar el número de poblaciones analizadas el valor de F_{IS} se vuelve significativo.

Es interesante subrayar que, en este caso, el incremento del número de poblaciones estudiadas de cuatro (en Viveros-Viveros *et al.*, 2010) a 12 poblaciones en este estudio, fue decisivo para considerar el valor encontrado de F_{IS} significativamente diferente de cero. El valor promedio de F_{IS} encontrado en *P. hartwegii* es alto en comparación con los encontrados en otras especies del género *Pinus*; por ejemplo, $F_{IS} = 0.014$ en *Pinus sylvestris* L. (Goncharenko *et al.*, 1994), $F_{IS} = 0.002$ en *Pinus strobus* L. (Beaulieu y Simon, 1994), $F_{IS} = 0.016$ en *Pinus albicaulis* Engelm. (Bruederle *et al.*, 1998), $F_{IS} = 0.140$ en *P. pinceana* Gordon (Ledig *et al.*, 2001), y $F_{IS} = 0.078$ en *Pinus longaeva* Bailey (Lee *et al.*, 2002). En este caso, es posible que los valores de endogamia encontrados sean ocasionados por la deriva génica, por un efecto de cuello de botella (Ledig *et al.*, 1999; 2001), o por un posible exceso de autopolinización derivado de la baja densidad de los rodales (Iglesias *et al.*, 2006).

La similitud de los valores de los parámetros genéticos (heterocigosidad y F de Wright) encontrados por Viveros-Viveros

Cuadro 2. Valores de la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) en 12 poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. a través de un gradiente altitudinal en Michoacán, México.

Población	H_o	H_e
3150	0.09	0.10
3200	0.08	0.11
3250	0.04	0.12
3300	0.09	0.11
3350	0.06	0.09
3400	0.07	0.09
3450	0.09	0.08
3500	0.11	0.14
3550	0.07	0.10
3650	0.10	0.09
3700	0.14	0.21
3750	0.09	0.15
Promedio	0.09	0.12
Todas las poblaciones	0.08	0.13

Cuadro 3. Estadísticos F de Wright calculados para 12 loci en *Pinus hartwegii* Lindl.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
ACP	0.301	0.123	0.388
G6P	0.295	0.122	0.381
MDH1	0.284	0.122	0.371
MDH2	0.295	0.122	0.380
PGI1	0.292	0.121	0.377
PGI2	0.303	0.124	0.389
6PG1	0.355	0.144	0.448
6PG2	0.218	0.079	0.280
EST	0.323	0.126	0.408
GOT	0.348	0.140	0.439
LAP	0.328	0.134	0.418
PGM	0.144	0.083	0.215
Promedio	0.304	0.127	0.403
Límite superior [†]	0.590	0.224	0.679
Límite inferior [†]	0.001	0.004	0.009

[†]95 % de I. C. de 10,000 repeticiones.

et al. (2009) (cuatro poblaciones y 30 individuos por población), con los del presente trabajo (12 poblaciones y 13 individuos por población), indican que el tamaño de muestra fue suficiente. Esto podría deberse a que el incremento del número de poblaciones compensó la disminución del número de individuos por población. Sin embargo, para futuros trabajos podría cuantificarse el efecto del tamaño de muestra mediante curvas con un número creciente de individuos muestreados acumulados por población (eje X), contra los parámetros genéticos estimados (Q_{ST} o F_{ST} en el eje Y), y determinar el tamaño de muestra en que se estabiliza el valor del parámetro estimado; esto de manera similar a las curvas de parámetros de diversidad de especies que se hacen en estudios de ecología.

El valor promedio de F_{IT} fue de 0.403, significativamente diferente de cero ($P \leq 0.05$), con un intervalo de confianza de 0.009 a 0.679 (Cuadro 3). Tal valor de F_{IT} es elevado en comparación con lo encontrado en otras especies de pinos. Esto nuevamente refleja que a nivel global existe deficiencia de individuos heterocigotos. Es poco común encontrar deficiencia de individuos heterocigotos en especies de polinización abierta como los pinos. Los valores de endogamia global (F_{IT}) están determinados tanto por los valores de la endogamia dentro de poblaciones (F_{IS}) como por el valor de la diferenciación entre poblaciones (F_{ST}); cada una de éstas puede influir en diferente magnitud a la endogamia global.

Por ejemplo, en poblaciones de *Liatris cylindracea* Michx. se encontró un valor de $F_{IT} = 0.43$, con valores de $F_{IS} = 0.41$ y $F_{ST} = 0.07$ (Schaal, 1975), mientras que en poblaciones de *Pinus rzedowskii* se reportó un valor de $F_{IT} = 0.405$, con valores de $F_{IS} = 0.274$ y $F_{ST} = 0.175$ (Delgado *et al.*, 1999). En el caso de *Pinus hartwegii*, al parecer ambos componentes (F_{IS} y F_{ST}) contribuyen de manera importante en el valor de F_{IT} . Es posible que la endogamia se deba a una baja densidad de las poblaciones, producto de la tala ilegal, incendios y falta de reclutamiento de nuevos individuos, por el pastoreo que ocurre en el Parque Nacional "Pico de Tancitaro". En el Cofre de Perote, Veracruz, esta especie muestra indicios de endogamia atribuida a la baja densidad de la población (Iglesias *et al.*, 2006).

La diferenciación genética entre poblaciones fue estadísticamente ($P \leq 0.05$) diferente de cero ($F_{ST} = 0.127$, con un intervalo de confianza de 0.004 a 0.224) (Cuadro 3). El valor de F_{ST} fue muy similar al encontrado con sólo cuatro poblaciones en el mismo gradiente ($F_{ST} = 0.111$); sin embargo, con 12 poblaciones aumenta el nivel de significancia.

Comparación entre Q_{ST} y F_{ST}

La mayoría de rasgos cuantitativos presentaron un patrón de variación clinal asociado al gradiente altitudinal. En un trabajo previo, Viveros-Viveros *et al.* (2009) reportaron un patrón más pronunciado en características como altura de planta a los siete meses de edad, diámetro basal de la planta a los siete y 18 meses de edad, y daños por bajas temperaturas. Se infiere que este patrón de variación altitudinal obedece a la presión de selección impuesta por el ambiente (Rehfeldt, 1991). En contraste, el análisis de isoenzimas no muestra correlación significativa con la altitud de origen, lo que indica que la presión de selección debida a gradientes ambientales aparentemente no está actuando sobre estos marcadores. Sin embargo, dado que hay diferenciación significativa entre poblaciones para isoenzimas, es de suponer que otras fuerzas evolutivas como la deriva y el flujo genético tienen una mayor influencia en el moldeado de la estructura genética que revelan estos loci (Lynch *et al.*, 1999; Evanno *et al.*, 2006).

Aunque el valor promedio de Q_{ST} (0.200) es superior al valor de F_{ST} (0.127), los valores de Q_{ST} estimados para cada uno de los rasgos no fueron significativamente diferentes al de F_{ST} al considerar la amplitud de los intervalos de confianza (Figura 3). Sin embargo, no debe perderse de vista que los métodos estadísticos usados para calcular los componentes de varianza y los intervalos de confianza de Q_{ST} influyen en la comparación de Q_{ST} vs. F_{ST} (Morgan *et al.*, 2005; Waldmann *et al.*, 2005). En este trabajo los intervalos de confianza para los valores de Q_{ST} y de F_{ST} fueron muy amplios; en el caso de Q_{ST} es fácil encontrar intervalos de confianza amplios (Merilä y Crnokrak, 2001; O'Hara y Merilä, 2005; Goudet y Büchi, 2006), aun en estudios con mayor intensidad de muestreo (Porcher *et al.*, 2006).

Sin embargo, no se puede descartar totalmente el hecho de que el número de poblaciones y de familias por población incluidos en el presente trabajo, hayan influido en la amplitud de los intervalos. O'Hara y Merilä (2005) señalan que para tener una mejor estimación de los intervalos de confianza de Q_{ST} es recomendable un número de poblaciones > 20 . En forma similar, la gran amplitud de los intervalos de confianza de F_{ST} probablemente se deba al número de individuos involucrados en algunas poblaciones así como al número de loci incluidos en el análisis, ambos por abajo del óptimo. Beaumont y Nichols (1996) mencionan que para una mejor estimación, lo ideal es incluir más de 10 poblaciones, más de 20 loci y más de 25 individuos por población.

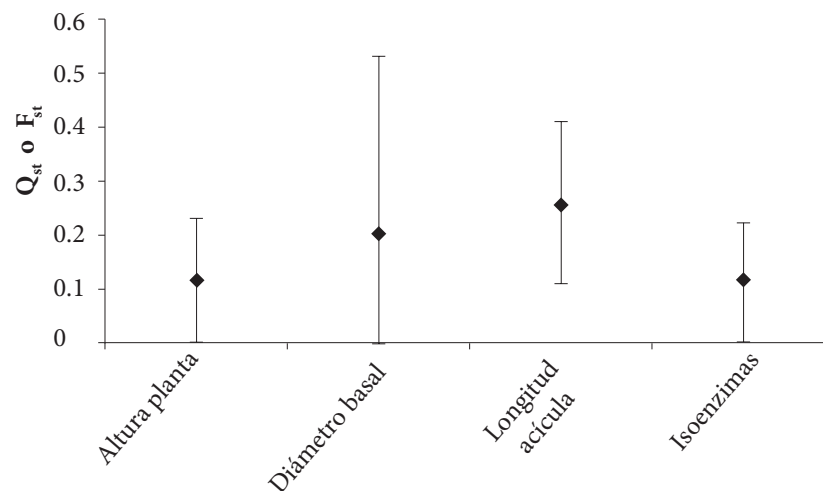


Figura 3. Diferenciación de poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. estimada para las características cuantitativas (Q_{ST}) y para isoenzimas (F_{ST}). Las líneas verticales representan los intervalos de confianza a 95 %.

Se han reportado valores de Q_{ST} mayores, menores o similares a los de F_{ST} (Merilä y Crnokrak, 2001). Los resultados de este estudio en donde $Q_{ST} > F_{ST}$ (pero sin diferencia estadística), indican que bajo el supuesto de neutralidad (Whitlock, 1999) la diferenciación entre las poblaciones de *Pinus hartwegii* se puede atribuir en gran medida a los efectos de la deriva génica (Yang *et al.*, 1996; Merilä y Crnokrak, 2001; Evanno *et al.*, 2006), y posiblemente a flujo génico desigual (Evanno *et al.*, 2006), o bien a la selección balanceadora (Yang *et al.*, 1996); también es posible que los efectos de la selección natural y la deriva sean de igual magnitud y por tanto no se puedan distinguir entre estos dos grupos de marcadores (Merilä y Crnokrak, 2001).

Otras explicaciones alternativas son que la varianza genética entre poblaciones incluya efectos de epistasia o de dominancia o ambos, lo cual aumenta la varianza genética pero disminuye el valor de Q_{ST} lo que ocasiona que éste sea similar a F_{ST} (Whitlock, 1999; Goudet y Büchi, 2006). Estos mismos autores establecen que más que la ausencia de selección, la similitud de los valores de Q_{ST} y F_{ST} puede deberse a la acción conjunta de la selección direccional y de la selección purificadora. Los datos de Viveros-Viveros *et al.* (2010) y de este trabajo permiten inferir que la diferenciación de las poblaciones determinada por los marcadores neutrales, se debe a la acción de la deriva génica.

Sin embargo, también existen indicios de la acción de dos tipos de selección natural: por una parte, la selección direccional manifestada por el patrón altitudinal de la variación genética de rasgos cuantitativos de valor adaptativo, y por otra parte, la selección purificadora que se encarga de purgar los alelos recesivos deletéreos en condición homocigóti-

ca. Se han reportado situaciones similares en *Pinus contorta* ssp. *latifolia* para las variables ángulo y diámetro de ramas (Yang *et al.*, 1996); en *Picea glauca* para el diámetro normal y altura del árbol e inicio de la brotación de la yema terminal (Jaramillo-Correa *et al.*, 2001), y en *Cedrela odorata* para longitud y ancho de hoja, así como diámetro del tallo y altura de la planta (Navarro *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Pinus hartwegii en el Pico de Tancitaro presenta diferenciación genética entre poblaciones tanto en características cuantitativas como en isoenzimas. Sin embargo, sólo las características cuantitativas mostraron un patrón clinal asociado con la altitud de origen de las poblaciones. Este hecho y la similitud encontrada entre los valores de Q_{ST} y de F_{ST} sugieren que las características cuantitativas están influenciadas por la selección natural debida a factores ambientales, mientras que las isoenzimas son neutras a la selección, por lo que la variación detectada con estos marcadores está moldeada principalmente por otras fuerzas evolutivas como la deriva genética y el flujo génico.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es parte de las actividades del Grupo de Trabajo sobre Recursos Genéticos Forestales, Comisión Forestal de América del Norte, FAO, ONU. Se agradece el financiamiento de los Fondos Sectoriales CONACYT-CONAFOR (2005-14783), CONACYT-SEP Ciencia Básica (004-C01-47777), Mixto CONACYT-Michoacán (2009-127128), y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH. Agradecemos a Felipe Aguilar, Rafael

Echeverría, Reyes Aguilar (Dirección Técnica Forestal de la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro), Miguel A. Silva (Servi-Ambiental El Bosque S.A. de C.V.), Rodrigo Niniz, Víctor H. Cambrón, José Carmen Soto, César Chávez y otras personas, por las facilidades y ayuda prestada en la colecta de semillas y en el establecimiento, mantenimiento y evaluación del ensayo. Se agradece a Consuelo Marín-Togo la elaboración del mapa. Tres revisores anónimos que contribuyeron a mejorar substancialmente el manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- Arriaga L. y L. Gómez (2004) Posibles efectos del cambio climático en algunos componentes de la biodiversidad de México. In: Cambio Climático: Una Visión desde México. J. Martínez, A. Fernández-Bremauntz (comps). Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. México, D.F. pp:255-265.
- Baradat P. (2008) DIOGENE: un logiciel pour la génétique et l'amélioration des plantes. Unité mixte de recherche "Botanique et bioinformatique de l'architecture des plantes". TA40/PS2, Boulevard de la Lironde, 34398 Montpellier Cedex 5, France.
- Barton N. H. and M. Turelli (1989) Evolutionary quantitative genetics: how little do we know? *Annual Review of Genetics* 23:337-370.
- Beaulieu J. and J. P. Simon (1994) Genetic structure and variability in *Pinus strobus* in Quebec. *Canadian Journal of Forest Research* 24:1726-1733.
- Beaumont M. A. and R. Nichols (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences* 263:1619-1626.
- Bekessy S. A., R. A. Ennos, M. A. Burgman, A. C. Newton and P. K. Ades (2003) Neutral DNA markers fail to detect genetic divergence in an ecologically important trait. *Biological Conservation* 110:267-275.
- Bermejo-Velázquez B. y F. Patiño-Valero (1981) Estudio de variación de las características morfológicas de *Pinus pseudostrobus* Lindl. y *Pinus pseudostrobus* var. *oaxacana* Martínez en Chiapas. *Revista Chapingo* 29-30:3-8.
- Bruederle L. P., D. F. Tomback, K. K. Nelly and R. C. Hardwick (1998) Population genetic structure in a bird-dispersed pine, *Pinus albicaulis* (Pinaceae). *Canadian Journal of Botany* 76:83-90.
- Butlin R. K. and T. Tregenza (1998) Levels of genetic polymorphism: marker loci versus quantitative traits. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 353(1366):187-198.
- Chan Y. and P. Arcese (2003) Morphological and microsatellite differentiation in *Melospiza melodia* (Aves) at a microgeographic scale. *Journal of Evolutionary Biology* 16:939-947.
- Delgado P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser and E. Álvarez-Buylla (1999) High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86:669-676.
- Edmands S. and J. S. Harrison (2003) Molecular and quantitative traits variation within and among populations of the intertidal Copecopod *Tigriopus californicus*. *Evolution* 57:2277-2285.
- Evanno G., E. Castella and J. Goudet (2006) Evolutionary aspects of population structure for molecular and quantitative traits in the freshwater snail *Radix balthica*. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1071-1082.
- Goncharenko G. G., A. E. Silin and V. E. Padutov (1994) Allozyme variation in natural populations of Eurasian pines. III. Population structure, diversity, differentiation and gene flow in central and isolated populations of *Pinus sylvestris* L. in Eastern Europe and Siberia. *Silvae Genetica* 43:119-132.
- González E. G. (2003) Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59:377-388.
- González-Martínez S. C., R. Alia and L. Gil (2002) Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity* 89:199-206.
- Goudet J. and L. Büchi (2006) The effects of dominance, regular inbreeding and sampling design on Q_{ST} , an estimator of population differentiation for quantitative traits. *Genetics* 172:1337-1347.
- Hamrick J. L. (1983) The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animals and Plant Populations. C. M. Schonewald-Cox, S. M. Chambers, B. MacBryde, W. L. Thomas (eds). The Benjamin/Cummings Publishing Company. Menlo Park, California, USA. pp:335-348.
- Hedrick P. W. (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53:313-318.
- Iglesias L. G., L. Y. Solís-Ramos y H. Viveros-Viveros (2012) Variación morfológica en dos poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* Lindl. del estado de Veracruz. *Phyton* 81:239-246.
- Iglesias-Andreu L. y Tivo-Fernández (2006) Caracterización morfológica de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Ra Ximhai* 2:449-468.
- Iglesias L., Y. Tivo y J. L. Casas (2006) *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote en Veracruz, México. *Cuadernos de Biodiversidad* 20:10-16.
- Isik K. (1986) Altitudinal variation in *Pinus brutia* Ten.: Seed and seedling characteristics. *Silvae Genetica* 35:58-67.
- Jaramillo-Correa J. P., J. Beaulieu and J. Bousquet (2001) Contrasting evolutionary forces driving population structure at expressed sequence tag polymorphisms, allozymes and quantitative traits in white spruce. *Molecular Ecology* 10:2729-2740.
- Karasawa M. M. G., R. Vencovsky, C. M. Silva, D. C. Cardim, E. de A. Bressan, G. C. X. Oliveira and E. Veasey (2012) Comparisson of microsatellites and isozymes in genetic diversity studies of *Oryza glabripatula* (Poaceae) populations. *Revista de Biología Tropical* 60:1463-1478.
- Karhu A., P. Hurme, M. Karjalainen, P. Karvonen, K. Kärkkäinen, D. Neale and O. Savolainen (1996) Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theoretical and Applied Genetics* 93:215-221.
- Kaya Z. and F. Isik (1997) The pattern of genetic variation in shoot growth of *Pinus brutia* Ten. populations sampled from the Toros Mountains in Turkey. *Silvae Genetica* 46:73-81.
- Lande R. and G. F. Barrowclough (1987) Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: Viable Populations for Conservation. M. E. Soulé (ed). Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp:87-123.
- 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 pincheana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88:1977-1987.
- Ledig F. T., M. T. Conkle, B. Bermejo-Velázquez, T. Eguiluz-Piedra, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson and W. S. Dvorak (1999) Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53:91-99.
- Lee S. W., F. T. Ledig and D. R. Johnson (2002) Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California. *American Journal of Botany* 89:566-577.
- Lynch M., M. Pfreder, K. Spitze, N. Lehman, J. Hicks and D. Allen (1999) The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution* 53:100-110.
- McKay J. K. and R. G. Latta (2002) Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology & Evolution* 17:285-291.
- Merilä J. and P. Crnokrak (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology* 14:892-903.
- Miller M. P. (1997) Tools for population genetic analyses [TFPGA] 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. <http://herb.bio.nau.edu/~miller> (Diciembre 2008).
- Morgan T. J., M. A. Evans, T. Garland, J. G. Swallow and P. A. Carter (2005) Molecular and quantitative genetic divergence among populations of house mice with known evolutionary histories.

- Heredity* 94:518-525.
- Navarro C., S. Cavers, A. Pappinen, P. Tigerstedt, A. Lowe, J. Lowe and J. Merilä (2005) Contrasting quantitative traits and neutral genetic markers for genetic resource assessment of Mesoamerican *Cedrela odorata*. *Silvae Genetica* 54:281-292.
- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- O'Hara R. B. and J. Merilä (2005) Bias and precision in Q_{ST} estimates: problems and some solutions. *Genetics* 171:1331-1339.
- Perry J. P. (1991) The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 231 p.
- Porcher E., T. Giraud and C. Lavigne (2006) Genetic differentiation of neutral markers and quantitative traits in predominantly selfing metapopulations: confronting theory and experiments with *Arabidopsis thaliana*. *Genetical Research* 87:1-12.
- Reed D. H. and R. Frankham (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55:1095-1103.
- Rehfeldt G. E. (1991) A model of genetic variation for *Pinus ponderosa* in the Inland Northwest (USA): applications in gene resource management. *Canadian Journal of Forest Research* 21:1491-1500.
- Sáenz-Romero C. and B. L. Tapia-Olivares (2003) *Pinus oocarpa* isoenzymatic variation along an altitudinal gradient in Michoacán, México. *Silvae Genetica* 52:237-240.
- Sáenz-Romero C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval, R. St-Amant, J. Beaulieu and B. A. Richardson (2010) Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Mexico and their use in understanding climate change impacts on vegetation. *Climatic Change* 102:595-623.
- Sáenz-Romero C., S. Aguilar-Aguilar, M. A. Silva-Farías, X. Madrigal-Sánchez, S. Lara-Cabrera and J. López-Upton (2012) Altitudinal morphological variation among *Pinus devoniana* Lindl. (*P. michoacana* Martínez) populations and putative variety *cornuta* in central-west México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 3:17-28.
- SAS Institute (1988) SAS/STAT Users's; release 6.03. SAS Institute. Cary, N.C. 1028 p.
- Schaal B. A. (1975) Population structure and local differentiation in *Latris cylindracea*. *American Naturalist* 109:511-528.
- Slatkin M. (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- Soltis D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow and G. J. Gastromy (1983) Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, and staining schedules. *American Fern Journal* 73:9-27.
- Spitze K. (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135:367-374.
- Tripiana V., M. Bourgeois, D. Verhaegen, P. Vigneron and J. M. Bouvet (2007) Combining microsatellites, growth, and adaptive traits for managing in situ genetic resources of *Eucalyptus urophylla*. *Canadian Journal of Forest Research* 37:773-785.
- Viveros-Viveros H., C. Sáenz-Romero, J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, G. Ramírez-Valverde and A. Santacruz-Varela (2009) Altitudinal genetic variation in *Pinus hartwegii* Lindl.: I. Height growth, shoot phenology and cold damage in seedlings. *Forest Ecology and Management* 257:836-842.
- Viveros-Viveros H., B. L. Tapia-Olivares, C. Sáenz-Romero, J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, A. Santacruz-Varela y G. Ramírez-Valverde (2010) Variación isoenzimática de *Pinus hartwegii* Lindl. en un gradiente altitudinal en Michoacán, México. *Agrociencia* 44:723-733.
- Viveros-Viveros H., A. R. Camarillo-Luna, C. Sáenz-Romero y A. Aparicio-Rentería (2013) Variación altitudinal en caracteres morfológicos de *Pinus patula* en el estado de Oaxaca (México) y su uso en la zonificación. *Bosque* 34:173-179.
- Waldmann P. and S. Andersson (1998) Comparison of quantitative genetic variation and allozyme diversity within and between populations of *Scabiosa canescens* and *S. columbaria*. *Heredity* 81:79-86.
- Waldmann P., M. R. García-Gil and M. J. Sillanpää (2005) Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: an applications to *Pinus sylvestris*. *Heredity* 94:623-629.
- Weir B. S. and C. C. Cockerham (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Whitlock M. C. (1999) Neutral additive genetic variance in a metapopulation. *Genetical Research* 74:215-221.
- Wright S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Wright S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to system of mating. *Evolution* 19:395-420.
- Yang R. C., F. C. Yeh and A. Yanchuk (1996) A comparison of isozyme and quantitative genetic variation in *Pinus contorta* ssp. *latifolia* by F_{ST} . *Genetics* 142:1045-1052.
- Yamada M. and R. P. Guries (1989) Manual for Starch Gel Electrophoresis: New Chocolate Lovers Edition. Staff Paper Series No. 39. Dept. of Forestry. University of Wisconsin. Madison, WI. 21 p.
- Zobel B. y J. Talbert (1992) Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales. Ed. Limusa. México, D. F. 545 p.