



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y PATRÓN DE
CRUZAMIENTO EN POBLACIONES NATURALES DE
Pseudotsuga menziesii (MIRB.) FRANCO**

JORGE CRUZ NICOLÁS

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2007

La presente tesis titulada **Diversidad genética y patrón de cruzamiento en poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco**, fue realizada por el alumno **Jorge Cruz Nicolás** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. Porfirio Ramírez Vallejo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. J. Jesús Vargas Hernández

ASESOR

Dr. Javier López Upton

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó con apoyo de los proyectos “Diversidad genética y conservación de *Pseudotsuga* en México”, financiado por el **CONACYT** (Proyecto 33617-B), y “Conservación y mejoramiento genético de *Pseudotsuga spp.*, conífera estratégica del estado de Tlaxcala y la región central del país” financiado por el Fondo Sectorial **CONAFOR-CONACYT** (Proyecto 2002-C01-6416).

Se agradece de manera especial a las siguientes instituciones y personas.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por ser el soporte para la realización de mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados**, especialmente al **Programa de Genética** por formarme profesionalmente.

Al **Dr. J. Jesús Vargas Hernández**, por su apoyo incondicional e interés mostrado en el presente trabajo, además del valioso tiempo que dedicó para la culminación del mismo.

Al **Dr. Porfirio Ramírez Vallejo**, por sus atinadas observaciones, sugerencias, por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación y por su amistad.

Al **Dr. Javier López Upton**, por sus valiosos consejos así como, por sus acertadas aportaciones y sugerencias para la mejora de este documento.

Al **Dr. Fernando Castillo**, por el apoyo brindado durante mi estancia en el Colegio.

AL **C. Juan Carlos Zaragoza Ramírez**, por su apoyo en el trabajo de laboratorio y por su amistad.

DEDICATORIA

Con mucho cariño

A **Dios** y a la **Virgen Santísima**, sincero agradecimiento por su ayuda en los momentos difíciles.

A mis Padres **Zenen Cruz Santiago** e **Isabel Nicolás Medina**

A mis hermanos **Raúl, Diego** y **Fabiola**

A mis amigos de siempre: **Maritoña** y todos los integrantes del grupo

A todo el personal y compañeros del Laboratorio de Marcadores Genéticos: **Ángeles Arenas, María Nicolasa Rodríguez, Joaquina, Jaime Canul, Mario Rocandio, Marce Velez, Rogelio Gutiérrez, Gustavo Espejel** y **Hugo Romero**, por hacer más agradable mi estancia en el Colegio.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN GENERAL	vi
ABSTRACT	vii
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPITULO II: DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE <i>Pseudotsuga menziesii</i> (MIRB.) FRANCO EN MÉXICO	5
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Material biológico	10
Extracción de tejidos y procedimiento electroforético	11
Estimación de parámetros de diversidad y estructura genética	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Diversidad genética de las poblaciones de <i>Pseudotsuga menziesii</i>	15
Estructura de la diversidad genética	18
Patrón geográfico de diversidad genética	20
CONCLUSIONES	25
CAPITULO III: PATRÓN DE CRUZAMIENTO EN POBLACIONES NATURALES DE <i>Pseudotsuga menziesii</i> (MIRB.) FRANCO EN MÉXICO	26

RESUMEN	26
ABSTRACT	27
INTRODUCCIÓN	28
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Poblaciones muestreadas y análisis isoenzimático	31
Estimación de los parámetros de cruzamiento y análisis estadístico	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
Sistema de cruzamiento	37
Correlación de paternidad	39
CONCLUSIONES	41
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN GENERAL	42
LITERATURA CITADA	46

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ubicación geográfica, altitud y número de individuos muestreados de las poblaciones naturales de <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco incluidas en el presente estudio.	10
2	Valores de diversidad genética y prueba de χ^2 para 11 poblaciones naturales de <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco de México, con base en 18 <i>loci</i> isoenzimáticos.	17
3	Estadísticos de “F” (Wright, 1965) y flujo génico (N_m) con base en 15 <i>loci</i> polimórficos en 11 poblaciones naturales de <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco de México.	19
4	Matriz de distancias genéticas (triángulo superior) y distancias geográficas (km, triángulo inferior) entre pares de poblaciones mexicanas de <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco.	21
5	Ubicación geográfica, número de árboles muestreados y número promedio de progenies de <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco, de tres poblaciones estudiadas.	31

- 6 Frecuencias alélicas de polen y óvulos con sus respectivos intervalos de confianza ($p < 0.05$) en tres poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. 36
- 7 Tasa de polinización cruzada estimada con base en información de *loci* múltiples (\hat{t}_m) y *locus* individuales (\hat{t}_s), con sus respectivos intervalos de confianza ($p = 0.05$) y valores de correlación de paternidad, estimada con base en \hat{t}_m (con error estándar entre paréntesis) en tres poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco de México. 37

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Relación entre distancias genéticas y distancias geográficas para las 11 poblaciones de <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco incluidas en el estudio.	22
2	Agrupamiento de consenso de las poblaciones de <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco, a partir de las distancias genéticas entre ellas, construido con base en 500 repeticiones con reemplazo. El porcentaje en cada una de las ramas representa la proporción en que ocurrieron. a) Agrupamiento incluyendo las 11 poblaciones; b) agrupamiento excluyendo las cuatro poblaciones con menor tamaño de muestra.	23

RESUMEN GENERAL

Se determinó la estructura de la diversidad genética y el patrón de cruzamiento en poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en México con base en información de isoenzimas. Para evaluar la diversidad genética se utilizó una muestra de 11 poblaciones naturales distribuidas en diferentes regiones geográficas (noroeste, noreste y centro) del país; el patrón de cruzamiento y su efecto sobre el nivel de endogamia sólo se evaluó en una muestra de tres poblaciones, representativas de cada región geográfica. Se encontró una amplia diversidad genética a nivel de especie (83.3% de *loci* polimórficos y un promedio de 2.9 alelos por *locus*), pero reducida a nivel de poblaciones (28.3 % de *loci* polimórficos y 1.52 alelos por *locus*), especialmente en la región central, donde los valores promedio estuvieron por debajo de la media general. La alta diferenciación genética entre poblaciones ($F_{st} = 0.298$) muestra que a pesar de la amplia diversidad genética a nivel de especie, cada población sólo tiene una pequeña porción de la variación total. La distancia genética entre las poblaciones de la Sierra Madre Oriental (noreste y centro) se correlacionó en forma positiva ($r = 0.87$) con la distancia geográfica entre ellas, lo que permitió diferenciar las poblaciones de estas dos regiones. En las poblaciones del norte de México se estimó un valor cercano a 90% de polinización cruzada (\hat{t}_m), mientras que en la población del centro el valor estimado fue de 49%, indicando un alto porcentaje de autofecundación en ella. La similitud de la estimación del patrón de cruzamiento con base en el modelo de loci múltiples (\hat{t}_m) y de un solo locus (\hat{t}), indica que la autofecundación es la principal forma de endogamia en las poblaciones evaluadas. Se discuten las implicaciones de estos resultados en la conservación de las poblaciones, sobre todo en la región central del país.

Palabras clave: Abeto Douglas, distancias genéticas, diversidad genética, endogamia, isoenzimas, polimorfismo, polinización cruzada.

ABSTRACT

The structure of genetic diversity and the mating system in natural populations of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco were studied using isozymes. A sample of 11 natural populations from different regions in Mexico (northwest, northeast and central) were included to evaluate the geographic pattern of genetic diversity; the mating system and its effect on inbreeding was studied only in three of them, representatives of each geographic region. A broad genetic diversity was found at the species level (83.3% polymorphic *loci* and a mean of 2.9 alleles per *locus*), but genetic diversity was relatively low (28.3% polymorphic *loci* and 1.52 alleles per *locus*) at the population level, especially in the central region, with average values below the overall mean. The high degree of genetic differentiation among populations ($F_{st} = 0.298$) shows that despite the high genetic diversity found within the species, each population has only a small portion of the total variation. The genetic distance between pairs of populations from the Sierra Madre Oriental (northeast and central regions) was positively correlated ($r = 0.87$) with the geographic distance between them, so it was possible to differentiate the populations from these two regions. Cross pollination (\hat{t}_m) was close to 90 % in the two northern populations, whereas in the population from central Mexico it was only 49 %, showing a high rate of self-pollination. The similarity of cross-pollination estimation based on both multi- and single-locus genotypes (\hat{t}_m and \hat{t}_s) shows that self-pollination is the main form of inbreeding in these populations. The implications of the results on population conservation are discussed, particularly for those in central Mexico.

Key Words: Cross-pollination, Douglas-fir, genetic distances, genetic diversity, inbreeding, isozymes, polymorphism.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Pseudotsuga* se encuentra distribuido en el Oeste de Norteamérica (Estados Unidos y Canadá), México, Japón y parte de China (Martínez, 1963). En México, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco se distribuye en los sistemas montañosos de la Sierra Madre Occidental (en los estados de Chihuahua, Durango y Zacatecas) y la Sierra Madre Oriental (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas); así como en la zona centro - sur del país en los estados de Querétaro, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Veracruz (Martínez, 1963). En Oaxaca se encuentran dos localidades que representan el límite más meridional de la distribución de esta especie (Debreczy y Racz, 1995; Del Castillo *et al.*, 2004). La distribución natural de *Pseudotsuga* en México presenta distintas condiciones fisiográficas y micro-ambientales. Esta distribución obedece al cambio climático posterior a la última glaciación, que forzó a las coníferas a moverse del sur hacia el norte o a mayores elevaciones hacia las serranías, lo que causó una distribución fragmentada y discontinua en manchones aislados de tamaño pequeño, sobre todo en la región centro - sur de México (Farjon, 1990). Los pronósticos de cambio climático (Iverson y Prasad, 2002) sugieren que los rodales de esta especie ubicados en el extremo sur están en riesgo de perderse; por esta razón, la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059, protege a este género desde 1994 (Anónimo, 1994), protección que fue ratificada en 2002 (Anónimo, 2002).

Por otro lado, el estatus taxonómico de esta especie ha sido motivo de controversia en los últimos años. Dado que, según Martínez (1963), en México existen cuatro especies: *Pseudotsuga flahualti* Flous, *P. guinieri* Flous, *P. macrolepis* Flous y *P. rhederi* Flous. Sin embargo, un estudio basado en características morfológicas apunta en la dirección de que en México existe sólo una especie de *Pseudotsuga* y que las variaciones en atributos morfológicos y anatómicos

son debidos a los factores ecológicos contrastantes a los cuáles se han tenido que adaptar las poblaciones de *Pseudotsuga* en nuestro país; estos elementos propiciaron que Flous y Martínez concluyeran y aceptarán la existencia de varias especies de *Pseudotsuga* en México (Reyes *et al.*, 2005). Estas observaciones conducen a definir con mayor claridad el grado de especiación observada, con fines de conservación y mantenimiento de los rodales existentes en el país.

Las diferencias en características morfológicas y fenológicas ha permitido diferenciar a las poblaciones del norte de las del centro de México (Reyes *et al.*, 2006; Acevedo *et al.*, 2006), lo que permite inferir que existe un proceso de diferenciación genética en las poblaciones de *Pseudotsuga* en México y al mismo tiempo sugiere la necesidad de evaluar el proceso de diferenciación a nivel genético, ambos elementos ayudarían a definir con mayor claridad el estatus taxonómico de esta especie en México. En la caracterización para el conocimiento de la diversidad genética en especies forestales, una de las herramientas más comúnmente utilizadas han sido las isoenzimas. Descubiertas en 1957 por Hunter y Market, las isoenzimas han jugado un papel muy importante en muchas ramas de la biología desde entonces. Para la definición de la diversidad genética, los parámetros más utilizados han sido la proporción de enzimas por *loci* para las que la población es polimorfica (Polimorfismo; P) y el promedio del número de *loci* para él que los individuos son heterocigotos (Heterocigocidad; H) (Stebbins, 1989).

La información derivada de los marcadores isoenzimáticos en especies forestales ha permitido investigar cuestiones fundamentales de biología evolutiva (Ledig *et al.*, 1997; Ledig *et al.*, 2000); además, ha permitido cuantificar el nivel de variación entre y dentro de poblaciones, identificar el patrón geográfico de dicha variación e identificar las posibles fuerzas asociadas con los patrones de diversidad genética. La caracterización poblacional es importante para determinar la magnitud y el tipo de variación presente en las poblaciones, y es un instrumento valioso para su posterior utilización para fines ecológicos y sustentables (Zobel y Talbert, 1988).

La variabilidad genética dentro de poblaciones puede ser reducida por disturbios antropogénicos, plagas y enfermedades; a esta reducción también contribuye de forma sustancial el aislamiento y tamaño poblacional, ya que ambos factores dificultan la capacidad de regeneración natural de la población, así como, la generación de nueva variación (Eguiluz, 1998). Esta situación puede observarse en *Pseudotsuga* en el centro del país, donde se ha encontrado una alta producción de semillas vanas, baja regeneración natural y bajo vigor de las plántulas (Juárez *et al.*, 2006; Mápula *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007); particularmente, la producción de semillas vanas está asociada con el cruzamiento entre árboles emparentados genéticamente, fenómeno que es muy común en poblaciones pequeñas y aisladas; en tanto que, la pérdida de vigor en *Pseudotsuga*, se asocia con la depresión endogámica (Sorensen y Campbell, 1997). Estas evidencias hacen suponer que la deriva genética ha tenido un efecto importante sobre el nivel de endogamia.

Dentro de todo este marco la biología de la conservación juega un papel importante para establecer estrategias para el mantenimiento de la diversidad genética de poblaciones, especies, hábitats y ecosistemas. Sobre todo cuando las especies por conservar presentan un potencial biológico, ecológico o económico, actual o futuro, y son de utilidad para el hombre. En este sentido, el género *Pseudotsuga* presenta un amplio potencial como especie maderable y ornamental, sobre todo por su uso como árbol de navidad.

De acuerdo con la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) cada año se importan cerca de 1 millón 200 mil árboles, de Estados Unidos principalmente, país donde el género con mayor demanda es *Pseudotsuga*. En México los principales estados productores de árboles de navidad son Veracruz, México, Puebla, Nuevo León y Coahuila (CONAFOR, 2007). La importancia económica de esta actividad en la región central, destaca la necesidad del mantenimiento de las poblaciones regionales a largo plazo.

Dada la importancia económica, biológica y forestal de la especie *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, así como por las características de su distribución en México, se desarrolló el presente trabajo con los objetivos siguientes: 1) Evaluar el grado de diversidad genética de la especie en poblaciones naturales del centro de México y algunas del norte del país, con base en marcadores isoenzimáticos; 2) Caracterizar la estructura de la diversidad genética en las poblaciones del centro de México; 3) Establecer la relación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas de las poblaciones estudiadas; y 4) Determinar el patrón de cruzamiento y nivel de polinización cruzada en poblaciones de *Pseudotsuga menziesii*.

Para lograr estos objetivos el trabajo se estructuró en dos partes. En la primera (Capítulo II) se evalúa y analiza la magnitud y estructura geográfica de la diversidad genética de la especie, con base en 11 poblaciones naturales, que incluyen tres del norte y ocho poblaciones del centro del país, en la que se cubren los primeros tres objetivos. En la segunda parte (Capítulo III) se discute el cuarto objetivo, mediante la estimación del nivel de polinización cruzada en tres poblaciones naturales, dos del norte y una del centro del país. Finalmente, en el capítulo IV se integran los resultados obtenidos en los capítulos anteriores y se discuten las implicaciones sobre el manejo y conservación de los recursos genéticos de *Pseudotsuga* en México.

CAPITULO II

DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE *Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO EN MÉXICO

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el grado de diversidad genética de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco y el nivel de diferenciación genética entre sus poblaciones en México, se estudió la estructura de la diversidad genética en 11 poblaciones naturales de esta especie, con base en 18 *loci* isoenzimáticos. Los resultados mostraron una amplia diversidad genética a nivel de especie (83.3% de *loci* polimórficos y un promedio de 2.9 alelos por *locus*); al mismo tiempo, se encontró una baja diversidad a nivel de poblaciones (28.3 % de *loci* polimórficos y 1.52 alelos por *locus*), especialmente en la región central, donde los valores promedio estuvieron por debajo de la media general. La alta diferenciación genética entre poblaciones ($F_{st} = 0.298$), muestra que a pesar de la amplia diversidad genética a nivel de especie, cada población sólo tiene una pequeña porción de ésta. La correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas sólo fue significativa y positiva ($r = 0.87$) en las poblaciones de la Sierra Madre Oriental (regiones noreste y centro), lo que permitió diferenciar las poblaciones de estas dos regiones. Sin embargo, la población “Mohinora” del Noroeste de México se agrupó con las del centro, por lo que se requiere un estudio más detallado en las poblaciones de esta región para dilucidar la razón de este agrupamiento.

Palabras clave: Abeto Douglas, distancias genéticas, diversidad genética, isoenzimas, polimorfismo.

ABSTRACT

To determine the level of genetic diversity in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco and the degree of genetic differentiation among its populations from Mexico, the structure of genetic diversity was studied in 11 natural populations in this species, based on 18 isozyme loci. A broad genetic diversity was found at the species level (83.3% polymorphic loci and a mean of 2.9 alleles per locus), but it was relatively low at the population level (28.3% polymorphic loci, and 1.52 alleles per locus), particularly for those from the central region, where the average values were below the overall mean. The high degree of genetic differentiation among populations ($F_{st} = 0.298$), shows that each population has only a small fraction of the total genetic diversity. The correlation between genetic and geographic distances was significant and positive ($r = 0.87$) only for the populations from the Sierra Madre Oriental (northeastern and central regions), allowing to distinguish both regions. However, the “Mohinora” population in northwest of Mexico was clustered with populations from the central region, so a more comprehensive study of northwestern populations is necessary to elucidate the causes of this clustering.

Key words: Douglas-fir, genetic distances, genetic diversity, isozymes, polymorphism.

INTRODUCCIÓN

Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco es una de las especies maderables más importantes en el mundo (Hermann y Lavender, 1999). Por la importancia ecológica y económica de la especie en Estados Unidos y Canadá, en estos países ha sido objeto de numerosos estudios genéticos y programas de domesticación en los últimos 50 años (Amarasinghe y Carlson, 2002). En México, *Pseudotsuga menziesii* también tiene un importante papel económico y ecológico; ya que además de su utilidad como especie maderable (Martínez, 1963), en años recientes se ha promovido su producción para su utilización como árboles de navidad. Desde el punto de vista ecológico, las poblaciones naturales de esta especie constituyen una aportación única a la biodiversidad de México, especialmente en las comunidades vegetales de clima templado-frío. Asociada a las comunidades arbóreas donde *Pseudotsuga menziesii* es el elemento principal, se encuentra una gran diversidad biológica (Domínguez, 1994), por lo que el mantenimiento de este hábitat es crucial para la conservación de las especies asociadas.

Pseudotsuga menziesii se distribuye en México a lo largo de tres sistemas montañosos: la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental (Martínez, 1963) y la Sierra Madre del Sur (Debreczy y Racz, 1995; Del Castillo *et al.*, 2004). En la primera se incluyen los estados de Chihuahua, Durango y Zacatecas; la segunda se localiza en los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas en el norte de México; y la tercera hacia la parte centro-oriente del país, en los estados de Querétaro, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Veracruz. En la región sur existen dos localidades en el estado de Oaxaca (Del Castillo *et al.*, 2004), que son las poblaciones más aisladas de la especie. A diferencia de su distribución natural en Canadá y EUA, una de las peculiaridades de esta especie en México es que se encuentra distribuida en forma discontinua y

fragmentada formando poblaciones aisladas, de tamaño reducido, generalmente mezcladas con otras especies arbóreas (Domínguez, 1994).

Aunque en el pasado se generó una controversia sobre el número de especies de *Pseudotsuga* existentes en México (Martínez, 1963; Little, 1979), y la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059 mantiene bajo protección especial varias especies de este género (Anónimo, 2002), estudios recientes coinciden en señalar que las poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* corresponden a la especie *Pseudotsuga menziesii* (Farjon, 1990; Debreczy y Racz, 1995; Gernandt y Liston, 1999). Diferentes estudios han confirmado que existe una amplia diferenciación en características morfológicas (Reyes *et al.*, 2006; Mápula *et al.*, 2007), fenológicas (Acevedo *et al.*, 2006) y del crecimiento de las plantas (Juárez *et al.*, 2006) entre estas poblaciones; sin embargo, a pesar de su gran valor como reserva de recursos genéticos, hasta ahora se desconoce el nivel y estructura de la diversidad genética existente en ellas.

El conocimiento de la diversidad genética de una especie, y su distribución entre y dentro de las poblaciones, es importante para la conservación y el manejo adecuado de sus recursos genéticos. Esta información nos permite establecer las prioridades para la conservación y, al mismo tiempo, definir la estrategia de muestreo más apropiada para el uso y/o mantenimiento de esa diversidad. Por ejemplo, cuando la mayor parte de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones y éstas no difieren entre sí, sólo se requiere conservar algunas de ellas (Brown y Hardner, 2000); sin embargo, el problema se complica cuando la diversidad genética tiene una estructura más compleja y hay una diferenciación significativa entre poblaciones. El análisis espacial de la estructura de la diversidad genética de una especie en una región determinada también permite hacer inferencias sobre las principales fuerzas evolutivas que han influido sobre ella, y usar dicha información para hacer un uso más eficiente de los recursos genéticos asociados (Hamrick y Nason, 2000).

Debido a las diferencias fisiográficas y micro-ambientales existentes en el área de distribución natural de *Pseudotsuga menziesii* en México, es posible que la selección natural juegue un papel importante en el nivel de diversidad genética de la especie y en el grado de diferenciación genética entre sus poblaciones. Sin embargo, el tamaño reducido de las poblaciones, sobre todo en la región central del país, asociado a los procesos de fragmentación y aislamiento entre ellas, hacen suponer que también la deriva genética ha tenido un efecto importante en la diferenciación de las poblaciones y en la estructura espacial de la diversidad (Reyes *et al.*, 2006). Es importante distinguir entre la acción de la selección natural y el efecto asociado de la deriva genética sobre el aumento en el nivel de endogamia y la reducción de la heterocigocidad dentro de las poblaciones (Savolainen y Kuittinen, 2000).

En el presente estudio se proporciona información sobre la magnitud y estructura de la diversidad genética en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii*, que sería útil para proponer medidas adecuadas de conservación de los recursos genéticos existentes en ellas. Los objetivos específicos del estudio son: a) caracterizar la magnitud y estructura de la diversidad genética en las poblaciones mexicanas de esta especie, en particular el grado de diferenciación dentro de la región central de México; b) estimar el nivel de endogamia existente en las poblaciones muestreadas; y c) determinar la asociación de la diferenciación de las poblaciones con un patrón geográfico particular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó una muestra de semilla de 170 árboles madre provenientes de 11 poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Cuadro 1). La recolección y extracción de la semilla fue realizada en diferentes años por personal del Colegio de Postgraduados.

Cuadro 1. Ubicación geográfica, altitud y número de individuos muestreados de las poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco incluidas en el presente estudio.

Región y población	Municipio y Estado	Latitud (N)	Longitud (W)	Altitud (msnm)	n
<u>Región norte</u>					
Mohinora	Guadalupe y Calvo, Chih.	25° 57' 42"	107° 02' 21"	3,185	18
Jamé	Arteaga, Coah.	25° 20' 32"	100° 33' 56"	2,600	17
Puerto Palomo	Galeana, N. L.	24° 56' 40"	100° 16' 12"	2,647	23
<u>Región centro</u>					
San José Capulines	Mineral del Chico, Hgo.	20° 11' 02"	98° 47' 42"	2,855	20
El Salto	Singuilucan, Hgo.	20° 04' 31"	98° 32' 37"	2,955	15
Tlaxco	Tlaxco, Tlax.	19° 38' 55"	98° 03' 11"	2,960	20
Ejido Zapata	E. Zapata, Tlax.	19° 32' 40"	97° 56' 30"	2,940	5
La Rosa	Terrenates, Tlax.	19° 31' 57"	97° 54' 00"	2,785	26
Axopilco	Altzayanca, Tlax.	19° 27' 42"	97° 46' 18"	2,880	7
La Caldera	Ixtacamaxtitlán, Pue.	19° 30' 25"	97° 52' 10"	2,900	7
Apizaquito	Saltillo La Fragua, Pue.	19° 12' 11"	97° 18' 41"	3,100	7

n = Número de individuos muestreados.

Al momento de recolectar se aseguró una distancia mínima de 50 m entre cada árbol, para evitar individuos emparentados; cada lote de semilla recolectado se mantuvo por separado,

identificado para cada árbol madre. La cantidad de árboles por población incluidos en el presente estudio estuvo sujeta a la disponibilidad y capacidad de germinación de la semilla.

En estudios previos de *Pseudotsuga* se ha demostrado la necesidad de tratamientos pre-germinativos para obtener una germinación adecuada (Jarvis *et al.*, 1997). En este caso se realizó la imbibición de la semilla en H₂O₂ al 1% durante 24 horas, y posteriormente se estratificó a una temperatura de 4 °C durante 50 días aproximadamente. Posteriormente, las semillas fueron germinadas en cajas Petri, con papel filtro húmedo a una temperatura de 24 °C en una cámara de germinación; la extracción del tejido del megagametófito de cada semilla se realizó en el momento en que la radícula alcanzó 5 mm, aproximadamente.

Extracción de tejidos y procedimiento electroforético

Para el análisis isoenzimático se utilizó electroforesis horizontal en geles de almidón del tejido del megagametofito de las semillas. Para determinar el genotipo de cada uno de los árboles madre se utilizó una muestra de seis a siete semillas por individuo, dado que con seis megagametofitos la probabilidad de no identificar un árbol heterocigoto es de 0.031 ($2[1/2]^6$) y con siete es de 0.016 ($2[1/2]^7$). Al momento de la extracción se separaron la testa y el embrión de las semillas, dejando únicamente el megagametofito. Este tejido fue macerado en un tubo eppendorff con una punta de plástico adaptada a un taladro eléctrico, agregando a cada tubo 100 μ l de amortiguador de extracción (USDA, Forest Service 2003). Los extractos obtenidos fueron almacenados en un congelador a -81 °C hasta el momento de realizar los corrimientos electroforéticos.

Los extractos fueron sometidos a electroforesis tomando como base la metodología desarrollada por el Laboratorio Nacional de Electroforesis y Genética Forestal del Servicio Forestal de Estados Unidos en Placerville, California (USDA, Forest Service 2003), en el

Laboratorio de Marcadores Genéticos del Colegio de Postgraduados. Se evaluaron 11 sistemas enzimáticos que en estudios previos (El-Kassaby y Sziklai, 1982; Li y Adams, 1989; Adams *et al.*, 1990) han mostrado polimorfismo para esta especie. Dichos sistemas son leucina aminopeptidasa (LAP), enzima málica (ME), esterasa (EST), glutamato deshidrogenasa (GDH), fosfoglucoosa isomerasa (PGI), fosfoglucomutasa (PGM), glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), malato deshidrogenasa (MDH), 6- fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD), isocitrato deshidrogenasa (IDH) y diaforasa (DIA). En algunos casos fue necesario ajustar los métodos de análisis para obtener un revelado adecuado. Para los sistemas, como DIA y GOT fue necesario adaptar el proceso de tinción descrito por Stuber *et al.* (1988). En estos sistemas enzimáticos se evaluaron 18 *loci* putativos; la identificación de los genotipos electroforéticos (alelos presentes en cada *locus*) se efectuó considerando la migración relativa de las enzimas a partir del origen dentro de los geles. Para facilitar la interpretación de los *loci* y sus alelos correspondientes se incluyeron como testigo muestras de megagametofitos de *Pinus resinosa* Ait. , especie que es completamente fija para estos *loci*. En las enzimas en las que se identificó más de una zona de actividad, los *loci* se identificaron con numerales sucesivos junto con la clave de la enzima. La designación de cada alelo se realizó considerando como alelo 1 al de mayor frecuencia en toda la muestra, y posteriormente, se designaron a los de menor frecuencia en forma sucesiva con base en su distancia de corrimiento.

Estimación de parámetros de diversidad y estructura genética

En cada población se calcularon las frecuencias génicas, el número de alelos por *locus* y el porcentaje de *loci* polimórficos (un *locus* se consideró polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común fue menor o igual a 0.95), de acuerdo a los procedimientos descritos por Brown y Weir (1983). También se estimó la heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e) para cada población de acuerdo con Nei (1978) para muestras pequeñas. La estructura de la diversidad

genética se evaluó con base en los estadísticos "F" (Wright, 1965) que incluye los valores de F_{it} , F_{is} y F_{st} . Donde F_{it} es el índice de fijación o endogamia de los individuos con respecto a la población total; F_{is} representa el índice de fijación o endogamia de los individuos dentro de cada una de las sub-poblaciones; y F_{st} representa el índice de fijación de las sub-poblaciones, y mide el grado de diferenciación entre ellas. Para calcular estos índices se utilizó el procedimiento descrito por Swofford y Selander (1989) con el programa BIOSYS-1. Con la finalidad de evaluar la importancia del aislamiento entre poblaciones y su efecto sobre la diferenciación de las mismas se estimó el flujo génico de acuerdo con el procedimiento de Slatkin y Barton (1989), el cual proporciona una estimación indirecta del número de migrantes por generación (N_m), con base en la siguiente expresión:

$$N_m = (1-F_{st})/4F_{st} \dots\dots\dots(1)$$

Para determinar si la diversidad genética sigue un patrón geográfico asociado a la distancia entre las poblaciones, se estimó la correlación entre las distancias genéticas y geográficas de cada par de poblaciones incluidas en el estudio. Las distancias genéticas entre pares de poblaciones se estimaron de acuerdo al procedimiento descrito por Nei (1978). La distancia geográfica entre los mismos pares de poblaciones se calculó con base en las coordenadas geográficas (latitud y longitud) de cada una de ellas (Byers, 1997).

La matriz de distancias genéticas también se utilizó para efectuar un análisis de agrupamiento de las poblaciones empleando el método de agrupamiento con promedios no ponderados (UPGMA). Para confirmar la consistencia del agrupamiento se utilizaron 500 repeticiones de muestreos con reemplazo de las frecuencias génicas en 15 *loci* polimórficos involucrados; las repeticiones se generaron con la rutina "bootstrap" del programa PHYLIP versión 3.6 (Felsenstein, 1995); los agrupamientos resultantes de las 500 repeticiones fueron

integrados con la rutina “consense” del mismo programa para generar el dendrograma con mayor consistencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética de las poblaciones de *Pseudotsuga menziesii*

En los 11 sistemas enzimáticos evaluados se resolvió un total de 22 *loci*; de ellos, cuatro *loci* (PGI-1, MDH-3, DIA-1 y 6-PGD1) fueron excluidos del análisis debido a su resolución inconsistente, tres más (MDH-4, GOT-1 y DIA-2) fueron completamente fijos y 15 *loci* fueron polimórficos en al menos una de las poblaciones. En los 15 *loci* polimórficos se encontraron un total de 44 alelos a nivel global, lo que representa un promedio de tres alelos por *locus*, aproximadamente. Por consiguiente, a nivel general 83.3% de los *loci* fueron polimórficos, lo que representa un amplio nivel de diversidad genética en las poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii*. Sin embargo, a nivel de poblaciones, la diversidad genética fue mucho más baja que a nivel global, con valores promedio de 1.5 alelos por *locus* y 28.3% de *loci* polimórficos; además, se observó una amplia variación entre poblaciones en los valores de estos índices (Cuadro 2). A nivel poblacional, los valores promedio observados de número de alelos por *locus* y porcentaje de *loci* polimórficos, son más bajos que los de poblaciones de la misma especie de otras regiones de Norteamérica (El-Kassaby y Sziklai, 1982; Merkle y Adams, 1987; Li y Adams, 1989; El-Kassaby y Ritland, 1996).

Las poblaciones del norte de México mostraron mayor diversidad genética que las de la región centro (Cuadro 2), que representa la zona marginal del área de distribución natural de la especie y donde existe un mayor grado de fragmentación y aislamiento entre sus poblaciones. Aunque en algunas localidades de la región centro (Ejido Zapata, Axopilco, La Caldera y Apizaquito) el tamaño de muestra fue menor a 10 genotipos, la situación no cambia si se consideran únicamente las cuatro con mayor tamaño de muestra. En esta región, los valores promedio observados en los índices de diversidad son más parecidos a los que se han encontrado

en *Picea chihuahuana* (Ledig *et al.*, 1997), *Pinus maximartinezii* (Ledig *et al.*, 1999), *P. pinceana* (Ledig *et al.*, 2001) y *P. greggii* en México (Ramírez *et al.*, 1997; Parraguirre *et al.*, 2002) y en *Picea breweriana* en California y Oregón (Ledig *et al.*, 2005), estas especies presentan en común fragmentación, aislamiento geográfico y tamaño de poblaciones reducido.

La heterocigocidad esperada (H_e) promedio por población fue relativamente baja (0.077, Cuadro 2), en comparación con los niveles de diversidad que se han encontrado en otras poblaciones naturales de esta especie (Merkle y Adams, 1987; Li y Adams, 1989), y en general de otras especies de coníferas como *Picea mariana* (Despots y Simon, 1987) y *Pinus strobus* (Rajora *et al.*, 1998), que también son alógamas y con polinización anemófila. En especies de pinos, el promedio de H_e es 0.154, (Hamrick y Godt, 1996), lo cual indica que en poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* incluidas en este estudio la diversidad genética es escasa, aún menor a la de otras especies de coníferas mexicanas como *Picea chihuahuana* (Ledig *et al.*, 1997) y *Abies religiosa* (Aguirre *et al.*, 2000). Sin embargo, en ninguna de las poblaciones se encontraron diferencias significativas entre la heterocigocidad observada y esperada (H_o y H_e) (Cuadro 2), por lo que al interior de ellas no existe deficiencia de heterocigotos y al parecer las frecuencias alélicas se encuentran en equilibrio.

Al igual que en el caso del polimorfismo, las poblaciones del norte de México presentaron valores de H_e casi tres veces más altos que las del centro (Cuadro 2); Jamé y Puerto Palomo, en el norte mostraron los valores máximos de H_e (0.175), que son similares a los registrados comúnmente en poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* en EUA y Canadá (Merkle y Adams, 1987; Li y Adams, 1989); en cambio, en Tlaxco y San José Capulines en la región centro presentaron los valores más bajos de diversidad genética ($H_e=0.022$ y 0.036 , respectivamente); más bajos incluso que los encontrados en *Picea chihuahuana* en el norte de México (Ledig *et al.*, 1997), una especie relictual endémica, con poblaciones geográficamente aisladas y escasa

regeneración natural. La población de Ejido Zapata fue completamente uniforme en todos los loci evaluados ($H_e=0$); resultado al que pudo contribuir, el tamaño de muestra estudiado que en ella fue relativamente pequeño ($n=5$), por lo que esta situación podría cambiar si el número de genotipos muestreados se aumentara.

Cuadro 2. Valores de diversidad genética (con errores estándar entre paréntesis) y prueba de χ^2 para 11 poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, de México, con base en 18 loci isoenzimáticos.

Región y Población	N [†]	A [‡]	P (%) [§]	Ho [¶]	He [¶]	χ^2
<i>Región norte:</i>						
Mohinora	17.8 (0.8)	1.8 (0.2)	38.9	0.089 (0.032)	0.084 (0.029)	NS
Jamé	16.6 (0.6)	1.8 (0.2)	55.6	0.175 (0.043)	0.178 (0.044)	NS
Puerto Palomo	22.9 (0.8)	2.0 (0.2)	61.1	0.175 (0.038)	0.178 (0.044)	NS
Promedio	19.1	1.9	51.9	0.146	0.147	NS
<i>Región centro:</i>						
San José Capulines	19.4 (0.4)	1.5 (0.1)	11.1	0.036 (0.014)	0.035 (0.014)	NS
El Salto	14.9 (0.4)	1.3 (0.1)	11.1	0.053 (0.029)	0.047 (0.025)	NS
Tlaxco	19.9 (0.1)	1.3 (0.1)	11.1	0.022 (0.012)	0.022 (0.011)	NS
Ejido Zapata	5.0 (0.0)	1.0 (0.0)	0.0	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	NS
La Rosa	25.4 (0.3)	2.1 (0.2)	38.9	0.097 (0.023)	0.100 (0.028)	NS
La Caldera	6.7 (0.3)	1.4 (0.1)	38.9	0.095 (0.042)	0.082 (0.031)	NS
Axopilco	7.0 (0.5)	1.3 (0.1)	27.8	0.059 (0.027)	0.054 (0.024)	NS
Apizaquito	7.8 (0.2)	1.2 (0.1)	16.7	0.069 (0.045)	0.066 (0.040)	NS
Promedio	13.3	1.4	19.5	0.054	0.051	NS
Promedio general	14.9	1.5	28.3	0.079	0.077	NS

[†]Tamaño promedio de muestra (genotipos) por locus; [‡]número promedio de alelos por locus; [§]porcentaje de loci polimórficos (loci en donde la frecuencia del alelo más común no excede 0.95); [¶]Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He)[¶]. Entre paréntesis errores estándar.

Estructura de la diversidad genética

Con excepción de EST-1, todos los *loci* presentaron un valor negativo de F_{is} , con un promedio de -0.068 (Cuadro 3), lo cual muestra que a nivel de cada sub-población existe un ligero exceso de heterocigotos conforme a lo esperado con base en sus respectivas frecuencias alélicas, bajo el supuesto de apareamiento aleatorio. Este valor de F_{is} difiere de los encontrados en otras especies de coníferas que también tienen poblaciones pequeñas y aisladas como *Pinus pinceana* (Ledig *et al.*, 2001) y *Picea breweriana* (Ledig *et al.*, 2005), en donde es común que haya una deficiencia de heterocigotos y niveles moderados de endogamia. Un proceso de selección en contra de los homocigotos en las etapas tempranas de desarrollo del embrión, como se ha propuesto en otras especies de coníferas (Despouts y Simon, 1987; Rajora *et al.*, 1998), podría ocasionar el exceso de heterocigotos observado en el presente estudio. Mapula *et al.* (2007) señalan que existe una elevada proporción de semillas vanas en estas poblaciones de *Pseudotsuga menziesii*, la cual se atribuye en parte a problemas de autofecundación en estas poblaciones pequeñas. En el caso de F_{it} , se encontró un valor promedio de 0.251 (Cuadro 3), valor que indica que las sub-poblaciones presentan una deficiencia marcada de heterocigotos, con una tendencia a la fijación de alelos en cada una de ellas, efecto que es característico de la deriva genética en poblaciones pequeñas a medida que avanza la diferenciación (Falconer y Mackay, 1996).

El valor promedio del índice de fijación (F_{st}) fue de 0.298 (Cuadro 3), lo que indica que casi una tercera parte de la diversidad genética detectada se encuentra entre poblaciones; en especies leñosas alógamas con polinización anemófila es común que más del 85% de la diversidad genética resida dentro de las poblaciones (Ledig, 1998). De hecho, el valor de F_{st} en estas poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga*, es cinco veces mayor al que se ha encontrado en otras regiones de su distribución natural (El-Kassaby y Ritland, 1996) y al encontrado en otras especies

de pinos como *Pinus ponderosa* (Ledig, 1998) y *P. strobus* (Rajora *et al.*, 1998). Cuando el valor de F_{st} es mayor a 0.25, como en este caso, se considera que existe un fuerte proceso de diferenciación genética entre las poblaciones, ya sea como resultado de la deriva genética, la selección natural y/o el aislamiento genético.

Cuadro 3. Estadísticos de “F” (Wright, 1965) y flujo génico (N_m) con base en 15 *loci* polimórficos en 11 poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco de México.

<i>Locus</i>	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m^\dagger
IDH-1	-0.077	-0.026	0.047	5.069
PGM-1	-0.115	-0.064	0.045	5.306
PGI-2	-0.137	-0.047	0.079	2.915
LAP-1	-0.374	0.161	0.389	0.393
LAP-2	-0.050	-0.011	0.038	6.329
EST-1	0.253	0.744	0.657	0.131
ME-1	-0.009	0.251	0.258	0.719
MDH-1	-0.147	-0.061	0.075	3.083
MDH-2	-0.106	-0.021	0.077	2.997
GOT-2	-0.052	-0.012	0.038	6.329
GOT-3	-0.101	0.386	0.442	0.316
GOT-4	-0.020	0.435	0.446	0.311
GOT-5	-0.029	0.399	0.416	0.351
G-PGD2	-0.056	-0.020	0.034	7.103
GDH-1	-0.089	-0.023	0.060	3.917
Promedio	-0.068	0.251	0.298	0.589

[†]Número de migrantes por generación, estimado de acuerdo al procedimiento de Slatkin y Barton (1989).

En otras especies mexicanas de coníferas como *Picea chihuahuana* (Ledig *et al.*, 1997), *Abies religiosa* (Aguirre *et al.*, 2000), *Pinus pinceana* (Ledig *et al.*, 2001), *P. greggii* (Parraguirre *et al.*, 2002), *P. rzedowski* (Delgado *et al.*, 1999) y *P. muricata* (Ledig, 1998), que presentan una distribución natural restringida o una fuerte fragmentación de sus poblaciones o ambas situaciones, también se han encontrado valores elevados de diferenciación, por lo que no es raro que el fenómeno ocurra en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii* muestreadas. El número estimado de migrantes por generación (N_m) en promedio de los 15 *loci* fue de 0.589, sin embargo, 8 de los 15 *loci* muestran valores entre 2 a 7 individuos; aunque el valor promedio observado es mucho menor al encontrado en otras poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* de Canadá (El-Kassaby y Ritland, 1996) y otras especies de coníferas con distribución continua (Ledig, 1998), y que indica un intercambio genético muy reducido entre las poblaciones, lo que contribuye a su diferenciación. Teóricamente se requieren como mínimo cuatro migrantes por generación para mantener un balance que evite los efectos de diferenciación genética asociados con la deriva genética (Wright, 1965), que se cumplen en 5 de los 15 *loci*; en tanto que, el valor promedio observado en los 15 *loci*, está muy por debajo del valor crítico.

Patrón geográfico de diversidad genética

La distancia genética promedio entre poblaciones fue de 0.035, con un intervalo de variación entre 0.001 y 0.125. Las distancias genéticas mayores se dieron entre las poblaciones de la región norte Jamé y Puerto Palomo, con el grupo de poblaciones de la región centro (Cuadro 4). La distancia genética entre poblaciones tuvo una correlación positiva ($r = 0.310$, $p < 0.05$) con la distancia geográfica, lo cual indica que la diferenciación entre las poblaciones está relacionada con la distribución geográfica. Cuando la población Mohinora es excluida del análisis, la correlación aumenta a 0.849 ($p < 0.01$), situación que refleja la notoria diferenciación genética entre las poblaciones de la región central con respecto a las del noreste de México (Figura 1). De

otra manera, cuando se consideran solamente a las poblaciones de la región central la correlación se vuelve negativa y no significativa ($r = -0.216$), lo que indica que en este grupo de poblaciones la diferenciación es más bien aleatoria con respecto a su ubicación espacial, fenómeno que podría ser consecuencia de la deriva genética, asociado con un tamaño reducido de poblaciones y posiblemente por efecto de endogamia que conduce a una rápida diferenciación, independientemente de las distancias que separan a las poblaciones.

Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas (triángulo superior) y distancias geográficas (km, triángulo inferior) entre pares de poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco.

Poblacion	Mohinora	Jamé	PPalomo	SJCapulines	El Salto	Tlaxco	Zapata	La Rosa	La Caldera	Axopilco	Apizaquito
Mohinora	0.000	0.060	0.086	0.007	0.005	0.006	0.007	0.002	0.031	0.009	0.001
Jamé	652	0.000	0.071	0.068	0.063	0.069	0.071	0.057	0.055	0.072	0.061
Ppalomo	688	53	0.000	0.096	0.096	0.102	0.104	0.075	0.125	0.105	0.085
Sjcapulines	1059	601	550	0.000	0.003	0.001	0.001	0.007	0.026	0.004	0.009
El Salto	1087	621	569	29	0.000	0.003	0.004	0.006	0.029	0.007	0.008
Tlaxco	1157	683	631	98	70	0.000	0.001	0.008	0.025	0.004	0.009
Zapata	1173	698	646	114	86	16	0.000	0.008	0.025	0.004	0.010
La Rosa	1177	701	649	118	90	21	5	0.000	0.032	0.010	0.003
La caldera	1181	705	653	123	95	25	9	4	0.000	0.028	0.034
Axopilco	1193	714	662	134	106	36	20	16	11	0.000	0.011
Apizaquito	1248	760	707	190	161	92	76	72	68	56	0.000

PPalomo = Puerto Palomo, SJCapulines = San José Capulines.

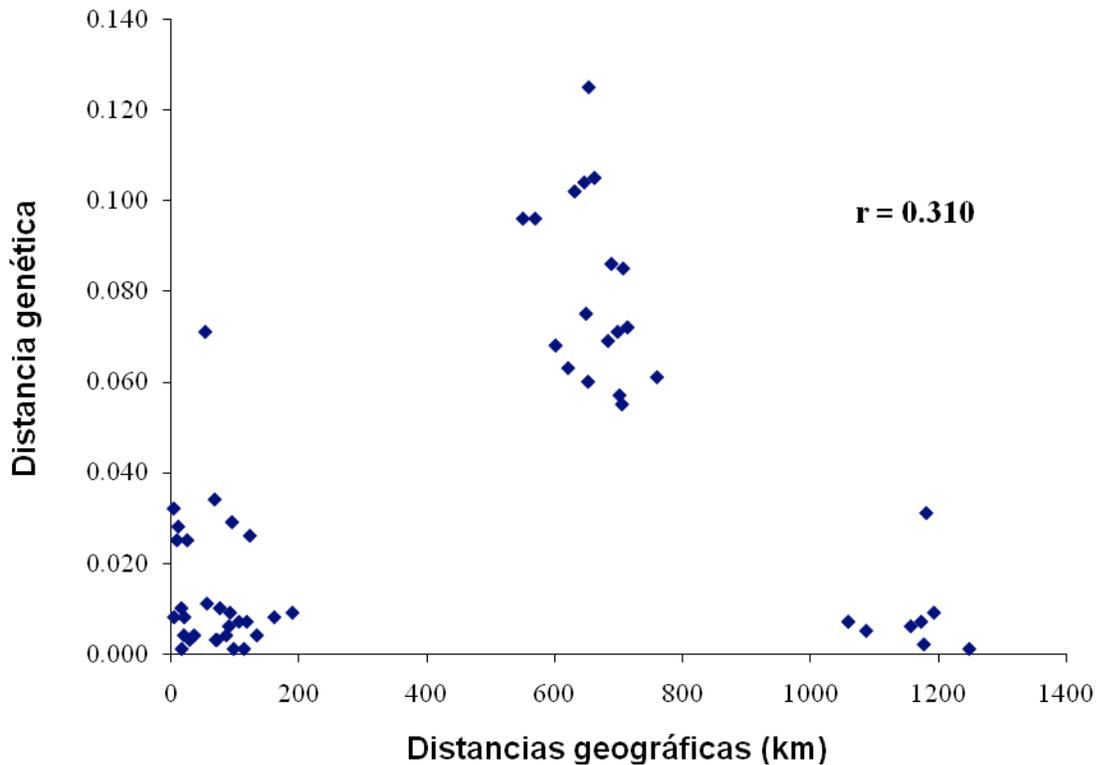


Figura 1. Relación entre distancias genéticas y distancias geográficas para las 11 poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco incluidas en el estudio.

El análisis de correlación de las distancias genéticas coincide con el patrón de agrupamiento de las poblaciones (Figura 2a). Las dos poblaciones del noreste de México, en la Sierra Madre Oriental (Jamé y Puerto Palomo) se separaron completamente de las otras poblaciones, mientras que las poblaciones de la región central se agruparon entre sí, pero con menores valores de consenso entre los subgrupos dentro de esta región, excepto en el caso de los subgrupos de Apizaquito y Mohinora y el de La Rosa. El patrón general de agrupamiento de las subpoblaciones no se modificó cuando se excluyeron las poblaciones con tamaño de muestra menor, excepto que el valor de consenso de los subgrupos en las poblaciones del centro fue mayor (Figura 2b).

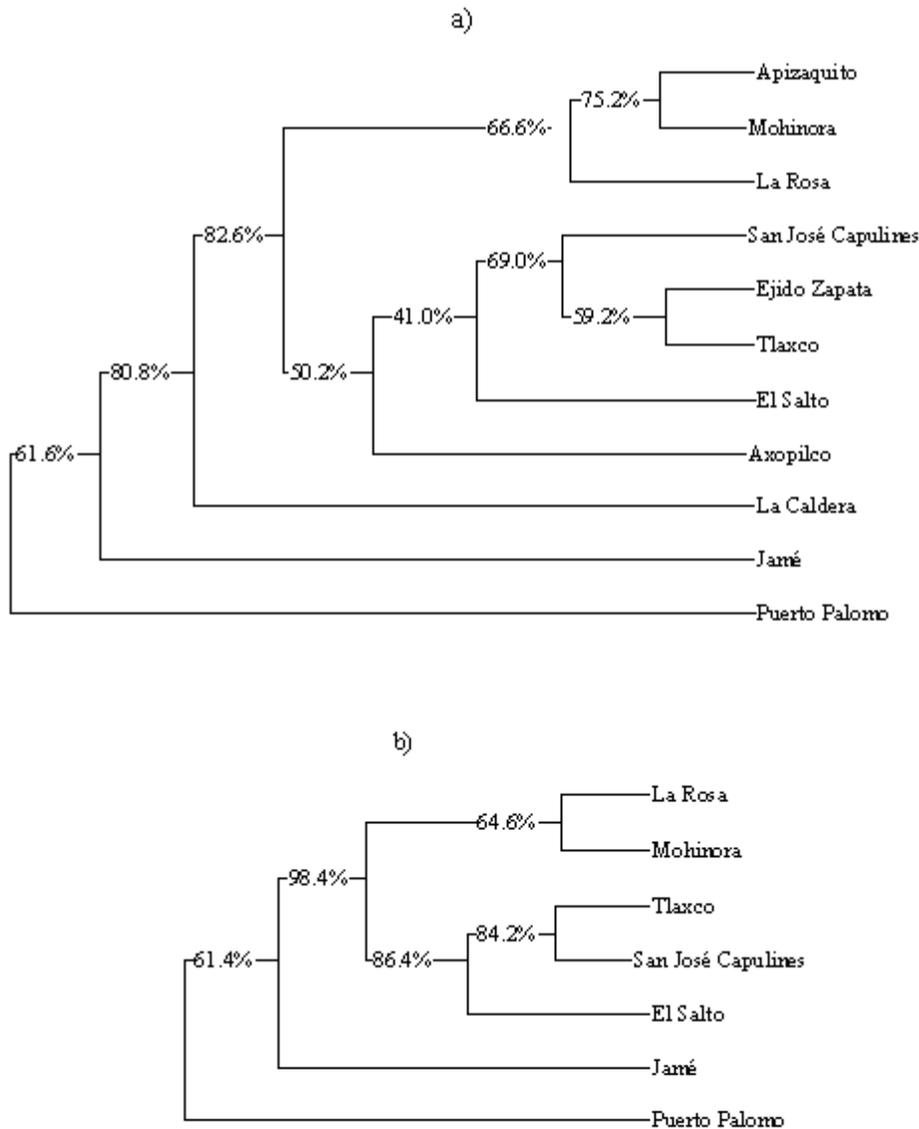


Figura 2. Agrupamiento de consenso de las poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, a partir de las distancias genéticas entre ellas, construido con base en 500 repeticiones con reemplazo. El porcentaje en cada una de las ramas representa la proporción en que ocurrieron. a) Agrupamiento incluyendo las 11 poblaciones; b) agrupamiento excluyendo las cuatro poblaciones con menor tamaño de muestra.

El patrón de agrupamiento coincide con el encontrado con variables morfológicas en un mayor número de poblaciones de las mismas regiones (Reyes *et al.*, 2006). La población de Mohinora, de la Sierra Madre Occidental, se agrupó con las poblaciones de la región central, este

resultado es inesperado pues estudios de variación con base en características morfológicas (Reyes *et al.*, 2006; Mápula *et al.*, 2007) y fenológicas (Acevedo *et al.*, 2006) muestran que esta población se asemeja más a las del noreste. Las diferencias morfológicas y genéticas observadas en el caso de esta población en particular, se pueden atribuir al valor adaptativo de las características comparadas, ya que las isoenzimas son consideradas marcadores neutrales a la selección, mientras que los caracteres morfológicos tienen un valor adaptativo alto, por lo que, es posible que reflejen distintos patrones geográficos de variación. Un estudio donde se incluya un mayor número de poblaciones de la Sierra Madre Occidental permitiría tener un mayor nivel de resolución en el agrupamiento de las poblaciones de esa región para resolver adecuadamente esta interrogante.

Dado que las poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii* representan una fuente importante de recursos genéticos, los resultados encontrados en el presente trabajo muestran la existencia de una notoria diferenciación genética entre las poblaciones del centro de México con respecto a las del noreste, y ambas a su vez difieren de las otras poblaciones naturales de la especie encontradas en Norteamérica (Li y Adams, 1989; Reyes *et al.*, 2006). La diferenciación de las poblaciones mexicanas, hace necesario desarrollar estrategias de conservación que permitan el mantenimiento de estas poblaciones a largo plazo. La distribución marginal de las poblaciones del centro de México y su alto nivel de diferenciación, valor potencial ante las posibilidades de cambio climático y grado de fragmentación, colocan a estas poblaciones en un alto nivel de prioridad en la conservación de los recursos forestales mexicanos. Las estrategias de conservación que se apliquen deberán considerar además la baja producción de semillas llenas (Mápula-Larreta *et al.*, 2007) y la baja capacidad de reclutamiento de nuevos individuos (Velasco *et al.*, 2007), además de otras presiones biológicas y ambientales que amenazan seriamente su persistencia, y que dificultan la conservación *in situ*.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que a nivel global existe una amplia diversidad genética en las poblaciones mexicanas de *P. menziesii*, así como un alto grado de diferenciación genética entre ellas, por lo que cada población representa sólo una pequeña muestra de la diversidad genética total. Las poblaciones del norte de México presentaron una mayor diversidad genética que las poblaciones de la región central del país, en donde existe un alto grado de fragmentación y aislamiento geográfico.

A pesar de haber encontrado un ligero exceso de heterocigotos dentro de cada una de las poblaciones, a nivel global es evidente la tendencia a la fijación de alelos. Este fenómeno ha repercutido en una reducción de la heterocigocidad, especialmente en la región central, así como en la deficiencia generalizada de heterocigotos y el aumento de la diferenciación entre las poblaciones, como consecuencia de la deriva genética. El patrón de agrupamiento de las poblaciones y la relación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas aportan evidencias adicionales sobre una estructura genética espacial fuertemente influenciada por procesos de selección natural, deriva genética y flujo genético restringido.

Estos resultados demuestran que las poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* de la región central de México se han diferenciado genéticamente de las poblaciones del noreste en la misma Sierra Madre Oriental. Dado que las poblaciones de la región Central también tienen una menor eficiencia reproductiva y están sometidas a una mayor presión y amenazas de destrucción, es necesario implementar una estrategia que permita conservar su diversidad genética, como una fuente importante de recursos genéticos de la especie ante las posibilidades de cambio climático que se pronostican.

CAPITULO III

PATRÓN DE CRUZAMIENTO EN POBLACIONES NATURALES DE *Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO EN MÉXICO

RESUMEN

El patrón de cruzamiento y su efecto sobre el nivel de endogamia en tres poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, dos del norte y una del centro de México, se evaluaron con base en el porcentaje de polinización cruzada. Con la información de cinco loci polimórficos se estimaron las frecuencias alélicas de polen y óvulos y la proporción de cruzamiento en cada población usando modelos de loci múltiples (\hat{t}_m) y de un solo locus (\hat{t}_s). No se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas de polen y de óvulos, lo que indica que el polen proviene de la misma comunidad que los árboles madre. El valor de \hat{t}_m en las dos poblaciones del norte fue cercano a 90 %; en la población del centro fue de 49 %, como resultado de un alto porcentaje de autofecundación. La similitud de las estimaciones del grado de cruzamiento (\hat{t}_m y \hat{t}_s), indica que la autofecundación es la principal forma de endogamia en las poblaciones evaluadas. A pesar del elevado porcentaje de cruzamiento en las poblaciones del norte, el coeficiente de correlación de paternidad en ellas fue mayor a 60 %, como consecuencia de un número reducido de árboles donadores de polen. Se discuten las implicaciones de estos resultados en la conservación de las poblaciones, sobre todo en la región centro.

Palabras clave: Abeto Douglas, conservación genética, endogamia, fragmentación, polinización cruzada, tamaño de población.

ABSTRACT

The mating pattern and its effect on the inbreeding of three natural populations of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, two from the northern and one from the central part of Mexico, were evaluated based on the estimation of cross pollination rates. Allelic frequencies of both pollen and ovules, as well as multilocus (\hat{t}_m) and single locus (\hat{t}_s) cross-pollination rates of each population were estimated based on five polymorphic loci. No differences in allelic frequencies of pollen and ovules were found in any population; in this way pollen and mother parents come from the same population (neighborhood). In the northern populations \hat{t}_m was close to 90 %, in the population from central Mexico reach only 49 %, as result of a larger rate or self-pollination. The similarity of both estimations of cross-pollination rates (\hat{t}_m and \hat{t}_s) shows that self-pollination is the main form of inbreeding. Despite a high cross-pollination rate in populations from northern, Mexico, paternity correlation coefficient was above 60 %, as consequence of a reduced number of trees as sources of pollen. The implications of the results on population conservation are discussed, particularly for communities from the central part of Mexico.

Key words: Douglas-fir, genetic conservation, inbreeding, cross-pollination rate, population size.

INTRODUCCIÓN

Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco ha sido un componente importante de los ecosistemas forestales en Norteamérica desde el Pleistoceno (Hermann y Lavender, 1990). Diferentes registros palinológicos (Clisby y Sears, 1955; Lozano *et al.*, 1993) indican que en el pasado remoto, la distribución natural de ésta y otras especies de coníferas de origen boreal llegó hasta el Sur de México. Sin embargo, el cambio climático asociado con el calentamiento posterior a las glaciaciones forzó a las coníferas a moverse nuevamente al norte o a mayores elevaciones en las montañas. En el proceso de contracción del área de distribución, algunas poblaciones de *Pseudotsuga* quedaron atrapadas, sin posibilidad de emigrar a otros sitios, lo que ocasionó una alteración importante de la distribución natural de la especie en su extremo sur, que actualmente se encuentra fragmentada y discontinua, en forma de manchones o rodales pequeños aislados entre sí en el centro de México (Farjon, 1990).

El aislamiento genético, junto con otros procesos evolutivos como la selección natural, generalmente conduce a la diferenciación genética de las poblaciones (Savolainen y Kuittinen, 2000). En poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii*, estudios con base en características morfológicas (Reyes *et al.*, 2006) y fenológicas (Acevedo *et al.*, 2006), indican que existe una notoria diferenciación entre las poblaciones de la región norte y las de la región centro-sur del país, que representan el límite sur de la distribución natural del género *Pseudotsuga* en el mundo. El alto grado de diferenciación poblacional ($F_{st} = 0.298$) y el reducido nivel de flujo genético entre estas poblaciones, ha sido confirmado con base en marcadores isoenzimáticos en un grupo de poblaciones mexicanas de esta especie (Capítulo II de esta tesis).

Los efectos del aislamiento genético son notorios en poblaciones pequeñas, ya que se da lugar a un proceso de deriva genética (Falconer y Mackay, 1996). Fenómeno que además de

aumentar la diferenciación entre las poblaciones, ocasiona un aumento en la homocigosis y la endogamia dentro de ellas (Savolainen y Kuittinen, 2000). Debido a que las especies de coníferas tienen un sistema reproductivo principalmente alógamo, el aumento de endogamia tiene consecuencias negativas sobre características de valor adaptativo de los individuos (Sorensen y Campbell, 1997). En el caso de *Pseudotsuga menziesii*, estudios recientes revelan que las poblaciones de la región central de México tienen una baja producción de semillas llenas, y que estas son de menor tamaño en comparación con las poblaciones del norte del país (Mápula *et al.*, 2007). También se ha encontrado que el germoplasma proveniente de la región norte tiene mayor vigor y capacidad de germinación, y las plántulas resultantes tienen mayor supervivencia y vigor que las de la región central (Juárez *et al.*, 2006).

Los efectos característicos de la depresión endogámica observados en estudios previos en las poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii* permiten suponer que al proceso de deriva genética se encuentra asociada una elevada tasa de autofecundación, especialmente en las poblaciones del centro de México, que son más pequeñas y tienen una menor densidad de arbolado adulto. En forma similar a lo observado en *Picea martinezii* T. F. Patterson (Ledig *et al.*, 2000) y *Picea mexicana* Martínez (Ledig *et al.*, 2002), especies de coníferas relictuales endémicas de México que tienen poblaciones pequeñas y aisladas, en las que se han encontrado altos niveles de autofecundación. En *Picea chihuahuana* Martínez (Ledig *et al.*, 1997) se encontró que el aumento de endogamia asociado a la autofecundación ocasiona una mayor producción de semillas vanas en las poblaciones.

A pesar de la distribución natural restringida y fragmentada que actualmente presenta *Pseudotsuga menziesii* en México, estas poblaciones tienen una elevada importancia ecológica y económica. Ecológicamente *P. menziesii* es un elemento florístico clave en las comunidades naturales de los climas templado-fríos donde se encuentra; por el microambiente que genera,

existe una gran diversidad de flora y fauna característica asociada con esta especie leñosa. Desde el punto de vista económico, la especie tiene un alto valor maderable a nivel mundial (Hermann y Lavender, 1990), por lo que los recursos genéticos existentes en estas poblaciones tienen una importancia estratégica en el proceso de domesticación de la especie. Sin embargo, los pronósticos de cambio climático (Iverson y Prasad, 2002) sugieren que los rodales ubicados en el extremo sur de su distribución natural estarán en riesgo de perderse. El riesgo es mayor si en las poblaciones existe una tasa reducida de cruzamiento, debido al efecto de la depresión endogámica con la consecuente reducción de la diversidad genética.

El presente estudio se realizó con el propósito de estimar el nivel de autofecundación existente en algunas poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii* que permitan sugerir medidas adecuadas para la conservación de estos recursos genéticos con base en las implicaciones derivadas del sistema de cruzamiento. Los objetivos específicos del trabajo fueron: a) determinar el patrón de cruzamiento en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii* y su efecto sobre el nivel de endogamia en ellas; y b) comparar el porcentaje de polinización cruzada en poblaciones de diferente tamaño en el norte y centro de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones muestreadas y análisis isoenzimático

Con el fin de comparar el patrón de cruzamiento se estudiaron tres poblaciones de *Pseudotsuga menziesii*, una del noroeste, una del noreste y una del centro de México (Cuadro 5). La población de Mohinora, en Chihuahua, es una comunidad forestal mezclada con *Picea mexicana* Martínez, *Pinus arizonica* Engelm, *Populus tremuloides* Michx. y *Abies* sp. El rodal donde se encuentra *Pseudotsuga menziesii* tiene una extensión aproximada de 69 ha, con una densidad promedio de 85 árboles adultos ha⁻¹. La población de Puerto Palomo, en Nuevo León, es un rodal puro y compacto de *Pseudotsuga menziesii*, con una extensión cercana a las 5 ha y una densidad promedio de 25 árboles adultos ha⁻¹; a su alrededor existen otros rodales de la misma especie cercanos entre si. En la población de La Rosa, en Tlaxcala, *Pseudotsuga menziesii* se encuentra asociada con varias especies de *Quercus* sp., *Abies religiosa* (H. B. K.) Schl. et cham., *Pinus teocote* Schl. et cham. y *P. rudis* Endl.. En este rodal existen alrededor de 160 árboles adultos distribuidos en una superficie aproximada de 5 ha, a lo largo de una cañada de 2 km de extensión.

Cuadro 5. Ubicación geográfica, número de árboles muestreados y número promedio de progenies de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, de tres poblaciones estudiadas.

Región	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud	n	p
		(N)	(W)	(m)		
Noroeste	Mohinora, Chih.	25° 57' 42"	107° 02' 21"	3,185	15	105
Noreste	Puerto Palomo, N. L.	24° 56' 40"	100° 16' 12"	2,647	24	168
Centro	La Rosa, Tlax.	19° 31' 57"	97° 54' 00"	2,785	26	182

n= Número de árboles madre muestreados; p = Tamaño de muestra estudiado en cada población.

De cada población se utilizó una muestra variable de árboles madre dependiendo de la disponibilidad de semilla (Cuadro 5) y de cada árbol madre se utilizaron 7 semillas. Se realizó la imbibición de la semilla en H₂O₂ al 1% durante 24 horas, y posteriormente se estratificó a una temperatura de 4 °C durante 50 días (Jarvis *et al.*, 1997; Juárez *et al.*, 2006). Posteriormente, las semillas se germinaron en cajas Petri con papel filtro húmedo, a una temperatura de 24 °C en una cámara de germinación, hasta el momento en que la radícula alcanzó una longitud de 5 mm aproximadamente. Al momento de la extracción se separó el tejido del megagametofito (haploide) y del embrión (diploide) de cada semilla. Ambos tejidos se analizaron en forma simultánea, porque el megagametofito representa la contribución materna y, por lo tanto, tiene la misma constitución genética del óvulo que da origen al embrión de la semilla; lo que permite deducir la contribución paterna (polen) por las diferencias con el genotipo del embrión. Este procedimiento permite conocer sin ambigüedad alguna la contribución de los dos padres en el embrión (Mitton, 1983; Cheliak *et al.*, 1985). Las muestras de cada uno de los tejidos (megagametofito y embrión) fueron maceradas con un taladro eléctrico con punta de plástico, utilizando 100 μ l de una solución de extracción (USDA Forest Service, 2003).

Los extractos obtenidos se almacenaron en un congelador a -81° C hasta el momento de realizar el análisis. Los extractos fueron sometidos a electroforesis horizontal en geles de almidón, en el Laboratorio de Marcadores Genéticos del Colegio de Postgraduados, siguiendo la metodología descrita por el Laboratorio Nacional de Electroforesis y Genética Forestal del Servicio Forestal de los Estados Unidos en Placerville, California (USDA Forest Service, 2003). Los sistemas enzimáticos utilizados fueron Glutamato deshidrogenasa (GDH), Fosfoglucoisomerasa (PGI), Fosfoglucomutasa (PGM) y Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), que en un estudio previo (Capítulo II de esta tesis) mostraron los mayores niveles de polimorfismo

dentro de las poblaciones referidas. En algunos casos fue necesario ajustar los métodos de análisis para obtener un revelado adecuado de las variantes electroforéticas. Para las enzimas GOT y PGI se utilizó la metodología descrita por Stuber *et al.* (1988), ajustada y adecuada en el Laboratorio de Marcadores Genéticos.

La identificación de los alelos presentes en cada *locus* se efectuó con base en la migración relativa de las enzimas a partir del punto de origen dentro de los geles. Para facilitar la interpretación de los *loci* y sus alelos correspondientes, en cada gel se incluyeron muestras del megagametofito de *Pinus resinosa* Ait., una especie completamente fija para estos *loci*. En los casos donde se identificaron varias zonas de actividad para una misma enzima, los *loci* se identificaron con numerales sucesivos a partir del cátodo. Para inferir la contribución paterna en cada embrión se analizó en forma paralela el megagametofito y el embrión de cada semilla. Al evaluar cada gel se determinó por diferencia la contribución paterna comparando las bandas electroforéticas del megagametofito (genotipo materno) con las del embrión.

Estimación de los parámetros de cruzamiento y análisis estadístico

A partir de la contribución paterna y materna en los embriones se calcularon las frecuencias alélicas en el polen y los óvulos muestreados, para determinar si ambas representan el mismo tamaño de comunidad en la población (vecindario). La proporción de entrecruzamiento (t) se calculó con base en los modelos de genotipos de un *locus* génico (\hat{t}) y en el de genotipos de varios *loci* simultáneos (\hat{t}_m) de la progenie de cada árbol muestreado. Las estimaciones de \hat{t} y \hat{t}_m se hicieron para cada población por separado utilizando el método de máxima verosimilitud del programa MLTR (Ritland, 1994). Con el mismo programa se calculó la correlación de paternidad (r_p) entre la progenie resultante del cruzamiento, que permite inferir sobre las estimaciones de \hat{t} y \hat{t}_m con base en el modelo de apareamiento mixto con autofecundación y polinización cruzada

(Shaw y Allard, 1982). Este modelo supone que cada progenie viable (embrión) es el resultado de polinización cruzada aleatoria, con probabilidad “ t ”, o de autofecundación, con probabilidad “ s ”, de tal manera que $s + t = 1$.

En el caso de la estimación de \hat{t}_m se supone que existe independencia entre los *loci* utilizados para estimar la proporción de entrecruzamiento (Furnier y Adams, 1986). Si esta condición no se cumple, el valor de \hat{t}_m estará sesgado; este sesgo es relativamente pequeño a menos que los *loci* involucrados estén fuertemente ligados y exista un desequilibrio de ligamento elevado en la población (Shaw *et al.*, 1981). A pesar del posible sesgo, la estimación multilocus (\hat{t}_m) es más eficiente desde el punto de vista estadístico que la estimación basada en un sólo *locus* (\hat{t}_k), ya que la primera toma en cuenta varios *loci* en forma simultánea. Además, mientras mayor sea el número de *loci* que se incluyen para estimar \hat{t}_m es posible detectar más eventos de polinización cruzada, por lo cual este estimador es menos sensible a las violaciones de los supuestos del modelo de apareamiento mixto (Shaw *et al.*, 1981). Por otro lado, el valor de (\hat{t}_k) puede variar en gran medida de un *locus* a otro, generando mayor heterogeneidad (error estándar) al estimarlo en diferentes poblaciones (Shaw y Allard, 1979).

Es importante estimar ambos valores niveles de entrecruzamiento (\hat{t}_m y \hat{t}_k), ya que cuando \hat{t}_k es menor que \hat{t}_m , se infiere que además de la autofecundación en la población se encuentran otras formas de endogamia, como el apareamiento entre parientes (Burczyk *et al.*, 1997). En este caso, los valores de \hat{t}_m y \hat{t}_k se estimaron para cada población utilizando el algoritmo EM para calcular las frecuencias alélicas de óvulos y polen (Ritland, 1994). Se utilizaron 200 muestras con reemplazo (bootstraps) para estimar el error estándar en cada uno de ellos. Para determinar si los valores de cruzamiento difieren entre las poblaciones se calcularon sus respectivos intervalos de confianza, con $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ninguna de las poblaciones se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las frecuencias alélicas de los dos gametos (Cuadro 6). Esto sugiere que el acervo genético contenido en el polen representa las frecuencias alélicas locales de los árboles maternos y, por lo tanto, ambos (polen y óvulos) representan el mismo tamaño de vecindario dentro de cada población. Esto no es común en especies de polinización anemófila, donde generalmente el polen puede viajar grandes distancias y representar a una comunidad (vecindario) de mayor tamaño que la muestra de individuos maternos (Ledig, 1998). Por ejemplo, en *Pinus greggii* Engelm. se ha observado que el acervo de polen generalmente representa una comunidad (vecindario) de mayor tamaño que el acervo de óvulos dentro de la población (Parraguirre *et al.*, 2004).

Sin embargo, dado que los rodales de *Pseudotsuga menziesii* estudiados son mucho más pequeños, es posible que ambas muestras (polen y óvulos) representen a toda la población. Aún en la población de Mohinora, que es más extensa que las otras dos, no se encontraron diferencias entre las frecuencias génicas de ambos gametos.

Cuadro 6. Frecuencias alélicas de polen y óvulos con sus respectivos intervalos de confianza ($p < 0.05$) en tres poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco.

Locus - alelos	Cerro el Mohinora		Puerto Palomo		La Rosa	
	polen	óvulos	polen	óvulos	polen	óvulos
GOT2-1	1.00 ± 0.00	0.90 ± 0.10 ns	1.00 ± 0.00	0.98 ± 0.04 ns	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00 ns
GOT2-2+3	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.10 ns	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.11 ns	-----	-----
GOT5-1	1.00 ± 0.00	0.97 ± 0.06 ns	0.11 ± 0.16	0.13 ± 0.11 ns	1.00 ± 0.00	0.98 ± 0.04 ns
GOT5-2	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.06 ns	0.89 ± 0.16	0.87 ± 0.11 ns	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04 ns
PGI1-1	0.97 ± 0.05	1.00 ± 0.00 ns	0.99 ± 0.01	0.94 ± 0.07 ns	0.99 ± 0.15	0.98 ± 0.04 ns
PGI1-2	0.03 ± 0.05	0.00 ± 0.00 ns	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.04 ns	0.01 ± 0.15	0.02 ± 0.04 ns
PGI1-3	-----	-----	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.06 ns	-----	-----
PGM1-1	0.97 ± 0.05	0.80 ± 0.12 ns	0.95 ± 0.14	0.96 ± 0.06 ns	1.00 ± 0.00	0.96 ± 0.05 ns
PGM1-2	0.02 ± 0.04	0.10 ± 0.10 ns	0.04 ± 0.14	0.02 ± 0.04 ns	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04 ns
PGM1-3	0.01 ± 0.03	0.10 ± 0.09 ns	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.04 ns	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.03 ns
GDH1-1	0.99 ± 0.02	0.90 ± 0.10 ns	0.88 ± 0.14	0.94 ± 0.07 ns	0.96 ± 0.17	0.90 ± 0.07 ns
GDH1-2	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.06 ns	0.10 ± 0.14	0.04 ± 0.06 ns	0.02 ± 0.11	0.06 ± 0.06 ns
GDH1-3	0.01 ± 0.02	0.07 ± 0.08 ns	0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.04 ns	0.02 ± 0.07	0.04 ± 0.05 ns

ns = No significativo con $p = 0.05$, entre óvulos y polen.

Sistema de cruzamiento

En ninguna de las poblaciones se encontraron diferencias significativas entre los valores promedio de polinización cruzada obtenidos con la información de *locus* múltiples (\hat{t}_m) o de *locus* simple (\hat{t}_s) (Cuadro 7). En la mayoría de los estudios de este tipo es común que el valor de \hat{t}_m sea ligeramente mayor al de \hat{t}_s ya que el primer estimador detecta de manera más eficiente la presencia de polinización cruzada (Shaw y Allard, 1982); sin embargo, en este caso, en ninguna de las poblaciones las diferencias numéricas entre los dos estimadores, fueron significativas, por lo que ambos procedimientos son consistentes.

Cuadro 7. Tasa de polinización cruzada estimada con base en información de *loci* múltiples (\hat{t}_m) y *locus* individuales (\hat{t}_s), con sus respectivos intervalos de confianza ($p = 0.05$) y valores de correlación de paternidad, estimada con base en \hat{t}_m (con error estándar entre paréntesis) en tres poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mír.) Franco de México.

Población	\hat{t}_m^{\dagger}	\hat{t}_s	$(\hat{t}_m - \hat{t}_s)$	r_p
Mohinora, Chih.	0.863 ± 0.163	0.845 ± 0.149	0.018 ns	0.607 (0.339)
Puerto Palomo, N. L.	0.929 ± 0.304	0.870 ± 0.269	0.059 ns	0.970 (0.359)
La Rosa, Tlax.	0.498 ± 0.459	0.527 ± 0.584	-0.029 ns	0.115 (0.503)

[†]Obtenido con base en cinco *loci* individuales; ns = no significativo con $p = 0.05$

Las dos poblaciones del norte de México presentaron un porcentaje de polinización cruzada cercano a 90 % (Cuadro 7) y sin diferencias significativas entre ambos tipos de estimación ($p = 0.05$). Estos valores se encuentran dentro del intervalo estimado para otras poblaciones naturales de esta especie en Norteamérica (El-Kassaby *et al.*, 1981; Shaw y Allard, 1982; Neale y Adams, 1985; Yeh y Morgan 1987), o incluso en plantaciones y huertos semilleros (Ritland y El-Kassaby, 1985). Este grado de polinización cruzada es común en la mayoría de las especies de coníferas en poblaciones relativamente grandes, y refleja la capacidad de dispersión del polen a grandes distancias. Ledig (1998) señala que en especies con polinización anemófila,

como es el caso del género *Pinus* y otras coníferas, el porcentaje de polinización cruzada es cercano a 1.0, cuando no existen otros factores que interfieran en el fenómeno.

En contraste, en la población de La Rosa, Tlax., el valor estimado de polinización cruzada es de alrededor de 50%, y es menor con respecto al de ambas poblaciones de norte del país, además es un valor muy inferior al encontrado para esta especie en su hábitat natural. En poblaciones naturales de otras especies de coníferas mexicanas que comparten similitudes en tamaño y aislamiento geográfico, también se han encontrado valores reducidos de polinización cruzada; por ejemplo, en *Picea martinezii*, Ledig *et al.* (2000) encontraron un promedio de 0.399 y 0.589 para dos poblaciones de dicha especie. En *P. mexicana*, el valor promedio en tres poblaciones varió de 0.590 a 0.807 (Ledig *et al.*, 2002) y en algunas poblaciones de *Picea chihuahuana* el valor fue incluso cercano a 0 (Ledig *et al.*, 1997).

Aunque en la población de *P. menziesii* de La Rosa, no se encontró un valor tan bajo de polinización cruzada como en *Picea chihuahuana*, sí refleja la presencia de un nivel importante de endogamia que podría estar asociado a la frecuencia de autofecundación en sus eventos reproductivos. En especies con un sistema reproductivo que favorece la polinización cruzada, la autofecundación generalmente ocasiona depresión endogámica en la progenie, fenómeno que se refleja en la reducción en la producción de semilla viable, así como en el vigor y tasa de crecimiento de las plántulas (Frankham, 1998; Mápula *et al.*, 2007). Un fenómeno similar es posible que esté ocurriendo en las poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* de la región central de México, como lo muestran estudios previos (Juárez *et al.*, 2006; Mápula *et al.*, 2007) que han documentado en ellas una alta proporción de semillas vanas y una menor capacidad y vigor germinativo de las semillas llenas de esta región en relación con semillas de las poblaciones del Norte de México.

Con base en el porcentaje de autofecundación estimado en la población La Rosa, se esperaría encontrar un alto grado de endogamia y una deficiencia notoria de heterocigotos en su progenie; sin embargo, los datos de diversidad genética estimados con base en una muestra de 18 loci izoenzimáticos no corroboran esta situación (Capítulo II de esta tesis). Una posible explicación a este fenómeno sería que en esta población se tenga una fuerte presión de selección durante las etapas tempranas de desarrollo del cigoto en contra de los embriones homocigóticos producto de la autofecundación, ocasionando una elevada cantidad de semillas vanas (Sorensen, 1982). En *Picea glauca*, Sproule y Dancik (1996) señalan un fenómeno similar, en donde a pesar de existir un elevado porcentaje de autofecundación y endogamia no se encontró una deficiencia de individuos heterocigotos en la progenie, que se atribuye a una fuerte presión de selección sobre los embriones derivados por autofecundación, asociada a la presencia de genes recesivos letales.

Correlación de paternidad

A pesar de que en las poblaciones del norte de México se encontró un bajo porcentaje de autofecundación, la correlación de paternidad entre las progenies de estas poblaciones fue relativamente elevada ($r_p > 0.60$), lo que indica una alta probabilidad de que dos individuos del mismo árbol madre compartan un mismo padre (Cuadro 7). Una alta correlación de paternidad y una elevada tasa de polinización cruzada implica que un número reducido de padres participaron en la polinización de cada uno de los árboles madre muestreados, ya sea por la interferencia en la dispersión del polen causada por la presencia de otras especies, por el reducido número de individuos reproductivos existentes, o por problemas de sincronización fenológica en la dispersión del polen. Dado que Puerto Palomo, N. L., es un rodal puro de *Pseudotsuga menziesii* pero con una baja densidad de arbolado adulto, es posible que los problemas de sincronización fenológica, junto con el reducido número de individuos, hayan contribuido a una elevada

correlación de paternidad. La participación de un número reducido de individuos en los eventos reproductivos puede conducir a una disminución de la diversidad genética en las poblaciones, lo cual pone en riesgo la persistencia de la población si no hay intercambio genético entre los individuos que la constituyen.

Las tasas de cruzamiento y de correlación de paternidad indican que las tres poblaciones muestreadas están expuestas a la reducción de la diversidad genética. Por lo tanto, los esfuerzos de conservación de esta especie se deben enfocar a las poblaciones de la Región Central, como la de La Rosa, por su bajo porcentaje de polinización cruzada. En estas poblaciones es importante restaurar el intercambio genético y promover la participación de un mayor número de individuos en los eventos reproductivos. Debido a los efectos de depresión endogámica que se observan en estas poblaciones, se sugiere propiciar el intercambio genético (movimiento de polen) entre las poblaciones del centro; de esta manera la introducción de plantas producidas en vivero de otras poblaciones del centro puede ser útil para aumentar la diversidad genética y promover la polinización cruzada entre los individuos, ya que la introducción de germoplasma del norte en las poblaciones naturales del centro del país, como un mecanismo para aumentar la diversidad genética y reducir los efectos de la endogamia, no es recomendable debido a la notoria diferencia en las características adaptativas de las poblaciones del centro y del norte de México (Acevedo *et al.*, 2006)

CONCLUSIONES

Las frecuencias alélicas del polen y de los óvulos fueron similares en las tres poblaciones estudiadas, lo que implica que las frecuencias alélicas del polen representan a las frecuencias alélicas de los árboles madre, y por lo tanto, no hay evidencias de participación de polen extraño en cada una de las poblaciones. El porcentaje de polinización cruzada fue cercano al máximo posible en las poblaciones del norte, acorde a lo esperado para especies de coníferas con polinización anemófila; sin embargo, en la población del centro de México (La Rosa) se encontró una reducción importante en la polinización cruzada, fenómeno que puede asociarse con el aislamiento geográfico y el tamaño reducido de la población. No se encontraron diferencias significativas entre las estimaciones con locus múltiples (\hat{t}_m) y locus simples (\hat{t}_s) de la polinización cruzada, resultando que la principal forma de endogamia observada en la población de La Rosa es la autofecundación. La alta correlación de paternidad en las poblaciones del norte sugiere que aunque ocurre polinización cruzada en ellas, hay una elevada proporción de hermanos completos que resultan de una baja participación de individuos reproductivos en la población. Para reducir los efectos negativos de la endogamia acumulada en las poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* del centro de México, se sugiere mezclar polen de estas poblaciones y polinizar árboles de la región central, para generar variación genética adicional.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

Los valores de diversidad genética encontrados en el presente estudio, indican una marcada diferencia de las poblaciones de la región norte con respecto a las del centro. No se encontraron diferencias significativas en los valores de Heterocigocidad observada y esperada, lo que indica un equilibrio dentro de las poblaciones. El número de alelos por *locus* y el porcentaje de *loci* polimorficos, permitieron establecer que las poblaciones del norte tienen mayor similitud con poblaciones naturales de Estados Unidos y Canadá (Merkle y Adams, 1987; Li y Adams, 1989); por el contrario, las poblaciones de la región central del país presentaron mayor similitud en el grado de diversidad, con especies mexicanas como *Picea chihuahuana* (Ledig *et al.*, 1997), *Pinus maximartinezii* (Ledig *et al.*, 1999) y *P. greggii* (Ramírez *et al.*, 1997; Parraguirre *et al.*, 2002). Estas especies presentan en común las características de fragmentación, aislamiento geográfico y tamaño de poblaciones reducido.

La diferenciación genética entre poblaciones fue elevada ($F_{st} = 0.298$). Esta característica refuerza la hipótesis del aislamiento, reducción y fragmentación de las poblaciones; por lo tanto, podemos suponer que la deriva genética y la endogamia han tenido un gran impacto sobre la estructura de la diversidad genética, sobre todo en las poblaciones de la región centro. Este fenómeno se confirma con el bajo número de migrantes por generación ($Nm = 0.589$). A pesar de haber encontrado un aparente exceso de heterocigotos dentro de cada población, es posible que muchos homocigotos se pierdan en un proceso de selección temprana como se ha propuesto en otros trabajos (Desponts y Simon, 1987; Rajora *et al.*, 1998), esto tiene soporte en el hecho de que existe una alta proporción de semillas vanas en poblaciones de la región centro (Mápula *et al.*, 2007).

El agrupamiento de las poblaciones, a diferencia de lo que se ha encontrado en otras especies de coníferas en México como *Pinus greggii* (Parraguirre *et al.*, 2002), exceptuando a la población Mohinora, tuvo un patrón geográfico definido, similar al encontrado con base en características morfológicas (Reyes *et al.*, 2006;), fenológicas (Acevedo *et al.*, 2006) y del crecimiento de las plantas (Juárez *et al.*, 2006). La correlación significativa y positiva ($p > 0.05$) entre distancias genética y geográfica en poblaciones de la Sierra Madre Oriental permite inferir que la selección es una fuerza evolutiva importante en la diferenciación de las poblaciones de esta región, un comportamiento contrario ocurre al correlacionar las poblaciones de la región centro, donde esta se vuelve no significativa, este comportamiento confirma que la deriva genética ha sido la principal causa de la diferenciación genética en las poblaciones de esta región.

La tasa de polinización cruzada fue muy cercana a 90% en poblaciones del norte de México, porcentaje que se encuentra en el intervalo reportado para otras poblaciones naturales de esta especie en Norteamérica (El-Kassaby *et al.*, 1981; Shaw y Allard 1982; Yeh y Morgan 1987). Estas tasas de polinización son comunes en la mayoría de las coníferas y reflejan la capacidad de dispersión del polen a grandes distancias. En la población de La Rosa, ubicada en la región central, este valor fue de 50% aproximadamente y es similar al de poblaciones naturales de coníferas mexicanas, como *Picea martinezii*, (Ledig *et al.*, 2000), *P. mexicana* (Ledig *et al.*, 2002) y algunas poblaciones de *P. chihuahuana* (Ledig *et al.*, 1997), que se caracterizan por aislamiento geográfico y tamaño reducido de la población. Este valor de polinización cruzada refleja la presencia de endogamia, que se confirma con la ausencia de diferencia significativa en las estimaciones de *locus* múltiples y *locus* simples, este comportamiento se asocia a la autofecundación, como principal fuente generadora de endogamia. En especies de polinización anemófila la autofecundación generalmente ocasiona depresión endogámica en la progenie, que causa altos porcentajes de semillas vanas, así como vigor y tasa de crecimiento de las plántulas

bajos (Frankham, 1998). Es posible que esta situación esté ocurriendo en las poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* de la región central de México, ya que estudios previos han documentado este fenómeno (Mápula *et al.*, 2007; Juárez *et al.*, 2006).

La correlación de paternidad elevada en poblaciones del norte ($r_p > 0.60$), asociada con una elevada tasa de polinización cruzada, implica que un número reducido de padres participan en la polinización de cada uno de los árboles madre muestreados, ya sea por la interferencia en la dispersión del polen causada por la presencia de otras especies, por el reducido número de individuos reproductivos existentes, o por problemas de sincronización fenológica en la dispersión del polen. La participación de pocos individuos en los eventos reproductivos puede generar una disminución de la diversidad genética en las poblaciones, lo cual pondrá en riesgo su persistencia. Por lo tanto, las tres poblaciones muestreadas están expuestas en algún grado a una reducción en la diversidad genética, aunque las causas que las originan en cada una de ellas sean diferentes.

Los resultados de esta investigación sugieren que la conservación de los recursos genéticos debe ser enfocada principalmente a las poblaciones de la región central, en las que la poca eficiencia reproductiva, las amenazas de destrucción (cambio de uso de suelo, sobrepastoreo, cosecha desordenada de semillas), el bajo porcentaje de polinización cruzada y los cambios en los patrones climáticos podrían causar la desaparición de las poblaciones de la región central a corto plazo. Se propone, por lo tanto, con base en los resultados de esta investigación restaurar y promover el flujo genético en estas poblaciones y aumentar el número de individuos que participen en los eventos reproductivos para generar variación dentro de estas poblaciones y evitar los efectos de la endogamia; con base en mezcla de polen de poblaciones del centro, por la similitud de sus características fenológicas (Acevedo *et al.*, 2006); adicionalmente la introducción de plantas producidas en vivero con semilla de otras poblaciones del centro podría ser también de

utilidad. Finalmente, resulta igualmente importante reordenar la cosecha de semilla para producción de árboles de navidad, estimular a los poseedores del recurso forestal para evitar el cambio de uso de suelo y conservar de esta manera el recurso forestal.

LITERATURA CITADA

- Acevedo R., R., J.J. Vargas H., J. López U. y J. Velázquez M. 2006. Efecto de la procedencia geográfica y de la fertilización en la fenología del brote terminal en plántulas de *Pseudotsuga* sp. *Agrociencia* 40: 125-137.
- Adams, W.T., D.B. Neale, A.H. Doerksen, and D.B. Smith. 1990. Inheritance and linkage of isozyme variants from seed and vegetative bud tissues in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco). *Silvae Genet.* 39: 153-167.
- Aguirre P., E., G.R. Furnier, and L.E. Eguiarte. 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *Amer. J. Bot.* 87: 362-371.
- Amarashinge, V., and J. E. Carlson. 2002. The development of microsatellite DNA markers for genetic analysis in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 32: 1904-1915.
- Anónimo. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994 que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción y que establece especificaciones para su protección. *Diario Oficial de la Federación*. Mayo de 1994. 54 p.
- Anónimo. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres –categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. Segunda sección-SEMARNAT. Marzo de 2002. 85 p.
- Brown, A.H.D., and B.S. Weir. 1983. Measuring genetic variability in plant population. *In*: S. D. Tanksley, and T.J. Orton (Eds.). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Part “A”. Elsevier. Amsterdam, Holland. pp: 219-239.

- Brown, A.H.D. and C.M. Hardner. 2000. Sampling the gene pools of forest trees for *ex situ* conservation. *In*: A. Young, D. Boshier, and T. Boyle (Eds.). Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. CSIRO Publishing, Australia. pp: 185-196.
- Burczyk, J., W. T. Adams, and J. Y. Shimizu. 1997. Mating system and genetic diversity in natural populations of Knobcone pine (*Pinus attenuata*). *For. Gen.* 4(4): 223-226.
- Byers, J.A. 1997. Surface distance between two points of latitude and longitude. Computer program available at web site: <http://www.wcrl.ars.usda.gov/cec/java/lat-long.htm>
- Cheliak, W. M., J. A. Pitel, and G. Murray. 1985. Population structure and the mating system of white spruce. *Can. J. For. Res.* 15: 301-308.
- Clisby K., H., and P. B. Sears. 1955. Palynology in southern North America. Part III: Microfossil profiles under Mexico City correlated with the sedimentary profiles. *Bull. Geol. Soc. Am.* 66:511-520.
- CONAFOR. 2007. Importación de árboles de navidad. *En*: Revista México Forestal, bosques y selvas para siempre 53. disponible en <http://www.mexicoforestal.gob.mx/index.php>
- Debreczy, Z. and I. Racz. 1995. New species and varieties of conifers from Mexico. *Phytologia* 78: 217-243.
- Del Castillo R. F., J. A. Pérez de la R., G. Vargas A. y R. Rivera G. 2004. Coníferas. *In*: Biodiversidad de Oaxaca. A. J. García M., M. J. Ordoñez y M. Briones (eds.). Instituto de Biología-UNAM, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la naturaleza. pp: 141-158.
- Delgado, P., D. Piñeiro, A. Chaos, N. Perez N., and E. Alvarez B. 1999. High population differentiation and genetic variation in endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *Amer. J. Bot.* 86: 669-676.

- Desponte, M., and J.P. Simon. 1987. Structure et variabilité génétique de populations d'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) B. S. P.) dans la zone hémiairtique du Nouveau-Québec. Can. J. For. Res. 17: 1006-1012.
- Domínguez A., F. A. 1994. Análisis histórico-ecológico de los bosques de *Pseudotsuga* en México. INIFAP-CIR Golfo Centro. Folleto Técnico No. 23. México. 43 p.
- Eguiluz, P. T. 1998. Herencia y evolución. Serie de apoyo académico No. 1. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. 25 p.
- El-Kassaby, Y. A., F. Yeh, and O. Sziklai. 1981. Estimation of the outcrossing rate of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*) using allozyme polymorphisms. Silvae Genet. 30: 182-184.
- El-Kassaby, Y.A., and O. Sziklai. 1982. Genetic variation of allozyme and quantitative traits in a selected Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco) population. For. Ecol. Manage. 4: 115-126.
- El-Kassaby Y.A. and K. Ritland. 1996. Genetic variation in low elevation Douglas-fir of British Columbia and its relevance to gene conservation. Biodiversity and Conservation 5: 779-794.
- Falconer, D.S. y T. F.C. Mackay. 1996. Introducción a la Genética Cuantitativa. Caballero R., A., C. López-Fanjul, M.A. Toro I. y A. Blasco M. (trads). ACRIBIA S. A. Zaragoza, España. 469 p.
- Farjon, A. 1990. Pinaceae: drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books. Königstein, Federal Republic of Germany. pp: 171-191.
- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction island populations. Conservation Biol. 12: 665-675.

- Felsenstein, J. 1995. PHYLIP: a phylogeny inference package, version 3.57c. Computer program available at website, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>
- Furnier, G. R., and W. T. Adams. 1986. Mating system in natural populations of Jeffrey pine. *Am. J. Bot.* 73(7): 1002-1008.
- Gernandt, D.S., and A. Liston. 1999. Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Amer. J. Bot.* 86: 711-723.
- Hamrick, J.L., and J.D. Nason. 2000. Gene flow in forest trees. *In*: A. Young, D. Boshier, and T. Boyle (Eds.). *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. CSIRO Publishing, Australia. pp: 81-90.
- Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. *In*: Avise J.C. and J.L. Hamrick (Eds.) *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York. pp: 281-304.
- Hermann, R. K., and D. P. Lavender. 1990. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *In*: *Silvics of North America, Vol. 1. Conifers*. R. Burns, and B. H. Honkala (eds). USDA Forest Service. Washington, D. C. pp: 540-557.
- Hermann, R.K., and D.P. Lavender. 1999. Douglas-Fir planted forests. *New Forests* 17: 53-70.
- Iverson, L. R., and A. M. Prasad. 2002. Potential redistribution of tree species habitat under five climate change scenarios in the eastern U. S. *For. Ecol. Manag.* 155:205-222.
- Jarvis, S.B., M.A. Taylor, J. Bianco, F. Corbineau and H.V. Davies. 1997. Dormancy-breakage in seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) support for the hypothesis that LEA gene expression is essential for this process. *J. Plant Physiol.* 151: 457-464.

- Juárez A., A., J. López U., J.J. Vargas H. y C. Sáenz R. 2006. Variación geográfica en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agrociencia* 40: 783-792.
- Ledig, F.T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson, D.M. (Ed.). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge. pp: 251-280.
- Ledig, F. T., B. Bermejo V., P. D. Hodgkiss, D. R. Johnson, C. Flores L., and, V. Jacob C. 2000. The mating system and genetic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of México's Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Can. J. For. Res.* 30:1-9.
- Ledig, F.T., M.A. Capó A., P.D. Hodgkiss, H. Sbay, C. Flores L., M.C. Thompson and B. Bermejo V. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *Amer. J. Bot.* 88: 1977-1987.
- Ledig, F.T., M.T. Conkle, B. Bermejo V., T. Eguiluz P., P.D. Hodgkiss, D.R. Johnson and W. S. Dvorak. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53: 91-99.
- Ledig, F.T., P.D. Hodgkiss and D. R. Johnson. 2005. Genetic diversity, genetic structure, and mating system of brewer spruce (Pinaceae), a relict of the arcto-tertiary forest. *Amer. J. Bot.* 92: 1975-1986.
- Ledig, F. T., P. D. Hodgkiss, and V. Jacob C. 2002. Genetic diversity, mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martínez. *Conservation Genetics* 3:113-122.

- Ledig, F.T., V. Jacob C., P.D. Hodgskiss, and T. Eguiluz P. 1997. Evolution and divergence among populations of a rare Mexican endemic, Chihuahua spruce, following Holocene warming. *Evolution* 51: 1815–1827.
- Li, P. and W.T. Adams. 1989. Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. For. Res.* 19: 149-161.
- Little, E.L. Jr. 1979. Checklist of United States Trees (native and naturalized). USDA Forest Service. Agricultural Handbook No. 541. 375 p.
- Lozano G., M., S. B. Ortega G., M. Caballero M., and J. Urrutia F. 1993. Late Pleistocene and Holocene paleoenvironments of Chalco Lake, central Mexico. *Quat. Res.* 40:332-342.
- Mápula-Larreta., M., J. López-Upton, J. J. Vargas-Hernández, and A. Hernández-Livera. 2007. Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 16: 727-742.
- Martínez, M. 1963. Las Pináceas Mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México. 3ra. Ed. México, D. F. pp: 27-74.
- Merkle, S. A. and W. T. Adams. 1987. Patterns allozyme variation within and among Douglas-fir breeding zones in Southwest Oregon. *Can. J. For. Res.* 17: 402-407. Mitton J, B. 1983. Conifers, *In*: Tanksley S. D. and T. J. Orton (Eds.). *Isozymes in plant genetic and plant breeding, part B*. Elsevier, Amsterdam. pp: 443-472.
- Mitton J, B. 1983. Conifers, *In*: S. D. Tanksley, and T. J. Orton (Eds.). *Isozymes in plant genetic and plant breeding, part B*. Elsevier, Amsterdam. pp: 443-472.
- Neale, D. B., and W. T. Adams. 1985. The mating system in natural shelterwood stands of Douglas-fir. *Theor. Appl. Genet.* 71:201-207.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.

- Parraguirre L., C., J.J. Vargas H., P. Ramírez V., H.S. Aspiroz R. y J. Jasso M. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. Rev. Fitotecnia Mex. 25: 279-287.
- Parraguirre L., C., J. J. Vargas H., P. Ramírez V. y C. Ramírez H. 2004. Sistema de cruzamiento en cuatro poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. Agrociencia 38: 107-119.
- Rajora, O.P., L. De verno, A. Mosseler y D.J. Innes. 1998. Genetic diversity and population of disjunct Newfoundland and central Ontario populations of eastern white pine (*Pinus strobus*). Can. J. Bot. 76: 500-508.
- Ramírez H., C., J.J. Vargas H., J. Jasso M., G. Carrillo C. y H. Guillén A. 1997. Variación isoenzimática en diez poblaciones de *Pinus greggii* Engelm. Agrociencia 31: 223-230.
- Reyes, H. V., J. J. Vargas H., J. López U. y H. Vaquera H. 2005. Variación morfológica y anatómica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* (Pinaceae). Acta Botánica Mexicana. 70: 47-67.
- Reyes H., V.J., J.J. Vargas H., J. López U. y H. Vaquera H. 2006. Similitud fenotípica de poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* Carr. Agrociencia 40: 545-556.
- Ritland, K. 1994. Multilocus mating system program MLTR, version 0.9 K. Ritland. Department of Botany, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.
- Ritland, K. and Y. A. El-Kassaby. 1985. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. Theor. Appl. Genet. 71:375-384
- Savolainen, O. and H. Kuittinen. 2000. Small population processes. In: A. Young, D. Boshier and T. Boyle (Eds.). Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. CSIRO Publishing, Australia. pp: 91-100.
- Shaw, D. V. and R. W. Allard. 1979. Analysis of mating system parameters and population structure in Douglas-fir using single-locus and multilocus methods. In: Proceedings of

- Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects. July 27, 1979. Berkeley, Cal. USDA For. Serv., Gen. Tech. Rep. PSW-48. Berkeley, Cal. pp: 18-22.
- Shaw, D. V., A. L. Kahler and R. W. Allard. 1981. A multilocus estimator of mating parameters in plant populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78(2): 1298-1302.
- Shaw, D. V. and R. W. Allard. 1982. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozymes markers. *Theor. Appl. Genet.* 62: 113-120.
- Slatkin, M. and N.H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- Sorensen, F. C. 1982. The role of polyembryony and embryo viability in the genetic system of conifers. *Evolution* 36: 725-733.
- Sorensen, F. C., and R. K. Campbell. 1997. Near neighbor pollination and plant vigor in coastal Douglas-fir. *For. Gen.* 4: 149-157.
- Sproule, A.T. and B.P. Dancik. 1996. The mating system of black spruce in North-Central Alberta, Canada. *Silvae Genet.* 45: 159-164.
- Stebbins G. L. 1989. Isozymes in plant biology. *Advances in Planta Sciences Series. Vol- 4* Edited by; Douglas E. Soltis y Pamela S. Soltis. pp. 1-4.
- Stuber, C.W., J.F. Wendel, M.M. Goodman and J.S.C. Smith. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). North Carolina Agricultural Research Service. North Carolina State University. Raleigh, N.C., U.S.A. Technical Bulletin. No. 286. 87 p.
- Swofford, D.L. and R.B. Selander. 1989. BIOSYS-1: a computer program for analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics, release 1.7. Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill. U.S.A. 65 p.

- USDA Forest Service. 2003. The National Forest Genetics Laboratory (NFGEL) Standard Operating Procedures. Pacific Southwest Research Station. Placerville, CA. 90 p.
- Velasco G., M.V., J. López U., G. Angeles P., J.J. Vargas H. y V. Guerra de la C. 2007. Dispersión de semillas de *Pseudotsuga menziesii* en poblaciones del centro del México. *Agrociencia* 41: 121-131.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Yeh, F. C. and K. Morgan. 1987. Mating system and multilocus associations in a natural population of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Theor. Appl. Genet.* 73: 799-808.
- Zobel, B. y J. Talbert. 1988. Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales. Ed. Limusa. México, D. F. 545 p.