

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO FORESTAL

**DIVERSIDAD GENÉTICA,
ESTRUCTURA GENÉTICA Y
SISTEMA DE CRUZAMIENTO EN
*Pinus johannis***

VERÓNICA GARCÍA GÓMEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis titulada: "Diversidad Genética, estructura genética y sistema de cruzamiento en Pinus johannis"

realizada por el alumno: Verónica García Gómez

bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FORESTAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



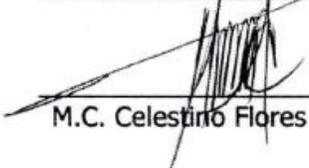
DR. CARLOS RAMÍREZ HERRERA

ASESOR



DR. JAVIER LÓPEZ UPTON

ASESOR



M.C. Celestino Flores López

ASESOR

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2013

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad de ser parte de la institución y así continuar mi preparación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que me otorgo el apoyo financiero durante mis estudios de postgrado.

Al Dr. Carlos Ramírez Herrera por la confianza, la guía académica y el apoyo personal que me brindo en todo momento, permitiéndome concluir esta etapa profesional.

Al Dr. Javier López Upton y el M. C. Celestino Flores López por la disposición que siempre mostraron para desarrollar y mejorar este proyecto de investigación.

Al Dr. Marcos Jiménez Casas por su apoyo y sus correcciones a este manuscrito.

Al personal académico y administrativo del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y particularmente al que labora en el Programa Forestal, porque en todo momento me otorgaron las facilidades necesarias para llevar a cabo mis estudios de postgrado.

A Raúl López Lozano, Lauro Guadalupe Franco Mejía y Sergio Ivan Chávez Santoyo por su ayuda en el laboratorio.

A mis amigos del Colegio de Postgraduados y a la generación otoño 2010 del Postgrado Forestal, porque siempre han tenido un consejo, palabras de aliento y esa chispa de alegría que hicieron mi estancia en el Colegio muy reconfortante. A Alejandra Z., Alma M., Daniel C, Daniela D, Gabriel J., Lucia G., Mónica N., Patricia U., Xochiquetzalli E. y Yazmit V. por sus consejos, su apoyo incondicional y su amistad.

A Christian A. por creer en mi y por tu amor.

“He vivido en busca de una visión, tanto personal como social. Personal: cuidar lo que es noble, lo que es bello, lo que es amable; permitir momentos de intuición para entregar sabiduría en los tiempos más mundanos. Social: ver en la imaginación la sociedad que debe ser creada, donde los individuos crecen libremente, y donde el odio y la codicia y la envidia mueren porque no hay nada que los sustente. Estas cosas, y el mundo, con todos sus horrores, me han dado fortaleza”. Bertrand Russell

Este trabajo está dedicado a:

Mis Padres

Que a pesar de su historia de vida creyeron en la familia y se esfuerzan día a día en dar lo mejor de ustedes para educarnos y mostrarnos su amor. Es una bendición tenerlos aun conmigo.

Mi hermano

Por ser mi ejemplo de alegría, apoyo y buen corazón. Gracias por nunca dejarme sola.

Ariana, Erik Jonathan y Leidi Ana

Por seguir alumbrando mi camino, los quiero mucho.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	ii
CONTENIDO.....	iii
INDICE DE CUADROS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	3
CAPITULO II. DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE <i>PINUS JOHANNIS</i>	5
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
CONCLUSIONES.....	19
LITERATURA CITADA.....	19
CAPITULO III. SISTEMA DE CRUZAMIENTO EN <i>PINUS JOHANNIS</i>	25
RESUMEN.....	25
ABSTRACT.....	26
INTRODUCCIÓN.....	27

MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	34
LITERATURA CITADA.....	35
CAPITULO IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	39
LITERATURA CITADA.....	44

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Localización de las cuatro poblaciones estudiadas de <i>Pinus johannis</i>	9
Cuadro 2.2. Número y clases de alelos encontrados en las cuatro poblaciones estudiadas de <i>Pinus johannis</i>	12
Cuadro 2.3. Diversidad genética de las cuatro poblaciones estudiadas de <i>Pinus johannis</i>	14
Cuadro 2.4. Valores de los F-estadísticos de Wright para 16 loci en cuatro poblaciones de <i>Pinus johannis</i>	17
Cuadro 2.5. Distancias genéticas entre cuatro poblaciones de <i>Pinus johannis</i>	18
Cuadro 3.1. Localización de cuatro poblaciones de <i>Pinus johannis</i> estudiadas.....	29
Cuadro 3. 2. Frecuencias alélicas de polen y óvulos en cuatro poblaciones de <i>Pinus johannis</i> ...	32
Cuadro 3.3. Tasa multilocus de cruzamiento (t_m), tasa locus individual de cruzamiento (t_s) y correlación de paternidad (r_p) en <i>Pinus johannis</i>	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1. Agrupamiento de cuatro poblaciones de *Pinus johannis* con base en las Distancias Genéticas de Nei.....18

DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA GENÉTICA Y SISTEMA

DE CRUZAMIENTO EN *Pinus johannis*

Verónica García Gómez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2013

Pinus johannis M. F. Robert es una especie endémica de México que se distribuye en poblaciones aisladas en la sierra Madre Oriental. Los objetivos del presente estudio fueron: a) conocer el nivel de diversidad genética y estructura genética de *P. johannis*; y b) estimar su tasa de cruzamiento. Se utilizaron 143 árboles en cuatro poblaciones de *Pinus johannis* para estimar los parámetros de diversidad genética tales como número promedio de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad observada y esperada. Para calcular la tasa de cruzamiento (t) se utilizó tejido de semilla de 127 árboles. Para conocer la diversidad genética se analizaron nueve sistemas enzimáticos en geles de almidón utilizando electroforesis, y tres para el sistema de cruzamiento. El número promedio de alelos por locus fue 2.1 y el porcentaje de loci polimórficos fue 88 %. La heterocigosidad promedio observada y esperada fue 0.231 y 0.245, respectivamente. Aproximadamente el 7 % ($F_{ST} = 0.071$) de la diversidad genética se encontró entre poblaciones. La tasa de cruzamiento promedio calculada por los estimadores multilocus (t_m) y locus individual (t_s) fue de 0.84. La correlación promedio de paternidad (r_p) fue de 0.17. *P. johannis* presentó un nivel alto de diversidad genética, nivel moderado de diferenciación entre poblaciones con una tasa de cruzamiento baja.

Palabras clave: heterocigosidad, índice de fijación, distancia genética, tasa de cruzamiento, autofecundación.

GENETIC DIVERSITY, GENETIC STRUCTURE AND MATING SYSTEM

IN *Pinus johannis*

Verónica García Gómez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2013

Pinus johannis M. F. Robert is a Mexican-endemic species that grows in isolated populations in the Sierra Madre Oriental. The objectives in the present study were: a) to know the level of genetic diversity and genetic structure of *P. Johannis*; and b) to estimate its outcrossing rate. One hundred forty three trees from four populations were used to estimate the parameters of genetic diversity such as average number of alleles per locus, percentages of polymorphic loci, observed heterozygosity and expected heterozygosity. Tissue from seeds of 127 trees was used. Nine enzyme systems were analysed in starch gel using electrophoresis to know the genetic diversity, and three enzyme systems to assess the outcrossing rate. The average number of alleles per locus was 2.1, and the percentage of polymorphic loci was 88 %. The observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.231 and 0.245, respectively. Approximately, 7 % ($F_{ST} = 0.07$) of the genetic diversity was among populations. The average outcrossing rate estimated by multilocus (t_m) and single locus estimator was 0.84. The average correlation (r_p) of paternity was 0.17. *Pinus johannis* showed a high level of genetic diversity, moderate level of differentiation among populations and low outcrossing rate.

Key words: Heterozygosity, fixation index, genetic distance, outcrossing rate, selfing

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Pinus johannis M.-F. Robert es una especie endémica que crece en poblaciones aisladas, y distribuidas de manera discontinua en los estados de Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Querétaro, a una altitud que varía entre 2400 y 2800 m, con una precipitación promedio anual de 300-400 mm (Perry, 1991; Romero *et al.*, 1996). Esta especie está enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de protección especial (SEMARNAT, 2010).

Los árboles de *P. johannis* tienen utilidad ornamental y se plantan en sitios con baja precipitación (Robert, 1978). Las ramas de esta especie se usan como leña y sus semillas se recolectan para alimento humano (Robert, 1978; Perry, 1991). Las copas de los árboles de *P. johannis* proporcionan sombra que disminuye la evaporación, formando un microclima que favorece el crecimiento de especies herbáceas y arbustivas (Romero y García, 2002). La disposición de los conos de *P. johannis* sirvió para inferir el origen y la evolución de la bisexualidad en angiospermas y gimnospermas, debido a que 99 % de los individuos de esta especie tuvieron un comportamiento dioico (Flores-Rentería *et al.*, 2011).

Es fundamental conocer la magnitud y distribución de la diversidad genética en especies para poder establecer estrategias de conservación y programas de manejo sustentable a largo plazo (Rozzi *et al.*, 2001). El sistema de cruzamiento influye en el nivel y patrón de diversidad genética, así como en la estructura genética de una especie (Charlesworth, 2006; Höglund, 2009). El tipo de apareamiento en plantas puede ser identificado como autofecundación y cruzamiento entre individuos (White *et al.*, 2007). La autofecundación es el máximo nivel de endogamia la cual favorece la homocigosis en una población, ocasionando la pérdida de diversidad dentro poblaciones y aumentando la diferenciación entre éstas (Hartl y Clark, 2007).

Una consecuencia de la endogamia puede ser la depresión endogámica la cual disminuye la capacidad adaptativa de individuos de una especie al aumentar la probabilidad de que alelos deletéreo se manifiesten en genotipos homocigótico (Hartl y Clark, 2007).

Las especies del género *Pinus* son plantas monoicas donde las estructuras reproductivas, tanto masculinas como femeninas, se encuentran en el mismo individuo; permitiendo que la reproducción se realice por autofecundación o por cruzamiento entre árboles diferentes (White *et al.*, 2007). Este tipo de cruzamiento se conoce como mixto (Ritland, 2002). Semillas vanas y tasas bajas de crecimiento son algunas de las consecuencia de autofecundación en especies de coníferas (Rajora *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2003). Por otro lado *P. johannis* se considera una especie casi dioica, debido a que las estructuras reproductivas femeninas y masculinas se producen en diferentes individuos, caso singular en el género *Pinus* (Flores-Rentería *et al.*, 2011). Por lo antes expuesto se esperaría que la tasa de cruzamiento entre individuos de *P. johannis* sea producto de apareamiento entre individuos diferentes con ninguna posibilidad de autofecundación. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron: a) estimar el nivel de diversidad genética y estructura genética de cuatro poblaciones de *P. johannis*; y b) estimar la tasa de cruzamiento en *P. johannis*.

LITERATURA CITADA

- Charlesworth, D. 2006. Evolution of plant breeding system. *Current Biology* 16: 726-735.
- Flores-Rentería, L., A. Vásquez-Lobo, A. V. Whipple, D. Piñero, J. Márquez-Guzmán and C. A. Domínguez. 2011. Functional bisporangiate cones in *Pinus johannis* (Pinaceae): implications for the evolution of bisexuality in seed plants. *American Journal of Botany* 98: 130-139.
- Hartl, D. L. y A. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates. Massachusetts, U.S.A. 682 p.
- Höglund, J. 2009. *Evolution Conservation Genetics*. Oxford University Press Inc. New York, USA. 189 p.
- Johnsen, K. H., J. E. Major and C. A. Mier. 2003. Selfing results inbreeding depression but not gas exchange of surviving adult black spruce trees. *Tree Physiology* 23: 1005-1008.
- Perry, J. P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, Oregon. 231 p.
- Rajora, O. P., A. Mosseler and J. E. Major. 2002. Mating system and reproductive fitness traits of eastern white pine (*Pinus strobus*) in large, central versus small, isolated, marginal populations. *Canadian Journal of Botany* 80: 1173-1184.
- Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Robert, M. F. 1978. Un nouveau pin pignon mexicain: *Pinus johannis*. *Adansonia* 18: 365-373.
- Romero M., A., E. García y M. Passini. 1996. *Pinus cembroides* y *Pinus johannis* del Antiplano Mexicano: una síntesis. *Acta Botanica Gallica* 143: 681-693.

- Romero M., A. y E. García M. 2002. Estabilidad y elasticidad de la composición florística de los piñonares de San Luis Potosí, México. *Agrociencia* 36: 243-254.
- Rozzi, R., P. Feinsinger, F. Massardo y R. Primack. 2001. ¿Qué es la diversidad biológica? *In*: Primack, R., R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo, y F. Massardo (eds). *Fundamentos de Conservación Biológica*. Fondo de Cultura Económica. México D.F., México. pp: 59-97.
- SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. México. 30 de diciembre de 2010. Segunda sección. 78 p.
- White, T. L., T. W. Adams and D. B. Neale. 2007. *Forest Genetics*. CAB International, Oxford. 682 p.

CAPITULO II. DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Pinus johannis*

RESUMEN

Pinus johannis M.-F. Robert es una especie endémica de México que se distribuye en poblaciones aisladas en la sierra Madre Oriental. El objetivo del presente estudio fue estimar el nivel de diversidad genética y estructura genética de *P. johannis*. Se recolectaron conos de 143 árboles procedentes de cuatro poblaciones y se utilizaron seis megagametofitos para conocer el genotipo de cada árbol muestreado. Se analizaron nueve sistemas enzimáticos en geles de almidón utilizando electroforesis. El número promedio de alelos por locus fue 2.1 y el porcentaje de loci polimórficos fue 88 %. La heterocigosidad promedio observada y esperada fue 0.231 y 0.245, respectivamente. Aproximadamente, 7 % de la diversidad genética se encontró entre poblaciones. *P. johannis* presentó un nivel alto de diversidad genética con niveles moderados de endogamia y de diferenciación entre poblaciones.

Palabras clave: heterocigosidad, isoenzimas, endémico, índice de fijación, distancias genéticas

ABSTRACT

Pinus johannis M.-F. Robert is a Mexican-endemic species that grows in isolated populations in the Sierra Madre Oriental. The objective in the present study was to estimate the level of genetic diversity and genetic structure in *P. johannis*. Cones of 143 trees from four populations were collected. Six megagametophytes were used to know the genotypes of each sampled tree. Nine enzyme systems were analysed in starch gel using electrophoresis. The number of alleles per locus was 2.1, and the percentage of polymorphic loci was 88 %. The observed heterozygosity and expected heterozygosity was 0.231 and 0.245, respectively. Approximately, 7 % of the genetic diversity was among populations. The study showed a high level of genetic diversity, moderate level of inbreeding and moderate level of differentiation among populations of *Pinus johannis*.

Key words: Heterozygosity, isoenzymes, endemic, fixation index, genetic distance

INTRODUCCIÓN

En México, el género *Pinus* está constituido por 54 especies, 17 variedades y 6 formas de árboles y arbustos de importancia ecológica y económica (Perry, 1991) y 50 % de las especies de este género son endémicas (Perry, 1991). *Pinus johannis* M. F. Robert es una especie endémica que crece en poblaciones aisladas, distribuidas de manera discontinua, en los estados de Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Querétaro, a una altitud que varía entre 2400 y 2800 m, con una precipitación promedio anual de 300-400 mm (Perry, 1991; Romero *et al.*, 1996). Esta especie está enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de protección especial (SEMARNAT, 2010).

Los árboles de *P. johannis* tienen utilidad ornamental y se plantan en sitios con precipitación baja (Robert, 1978). También las ramas de esta especie se usan como leña y sus semillas se recolectan para alimento humano (Robert, 1978; Perry, 1991). Ecológicamente, las copas de los árboles de *P. johannis* proporcionan sombra que disminuye la velocidad de evaporación, formando un microclima que favorece el crecimiento de especies herbáceas y arbustivas (Romero y García, 2002). Los bosques de *P. johannis* tienen semejanzas florísticas con los bosques formados con *Pinus cembroides* Zucc. (Luna-Cavazos *et al.*, 2008). *P. johannis* también ha servido como modelo biológico para explicar eventos evolutivos y discrepancias taxonómicas del género *Pinus*, utilizando características morfológicas (oleorresinas) y monoterpenos (Zavarin y Snajberk, 1986; Romero *et al.*, 1996; 2000). La disposición de los conos de *P. johannis* sirvió para inferir el origen y la evolución de la bisexualidad en angiospermas y gimnospermas, ya que 99 % de los individuos de esta especie tuvieron un comportamiento dioico (Flores-Rentería *et al.*, 2011; 2013).

Es fundamental conocer la magnitud de la diversidad genética y cómo se reparte en las distintas poblaciones de las especies con algún tipo de aprovechamiento o importancia económica para poder establecer estrategias de conservación y programas de manejo sustentable a largo plazo (Rozzi *et al.*, 2001). Estos programas deben incluir tanto los recursos genéticos representativos, como los únicos y singulares (Jiménez y Collado, 2000) para disminuir problemas relacionados con tamaños efectivos pequeños, efectos deletéreos por endogamia o cruce de individuos muy distintos, reducción del flujo génico, efecto de la acumulación de mutaciones deletéreas y pérdida de la habilidad para evolucionar en respuesta a los cambios ambientales, plagas y enfermedades (Frankham *et al.*, 2002).

Sin embargo, a pesar de la importancia de *P. johannis*, sus poblaciones están en peligro de extinción por encontrarse en áreas cercanas a lugares con actividades humanas, como agricultura y ganadería (García y Passini, 1993). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estimar el nivel de diversidad genética y estructura genética de cuatro poblaciones de *P. johannis*.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron estróbilos de 143 árboles en cuatro poblaciones en los estados de Nuevo León, Coahuila y Zacatecas (Cuadro 2.1). En cada población, la distancia mínima entre árboles fue 30 m, para evitar en lo posible incluir individuos emparentados. Los árboles de donde se recolectaron los estróbilos se marcaron con un número consecutivo en cada población. Los estróbilos de cada árbol se colocaron en bolsas de papel para su transporte al laboratorio de semillas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) para su procesamiento.

Las bolsas de papel se identificaron con el número del árbol donde se recolectaron los estróbilos y el nombre de la población. Las semillas vanas se separaron de las semillas llenas por flotación en agua. Las semillas llenas de cada árbol se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas con el número consecutivo dado a cada árbol en cada población. Las bolsas con las semillas de cada árbol se mantuvieron en un cuarto frío a -7° C, en el laboratorio de Postgrado Forestal del Colegio de Postgraduados, hasta el momento del análisis electroforético.

Cuadro 2.1. Localización de las cuatro poblaciones estudiadas de *Pinus johannis*.

Población	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (m)
Laguna de Sánchez	Villa de Santiago, N.L.	25° 21' 26'' N	100° 20' 35'' O	2223
El Coahuilón	Arteaga, Coah.	25° 14' 49'' N	100° 23' 17'' O	2720
Concepción del Oro	Mazapil, Zac.	24° 37' 02'' N	101° 27' 59'' O	2500
La Siberia	Zaragoza, N.L.	23° 52' 02'' N	99° 48' 16'' O	2620

N.L. = Nuevo León; Coah. = Coahuila; Zac. = Zacatecas.

Seis semillas de cada árbol de *P. johannis* se colocaron sobre camas de papel absorbente dentro de cajas de plástico de 21 x 27 cm, y se agregaron 200 mL de agua potable. Las cajas se taparon y se colocaron en una estufa a 25 °C por 7 días para la germinación de las semillas. Posteriormente las semillas se lavaron, secaron, y se rompió la testa para separar el embrión y megagametofito de cada una de ellas. En las coníferas, el embrión es tejido diploide que hereda los genomas tanto del árbol madre como del árbol padre; mientras que el megagametofito de la semilla es tejido haploide que únicamente contiene el genotipo del

árbol madre por lo que, analizando el megagametofito, se puede determinar el genotipo del árbol madre (López, 1998). Analizando seis megagametofitos la probabilidad de identificar correctamente el genotipo de una madre es igual a $0.935 (1/2)^{n-1}$ donde n es igual al número de megagametofitos por árbol (Ledig *et al.*, 2000). Una porción del megagametofito de cada una de las seis semilla de cada árbol se colocó en una gradilla de plástico con 96 pozos, y se molió en frío utilizando un micropistilo de plástico y agregando 50 μ L de 0.2 M amortiguador de fosfato de sodio a un pH de 0.7 (NFGEL, 2003). Después de moler las muestras las gradillas se cerraron y guardaron en un congelador a -20 °C hasta que se realizó el análisis de electroforesis.

Para realizar el análisis de electroforesis, las muestras se descongelaron colocándolas sobre hielo para evitar la desnaturalización de las enzimas. Ya descongeladas, se introdujo una tira de papel Whatman No. 5 de 12 x 1 mm en cada muestra y se espero a que absorbieran el sustrato en cada poso de la gradilla. Posteriormente las tiras de papel se colocaron en un gel de almidón al 10 %. Semillas germinadas de *Pinus resinosa* Aiton, una especie sin diversidad isoenzimática (Fowler y Morris, 1977), fueron molidas utilizando el mismo procedimiento que los megagametofitos de *P. johannis* y usadas como control.

En la electroforesis se analizaron los sistemas enzimáticos diaforasa (DIA, EC 1.6.99.1), isocitrato deshidrogenasa (IDH, EC.1.1.1.41), malato deshidrogenasa (MDH, EC.1.1.1.37), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD, EC.1.1.44) y shikimato deshidrogenasa (SKD, EC.1.1.1.25), utilizando amortiguador para gel y electrodo de 0.040 M ácido cítrico y 0.068 M N-(3-Aminopropil)-morfolina con pH 6.1; mientras que fosfoglucoisomerasa (PGI, EC.5.3.1.9), enzima málica (ME, EC.1.1.1.40), fosfoglucomutasa (PGM, EC.5.4.2.2) y glucosa 6 fosfato

deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49) se analizaron utilizando amortiguador para gel de 0.005 M L-Histidina con pH 7.0 y amortiguador para electrodo de ácido cítrico 0.410 M, también de pH 7.0 (Wendel y Weeden, 1989; NFGEL, 2003).

Los loci encontrados se nombraron de acuerdo al nombre abreviado del sistema enzimático, y cuando se identificó más de un locus, estos se enumeraron consecutivamente a partir del locus que se desplazó más rápido. La numeración de los alelos dentro de cada locus se realizó de acuerdo al alelo con mayor frecuencia. Cuando se detectó sólo un alelo, éste se clasificó como monomórfico (Falconer, 1989). Los alelos se determinaron como raros cuando su frecuencia fue menor a 0.05 y, como comunes, cuando su frecuencia fue igual o mayor a 0.05 (Marshall y Brown, 1975). Un alelo se consideró como privado cuando solo se encontró en una población (Neel, 1973).

Para cada población se estimaron los siguientes parámetros de diversidad genética utilizando el programa POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1997): porcentaje de loci polimórficos (P), número promedio de alelos por locus (A), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) (Nei, 1973), e índice de fijación (F). Para determinar la estructura genética de las poblaciones estudiadas se estimaron los estadísticos F de Wright (F_{it} , F_{is} y F_{st}) y el número de migrantes por generación (N_m) (Nei, 1987). Se calcularon las distancias genéticas entre las cuatro poblaciones estudiadas de *P. johannis* (Nei, 1972) y se construyó el dendrograma utilizando el método de agrupamiento de pares por promedios aritméticos (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las cuatro poblaciones de *P. johannis* el número de alelos en los 16 loci muestreados varió entre 31 y 35 alelos (Cuadro 2.2). La mayoría de estos fueron alelos comunes con una frecuencia mayor a 0.05. Laguna de Sánchez y Concepción del Oro presentaron el mayor número de alelos totales y alelos raros. En La Siberia y El Coahuilón se encontraron cuatro y tres loci monomórficos, respectivamente; mientras que en Laguna de Sánchez sólo se registró un locus monomórfico. En Concepción del Oro se identificaron únicamente loci polimórficos. En Laguna de Sánchez, Concepción del Oro y La Siberia se encontró un alelo privado en cada una de éstas.

Cuadro 2.2. Número y clases de alelos encontrados en las cuatro poblaciones estudiadas de *Pinus johannis*.

Población	Comunes	Raros	Totales
Laguna de Sánchez, N.L.	29	6	35
El Coahuilón, Coah.	32	1	33
Concepción del Oro, Zac.	29	6	35
La Siberia, N.L.	28	3	31

N.L.= Nuevo León; Coah. = Coahuila; Zac. = Zacatecas

El promedio de alelos por locus fue de 2.1 (Cuadro 2.3). El mayor número de alelos por locus se encontró en Laguna de Sánchez y Concepción del Oro, mientras el menor número de alelos por locus se registró en La Siberia. En estudios previos con isoenzimas de especies del género *Pinus*, con distribución geográfica semejantes a *P. johannis*, se han encontrado valores promedio de alelos por locus entre 1.8 y 2.5 (Delgado *et al.*, 1999; Ledig *et al.*, 2001; Molina-Freaner *et al.*, 2001).

El porcentaje de loci polimórficos de las poblaciones muestreadas de *P. johannis*, varió de 75 a 100 %, lo que es alto con respecto a otras coníferas con distribución restringida. Por ejemplo, los porcentajes de loci polimórficos en *P. torreyana* Parry ex Carr., una especie que crece en dos poblaciones en California, y en *P. maximartinenzii* Rzedowski, en una de las dos poblaciones conocidas de esta especie en los estados de Zacatecas y Durango, fueron de 0 y 30 %, respectivamente (Ledig y Conkle 1983; Ledig *et al.*, 1999). *Pinus pinceana* Gordon, otra especie endémica de la sierra Madre Oriental y listada como en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010), tuvo un 57% de loci polimórficos menor que el encontrado en las poblaciones muestreadas de *P. johannis* (Ledig *et al.*, 2001). También, el porcentaje de loci polimórficos en *P. johannis* fue mayor que los porcentaje de loci polimórficos encontrado en *P. hartwegii* Lindl. (58%) y *P. greggii* Engelm. (32%) dos especies de mayor distribución que *P. johannis* (Viveros-Viveros *et al.*, 2010; Parraguirre *et al.*, 2002). Se esperaría que especies de amplia distribución presenten porcentajes loci polimórficos mayores que especies de distribución restringida (Haig, 1998).

Cuadro 2.3. Diversidad genética de las cuatro poblaciones estudiadas de *Pinus johannis*.

Población	A	P	Ho	He	F
Laguna de Sánchez, N.L.	2.2	94	0.231	0.262	0.165
El Coahuilón, Coah.	2.1	81	0.255	0.241	0.020
Concepción del Oro, Zac.	2.2	100	0.289	0.281	0.056
La Siberia, N.L.	1.9	75	0.150	0.195	0.277
Promedio	2.1	88	0.231	0.245	0.130

A = Número promedio de alelos por locus; P = Proporción de loci polimórficos (%);
 Ho = Heterocigosidad observada; He = Heterocigosidad esperada de Nei; F = Índice de fijación, N.L.= Nuevo León, Coah. = Coahuila, Zac. = Zacatecas

La mayor heterocigosidad observada (Ho) y la mayor heterocigosida esperada (He) se encontraron en Concepción del Oro, en el estado de Zacatecas, mientras que la menor heterocigosidad observada y menor heterocigosidad esperada se observaron en La Siberia en el Estado de Nuevo León (Cuadro 2.3). La heterocigosidad esperada o diversidad genética en *P. johannis* fue alta comparada con la herocigosidad promedio esperada (0.169) en varias especies de coníferas (Hamrick *et al.*, 1992). También, se registró mayor heterocigosidad esperada en *P. johannis* que la heterocigosidad que se reportó en otras especies del género *Pinus* en México (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010). Sin embargo, la heterocigosidad esperada en *P. johannis* fue menor que las heterocigosidades esperadas que se reportó para *P. lagunae* M.F. Passini (0.386) y *P. muricata* D. Don (0.346), aunque la estimación de la heterocigosidad esperada promedio en éstas especies se realizó con base en únicamente loci polimórficos (Molina-Freaner *et al.*, 2001). Con base en los valores

de los parámetros genéticos encontrados se encontró niveles altos de diversidad genética en *P. johannis*.

El índice de fijación promedio (F) fue positivo en las poblaciones de *P. johannis* con valores que variaron entre 0.020 a 0.277 (Cuadro 2.3), indicando niveles diferentes de endogamia en cada población. Es común esperar niveles altos de endogamia en poblaciones pequeñas (Hart y Clark, 2007). El índice promedio de fijación (F) en *P. johannis* fue ligeramente superior al índice promedio de fijación (0.116) que se reportó para ocho poblaciones de *P. pinceana*, una especie que crece en poblaciones aisladas en la Sierra Madre Oriental (Ledig *et al.*, 2001). Sin embargo, el índice de fijación en *P. johannis* fue inferior al encontrado en *Tsuga canadensis* [L.] Carr. ($F = 0.443$), una conífera que tiene amplia distribución en el este de América del Norte (Potter *et al.*, 2008).

El índice de endogamia (F_{IS}) promedio a nivel población, con un valor positivo, indicó un nivel bajo de endogamia; sin embargo, considerando las cuatro poblaciones juntas, el índice de endogamia promedio (F_{IT}) indicó un nivel de endogamia mayor (Cuadro 2.4). El índice de endogamia (F_{IS}) a nivel población mostró deficiencia de individuos heterocigóticos en 11 de los 16 loci polimórficos, mientras que el índice de endogamia (F_{IT}), considerando las cuatro poblaciones juntas, indicó una deficiencia de individuos heterocigóticos en 13 de los 16 loci polimórficos incluidos en el presente estudio (Cuadro 2.4). En otras especies mexicanas del género *Pinus* se reportaron índices de endogamia mayores que los encontrados en *P. johannis*. Por ejemplo, los índices de endogamia (F_{IS} y F_{IT}) que se registraron en *P. johannis* fueron menores a los índices de endogamia ($F_{IS} = 0.140$ y $F_{IT} = 0.271$) que se encontraron en *P. pinceana* (Ledig *et al.*, 2001). El índice de endogamia en *P. johannis* fue menor que los índices de

endogamia que se encontraron en *Abies hickeli* Flous et Gausen ($F_{IS} = 0.121$), *A. guatemalensis* Reheder ($F_{IS} = 0.235$ y $F_{IT}=0.122$), *A. religiosa* (H.B.K) Schltld. et Cham. ($F_{IS}=0.216$ y $F_{IT}=0.250$), gimnospermas que crecen en las montañas mexicanas (Aguirre-Planter *et al.*, 2000).

Aproximadamente, el 7% de la diversidad genética en *P. johannis* se encontró entre poblaciones ($F_{ST} = 0.071$) (Cuadro 2.4). Los valores de índice de diferenciación (F_{ST}) variaron de 0.005 a 0.161 en los loci PGI1 y DIA1, respectivamente. El valor promedio de F_{ST} indicó un nivel moderado de diferenciación entre poblaciones semejante al nivel de diferenciación ($F_{ST} = 0.094$) que se reportó para *P. flexilis* James una especie de amplia distribución en Norte América (Jorgensen *et al.*, 2002). El nivel de diferenciación encontrado en *P. johannis* fue menor al nivel de diferenciación que se reportó para otras especies mexicanas tales como *P. pinceana* ($F_{ST} = 0.152$), *P. lagunae* ($F_{ST} = 0.188$), *P. muricata* ($F_{ST} = 0.161$), *P. greggii* ($F_{ST} = 0.379$) y *P. hartwegii* ($F_{ST} = 0.111$). (Ledig *et al.*, 2001; Molina-Freaner *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

En *P. johannis* se registró en promedio tres migrantes por generación (Nm) (Cuadro 2.4). El número promedio de migrantes que se encontró en *P. johannis* fue mayor que el número de migrantes en *P. pinceana* ($Nm = 1$) y *P. greggii* ($Nm = 1$) (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002). También, el número de migrantes en las poblaciones de *P. johannis* fue superior al número de migrantes que se reportó en *Abies flinckii* Rushforth ($Nm = 1$), *A. guatemalensis* ($Nm = 2$) y *A. religiosa* ($Nm = 1$) (Aguirre-Planter *et al.*, 2000). Al menos un migrante por generación puede evitar la diferenciación de las poblaciones por el efecto de deriva genética (Hartl y Clark, 2007). El número alto de migrantes en *P. johannis* puede ser una causa del nivel moderado de diferenciación entre poblaciones de esta especie.

Cuadro 2.4. Valores de los F-estadísticos de Wright para 16 loci en cuatro poblaciones de *Pinus johannis*.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	Nm
MDH1	-0.034	0.119	0.148	1
MDH2	0.419	0.437	0.031	8
MDH3	0.024	-0.016	0.008	32
MDH4	0.124	0.200	0.087	3
6PGD1	0.329	0.372	0.064	4
6PGD2	0.619	0.638	0.051	4
DIA1	0.314	0.425	0.161	1
G6PDH1	-0.374	-0.155	0.159	1
PGI1	0.114	0.118	0.005	49
PGI2	-0.030	0.010	0.039	6
ME1	-0.513	-0.370	0.095	2
PGM1	0.211	0.241	0.038	6
PGM2	0.182	0.210	0.033	7
SKD1	0.252	0.282	0.040	6
SKD2	0.270	0.288	0.025	10
IDH1	-0.003	0.012	0.015	16
Promedio	0.041	0.109	0.071	3

Nm = Flujo génico

La menor distancia genética (0.014) se encontró entre las poblaciones localizadas en La Siberia, Nuevo León y El Coahuilón, Coahuila (Cuadro 2.5; Figura 2.1); y la mayor distancia genética (0.043) se presentó entre las localidades de La Siberia, Nuevo León y Concepción del Oro, Zacatecas (Cuadro 5). Las distancias genéticas entre las poblaciones de *P. johannis* fueron menores que las distancias que se reportaron para otras especies mexicanas del género *Pinus* (Ledig *et al.*, 2001; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

Cuadro 2.5. Distancias genéticas entre cuatro poblaciones de *Pinus johannis*.

Población	Laguna de Sánchez	El Coahuilón	Concepción del Oro	La Siberia
Laguna de Sánchez	-----	0.034	0.042	0.018
El Coahuilón		-----	0.027	0.014
Concepción del Oro			-----	0.043

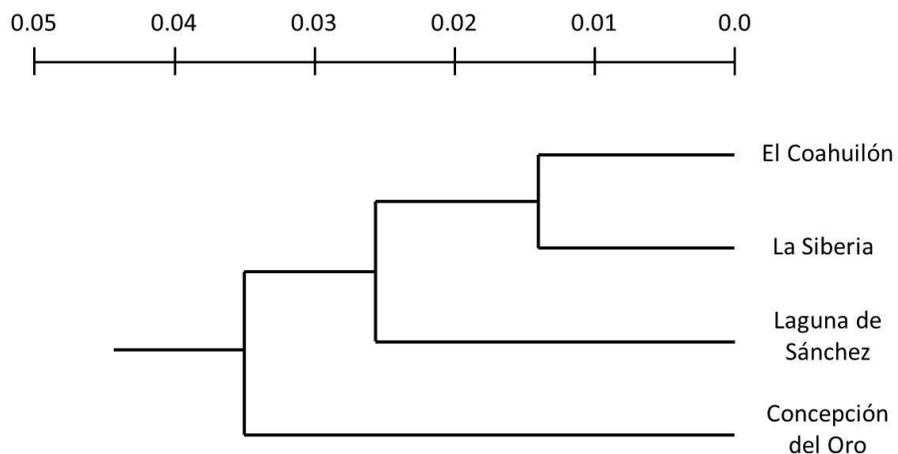


Figura 2.1. Agrupamiento de cuatro poblaciones de *Pinus johannis* con base en las Distancias Genéticas de Nei.

CONCLUSIONES

El porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada indicaron alta diversidad genética en las cuatro poblaciones muestreadas de *Pinus johannis*. Los índices de endogamia (F_{IT} y F_{IS}) mostraron niveles moderados de endogamia y un déficit de individuos heterocigóticos en *P. johannis*. Aproximadamente, el 7% de la diversidad genética en esta especie se encuentra entre poblaciones, y el nivel de diferenciación entre poblaciones es moderado.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Planter, E., G. R. Furnier and L. E. Eguiarte. 2000. Low level of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany* 87: 362-371
- Delgado, P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser and E. R. Alvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86: 669-676.
- Falconer, D. S. 1989. *Introduction to Quantitative Genetics*. 3rd ed. Longman Scientific & Technical. New York, USA. 438 p.
- Flores-Rentería, L., A. Vásquez-Lobo, A. V. Whipple, D. Piñero, J. Márquez-Guzmán and C. A. Domínguez. 2011. Functional bisporangiate cones in *Pinus johannis* (Pinaceae): implications for the evolution of bisexuality in seed plants. *American Journal of Botany* 98: 130-139.

- Flores-Rentería, L., F. Molina-Freaner, A. V. Whipple, C. A. Gehring and C. A. Domínguez. 2013. Sexual stability in the nearly dioecious *Pinus johannis* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 100: 602-612.
- Fowler, D. P. and R. W. Morris. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. *Canadian Journal of Forest Research*. 7: 343-347.
- Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 617 p.
- García, A. A. y M. Passini. 1993. Distribución y ecología de *Pinus johannis* M. F. Robert. *Phytologia* 74: 125-127.
- Haig, S. M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt and S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.
- Hartl, D. and A. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4ta. ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA. 651 p.
- Jiménez, P. y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación Agrícola: Sistemas de Recursos Forestales* 2: 237-248.
- Jorgensen, S., J. L. Hamrick and P. V. Wells. 2002. Regional patterns of genetic diversity in *Pinus flexilis* (Pinaceae) reveal complex species history. *American Journal of Botany* 89: 792-800.
- Ledig, F. T. and M. T. Conkle. 1983. Gene diversity and genetic structure in narrow endemic, torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution* 37: 79-85.

- Ledig, F. T., M. T. Conkle, B. Bermejo-Velázquez, T. Eguiluz-Piedra, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson and W. S. Dvorak. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53: 91-99.
- Ledig, F. T., B. Bermejo-Velázquez, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson, C. Flores-López and V. Jacob-Cervantes. 2000. The mating system and genetic diversity in Martinez spruce, and extremely rare endemic of Mexican Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Canadian Journal Research*. 30: 1156-1164.
- Ledig, F. T., M. A. Capó-Arteaga, P. D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. T. Conkle and B. Bermejo-Velázquez. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88: 1977-1987.
- López R., G. F. 1998. *Botánica. Anatomía, Morfología y Diversidad*. Universidad Autónoma Chapingo. 281 p.
- Luna-Cavazos, M., A. Romero-Manzanares y E. García-Moya. 2008. Afinidades en la flora genérica de piñonares del norte y centro de México: un análisis fenético. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 449-458.
- Marshall, D. R. and A. H. D. Brown 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. *In*: Frankel, O. H., and J. G. Hawkes (eds). *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge University Press, London. pp: 53-80.

- Molina-Freaner, F., P. Delgado, D. Piñero, N. Perez-Nasser and E. Alvarez-Buylla. 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany* 79: 131-138.
- NFGEL (National Forest Genetics Laboratory). 2003. Standard operating procedures for starch gel electrophoresis. United States Department of Agriculture. California. 90 p.
- Neel, J. V. 1973. "Private" genetic variants and the frequency of mutation among South American Indians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3311-3315.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. p: 159-164
- Parraguirre L., C., J. J. Vargas H., P. Ramírez V., H. S. Azpíroz R. y J. Jasso M. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 279-287.
- Perry, J. P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, Oregon. 231 p.
- Potter, K.M., W. S. Dvorak, B. S. Crane, V. D. Hipkins, R. M. Jetton, W. A. Whittier and R. Rhea. 2008. Allozyme variation and recent evolutionary history of eastern hemlock (*Tsuga canadensis*) in the southeastern United States. *New Forests* 35: 131–145.
- Robert, M. F. 1978. Un nouveau pin pignon mexicain: *Pinus johannis* M. F. Robert. *Adansonia* 18: 365-377.

- Romero M., A., E. García y M. Passini. 1996. *Pinus cembroides* y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano: una síntesis. *Acta Botanica Gallica* 143: 681-693.
- Romero M., A., M. Luna, E. García M. y M. Passini. 2000. Phenetic analysis of the Mexican midland pinyon pines, *Pinus cembroides* and *Pinus johannis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 181-194.
- Romero M., A. y E. García M. 2002. Estabilidad y elasticidad de la composición florística de los piñonares de San Luis Potosí, México. *Agrociencia* 36: 243-254.
- Rozzi, R., P. Feinsinger, F. Massardo y R. Primack. 2001. ¿Qué es la diversidad biológica? *In*: Primack, R., R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo, y F. Massardo (eds). *Fundamentos de Conservación Biológica*. Fondo de Cultura Económica. México D.F.. pp: 59-97.
- SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. México. 30 de diciembre de 2010. Segunda sección. 78 p.
- Sneath, H.A. and R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman. California Estados Unidos de América. 573 p.
- Viveros-Viveros, H., B. L. Tapia-Olivares, C. Sáenz-Romero, J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, A. Santacruz-Varela y G. Ramírez-Valverde. 2010. Variación isoenzimática de *Pinus hartwegii* Lindl. en un gradiente altitudinal en Michoacán, México. *Agrociencia* 44: 723-733.

- Wendel, J. F. and N. F. Weenden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In*: Soltis, D. E. and P. S. Soltis (eds.). *Isozymes in Plant Biology*. Portland, Oregon. pp: 5-45
- Yeh, F., R. Yang and T. Boyle. 1997. Popgene. Versión 1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research.
- Zavarin, E. and K. Snajberk. 1986. Monoterpenoid differentiation in relation to the morphology of *Pinus discolor* and *Pinus johannis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 14: 1-11.

CAPITULO III. SISTEMA DE CRUZAMIENTO EN *PINUS JOHANNIS*

RESUMEN

Pinus johannis M.-F. Robert es una especie endémica que crece en los estados de Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Querétaro. El sistema de cruzamiento influye en el nivel y patrón de diversidad genética y estructura genética de una especie. En el presente estudio se planteó el objetivo de estimar la tasa de cruzamiento en *Pinus johannis*. Se utilizaron 127 familias, provenientes de cuatro poblaciones, para calcular el sistema de cruzamiento. Se determinó el genotipo de seis embriones por árbol. Las frecuencias alélicas del polen oscilaron entre 0.001 y 0.990 y fueron iguales a las de los óvulos. La tasa de cruzamiento promedio calculadas por los estimadores multilocus (t_m) y locus individual (t_s) fue de 0.84. Correlación promedio de paternidad (r_p) fue de 0.17. *P. johannis* presentó una tasa de cruzamiento baja.

Palabras clave: endémica, sistema de cruzamiento, isoenzimas, endogamia

ABSTRACT

Pinus johannis M.-F. Robert is a Mexican species that grows in isolated population in Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí and Querétaro States. The mating systems influence the level and pattern of genetic diversity and genetic structure of a species. The outcrossing rate was estimated in *Pinus johannis*. Cones of 127 trees from four populations were collected. Six megagametophytes were used to know the genotypes of each sampled tree. The genotypes of six embryos per tree were determined. The allele frequencies of the pollen varied from between 0.001 and 0.990. The allele frequencies of the ovules were the same than those of the pollen. The average correlation (r_p) of paternity was 0.17. *Pinus johannis* showed a low outcrossing rate.

Key words:, endemic, isoenzymes, outcrossing rate, selfing

INTRODUCCION

Pinus johannis M.-F. Robert es una especie endémica que crece en poblaciones aisladas en los estados de Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Querétaro en altitudes entre los 2400 y 2800 metros, y una precipitación promedio anual de 300 a 400 mm (Perry, 1991; Romero *et al.*, 1996). Esta especie está enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 dentro de la categoría de protección especial (SEMARNAT, 2010).

Los árboles de *P. johannis* tienen utilidad ornamental y potencial para reforestar áreas degradadas con baja precipitación, se aprovecha para leña y sus semillas son comestibles (Perry, 1991). Las copas de los árboles de este pino piñonero proporcionan sombra que disminuye la evaporación formando un microclima que favorece el crecimiento de especies herbáceas y arbustivas (Romero y García, 2002). Las características morfológicas (oleorresinas) y monoterpenos de *P. johannis* se han usado como modelo biológico para explicar eventos evolutivos y discrepancias taxonómicas del género *Pinus* (Zavarin y Snajberk, 1986; Romero *et al.*, 1996; 2000); la disposición de los conos de *P. johannis* sirvió para inferir el origen y la evolución de la bisexualidad en angiospermas y gimnospermas (Flores-Rentería *et al.*, 2011).

El sistema de cruzamiento es la forma en la cual la información genética se transmite de una generación a la siguiente por lo que influye en el nivel y patrón de diversidad genética así como la estructura genética de una especie (Charlesworth, 2006). El tipo de apareamiento en plantas puede ser identificado como autofecundación y cruzamiento entre individuos (White *et al.*, 2007). La forma de transmitir la información a la generación siguiente influye en la proporciones genotípicas de la descendencia (Höglund, 2009). La autofecundación es el nivel máximo de endogamia la cual favorece la homocigosis en una población, favoreciendo la

pérdida de diversidad dentro poblaciones y aumentando la diferenciación entre éstas (Hartl y Clark, 2007). Una consecuencia de la endogamia puede ser la depresión endogámica la cual disminuye la capacidad adaptativa de individuos de una especie al aumentar la probabilidad de que alelos deletéreo se manifiesten en genotipos homocigótico (Hartl y Clark, 2007).

Las especies del género *Pinus* son plantas monoicas, en las cuales las estructuras reproductivas masculinas y femeninas se encuentran en la misma planta, por lo que la reproducción se puede realizar por autofecundación o por cruzamiento entre árboles diferentes (White *et al.*, 2007). Este tipo de cruzamiento se conoce como mixto (Ritland, 2002). La producción de semillas vanas y tasas bajas de crecimiento son algunas de las consecuencia de autofecundación en especies de coníferas (Rajora *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2003). Por otro lado, *P. johannis* se considera una especie casi dioica, en la cual las estructuras reproductivas femeninas y masculinas se producen en diferentes individuos contrariamente a la mayor de especies en el género *Pinus* (Flores-Rentería *et al.*, 2013). Por lo antes expuesto se esperaría que la tasa de cruzamiento entre individuos de *Pinus johannis* sea producto de apareamiento entre individuos diferentes con prácticamente ninguna posibilidad de autofecundación, por lo que en el presente estudio se planteó el objetivo de estimar la tasa de cruzamiento en *Pinus johannis*.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó semilla de 127 árboles de cuatro poblaciones en los estados de Nuevo León, Coahuila y Zacatecas (Cuadro 3.1). En cada población, la distancia mínima entre árboles fue de 30 m, para evitar el muestreo de individuos emparentados. Los estróbilos de cada árbol se

colocaron en bolsas de papel las cuales se marcaron con un número consecutivo y con el nombre de la población para su identificación antes de su transporte al laboratorio de semillas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), donde la semilla se benefició. Las semillas vanas se separaron de las semillas llenas por flotación en agua. Las semillas llenas de cada árbol se colocaron en bolsas de plástico. Las bolsas con las semillas de cada árbol se mantuvieron en un cuarto frío a -7°C en el laboratorio de Postgrado Forestal del Colegio de Postgraduados, hasta el momento del análisis electroforético. La identificación de la semilla se mantuvo durante todo el estudio.

Cuadro 3.1. Localización de las cuatro poblaciones de *Pinus johannis* estudiadas.

Población	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
Laguna de Sánchez	Villa de Santiago, N.L.	25° 21' 26'' N	100° 20' 35'' O	2223
El Coahuilón	Arteaga, Coah.	25° 14' 49'' N	100° 23' 17'' O	2720
Concepción del Oro	Mazapil, Zac.	24° 37' 02'' N	101° 27' 59'' O	2500
La Siberia	Zaragoza, N.L.	23° 52' 02'' N	99° 48' 16'' O	2620

N.L.= Nuevo León, Coah. = Coahuila, Zac. = Zacatecas.

Seis semillas de cada árbol de *P. johannis* se germinaron sobre toallas de papel absorbente en el interior de cajas de plástico de 21 x 27 cm, a las cuales se les agregó 200 ml de agua potable. Las cajas con las semillas se taparon y se colocaron en una estufa a una temperatura de 25°C durante una semana para la germinación de las semillas.

Posteriormente las semillas de las cajas se lavaron, secaron, y se rompió la testa de cada semilla para separar el embrión y megagametofito de cada una de éstas. En las coníferas, el embrión es tejido diploide que hereda los genomas tanto del árbol madre como del árbol padre; mientras que el megagametofito de la semilla es tejido haploide que únicamente contiene el genotipo del árbol madre (Ledig *et al.*, 2001). Por lo tanto, determinando el genotipo de seis megagametofito se puede conocer el genotipo del árbol madre con una probabilidad de error de $0.03 (2 \cdot (1/2)^n)$ donde n es el número de megagametofitos) y, conociendo también el genotipo del embrión, por diferencia, se puede deducir la contribución paterna (Ledig *et al.*, 2001).

Una porción del megagametofito y su respectivo embrión, de cada una de las seis semilla de cada árbol, fueron colectados por separado en una gradilla de plástico con 96 pozos, previamente etiquetada, y molidos en frío utilizando un micropistilo de plástico y agregando 50 μ L de 0.2 M amortiguador de fosfato de sodio a un pH de 0.7 (NFGEL, 2003). Después de moler las muestras las gradillas fueron cerradas y guardadas en un congelador a -20 °C.

Para realizar el análisis de electroforesis, las muestras fueron colocadas sobre hielo para descongelarlas y evitar la desnaturalización de las enzimas; se introdujo una tira de papel Whatman No. 5 de 12 x 1 mm en cada muestra para que absorbieran el sustrato en cada pozo de la gradilla. Posteriormente, las tiras de papel se colocaron en un gel de almidón al 10%. Como control se colocaron seis tiras de papel Whatman No. 5 con muestra de semillas de *Pinus resinosa* Aiton, especie sin diversidad aloenzimática (Fowler y Morris, 1977).

En la electroforesis se incluyeron tres sistemas enzimáticos con un total de siete loci: Diaforasa (DIA, EC 1.6.99.1) y Malato deshidrogenasa (MDH, EC.1.1.1.37) se analizaron

utilizando amortiguador para gel y electrodo de 0.040 M ácido cítrico y 0.068 M N-(3-Aminopropil)-morfolina con pH 6.1; mientras que Fosfoglucomutasa (PGM, EC.5.4.2.2) se analizó utilizando amortiguador para gel de 0.005 M L-Histidina con pH 7.0 y amortiguador para electrodo de ácido cítrico 0.410 M, también de pH 7.0 (Wendel y Weeden, 1989; NFGEL, 2003).

Para inferir la contribución paterna de cada embrión se corrió conjuntamente el megagametofito y el embrión de cada semilla. Los loci encontrados se nombraron de acuerdo al nombre abreviado del sistema enzimático, y cuando se identificó más de un locus, estos se enumeraron consecutivamente a partir del locus que se desplazó más rápido. La numeración de los alelos dentro de cada locus se realizó de acuerdo al alelo con mayor frecuencia.

Conociendo la contribución paterna y materna en los embriones, se calculó la frecuencia alélica de las muestras de polen y de óvulos para determinar si ambas presentan el mismo tamaño en cada población.

El sistema de cruzamiento en plantas se describe por el modelo de cruzamiento mixto (Brown *et al.*, 1989; Ritland, 2002): $t_m + s = 1$ o $t_s + s = 0$ donde: t_m y t_s son la tasa multilocus de cruzamiento y la tasa locus individual de cruzamiento, respectivamente. La tasa multilocus de cruzamiento (t_m) y tasa locus individual de cruzamiento (t_s) se calcularon con el programa de apareamiento multilocus (MLTR) versión 3.2. con el método numérico Newton-Raphson (Ritland, 2002). La desviación estándar se determinó con base en 1500 bootstrapping. Se calculó la correlación de paternidad de cruzamiento (r_p) entre progenies dentro de familias (Ritland, 2002)

RESUTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los casos las frecuencias alélicas del polen fueron iguales a las frecuencias alélicas de los óvulos, las cuales oscilaron entre 0.001 y 0.990 (Cuadro 3.2). Esta igualdad puede indicar que las frecuencias alélicas del polen representan las frecuencias alélicas locales de los árboles maternos, y que factores ecológicos o anatómicos pueden estar afectando la dispersión del polen; como en el caso de *Larix occidentalis* Nutt., que no presenta diferencias significativas entre las frecuencias alélicas del polen y óvulos (El-Kassaby y Jaquish, 1996).

Cuadro 3. 2. Frecuencias alélicas de polen y óvulos en cuatro poblaciones de *Pinus johannis*.

Locus	Alelo	Polen	Óvulo
DIA	1	0.988 ± 0.0001†	0.988 ± 0.0001
	2	0.012 ± 0.0001	0.012 ± 0.0001
MDH1	1	0.805 ± 0.0009	0.805 ± 0.0009
	2	0.195 ± 0.0009	0.195 ± 0.0009
MDH2	1	0.991 ± 0.0012	0.991 ± 0.0012
	2	0.009 ± 0.0012	0.009 ± 0.0012
MDH3	1	0.998 ± 7.9619 ⁻⁰⁵	0.998 ± 7.9619 ⁻⁰⁵
	2	0.002 ± 3.9809 ⁻⁰⁵	0.002 ± 3.9809 ⁻⁰⁵
	3	0.001 ± 3.9809 ⁻⁰⁵	0.001 ± 3.9809 ⁻⁰⁵
MDH4	1	0.955 ± 0.0006	0.955 ± 0.0006
	2	0.045 ± 0.0006	0.045 ± 0.0006
PGM1	1	0.931 ± 0.0015	0.931 ± 0.0015
	2	0.069 ± 0.0015	0.069 ± 0.0015
PGM2	1	0.905 ± 0.0011	0.905 ± 0.0011
	2	0.095 ± 0.0011	0.095 ± 0.0011

† = Error estándar

La tasa multilocus de cruzamiento y la tasa locus individual de cruzamiento fueron iguales para todos los loci incluidos en el presente estudio (Cuadro 3.3). Esto indicó que la totalidad de la endogamia se dio por autofecundación (Ritland, 2002). La t_m y t_s promedios fueron 0.84 y oscilaron entre 0.53 para el locus PGM1 y 1.00 para el locus MDH3 (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Tasa multilocus de cruzamiento (t_m), tasa locus individual de cruzamiento (t_s) y correlación de paternidad (r_p) en *Pinus johannis*.

Locus	N	t_m	t_s	r_p
DIA	631	0.93 ± 0.004†	0.93 ± 0.004	0.22 ± 0.023
MDH1	631	0.76 ± 0.003	0.76 ± 0.086	0.62 ± 0.009
MDH2	631	0.95 ± 0.008	0.95 ± 0.008	-0.83 ± 0.026
MDH3	631	1.00 ± 0.011	1.00 ± 0.011	-0.13 ± 0.032
MDH4	631	0.76 ± 0.006	0.76 ± 0.006	0.70 ± 0.018
PGM1	352	0.53 ± 0.015	0.53 ± 0.015	0.25 ± 0.026
PGM2	352	0.98 ± 0.006	0.98 ± 0.006	0.38 ± 0.012
Promedio	551	0.84	0.84	0.17

†=Error estándar.

Las tasas (t_m y t_s) de cruzamiento encontradas en *P. johannis* fueron muy similares a las tasas de cruzamiento reportadas en *P. maximartinezii* Rzedowski ($t_m = 0.82$) y *P. albicaulis* Engelm ($t_m = 0.86$ y $t_s = 84$) (Ledig *et al.*, 1999; Bouler y Aiken, 2007). Sin embargo, la tasa de cruzamiento en *P. johannis* fue mayor a la tasa de cruzamiento encontrada en *P. cembra* L. ($t_m = 0.70$) y *P. chiapensis* Mart. ($t_m = 0.49$) (Politov *et al.*, 2008; Del Castillo y Trujillo, 2008). En *P. attenuata* Lemmon ($t_m = 0.93$), *P. pinceana* Gordon ($t_m = 0.9$), *P. strobus* L. ($t_m = 0.92$), *P.*

greggii Engelm ($t_m = 0.9$) y *P. pinaster* Aiton ($t_m = 0.98$) se encontraron tasas de cruzamiento mayores que las encontrada en *P. johannis* (Burczyk *et al.*, 1997; Ledig *et al.*, 2001; Rajora *et al.*, 2002; Parraguirre-Lezama *et al.*, 2004; De-Lucas *et al.*, 2008).

Los valores de correlación de paternidad (r_p) fueron positivas para los loci DIA, MDH1, MDH4, PGM1 y PGM2, mientras que los valores de correlación de paternidad para los loci MDH2 y MDH3 fueron negativos (Cuadro 3.3). Los valores positivos de correlación de paternidad encontrados indicaron estructura genética en *P. johannis*. La correlación promedio de paternidad indicó que si se seleccionan aleatoriamente dos individuos de la misma familia de polinización libre de *P. johannis*, la probabilidad de compartir el mismo padre sería de 0.17. Los valores de correlación de paternidad variaron de -0.83 para el locus MDH2 a 0.70 para el locus MDH4 (Cuadro 3.3). Los valores de correlación de paternidad encontrados en el presente estudio fueron mayores que los encontrado en *P. chiapensis* (-0.20 y 0.05) y *P. parviflora* Siebold *et* Zucc. var. *parviflora* (0.036 a 0.611) (Del Castillo y Trujillo, 2008; Iwasaki *et al.*, 2013). Sin embargo, el valor promedio de correlación de paternidad fue similar al reportado en *P. sylvestris* L. ($r_p = 0.196$) (Robledo-Anuncio *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

La tasa de cruzamiento en *Pinus johannis* fue baja. Los valores estimados de tasa de cruzamiento a través de multilocus (t_m) y locus individual (t_s) estimadores fueron iguales para todos los loci incluidos indicando que la totalidad de la endogamia fue por autofecundación. Los valores de correlación de paternidad (r_p) encontrados en *P. johannis* fueron cercanos a uno señalando estructura genética en la especie.

LITERATURA CITADA

- Bouler A. D. and S. N. Aiken. 2007. Mating system and inbreeding depression in whitebark pine (*Pinus albicaulis* Engelm). *Tree Genetics & Genomes* 3: 379-388.
- Brown, A. H. D., J. J. Burdon and A. M. Jarosz. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems. *In: Soltis, D. E. and P. S. Soltis (eds). Izozymes in Plant Biology. Dioscorides Press. Portland, Oregon, USA. pp: 73-86*
- Burczyk, J., W. T. Adams and J. Y. Shimizu. 1997. Mating system and genetic diversity in natural population of knobcone pine (*Pinus attenuata*). *Forest Genetics* 4: 223-226.
- Charlesworth, D. 2006. Evolution of plant breeding system. *Current Biology* 16: 726-735.
- De-Lucas, A., J. J. Robledo-Arnuncio, E. Hidalgo and S. C. González-Martínez. 2008. Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine. *Heredity* 100: 390-399.
- Del Castillo, R. F. and S. Trujillo. 2008. Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. *New Phytologist* 177: 517-524.
- El-Kassaby, Y. A. and B. Jaquish. 1996. Populations density and mating pattern in western larch. *Journal of Heredity* 87: 438-443.
- Flores-Rentería, L., A. Vásquez-Lobo, A. V. Whipple, D. Piñero, J. Márquez-Guzmán and C. A. Domínguez. 2011. Functional bisporangiate cones in *Pinus johannis* (Pinaceae): implications for the evolution of bisexuality in seed plants. *American Journal of Botany* 98: 130-139.
- Flores-Rentería, L., F. Molina-Freaner, A. V. Whipple, C. A. Gehring and C. A. Domínguez. 2013. Sexual stability in the nearly dioecious *Pinus johannis* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 100: 602-612.

- Fowler, D. P. and R. W. Morris. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. *Canadian Journal of Forest Research* 7: 343-347.
- Hartl, D. and A. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4th ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA. 651 p.
- Höglund J. 2009. *Evolutionary Conservation Genetics*. Oxford University Press Inc. New York, USA. 189 p.
- Iwasaki, T., T. Sase, S. Takeda, T. A. Ohsawa, K. Osaki, N. Tani, H. Ikada, M. Suzuki, R. Endo, K. Tohei and Y. Watano. 2013. Extensive selfing in an endangered population in *Pinus parviflora* var. *parviflora* (Pinaceae) in the Boso Hills, Japan. *Tree Genetics & Genomes* 9: 693-705.
- Johnsen K.H., J.E. Major and C.A. Mier. 2003. Selfing results inbreeding depression but not gas exchange of surviving adult black spruce trees. *Tree Physiology* 23: 1005-1008.
- Ledig, F. T., T. Conkle, B. Bermejo-Velázquez, T. Eguiluz-Piedra, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson and W. S. Dvorak. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53: 91-99.
- Ledig, F. T., M. A. Capó-Arteaga, P. D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. T. Conkle and B. Bermejo-Velázquez. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88: 1977-1987.
- NFGEL (National Forest Genetics Laboratory). 2003. Standard operating procedures for starch gel electrophoresis. United States Department of Agriculture. California. 90 p.

- Parraguirre-Lezama, C., J. J. Vargas-Hernández, P. Ramírez-Vallejo y C. Ramírez-Herrera. 2004. Sistema de cruzamiento en cuatro poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Agrociencia* 38: 107-119.
- Perry, J. P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon. 231 p.
- Politov, D. V., Y. V. Pirko, N. N. Pirko, E. A. Mudrik and I. I. Korshikov. 2008. Analysis of mating system in two *Pinus cembra* L. populations of the Ukrainian Carpathians. *Annals of Forest Research* 51: 11-18.
- Rajora, O. P., A. Mosseler and J. E. Major. 2002. Mating system and reproductive fitness traits of eastern white pine (*Pinus strobus*) in large, central versus small, isolated, marginal populations. *Canadian Journal of Botany* 80: 1173-1184.
- Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Robledo-Anuncio, J. J., R. Alía and L. Gil. 2004. Increased self and correlation paternity in small population of a predominant outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology* 13: 2567-2577.
- Romero M., A., E. García y M. Passini. 1996. *Pinus cembroides* y *Pinus johannis* del Antiplano Mexicano: una síntesis. *Acta Botánica Gallica* 143: 681-693.
- Romero M., A., M. Luna, E. García M. y M. Passini. 2000. Phenetic analysis of the Mexican midland pinyon pines, *Pinus cembroides* and *Pinus johannis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 181-194.

- Romero M., A. y E. García M. 2002. Estabilidad y elasticidad de la composición florística de los piñonares de San Luis Potosí, México. *Agrociencia* 36: 243-254.
- SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. México. 30 de diciembre de 2010. Segunda sección. 78 p.
- Wendel, J. F. and N. F. Weenden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In*: Soltis, D. E. and P. S. Soltis (eds.). *Isozymes in Plant Biology*. Portland, Oregon. pp: 5-45
- White, T. L., T. W. Adams and D. B. Neale. 2007. *Forest Genetics*. CAB International, Oxford. 682 p.
- Zavarin, E. and K. Snajberk. 1986. Monoterpenoid differentiation in relation to the morphology of *Pinus discolor* and *Pinus johannis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 14: 1-11.

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN GENERAL

En las cuatro poblaciones de *P. johannis* el número de alelos en los 16 loci muestreados varió entre 31 y 35 alelos. La mayoría de alelos fueron alelos comunes con una frecuencia mayor a 0.05. Laguna de Sánchez y Concepción del Oro presentaron el mayor número de alelos totales y alelos raros. En Laguna de Sánchez, Concepción del Oro y La Siberia se encontró un alelo privado en cada una de éstas.

El promedio de alelos por locus fue de 2.1. El mayor número de alelos por locus se encontró en Laguna de Sánchez y Concepción del Oro, mientras el menor número de alelos por locus se registró en La Siberia. En estudios previos con isoenzimas de especies del género *Pinus*, con características de distribución geográfica semejantes a *P. johannis*, se han encontrado valores promedio de alelos por locus entre 1.8 y 2.5 (Delgado *et al.*, 1999; Ledig *et al.*, 2001; Molina-Freaner *et al.*, 2001).

El porcentaje de loci polimórficos de las poblaciones muestreadas de *P. johannis*, varió de 75 a 100 %, lo que fue alto con respecto a otras coníferas que crecen en una distribución restringida. Por ejemplo, los porcentajes de loci polimórficos en *P. torreyana* Parry ex Carr. y *P. maximartinezii* Rzedowski, fueron de 0 y 30 %, respectivamente (Ledig y Conkle, 1983; Ledig *et al.*, 1999). *P. pinceana* Gordon, otra especie endémica de la sierra Madre Oriental y listada como en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010), tuvo un 57% de loci polimórficos, menor que el encontrado en las poblaciones muestreadas de *P. johannis* (Ledig *et al.*, 2001). También, el porcentaje de loci polimórficos en *P. johannis* fue mayor que los porcentaje de loci polimórficos encontrado en *P. hartwegii* Lindl. (58%) y *P. greggii* Engelm. (32%) dos especies de mayor distribución que *P. johannis* (Viveros-Viveros *et al.*, 2010; Parraguirre *et al.*, 2002).

La mayor heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) se encontraron en Concepción del Oro, en el estado de Zacatecas, mientras que la menor heterocigosidad observada esperada se observaron en La Siberia en el Estado de Nuevo León. La heterocigosidad esperada o diversidad genética en *P. johannis* fue alta comparada con la heterocigosidad promedio esperada (0.169) en varias especies de coníferas (Hamrick *et al.*, 1992). También, se registró mayor heterocigosidad esperada en *P. johannis* que reportada en otras especies del género *Pinus* en México (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010). Sin embargo, la heterocigosidad esperada en *P. johannis* fue menor que las heterocigosidades esperadas que se encontrada en *P. lagunae* M.F. Passini (0.386) y *P. muricata* D. Don (0.346), aunque la estimación de la heterocigosidad esperada promedio en estas especies se realizó con base en únicamente loci polimórficos (Molina-Freaner *et al.*, 2001). Con base en los valores de los parámetros genéticos se encontró niveles altos de diversidad genética en *P. johannis*.

El índice de fijación promedio (F) fue positivo en las poblaciones de *P. johannis*, con valores que variaron entre 0.020 a 0.277, indicando niveles diferentes de endogamia en cada población. Es común esperar niveles altos de endogamia en poblaciones pequeñas (Hart y Clark, 2007). El índice promedio de fijación (F) en *P. johannis* fue ligeramente superior al índice promedio de fijación (0.116) que se reportó para ocho poblaciones de *P. pinceana*, una especie que crece en poblaciones aisladas en la sierra Madre Oriental (Ledig *et al.*, 2001). Sin embargo, el índice de fijación en *P. johannis* fue inferior al encontrado en *Tsuga canadensis* [L.] Carr. ($F = 0.443$), una conífera que tiene amplia distribución en el este de América del Norte (Potter *et al.*, 2008).

El índice de endogamia (F_{IS}) promedio a nivel población, con un valor positivo, indicó un nivel bajo de endogamia, sin embargo, considerando las cuatro poblaciones juntas, el índice de endogamia promedio (F_{IT}) indicó un nivel de endogamia mayor. El índice de endogamia (F_{IS}) a nivel población mostró deficiencia de individuos heterocigóticos en 11 de los 16 loci polimórficos, mientras que el índice de endogamia (F_{IT}), considerando las cuatro poblaciones juntas, indicó una deficiencia de individuos heterocigóticos en 13 de los 16 loci polimórficos incluidos en el presente estudio. En otras especies mexicanas del género *Pinus* se reportaron índices de endogamia mayores que los encontrados en *P. johannis*. Por ejemplo, los índices de endogamia (F_{IS} y F_{IT}) que se registraron en este pino fueron menores a los índices de endogamia ($F_{IS} = 0.140$ y $F_{IT}=0.271$) que se encontraron en *P. pinceana* (Ledig *et al.*, 2001). El índice de endogamia en *P. johannis* fue menor que los índices de endogamia que se encontraron en *Abies hickeli* Flous *et Gausen* ($F_{IS} = 0.121$), *A. guatemalensis* Reheder ($F_{IS} = 0.235$ y $F_{IT}=0.122$), *A. religiosa* (H.B.K) Schltld. *et Cham.* ($F_{IS}=0.216$ y $F_{IT}=0.250$), gimnospermas que crecen en las montañas mexicanas (Aguirre-Planter *et al.*, 2000).

Aproximadamente, el 7% de la diversidad genética en *P. johannis* se encontró entre poblaciones ($F_{ST} = 0.071$). Los valores de índice de diferenciación (F_{ST}) variaron de 0.005 a 0.161 en los loci PGI1 y DIA1, respectivamente. El valor promedio de F_{ST} indicó un nivel moderado de diferenciación entre poblaciones semejante al nivel de diferenciación ($F_{ST} = 0.094$) que se reportó para *P. flexilis* James una especie de amplia distribución en Norte América (Jorgensen *et al.*, 2002). El nivel de diferenciación encontrado en *P. johannis* fue menor al nivel de diferenciación que se reportó para otras especies mexicanas tales como *P. pinceana* ($F_{ST} = 0.152$), *P. lagunae* ($F_{ST} = 0.188$), *P. muricata* ($F_{ST} = 0.161$), *P. greggii* ($F_{ST} = 0.379$) y *P. hartwegii*

($F_{ST} = 0.111$). (Ledig *et al.*, 2001; Molina-Freaner *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

En *P. johannis* se registró en promedio tres migrantes por generación (Nm). El número promedio de migrantes que se encontró en este piñonero fue mayor que el número de migrantes en *P. pinceana* ($Nm = 1$) y *P. greggii* ($Nm = 1$) (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002). También, el número de migrantes en las poblaciones de *P. johannis* fue superior al número de migrantes que se reportó en *Abies flinckii* Rushforth ($Nm = 1$), *A. guatemalensis* ($Nm = 2$) y *A. religiosa* ($Nm = 1$) (Aguirre-Planter *et al.*, 2000). Al menos un migrante por generación puede evitar la diferenciación de las poblaciones por el efecto de deriva genética (Hartl y Clark, 2007). El número alto de migrantes en *P. johannis* puede ser una causa del nivel moderado de diferenciación entre poblaciones de esta especie.

La menor distancia genética (0.014) se encontró entre las poblaciones localizadas en La Siberia, Nuevo León y El Coahuilón, Coahuila; y la mayor distancia genética (0.043) se presentó entre las localidades de La Siberia, Nuevo León y Concepción del Oro, Zacatecas. Las distancias genéticas entre las poblaciones de *P. johannis* fueron menores que las distancias que se reportaron para otras especies mexicanas del género *Pinus* (Ledig *et al.*, 2001; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

En todos los casos las frecuencias alélicas del polen fueron iguales a las frecuencias alélicas de los óvulos, las cuales oscilaron entre 0.001 y 0.990. Esta igualdad puede indicar que las frecuencias alélicas del polen representan las frecuencias alélicas locales de los árboles maternos, y que factores ecológicos pueden estar afectando la dispersión del polen; como en

el caso de *Larix occidentalis*, que no presenta diferencias significativas entre las frecuencias alélicas del polen y óvulos (El-Kassaby y Jaquish, 1996).

La tasa multilocus de cruzamiento y la tasa locus individual de cruzamiento fueron iguales para todos los loci incluidos en el presente estudio. Esto indicó que la totalidad de la endogamia se dio por autofecundación (Ritland, 2002). La t_m y t_s promedio fue de 0.84 y oscilaron entre 0.53 para el locus PGM1 y 1.00 para el locus MDH3.

Las tasas (t_m y t_s) de cruzamiento encontradas en *P. johannis* fueron muy similares a las tasas de cruzamiento reportadas en *P. maximartinezii* Rzedowski ($t_m = 0.82$) y *P. albicaulis* Engelm ($t_m = 0.86$ y $t_s = 84$) (Ledig *et al.*, 1999; Bouler y Aiken, 2007). Sin embargo, la tasa de cruzamiento en *P. johannis* fue mayor a la tasa de cruzamiento encontrada en *P. cembra* L. ($t_m = 0.70$) y *P. chiapensis* Mart. ($t_m = 0.49$) (Politov *et al.*, 2008; Del Castillo y Trujillo, 2008). En *P. attenuata* Lemmon ($t_m = 0.93$), *P. pinceana* Gordon ($t_m = 0.9$), *P. strobus* L. ($t_m = 0.92$), *P. greggii* Engelm ($t_m = 0.9$) y *P. pinaster* Aiton ($t_m = 0.98$) se encontraron tasas de cruzamiento mayores que las encontrada en *P. johannis* (Burczyk *et al.*, 1997; Ledig *et al.*, 2001; Rajora *et al.*, 2002; Parraguirre-Lezama *et al.*, 2004; De-Lucas *et al.*, 2008).

Los valores de correlación de paternidad (r_p) fueron positivas para los loci DIA, MDH1, MDH4, PGM1 y PGM2, mientras que los valores de correlación de paternidad para los loci MDH2 y MDH3 fueron negativos. Valores positivos de correlación de paternidad mostraron estructura genética en *P. johannis*. La correlación promedio de paternidad indicó que si se seleccionan aleatoriamente dos individuos de la misma familia de polinización libre de *P. johannis*, la probabilidad de compartir el mismo padre sería de 0.17. Los valores de correlación de paternidad variaron de -0.83 para el locus MDH2 a 0.70 para el locus MDH4. Los valores de

correlación de paternidad encontrados en el presente estudio fueron mayores que los encontrado en *P. chiapensis* (-0.20 y 0.05) y *P. parviflora* Siebold et Zucc. var. *parviflora* (0.036 a 0.611) (Del Castillo y Trujillo, 2008; Iwasaki *et al.*, 2013). Sin embargo, el valor promedio de correlación de paternidad fue similar al reportado en *P. sylvestris* L. ($r_p = 0.196$) (Robledo-Anuncio *et al.*, 2004).

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Planter, E., G. R. Furnier, and L. E. Eguiarte. 2000. Low level of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany* 87: 362-371.
- Bouler A. D. and S. N. Aiken. 2007. Mating system and inbreeding depression in whitebark pine (*Pinus albicaulis* Engelm). *Tree Genetics & Genomes* 3: 379-388.
- Burczyc, J., W. T. Adams and J. Y. Shimizu. 1997. Mating system and genetic diversity in natural population of knobcone pine (*Pinus attenuata*). *Forest Genetics* 4: 223-226.
- De-Lucas, A., J. J. Robledo-Arnuncio, E. Hidalgo and S. C. González-Martínez. 2008. Mating system and pollen gene flow in mediterranean maritime pine. *Heredity* 100: 390-399.
- Del Castillo, R. F. and S. Trujillo. 2008. Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. *New Phytologist* 177: 517-524.
- Delgado, P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser and E. R. Alvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86: 669-676.

- El-Kassaby, Y. A. and B. Jaquish. 1996. Populations density and mating pattern in western larch. *Journal of Heredity* 87: 438-443.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt and S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.
- Hartl, D. and A. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4ta. ed. Sinauer Associates Inc. Massachusett, USA. 651 p.
- Iwasaki, T., T. Sase, S. Takeda, T. A. Ohsawa, K. Osaki, N. Tani, H. Ikada, M. Suzuki, R. Endo, K. Tohei and Y. Watano. 2013. Extensive selfing in an endangered population in *Pinus parviflora* var. *parviflora* (Pinaceae) in the Boso Hills, Japan. *Tree Genetics & Genomes* 9: 693-705.
- Ledig, F. T. and M. T. Conkle. 1983. Gene diversity and genetic structure in narrow endemic, torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution* 37: 79-85.
- Ledig, F. T., M. T. Conkle, B. Bermejo-Velázquez, T. Eguiluz-Piedra, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson and W. S. Dvorak. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican piñon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53: 91-99.
- Ledig, F. T., M. A. Capó-Arteaga, P. D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. T. Conkle and B. Bermejo-Velázquez. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88: 1977-1987.

- Molina-Freaner, F., P. Delgado, D. Piñero, N. Pérez-Nasser and E. Alvarez-Buylla. 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany* 79: 131-138.
- Parraguirre L., C., J. J. Vargas H., P. Ramírez V., H. S. Azpíroz R. y J. Jasso M. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 279-287.
- Parraguirre-Lezama, C., J. J. Vargas-Hernández. P. Ramírez-Vallejo y C. Ramírez-Herrera. 2004. Sistema de cruzamiento en cuatro poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Agrociencia* 38: 107-119.
- Politov, D. V., Y. V. Pirko, N. N. Pirko, E. A. Mudrik and I. I. Korshikov. 2008. Analysis of mating system in two *Pinus cembra* L. populations of the Ukrainian Carpathians. *Annals of Forest Research* 51: 11-18.
- Rajora, O. P., A. Mosseler and J. E. Major. 2002. Mating system and reproductive fitness traits of eastern white pine (*Pinus strobus*) in large, central versus small, isolated, marginal populations. *Canadian Journal of Botany* 80: 1173-1184.
- Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Robledo-Anuncio, J. J., R. Alía and L. Gil. 2004. Increased self and correlation paternity in small population of a predominant outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology* 13: 2567-2577.

- Potter, K.M., W. S. Dvorak, B. S. Crane, V. D. Hipkins, R. M. Jetton, W. A. Whittier and R. Rhea. 2008. Allozyme variation and recent evolutionary history of eastern hemlock (*Tsuga canadensis*) in the southeastern United States. *New Forests* 35: 131–145.
- SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. México. 30 de diciembre de 2010. Segunda sección. 78 p.
- Viveros-Viveros, H., B. L. Tapia-Olivares, C. Sáenz-Romero, J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, A. Santacruz-Varela y G. Ramírez-Valverde. 2010. Variación isoenzimática de *Pinus hartwegii* Lindl. en un gradiente altitudinal en Michoacán, México. *Agrociencia* 44: 723-733.