



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas (PIMCB),
Fisiología y Genética Vegetal

**Variación genética y estructura filogeográfica de *Pinus martinezii*
E. Larzen y *Pinus durangensis* Mtz., endémicas de México: dos
linajes con historias evolutivas contrastantes**

TESIS

que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

Rubí Contreras Bailón

Directora

Dra. Patricia Delgado Valerio

Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH

Codirectora

Dra. Alejandra Moreno Letelier

Jardín Botánico. Instituto de Biología, UNAM

Uruapan, Michoacán, marzo 2021

DEDICATORIA

A mi familia, con todo mi amor y agradecimiento infinito. Especialmente al amor de mi vida, mi Pa, que aunque la vida me lo quito antes de tiempo, sé que sigue cuidándome y dándome su amor desde donde quiera que esté. A mi mamá, la persona que más me apoya y me chiquea, dúrame toda la vida Marcia y permíteme agradecerte todo el amor que nos das, eres increíble, única y sobre todo hermosa. A mi hermano, ejemplo a seguir, sinónimo de perseverancia y esfuerzo, gracias Beturro por siempre estar guiándome en esta vida, agradezco también a tu hermosa familia, gracias Gaby por siempre estar y por haberme dado a mi hermoso sobrino Tadeo, que sin duda ha llenado de felicidad mis días. A Miriam mi otra hermana y a mi Gordi Victoria, que me han dado momentos muy felices. Los amo mis bebés (Tadeo y Victoria).

Principalmente a mi hijo, Miguel Balam, mi bebé, quien vino a enseñarme que la vida puede cambiar en un segundo, que uno se hace fuerte con los problemas, y que lo que yo pude ver como el fin del mundo, era solo el principio de una nueva vida. Te dedico mi trabajo y mi esfuerzo porque me enseñaste el amor más puro que pueda existir, y ningún cansancio o dolor es más importante que ver una sonrisa tuya o tomarte de la mano. Te amo con toda mi esencia y todo lo que soy mi JAGUARSITO.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Agrobiología por estar al alcance de todos los estudiantes y proporcionar las instalaciones necesarias para poder realizar exitosamente el proyecto de investigación.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de enriquecer mi conocimiento profesional y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca asignada con número de registro 732033 que me permitió desarrollar y culminar con mis estudios de Maestría.

Principal y especialmente a mi asesora, Dra. Patricia Delgado Valerio, por aceptarme como estudiante incluso sin conocerme. Gracias Dra., no tengo palabras para agradecerle todo lo que me ayudó y apoyó durante estos dos años, no solo académicamente sino personalmente también. Por compartir sus conocimientos conmigo, estar siempre al pendiente de mi proceso y por brindarme todas las facilidades para poder terminar este hermoso trabajo. Quiero agradecerle también por su paciencia y dedicación y por ser más que una asesora para convertirse en una amiga. Tiene mucha chispa Dra., nunca deje apagar su alegría.

A la Dra. Alejandra Moreno Letelier por aceptar ser mi co-asesora, gracias también por compartirme de su conocimiento y aportar tanto a este trabajo. Gracias por ser una motivación, al ser tan joven y tener tanta experiencia profesional, por hacer más ligera y más interesante esta rama de investigación y por siempre tener una forma amable de transmitir su conocimiento.

Al Dr. Daniel Piñero un excelente investigador, gracias por sus aportaciones puntuales y enriquecedoras a este trabajo y por darse el tiempo de ser parte de mi comité sinodal.

Quiero agradecer también al Dr. Cuauhtémoc Sáenz, un excelente profesor, que me ayudó mucho en la parte ambiental de este trabajo. Gracias por ser parte de mi comité sinodal y por ser mi profesor en esa clase tan reveladora e informativa.

A la Dra. Carmen Rocha, por sus aportaciones a este trabajo semestre tras semestre y por hacerme empezar la maestría con mucha exigencia para poder obtener buenos resultados.

Al Dr. Ulises Manzanilla por todo su apoyo en la parte metodológica y gráfica, por su siempre disponibilidad de ayudar.

Al M.C. Agustín Molina, por su gran ayuda en la colecta de material biológico, por orientarme con algunos programas bioinformáticos y en la elaboración de varios gráficos.

Al Ing. Agrónomo Juna Pablo (Juanpi) por toda la ayuda brindada en laboratorio y en las colectas de campo, por ser muy bueno con la resortera. Gracias Juanpi de verdad me ayudaste un montón.

Gracias también a todos mis compañeros de laboratorio que me apoyaron en campo y en laboratorio, por los momentos divertidos y por aguantarme, los aprecio mucho, chiquillos: Juanpi, Omar, Agustín, Solorio, Lupita, a los chicos de Bosques y a los que realizaron practicas vocacionales.

Esta investigación fue financiada por la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Proyecto 2020 de P. Delgado.

ÍNDICE

I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
2.1 Genética de poblaciones.....	4
2.1.1 Deriva génica	5
2.1.2 Migración	5
2.1.3 Mutación	5
2.1.4 Selección natural	6
2.2 Filogeografía	7
2.3 Estudios filogeográficos en especies de <i>Pinus</i>	9
2.4 Especies de estudio.....	13
Hipótesis	17
Objetivos	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos	17
III. Metodología	18
3.1 Trabajo de campo	18
3.1.1 Colecta de material biológico.....	18
3.2 Trabajo de laboratorio	19
3.2.1 Extracción de ADN.....	19
3.2.2 Microsatélites de cloroplasto.....	19
3.2.3 Análisis de datos.....	22
IV. Resultados	25
4.1 Variación genética.....	26
4.2 Estructura geográfica de la variación genética.....	26
4.3 Aislamiento por distancia y por ambiente.....	30
V. Discusión	34
VII. Conclusión	44
Literatura citada	45

Índice de tablas

Tabla	Página
1. Localidades de colecta, estado, provincia biogeográfica (SMOC: Sierra Madre Occidental, SMS: Sierra Madre del Sur, FVTM: Faja Volcánica Transmexicana), coordenadas geográficas, altitud, y tamaño de muestra (n) de <i>Pinus durangensis</i> Mtz. y <i>Pinus martinezii</i> E. Larzen.....	20
2. Microsatélites de cloroplasto (SSRcp; Vendramin <i>et al.</i> , 1996) utilizados en las especies de estudio.....	19
3. Población, tamaño de la muestra (N), riqueza haplotípica (<i>R_h</i>), diversidad genética imparcial de Nei (<i>H</i>), valor de theta bajo el modelo de mutación paso a paso (Θ SMM) y el tamaño poblacional (<i>N_e</i>).....	26
4. Análisis de varianza molecular con valores de <i>F_{ST}</i> y <i>R_{ST}</i> . En letras bold se indican los valores más altos para cada grupo de análisis. La significancia estadística fue obtenida con 10000 permutaciones no-paramétricas (Excoffier y Lischer, 2010)	28

Índice de figuras

Figuras	Página
<p>1. Relación evolutiva (genealógica) de cuatro haplotipos (individuos) dentro de una población. Los linajes de los haplotipos pueden rastrearse hacia atrás en el tiempo y así identificar los eventos coalescentes. Por ejemplo, los haplotipos A y B tienen su ancestro común más reciente (ACMR) dos generaciones atrás (*)</p>	8
<p>2. Patrones demográficos de las poblaciones. Constante; número de alelos se mantiene estable. Reducción: se van perdiendo alelos. Expansión; se ganan alelos por diferentes procesos.....</p>	8
<p>3. Mapa de distribución de las especies. A) <i>Pinus durangensis</i> y B) <i>Pinus martinezii</i>.....</p>	14
<p>4. Morfología de los conos femeninos de a) <i>P. martinezii</i> y b) <i>P. durangensis</i>.....</p>	16
<p>5. Distribución geográfica de las poblaciones en estudio de <i>Pinus durangensis</i> y <i>P. martinezii</i>, México.....</p>	18
<p>6. Lectura del tamaño de los fragmentos en los electrofenogramas con el programa Peak Scanner.....</p>	21
<p>7. Resultado del análisis bayesiano de estructura poblacional (BAPS). YC, Yecora; CRL, Creel; BT, Batopilas (ROJO). AHM, Maderas; BS, Bassaseachic; SJ, San Juanito; SN, Sitio Negros; SD, San Diego (VERDE). GH, Guachochi; FE, Flor Espinoza (AZUL). BAQ, Meza de Baqueriche; STO, El Salto; CAP, Capillas (AMARILLO). SNVO, San Juan Nuevo; PÑ, Peñuelas; SPJ, San Pedro Jacuaro (AZUL AGUA). CH, Chilar; AH, Alta Huerta (ROSA). AZ, Azufres; TM, Temazcal (CAFÉ).....</p>	27
<p>8. Mapa de barreras genéticas estimadas con BARRIER. a) R_{ST} para 20 poblaciones, y b) R_{ST} para siete grupos genéticos. La barrera a, es la de mayor probabilidad.....</p>	29

9. Flujo filogenético N_m entre y dentro poblaciones de <i>P. durangensis</i> y <i>P. martinezii</i> . El traslape de colores indica la existencia de flujo genético entre las poblaciones ubicadas en sitios diferentes y cuya intensidad varía acorde con la nomenclatura señalada en los colores del mapa y que van de muy alto a muy bajo intercambio genético.....	30
10. Patrón de aislamiento por distancia (IBD) entre las poblaciones de <i>P. duranguensis</i> y <i>P. martinezii</i> , distribuidas en la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur y en la Faja Volcánica Transmexicana, respectivamente.....	31
11. Índice de severidad de sequía de Palmer (PSDI) de las poblaciones de <i>P. durangensis</i> y <i>P. martinezii</i> . a) Periodo de 1960-1990, b) Periodo de 1980-2012, c) 1960-1990 vs.1980-2012.....	32
12. Patrón de aislamiento por ambiente (IBA) entre las poblaciones de <i>P. duranguensis</i> y <i>P. martinezii</i> distribuidas en México.....	33

Índice de apéndices

Apéndice

1. Frecuencia relativa de los haplotipos.
2. Matriz de flujo genético (N_m) entre las poblaciones de *P. durangensis* y *P. martinezii*.
3. Interpolaciones de IDW, de flujo genético de *P. durangensis* y *P. martinezii*, de norte a sur.
4. Provincias y subprovincias fisiográficas utilizadas para la delimitación del área M de *P. durangensis* y *P. martinezii*.
5. Barreras geográficas entre *P. durangensis* y *P. martinezii*.

Resumen

Pinus durangensis Mtz y *P. martinezii* E. Larzen, son endémicas de México. La primera especie se distribuye en la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre del Sur, mientras que *P. martinezii* está restringida a pequeñas poblaciones fragmentadas en la Faja Volcánica Transmexicana y está sujeta a protección especial. Algunos autores le dan el rango de especie, mientras que otros la consideran sinonimia de *P. durangensis*. Dada esta problemática es necesario generar información básica que ayude a esclarecer su estatus taxonómico, biológico y evolutivo. Se exploró la estructura genética de las especies y su asociación con la distribución geográfica y climática, con la finalidad de tratar de reconstruir su dinámica evolutiva y conocer los procesos histórico-demográficos asociados a suposible divergencia. Se usaron seis marcadores microsatélites de cloroplasto en 307 individuos de 20 poblaciones representativas de su distribución natural, así como métodos analíticos de la genética de poblaciones y filogeografía. Los resultados muestran niveles altos de variación genética en ambas especies ($H_e=0.905$ en *P. martinezii* y $H_e= 0.904$ para *Pinus durangensis*), con una diferenciación genética marcada entre las poblaciones ($R_{ST}= 0.503$). El análisis Bayesiano de estructura poblacional (BAPS) y la presencia de una barrera genética, indican que la partición óptima de la variación genética está conformada por dos grupos genéticos y geográficos: el primero de la zona Norte (Sonora, Chihuahua, Durango y Jalisco) correspondiente a *P. durangensis* y el segundo grupo de la zona Sur (Michoacán) representado por *P. martinezii*. Las poblaciones muestran una asociación significativa entre las distancias genéticas y geográficas ($r= 0.560$), y ambas zonas están diferenciadas de acuerdo al índice de severidad de sequía de Palmer (PSDI), con un mayor grado de sequía para la zona Norte (-0.51). Los resultados sustentan que *P. durangensis* y *P. martinezii*, son dos linajes genéticos independientes, aislados históricamente por barreras geográficas y climáticas, asociadas al surgimiento de la FVTM y a los eventos glaciares del pleistoceno. Se plantea el rescate y conservación de las poblaciones de mayor riesgo de extinción y representativas del acervo genético de las especies.

Palabras clave: *Pinus*, Estructura genética, Microsatélites, Divergencia, Conservación.

Abstract

Pinus durangensis Mtz and *P. martinezii* E. Larzen, are endemic to Mexico. The first species is widely distributed in the Sierra Madre Occidental and Sierra Madre del Sur, whereas *P. martinezii* is restricted to small fragmented populations in the Trans-Mexican Volcanic Belt and is subject to special protection. Nomenclaturally, some authors confer it the rank of species, whereas others consider it synonymy with *P. durangensis*. In agreement with this problem, is necessary to generate basic information to resolve its taxonomic, biological and evolutionary status. We explored the genetic structure of the populations and their association with the geographical and climatic distribution, to try to reconstruct their evolutionary dynamics and recognize the historical-demographic processes associated with the possible divergence of the species. Six chloroplast microsatellite markers were used in 307 individuals from 20 populations representative of their natural distribution, as well as analytical methods of population genetics and phylogeography. The results show high levels of genetic variation in both species ($H_e = 0.905$ in *P. martinezii* and $H_e = 0.904$ for *Pinus durangensis*), with a marked genetic differentiation between the populations ($R_{ST} = 0.503$). The Bayesian analysis of population structure (BAPS) and the presence of a genetic barrier, indicate that the optimal partition of genetic variation is conformed for two genetic and geographic groups: the first from the North zone (Sonora, Chihuahua, Durango and Jalisco) corresponding to *P. durangensis* and the second group from the Southern zone (Michoacán) represented by *P. martinezii*. Furthermore, the populations show a significant association between genetic and geographic distances ($r = 0.560$), and both geographic zones are differentiated according to the Palmer drought severity index (PSDI), with a higher degree of drought for the North zone. (-0.51). The results support that *P. durangensis* and *P. martinezii* are two independent genetic lineages, historically isolated by geographical and climatic barriers, associated with the emergence of the TMVB and the glacial events of the Pleistocene. Priority strategies are proposed for the rescue and conservation of the populations vulnerable to extinction and representative of the gene pool of the species.

Keywords: *Pinus*, Genetic structure, Microsatellites, Divergence, Conservation.

I. Introducción

Las condiciones biogeográficas, geológicas, orográficas y climatológicas de México han fomentado la diversificación de muchos linajes de plantas y animales. Entre ellos se encuentra el género *Pinus*, del cual México cuenta con el mayor número de especies del mundo. En México hay de 72-74 especies, variedades y formas de este género (Perry, 1991; Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014), distribuidas en una amplia gama de condiciones ambientales, por lo que a México se le ha considerado como un segundo centro de origen de especies de pinos del mundo (Millar 1993). Sin embargo, varias de las especies están representadas por poblaciones muy pequeñas y algunas de ellas están en peligro de desaparecer localmente. Además, muchas de las especies amenazadas son endémicas a México y por lo tanto se encuentran en peligro de extinción global.

Dos de las aproximaciones teóricas para reconocer el estatus o condición biológica y evolutiva de las poblaciones de especies a nivel molecular son: la genética de poblaciones y la filogeografía. La genética de poblaciones trata de analizar la dinámica de los alelos basada en la llamada Ley del equilibrio Hardy-Weinberg, que supone un equilibrio entre las frecuencias alélicas y genotípicas, las cuales permanecen constantes a través de las generaciones (Wright, 1965). Esta predicción solo se cumple bajo varias condiciones o supuestos; que los organismos sean diploides, no exista traslape de generaciones, el tamaño de las poblaciones sea grande, los apareamientos al azar y de ausencia de cualquier fuerza evolutiva (migración, mutación, deriva génica y selección; Hedrick, 1983). A través de la genética de poblaciones se pueden estimar los niveles de la variación y estructura genética de las poblaciones, el flujo genético, las tasas de entrecruzamiento y los tamaños efectivos de las poblaciones (Hartl y Clark, 1989). Esta información es de gran utilidad para la biología de la conservación, pues permite conocer los tamaños mínimos a proteger, así como seleccionar las poblaciones que contienen la diversidad genética representativa de las especies (Brow *et al.*, 1989; Hedrick, 1983).

La filogeografía se desarrolló a partir de los avances de la biología molecular. Esta disciplina estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes y reconstruye su historia evolutiva a través del tiempo y el espacio (Avice, 2000). Se sustenta en la llamada teoría de la coalescencia (Hudson, 1990), la cual trata de conocer eventos evolutivos que sucedieron en el pasado bajo el análisis genealógico de linajes evolutivos (Delgado y Piñero, 2008). La información contenida en las genealogías no solo nos habla de la variación genética de las poblaciones, sino de la manera en que se distribuye espacial y temporalmente, así como de los posibles eventos demográficos que han influido en la evolución de las poblaciones (expansión del rango, colonización, flujo genético restringido o fragmentación; Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998). Este tipo de información es de una importancia central para cuestiones de conservación y determinación de linajes de especies, formas o variedades. Permite reconocer los centros de origen, la divergencia de las especies y las rutas de migración de los genes o haplotipos (Newton *et al.*, 1999; Delgado y Piñero 2008; Moreno y Barraclough, 2015; Rebolledo *et al.*, 2018).

Uno de los sistemas de estudio interesante para analizar bajo estas perspectivas está conformado por dos especies de *Pinus* endémicas de México: *P. durangensis* Mtz y *P. martinezii* E. Larzen. Para estas especies no se ha logrado esclarecer su estatus taxonómico, biológico y evolutivo. *P. martinezii*, nomenclaturalmente es tratada como una especie por varios sistemáticos (Perry, 1991; Madrigal y Guridi, 2005), por la Norma oficial Mexicana, NOM-059 (SEMARNAT, 2010) y por bases de datos taxonómicos formales (Tropicos, The International Plant Name Index, IPNI), mientras que otros sistemáticos como Farjon y Styles (1997) y en otras bases de datos (The Plant List y Red List IUCN), la consideran como una sinonimia de *P. durangensis*. Sorprendentemente, *P. martinezii* no ha sido incluida en ninguna de las reconstrucciones filogenéticas realizadas hasta la fecha (Gernandt *et al.*, 2009, Gernandt y Pérez de la Rosa, 2014), por lo que su estudio puede aportar información relevante para aclarar su estatus taxonómico. Además, esta especie es considerada por la NOM-059 (SEMARNAT, 2010) en la categoría de Protección Especial, así como en la Lista Roja de especies en riesgo (IUCN) en la categoría de Casi Amenazada.

Acorde con lo expuesto, en el presente estudio se analizó la variación genética y estructura filogeográfica de las poblaciones de *P. durangensis* y *P. martinezii*, a través de su área de distribución natural, con el uso de herramientas moleculares (marcadores microsatélites de cloroplasto) y analíticas de la genética de poblaciones y de la filogeografía. La información generada en este trabajo es de utilidad para i) esclarecer el estatus taxonómico de las especies, ii) conocer los procesos demográficos que han moldeado la evolución de estos dos taxa, y iii) determinar las poblaciones representativas de su acervo genético, información que será de utilidad para proponer estrategias de manejo y conservación más apropiadas.

II. Antecedentes

2.1 *Genética de poblaciones*

La genética de poblaciones, es una disciplina que proporciona información acerca de los procesos históricos y evolutivos que dan lugar a la estructura y composición genética de las poblaciones a partir de las frecuencias alélicas y genotípicas, así como de aspectos demográficos que permiten conocer como ha sido su dinámica, además dilucida que los genotipos de las poblaciones no se encuentran distribuidos al azar, sino que presentan una estructura temporal y espacial (Hartl y Clark, 1989). Ésta disciplina se fundamenta en la teoría del equilibrio Hardy-Weimberg que sugiere que dentro de una población sexual y con apareamiento aleatorio, se establece un equilibrio de las frecuencias alélicas, donde las frecuencias de cada alelo permanecen constantes de generación en generación (Hedrick, 1983). Para que el equilibrio H-W se cumpla, es necesario que las poblaciones tengan un tamaño censal muy grande, que las generaciones no se traslapen, que los organismos tengan condición diploide, sean igualmente fértiles y viables, que los apareamientos sean al azar y que todos los individuos sean competentes para dejar descendencia. El grado en que las frecuencias alélicas o genotípicas se desvíen del equilibrio genético (Hardy-Weinberg), permite conocer los niveles de variación genética de las poblacional, así como los procesos o factores evolutivos asociados a su distribución dentro y entre las poblaciones, tales como selección, migración, deriva génica y mutación (Hedrick, 1983).

Las fuerzas evolutivas son fuentes de variación genética, que ayudan a averiguar cómo es que se modifica el balance entre las diversas combinaciones de genes en los individuos y cambia la frecuencia de alelos o frecuencia alélica de la población. Estos procesos evolutivos han generado tanto la adaptación (la adecuación de los organismos a su medio ambiente), como la gran diversidad de especies que hay y han existido en el pasado en la tierra.

2.1.1 *Deriva génica*

La deriva génica, tiene una gran influencia en el cambio al azar en las proporciones de los alelos en una población, debido a que por puro azar algunos individuos dejan más hijos y copias de sus genes que otros; entre menos individuos dejen descendientes, mayores van a ser estos cambios azarosos (Eguiarte *et al.*, 2013). En consecuencia, los alelos tenderán a desaparecer paulatinamente de la poza génica disminuyéndose la variabilidad hasta que, después de un número n de generaciones, ocurrirá fijación y el gen se volverá monoalélico (Herrera-Paz, 2013). El cambio de frecuencias alélicas que se producen al azar por deriva génica juega un papel muy importante en la evolución de las poblaciones pequeñas, en dos situaciones: el efecto fundador y el efecto cuello de botella en una población.

2.1.2 *Migración*

La Migración es una de las cuatro fuerzas evolutivas, es una fuerza direccional de cambio que consiste en el intercambio de individuos reproductores entre poblaciones distintas que, en principio, tendrán distintas frecuencias génicas, aumentando la variabilidad intrapoblacional y disminuyendo las diferencias interpoblacionales (Herrera-Paz, 2013).

2.1.3 *Mutación*

Las mutaciones son cambios que ocurren de manera espontánea e impredecible en el DNA, así como la fuente de todos los nuevos alelos, y, por lo tanto, de la variación en el acervo genético de una población. Surge como un error en el proceso de replicación del ADN que será heredable a las siguientes generaciones (Spencer, 2004). La mutación es la fuente última de variación genética en las poblaciones, debido a que las tasas de mutación son tan bajas que tienen un efecto significativo solo durante un tiempo muy largo. No obstante, algunos marcadores como los microsatélites, tienen tasas de mutación muy altas (Willyard *et al.*, 2007), para los que se ha documentado que pueden evolucionar a través de dos modelos de mutación: El modelo de alelos infinitos (IAM) que asume que cada mutación produce un alelo diferente a los que previamente existían de manera constante (Kimura y

Crow, 1964) y el modelo de mutación por pasos (SMM), en el cual los cambios se realizan un paso hacia delante o hacia atrás, con igual probabilidad (Ota y Kimura, 1973).

2.1.4 Selección natural

A diferencia de la mutación, la selección natural no produce cambio genético, sino que solo altera las frecuencias alélicas, es decir, una vez que el cambio ha ocurrido, favorece la supervivencia y el incremento en la reproducción de los individuos con la combinación genética más eficiente para las condiciones ambientales existentes (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Así, los individuos que tienen los alelos ventajosos, dejan más hijos y estos alelos incrementan su proporción en las pozas génicas, mientras que los alelos que no funcionan bien son removidos rápidamente por la selección natural (Eguiarte *et al.*, 2013).

Por tanto, la genética de poblaciones permite contestar diferentes preguntas evolutivas, relacionadas, por ejemplo, con los niveles de variación genética, endogamia, relaciones de parentesco, centros de origen, sobre los sistemas reproductivos, procesos de especiación, entre otros. Todos ellos de importancia para la conservación y manejo de los recursos genéticos.

A la fecha diversos autores han trabajado bajo estas perspectivas, varios de ellos con especies del género *Pinus*. Los estudios se han centrado en analizar la magnitud y distribución de la diversidad genética entre y dentro poblaciones. En México se ha tenido especial atención en aquellas especies propensas a la extinción, que crecen en poblaciones pequeñas, aisladas y fragmentadas, como *Pinus johannis*, *P. rzedowskii*, *P. pinceana* y *P. nelsonni*, las cuales presentan valores de diversidad genética altos, con valores de heterosigosis esperada (H_e) mayores a 0.600 (Delgado *et al.*, 1999; García-Gómez *et al.*, 2014; Vargas, 2018; Escalante, 2001; Cuenca *et al.*, 2003), contrario a lo que se esperaba, incluso muy similares o mayores a especies de amplia distribución en el país como *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite*, *P. strobiformis*, *P. cembroides*, *P. patula*, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*, con valores de diversidad genética en un intervalo de H_e de 0.4130 a 0.8029

(Delgado y Piñero, 2002; Ortíz-Medrano *et al.*, 2008; Moreno-Letelier *et al.*, 2013; Alfonso-Corrado *et al.*, 2014; Fuentes-Amaro *et al.*, 2019).

Los valores de diversidad genética de pinos mexicanos en comparación con especies de otros países siguen manteniendo un patrón constante, son más altos, por ejemplo, que en *Pinus pinea* y *P. nigra* (Europa) que exhiben valores de H_e entre 0.380 a 0.570 (Jiménez *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2002; Cerda, 2007). Esto podría deberse a la conformación geomorfológica que tiene México, la influencia de factores climáticos, así como los cambios altitudinales asociados con la consolidación de las principales cadenas montañosas características del país, que integran un escenario fisiográfico complejo que ha moldeado y/o afectado la estructura genética de las especies de pinos (Delgado y Piñero, 2002; Moreno-Letelier *et al.*, 2013).

2.2 Filogeografía

La filogeografía se desarrolló a partir de los avances de la biología molecular, apoyada en los conceptos teóricos y analíticos de la genética de poblaciones, demografía poblacional, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avise, 2000, 2009). Esta disciplina estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes y reconstruye su historia evolutiva a través del tiempo y el espacio (Avise, 2000). Se sustenta en la llamada teoría de la coalescencia (Hudson, 1990), la cual trata de conocer eventos evolutivos que sucedieron en el pasado bajo el análisis genealógico de linajes evolutivos hacia el pasado, los cuales coalescen en un ancestro común (Crandall *et al.*, 1994; Avise, 2000) (Figura 1). Por tanto, permiten aproximar los orígenes reales de los linajes de especies, como en el caso del género *Pinus*, donde las calibraciones sugieren un origen de entre 190-102 millones de años atrás (Willyard *et al.*, 2007).

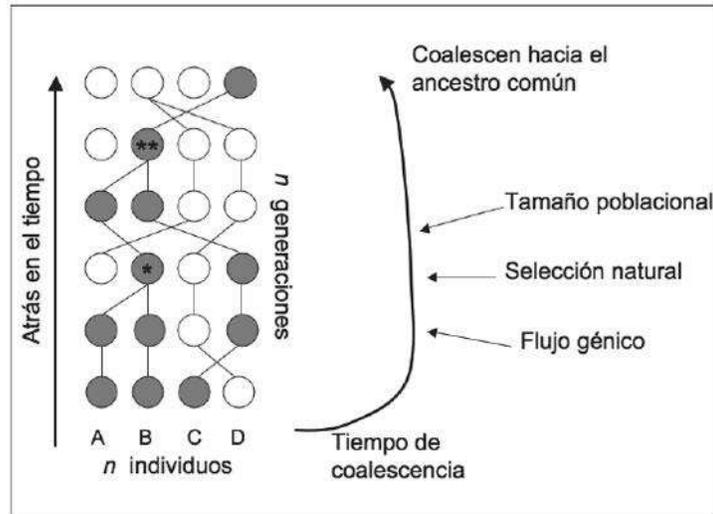


Figura 1. Relación evolutiva (genealógica) de cuatro haplotipos (individuos) dentro de una población. Los linajes de los haplotipos pueden rastrearse hacia atrás en el tiempo y así identificar los eventos coalescentes. Por ejemplo, los haplotipos A y B tienen su ancestro común más reciente (ACMR) dos generaciones atrás (*).

El análisis genealógico, además permite obtener interpretaciones sobre la demografía histórica de los linajes, como son procesos de expansión de las poblaciones a otras áreas de distribución potenciales (incluyendo eventos de colonización), fragmentación histórica por barreras geográficas al flujo genético y la reducción o aislamiento por distancia de las poblaciones, debido a flujo génico restringido (Cruzan y Templeton, 2000) (Figura 2). Todo ello dentro de un contexto filogenético (Roderick, 1996; Avise, 2000).

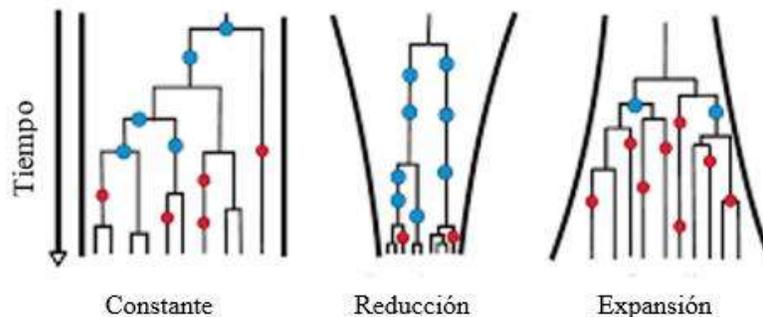


Figura 2. Patrones demográficos de las poblaciones. Constante; número de alelos se mantiene estable. Reducción; se van perdiendo alelos. Expansión; se ganan alelos por diferentes procesos.

Además, los análisis genealógicos permiten reconocer el origen de los linajes de acuerdo a las diferentes etapas del proceso de especiación: 1) polifilético, que corresponde a la primera etapa de diferenciación de un linaje (originado por alguna barrera geográfica montañas, ríos etc.) donde muchos de los individuos contendrán haplotipos de ancestros distintos, después de un determinado tiempo los linajes se van diferenciando cada vez más (sin flujo génico entre ellas) lo que origina una relación 2) parafilética y por último, cuando los haplotipos de cada linaje llegan a tener un ancestro común, dando origen a dos nuevas especies, se considera como 3) monofilético (Avice, 2000). Por tanto, permite reconocer en qué etapa del proceso de especiación se encuentran las especies. Por esta razón, la genética de poblaciones y la filogeografía, son un complemento ideal para conocer tanto la diversidad genética de las especies como su historia evolutiva.

2.3 Estudios filogeográficos en especies de *Pinus*

Para especies de *Pinus* muchos de los trabajos realizados sobre genética de poblaciones incluyen también algunas aproximaciones filogeográficas, los cuales contemplan tanto a especies de distribución amplia (Delgado *et al.* 2007; Floran *et al.*, 2009; Jardón *et al.*, 2011) como restringida (Escalante, 2001; Cuenca *et al.*, 2003; Ortiz-Medrano, 2008; Moreno-Letelier *et al.*, 2009, 2013).

Uno de los estudios filogeográficos pioneros en pinos mexicanos fue realizado en un pino relictivo, *P. nelsonii*, con el uso de microsatelites de cloroplasto (Cuenca *et al.*, 2003), encuentran niveles de variación genética moderados ($H= 0.730$), con una diferenciación entre poblaciones baja pero significativa ($F_{ST}= 0.130$), relacionada con su distribución geográfica, y sugieren eventos de colonización y expansión, señalando que las poblaciones de *P. nelsonii* han permanecido en equilibrio demográfico a través de su historia evolutiva.

Otro estudio pioneros fue realizado en dos especies de pino de distribución amplia, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*, donde analizaron la dinámica histórica de la hibridización con el uso de microsátélites de cloroplasto (Delgado *et al.*, 2007). Los resultados muestran

tres linajes genéticos; dos que incluyen a las especies tipo y un tercer linaje formado por poblaciones híbridas. Los procesos demográficos que se detectaron fueron de fragmentación, aislamiento por distancia y eventos de expansión de algunas de las poblaciones de *P. montezumae*, y que la hibridización introgresiva es unidireccional, de *P. montezumae* a *P. pseudostrobus*.

Jardón et al. (2012) analizaron la filogeografía de 24 poblaciones de cuatro especies de pinos caribeños: *P. caribaea*, *P. cubensis*, *P. occidentalis* y *P. maestrensis*, con el uso de microsatélites de cloroplasto. Identificaron 113 haplotipos, con una diversidad genética alta ($H= 0.970$), y estructura filogeográfica significativa ($R_{ST} = 0.671$). Sugieren que los haplotipos ancestrales provienen de Centroamérica por eventos históricos de expansión demográfica de las poblaciones de *P. caribaea* var. *hondurensis*. A su vez reportan que dos eventos de colonización dieron lugar a *P. caribaea* var. *bahamensis* y *P. caribaea* var. *caribaea* y que *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis* evolucionaron de forma independiente.

Para las especies de distribución fragmentada y restringida cabe resaltar el estudio realizado por Escalante (2001) en poblaciones de *P. pinceana* con el uso de SSRcp. Los valores de la variación y estructura genética fueron muy altos $H= 0.824$, $F_{ST}= 0.785$. El análisis filogeográfico sugiere eventos de aislamiento por distancia muy fuertes y fragmentación, donde las poblaciones con mayor variación genética y que contienen los haplotipos más ancestrales se ubican en la región centro de su distribución geográfica (San Luis Potosí) y las poblaciones menos diversas genéticamente y que contienen los haplotipos derivados se encuentran en la zona sur de su área de distribución natural (Hidalgo y Querétaro).

Obregón en 2010, exploró la estructura genética y la filogeografía de *Pinus hartwegii* utilizando nueve loci de microsatélites de cloroplasto (SSRcp) en 18 poblaciones a lo largo de toda la distribución natural de la especie (México y Guatemala). La diversidad genética de *Pinus hartwegii* resultó alta, especialmente en las poblaciones del centro de la Faja

Volcánica Transmexicana y se encontró una marcada estructura filogeográfica con tres grupos genéticos y geográficos separados por cuatro barreras geográficas.

En *P. ayacahuite* var. *ayacahuite* se analizó la estructura filogeográfica de las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* con microsatélites de cloroplasto (Ortiz-Medrano *et al.*, 2008). Encontraron 12 haplotipos y niveles medios de diversidad genética ($H= 0.705$), con dos grupos genéticos diferenciados, asociados significativamente a su distribución geográfica. Los dos grupos muestran procesos demográficos de expansiones del rango en diferentes proporciones; el primer grupo en todas las poblaciones analizadas y el segundo sólo en las poblaciones más sureñas. Señalan que el Istmo de Tehuantepec actuó como corredor para las especies de afinidad templada al inicio del Pleistoceno, y posteriormente funcionó como una barrera de dispersión.

En otro estudio más completo analizan las relaciones filogenéticas del complejo ayacahuite; *P. flexilis*, *P. estrobiformis* y *P. ayacahuite* distribuidas en México y Norteamérica (Moreno-Letelier *et al.*, 2013). Los autores usan secuencias de mitocondria, cloroplasto y microsatélites de cloroplasto, contrastados con información ambiental a través de la modelación de nicho ecológico. Ambos tipos de datos soportan evidencias de que son tres linajes divergentes, y revelan una zona de contacto ancestral entre *P. strobiformis* y *P. ayacahuite*.

Un estudio que integra información genética (usan microsatélites y secuencias de cloroplasto) morfológica, ecológica y geográfica ayudó a clarificar las relaciones filogenéticas de especies del grupo Cembroides (pinos piñoneros), un grupo complejo de origen reciente; *P. johannis*, *P. discolor*, *P. cembroides* y *P. culminicola* (Flores-Rentería *et al.*, 2013), encuentran una asociación significativa de las relaciones filogenéticas con las variables analizadas, indicando que para grupos de especies muy complejas, este tipo de aproximación es de gran utilidad.

Como se puede observar los estudios filogeográficos en pinos, se han basado fundamentalmente en el análisis de microsatélites de cloroplasto, lo cual se debe principalmente a que existen primers universales y las regiones están conservadas (Navascués y Emerson, 2005), son marcadores neutros y no están influenciados por procesos de selección, recombinación o migración, de tal manera que nos hablan únicamente de los procesos de mutación y por tanto de la historia evolutiva de los linajes o poblaciones (Petit *et al.*, 2005; Delgado y Piñero 2008). Las secuencias han sido utilizadas en estudios filogenéticos, pero a nivel intrapoblacional, son regiones conservadas y poco variables. Por tanto, para estudios intraespecíficos se recomienda el uso de secuencias homólogas, principalmente de tamaños cortos y de regiones no codificantes (Schaal *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 2005). Sin embargo, el ligamiento entre loci limita mucho las inferencias que pueden realizarse a partir de ese tipo de datos.

En la actualidad, se está implementando el uso de tecnologías de nueva generación (secuenciación masiva) para explorar una gran cantidad de loci, muchos de ellos selectivos de utilidad para estudios de asociación, sin embargo, siguen siendo poco accesibles en México, debido a los altos costos y la falta de herramientas bioinformáticas que vayan a la par de las necesidades específicas de los genomas o de las regiones particulares a estudiar (Rodríguez-Correa *et al.*, 2017).

La implementación de secuencias de genes de núcleo en investigación, también ha aumentado considerablemente. Estudios con especies de pinos se centran principalmente en el uso de genes de núcleo catalogados como: genes candidatos, genes de baja copia (copia única) o genes de mantenimiento (Syring *et al.*, 2005; Willyard *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2012; Moreno-Letelier y Barraclough, 2015), algunos de los cuales se describen a continuación.

Syring et al. (2007), utilizaron tres loci nucleares de baja copia para explorar el carácter distintivo de *P. chiapensis*, primero descrita como variedad disjunta de *P. strobus* y como una especie distinta de acuerdo a un trabajo morfológico posterior. *Pinus chiapensis* no compartió alelos con ninguno de los posibles progenitores (*P. ayacahuite*, *P. monticola* o *P. strobus*), todos sus alelos son monofiléticos en dos de los tres loci. Los resultados mostraron que *P. chiapensis* es tan distinta como las tres especies restantes ampliamente aceptadas.

Un estudio interesante es el realizado en *Pinus densata* es un híbrido homoploide ecológicamente exitoso, para el que evaluaron los cambios históricos en el tamaño de su población, flujo génico y divergencia en el tiempo y el espacio, con ocho loci nucleares en 19 poblaciones. Los resultados muestran una diferenciación fuerte ($F_{ST}= 0.282$) entre las regiones geográficas, tamaños efectivos de 2.11×10^5 de la población central y 2.62×10^5 0.80×10^5 de las poblaciones occidentales, con presencia de cuellos de botella en los tres grupos de *P. densata* así como un movimiento de flujo de genes limitado y observado solo entre regiones geográficas adyacentes de la especie (Gao et al., 2012).

En un complejo de especies de pinos blancos: *Pinus flexilis*, *P. strobiformis* y *P. ayacahuite* distribuidos desde Canadá a América Central, Moreno-Letelier y Barraclough (2015), exploraron el papel del aislamiento por medio ambiente. Secuenciaron cinco genes candidatos para la tolerancia a la sequía y tres genes de mantenimiento. Los resultados mostraron que diferentes loci varían en grados de diferenciación genética dentro de las especies y contrastan en los patrones de diferenciación entre especies, esto se considera un patrón de mosaico de diferenciación genética. También encontraron un aislamiento significativo por medio ambiente en los genes candidatos en *P. flexilis* y *P. ayacahuite* para genes de mantenimiento.

2.4 Especies de estudio

Pinus durangensis, se distribuye en gran parte de la Sierra de Chihuahua y Durango en el sur de la Sierra Madre Occidental (SMOC), así como en el estado de Sonora (Figura 3). Las

poblaciones son densas puras o asociadas con otras especies de pino (*P. teocote*, *P. strobiformis* y *P. cooperi*), en un intervalo altitudinal amplio (1400-3000) (Farjon *et al.*, 1997). La especie crece en diferentes condiciones de suelo, el mejor crecimiento es donde los suelos son andosol de origen volcánico, profundos y bien drenados con precipitación variables entre 600 a 1600 mm (Perry, 1991). La temperatura media es de 13.3 °C con extremas máximas de 40 grados °C y mínimas hasta de -19.1 grados °C. Los meses más calientes son de abril a junio y los más fríos en invierno (diciembre, enero y febrero) con presencia de heladas (Farjon *et al.*, 1997).

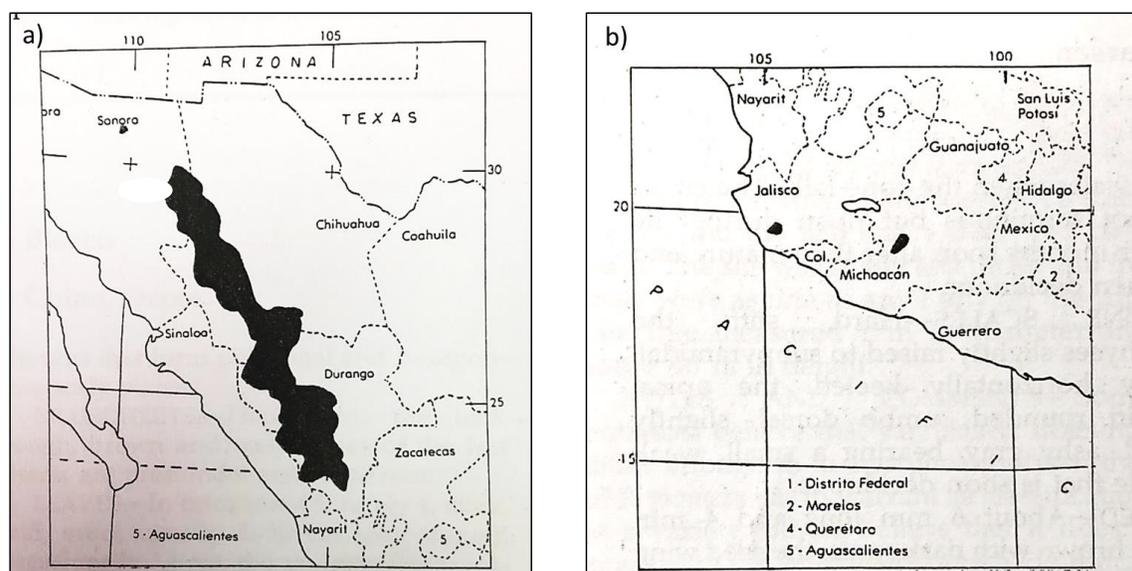


Figura 3. Mapa de distribución de las especies acorde con Perry (1991). a) *Pinus durangensis* y a) *Pinus martinezii*.

En contraste, *P. martinezii* presenta una distribución restringida al estado de Michoacán, en pequeñas poblaciones fragmentadas, así mismo, es considerada por la NOM-059 (SEMARNAT, 2010) bajo la categoría de Protección Especial, y como en la categoría de Casi Amenazada en Lista Roja de especies en riesgo (IUCN), contrario a lo que ocurre con *Pinus durangensis*, especie abundante de amplia distribución en el país. *P. martinezii*, se distribuye en poblaciones fragmentadas en el centro occidente de Michoacán y sur de Jalisco (Larsen, 1964; Perry, 1991) (Figura 1). Sin embargo, no se reconoce con certeza el

total de poblaciones que la representan; algunos autores indican que sólo existen dos localidades cercanas a Uruapan y Paracho Michoacán (Perry, 1991), mientras que otros consideran que tiene una distribución más amplia en Michoacán a través de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) (seis a 30 localidades; Silva 2005; Leal-Nares *et al.*, 2012). No obstante, a ello, las poblaciones que se han explorado (seis) se encuentran aisladas y representadas por pocos individuos distribuidos de manera dispersa, como consecuencia probable de la tala clandestina (Leal-Nares *et al.*, 2012). Las condiciones ambientales donde se distribuye la especie aparentemente son similares a los requerimientos de *P. durangensis*, se encuentra en un rango altitudinal de 2284-3022 que crece en suelos de tipo andosol y luvisol, con precipitaciones anuales de 1013 hasta 1499 mm, y una temperatura media anual de 15 a 15.4° C (Leal-Nares *et al.*, 2012), asociada a otras especies de pino como, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*, *P. teocote* y *P. leiophylla*, en altitudes entre los 1400 a los 2800 m (Silva, 2005).

Morfológicamente las características que las distinguen son: presencia de 3 canales resiníferos en *P. martinezii*, 2, 3 y 4 en *P. durangensis* (Perry 1991). Fascículos con 6 y 7 hojas en su mayoría y la presencia de pedúnculo no caedizo de los estróbilos femeninos de *P. martinezii* y, fascículos predominantes de 5 hojas, así como una corteza más pronunciada (en forma de placas) y oscura en *P. durangensis* (Delgado observ. Pers) (Figura 4). Sin embargo, a la fecha no se han reportado estudios formales de la variación morfológica y anatómica de ninguna característica de sus estructuras, como conos, acículas, corteza del tronco, para ninguna de las dos especies.

Recientemente Leal-Nares *et al.* (2012), realizó un estudio fisionómico de seis poblaciones de *P. martinezii* en la cuenca de Cuitzeo Michoacán, y reporta solo a dos de las poblaciones como conservadas (Agua Zarca y Nueva Victoria), ubicadas en altitudes entre 2,284 a 3,022 m, y asociadas con *P. teocote* y *Quercus crasifolia*.



Figura 4. Morfología de los conos femeninos de a) *P. martinezii* y b) *P. durangensis*.

Así mismo, realizó un análisis multicriterio de la de distribución potencial para las mismas poblaciones. Concluye que el nicho realizado de la especie ocupa solo una parte de su nicho fundamental, lo cual es debido a diversos factores que han impedido la dispersión y colonización, como las barreras geográficas, las interacciones bióticas y algunos procesos ocasionados por el cambio de uso de suelo y el aprovechamiento forestal. Dada estas problemáticas y la condición de protección especial que presenta la especie, es necesario hacer estudios genéticos, que permitan desarrollar esquemas de manejo y conservación emergentes.

En este estudio se pretendió hacer un análisis filogeográfico con el uso de marcadores genéticos microsatélites de cloroplasto (SSRcp) que fueron derivados del cloroplasto secuenciado de *Pinus thumbergii* (Vendramín *et al.*, 1996). En pinos el cloroplasto es heredado uniparentalmente vía paterna, por lo que el uso de esta región permitirá reconocer las rutas históricas de migración del polen y probablemente, observar una subestructuración espacial y temporal más marcada. Los cpSSR han sido usados en especies de pinos mexicanos con buenos resultados (Delgado *et al.*, 2007; Ortiz-Medrano *et al.*, 2008; Jardón *et al.*, 2011; Moreno-Letelier *et al.*, 2013).

Hipótesis

- *Pinus durangensis* es una especie de amplia distribución geográfica que contiene mayores niveles de variación genética que *P. martinezii* de distribución restringida, está representada por pocas poblaciones, aisladas y fragmentadas estructural y genéticamente.
- *Pinus durangensis* y *P. martinezii* son linajes divergentes, que han evolucionado de manera independiente por el aislamiento genético, geográfico y ambiental.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los niveles de variación genética y la estructura filogeográfica de las poblaciones de *P. durangensis* y *P. martinezii*, a través de su área de distribución natural en México.

Objetivos particulares

- Estimar los niveles de variación genética y el tamaño efectivo de las poblaciones *P. durangensis* y *P. martinezii*.
- Determinar la estructura geográfica de la variación genética y la existencia de barreras genéticas entre los dos taxa de estudio.
- Explorar si la divergencia de las especies está asociada a un patrón de aislamiento geográfico o ambiental.

V. Metodología

5.1 TRABAJO DE CAMPO

5.1.1 *Colecta de material biológico*

La selección de los sitios de colecta se hizo de acuerdo con información previa de la existencia de las poblaciones, a través de su área de distribución natural (Madrigal, 1986; Perry, 1991; Silva, 2005; Leal-Nares *et al.*, 2012; CONABIO, 2019). En total se colectaron 20 poblaciones; 12 correspondientes a *Pinus durangensis*, en los estados de Sonora, Chihuahua y Durango y ocho a poblaciones de *Pinus martinezii*, en Michoacán y Jalisco (Perry, 1991). Se tomaron datos de la distribución geográfica de las poblaciones (coordenadas geográficas y altitud), y datos generales de las condiciones ecológicas de las localidades (pendiente, tipo de suelo, clima y vegetación) (Figura 5).

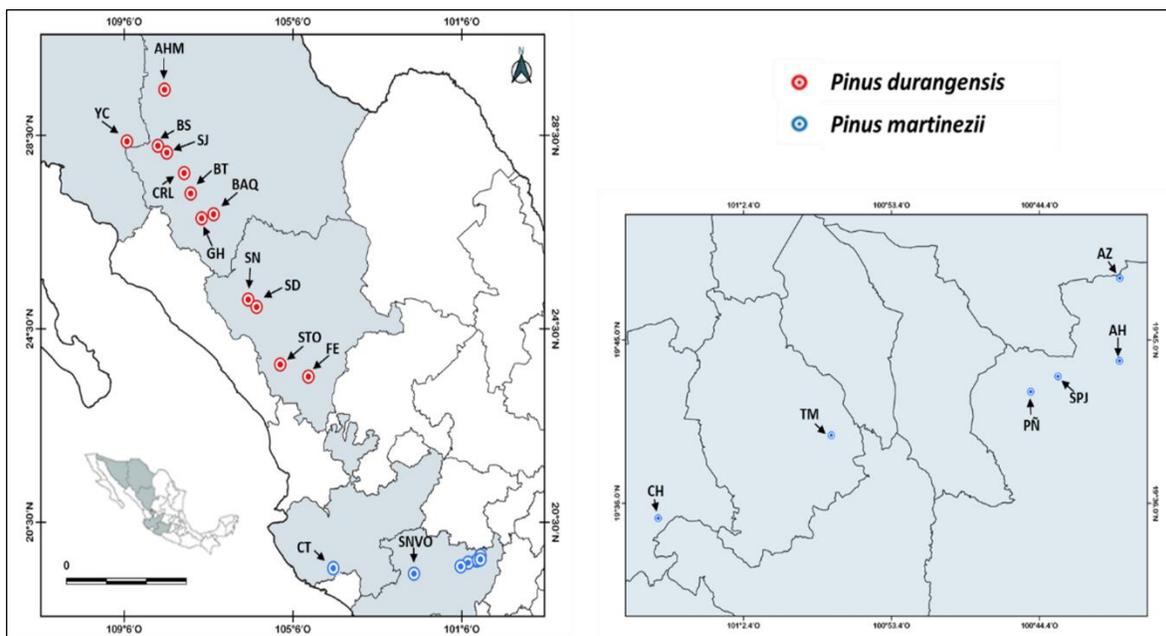


Figura 5. Distribución geográfica de las poblaciones en estudio de *Pinus durangensis* y *P. martinezii*, México.

En total se colectaron acículas de 307 individuos de 20 poblaciones y de 9 a 20 individuos elegidos al azar y separados a más de 50 m de distancia, para minimizar sesgo por parentesco (Tabla 1). El material biológico fue etiquetado con los siguientes datos; localidad, número de individuo y fecha de colecta, así como almacenado en un ultracongelador a -80°C , para su posterior procesamiento y extracción de ADN.

5.2 TRABAJO DE LABORATORIO

5.2.1 Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo de cada individuo utilizando el método de Miniprep CTAB 2X, optimizado para pinos (Vázquez-Lobo, 1996). La integridad del ADN fue comprobada con la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 0.5 % a 120 volts, en una cámara horizontal durante 20-40 minutos. Posteriormente el gel se colocó en un transiluminador de luz UV para observar las bandas de ADN, con el uso de un marcador de 1000 pb (1Kb).

5.2.2 Microsatélites de cloroplasto (SSRcp)

Inicialmente se ensayaron 10 SSRcp (Pt30204, Pt71936, Pt871329, Pt100783, Pt15169, Pt1254, Pt36480, Pt63718, Pt1254, Pt7995 y Pt110048) aislados de *Pinus thumbergii* (Vendramín *et al.*, 1996). El oligo forward fue marcado con fluorescencia para su amplificación por medio de la técnica de PCR de acuerdo con Vendramin *et al.* (1996), de los cuales seis fueron seleccionados para el estudio al ser polimórficos y reproducibles (Tabla 2).

Tabla 2. Microsatélites de cloroplasto (SSRcp; Vendramin *et al.*, 1996) utilizados en las especies de estudio.

Locus	Oligos (5' -3')	Tamaño (pb)	Fluorocromo
Pt30204	TCATAGCGGAAGATCCTCTTT CGGATTGATCCTAACCATAACC	136-141	FEM (azul)
Pt871329	GCCAGGGAAAATCGTAGG AGACGATTAGACATCCAACCC	159-164	HEX (Verde)
Pt100783	ATACGTATGTATCCCTAACTGTCA TCAATTTTTGCCATATCCTGA	113	HEX (Verde)
Pt15169	CTTGGATGGAATAGCAGCC GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA	118-115	FEM (azul)
Pt36480	TTGTACAAAATAAGG AAA'ITCCTAAAGAAGGAAGACCA	145-147	HEX (Verde)
Pt63718	CACAAAAGGATTTCAGTG CGACGEAAAGAATGGTG	92-94	FEM (azul)

Tabla 1. Localidades de colecta, estado, provincia biogeográfica (SMOC: Sierra Madre Occidental, SMS: Sierra Madre del Sur, FVTM: Faja Volcánica transmexicana, coordenadas geográficas, altitud, y tamaño de muestra (n) de *Pinus durangensis* Mtz. y *Pinus martinezii* E. Larzen.

Especie	Localidad/ abreviación	Estado	Provincia Biogeográfica	Latitud (N)	Longitud (W)	Altitud (msnm)	n
<i>P. durangensis</i>	Yecora/YC	Sonora	SMOC	28°22'27.0"	109°02'05.0"	2066	16
<i>P. durangensis</i>	Maderas/AHM	Chihuahua	SMOC	29°26'40.6"	108°08'39.5"	2179	14
<i>P. durangensis</i>	Basaseachi/BS	Chihuahua	SMOC	28°12'33.3"	108°12'17.7"	2053	13
<i>P. durangensis</i>	San Juanito/SJ	Chihuahua	SMOC	28°02'48.2"	107°50'05.4"	2564	17
<i>P. durangensis</i>	Creel/CRL	Chihuahua	SMOC	27°43'09.6"	107°40'43.8"	2447	16
<i>P. durangensis</i>	Batopilas/BT	Chihuahua	SMOC	27°17'49.9"	107°31'24.7"	2258	9
<i>P. durangensis</i>	Guachochi/GH	Chihuahua	SMOC	26°47'01.7"	107°15'51.9"	2512	17
<i>P. durangensis</i>	M. Baqueriche/BAQ	Chihuahua	SMOC	26°52'00.5"	106°58'54.4"	2472	16
<i>P. durangensis</i>	Sitios Negros/SN	Durango	SMOC	25°06'13.8"	106°09'44.4"	2603	13
<i>P. durangensis</i>	San Diego/SD	Durango	SMOC	24°57'05.4"	105°57'54.6"	2235	15
<i>P. durangensis</i>	El Salto/STO	Durango	SMOC	23°47'33.2"	105°23'22.3"	2557	19
<i>P. durangensis</i>	Flor Espinoza/FE	Durango	SMOC	23°30'59.8"	104°43'49.6"	2726	14
<i>P. martinezii</i>	Manantlán/CAP	Jalisco	SMS	19°55'23.9"	104°14'58.6"	2844	18
<i>P. martinezii</i>	Sn. Juan Nuevo/SNVO	Michoacán	FVTM	19°26' 06.3"	102°14'02.3"	2717	13
<i>P. martinezii</i>	Peñuelas/PÑ	Michoacán	FVTM	19°42'08.8"	100°44'55.8"	2352	15
<i>P. martinezii</i>	Temazcal/TM	Michoacán	FVTM	19°39'44.8"	100°57'03.9"	2491	15
<i>P. martinezii</i>	Chilar/CH	Michoacán	FVTM	19°35'10.5"	101°07'35.5"	2290	19
<i>P. martinezii</i>	Pedro Jacuaro/SPJ	Michoacán	FVTM	19°43'50.9"	100°39'31.9"	2265	17
<i>P. martinezii</i>	Alta Huerta/AH	Michoacán	FVTM	19°42'59.6"	100°43'16.4"	2494	15
<i>P. martinezii</i>	Los Azufres/AZ	Michoacán	FVTM	19°48'24.4"	100°39'30.8"	3060	16

Las reacciones de amplificación y condiciones de PCR se realizaron en una termocicladora c1000™ Thermal Cycler (BIO RAD), de acuerdo al método reportado por Vendramin et al. (1996). El programa consistirá de: 5 min de desnaturalización a 95 °C, seguido de 25 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de recocido a 55°C y un paso de extensión final de 72 °C durante 8 min, con las siguientes condiciones para un volumen final de 25 µl: 2.5 µl Buffer 10X (IM Tris, pH 9) 0.4 µl de DNTPs (4X, 100 Mm), 2.0 µl de oligo forward y revers (10 µl), 13.4 µl de H₂O, 2.0 µl de MgCl₂ (2.5 Mm), 0.2 µl de Taq polimerasa (1U) y 2.5 µl de ADN (20 ng/ µl).

Los fragmentos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Ethidio, con la finalidad de verificar su presencia. Para corroborar el tamaño de las amplificaciones se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb). Posteriormente, fueron enviados a servicio externo (Universidad de Illinois, USA) para la obtención de electrofenogramas en un secuenciador automático Applied Biosystems 3730xl.

Una vez obtenidos los electrofenogramas, se realizó la lectura de los tamaños de los fragmentos en pares de bases, con el uso del programa Peak Scanner (Applied Biosystems, 2012) (Figura 6). Para un manejo eficaz de la información se elaboró una base de datos en el programa Excel (2016), donde se registró el tamaño del fragmento de cada uno de los seis locus (microsatélites).

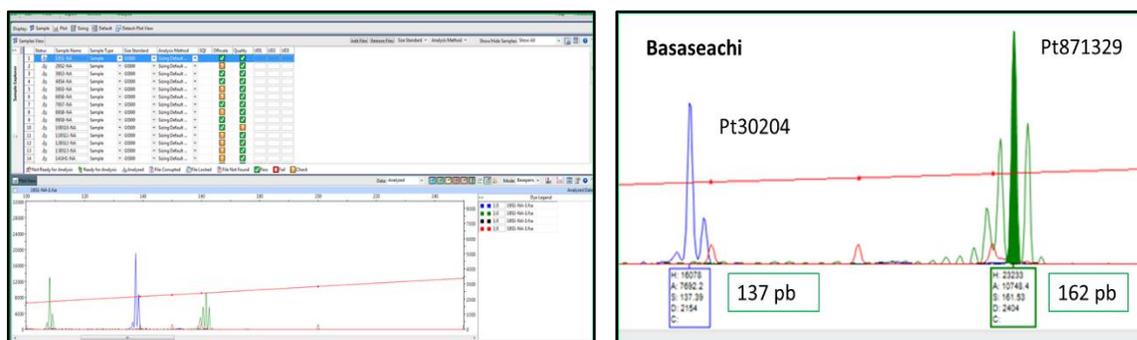


Figura 6. Lectura del tamaño de los fragmentos en los electrofenogramas con el programa Peak Scanner.

5.2.3 Análisis de datos

La variación genética se estimó con los siguientes parámetros: el número de haplotipos (h), el número de haplotipos privados (P), riqueza haplotípica (Rh), la diversidad genética (H ; Nei, 1987), la diversidad por población (Hs) y la total (Ht), con el uso del programa Haplotype analysis (Heliades y Eliades, 2009). El tamaño poblacional se obtuvo con el parámetro $\theta=2N_eu$, donde N_e es el tamaño efectivo poblacional basado en el modelo de mutación paso a paso, asumiendo una tasa de mutación constante estimada de 5.5×10^{-5} por generación (u ; Hedrick 1999; Provan *et al.*, 1999).

La estructura genética se obtuvo con un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), entre y dentro de poblaciones, entre grupos de poblaciones (dos regiones) y entre los grupos generados con el análisis Bayesiano BAPS, basados en los modelos de mutación de alelos infinitos IAM (Weir 1996) y de un paso (SMM) (Slatkin 1995). La significancia estadística se obtuvo con 1000 permutaciones no paramétricas utilizando el programa Arlequin 3.1 (Excoffier y Lischer, 2010).

Para la formación de grupos genéticos se utilizó una aproximación bayesiana con el programa BAPS ver. 6.0 (Colander *et al.*, 2008a), para explorar la subestructuración geográfica de la variación genética, ya que incorpora información espacial y supone que la estructura de una determinada población depende de la de las áreas adyacentes. El programa emplea un algoritmo de optimización estocástica para buscar el número de K grupos más probable a través de la descripción de la variación molecular en cada población (Corander *et al.*, 2008b). La búsqueda se realizó asumiendo de 2 a 10 K grupos, con 10 replicas por K , 10 000 periodos de burning y 10 000 iteraciones (MCMC; Cadenas de Markov tipo Monte Carlo), asumiendo información a priori de las poblaciones y frecuencias alélicas similares.

El algoritmo de diferencia máxima de Monmonier implementado en BARRIER ver. 2.0 (Manni *et al.*, 2004) se usó para inferir la ubicación geográfica de las principales

discontinuidades genéticas entre poblaciones. BARRIER crea un mapa donde identifica una barrera a lo largo de las teselaciones de Voronoi cuando se proporciona una matriz de distancia genética y una de datos geográficos. Para este propósito, se obtuvieron las distancias genéticas a partir del estadístico R_{ST} , con el uso del programa Arlequin 3.1 (Excoffier y Lischer, 2010), basadas en el modelo de mutación de un paso (SMM) y las distancias geográficas absolutas en kilómetros, obtenidas a través de un calculador implementado en el programa Google Harth (Keyhole, Inc., 2001). El número de barreras identificadas por BARRIER se estableció de 1 a 10.

El flujo genético entre las poblaciones se evaluó de manera indirecta de acuerdo con la fórmula $N_m = \frac{1}{2} [(1/F_{ST}) - 1]$ descrita por Slatkin (1995), donde N_m es el número efectivo de migrantes entre poblaciones por generación. La matriz de datos obtenida se usó para proyectar en un mapa el N_m en dirección Norte a Sur de su distribución, bajo los siguientes supuestos: el origen y dispersión del género *Pinus* en América (Millar, 1993) y un mayor N_m entre poblaciones más cercanas (Slatkin, 1995). Los valores de N_m entre las poblaciones (Norte-Sur) se interpolaron mediante la aplicación de las distancias inversas ponderadas (IDW) (Watson y Philip, 1985), con el programa Qgis ver. 3.2.3. La construcción del mapa se hizo con base a la delimitación del área accesible M para cada especie, definida como el espacio donde una especie está o se asume que podría estar dado el conocimiento biológico que se tiene de ella y de su capacidad de dispersión por no existir barreras ambientales que pudieran limitar su establecimiento (Soberón y Peterson, 2005; Martínez-Méndez *et al.*, 2016; Manzanilla *et al.*, 2019). Para delimitarla, se usaron tres provincias (SMOC, SMS y FVTM) y 11 sub-provincias fisiográficas de México (INEGI 2001), que corresponden a las poblaciones colectadas y a registros de *P. durangensis* y *P. martinezii*, consultadas en la base de datos Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2020) y del Herbario Nacional MEXU (UNAM, 2020) (Apéndice 4).

Finalmente, para ver si la distribución de la variación genética está asociada con su distribución geográfica (IBD) y/o ambiental (IBA), se hicieron análisis de correlación con una

prueba de Mantel con 10 000 permutaciones usando el programa IBD v 1.52 (Bohonak, 2002). Las distancias genéticas se obtuvieron a partir de los valores pareados de R_{ST} , las distancias geográficas del análisis de Barreras genéticas (ver párrafo anterior), y para el caso del IBA se usó el índice de severidad de sequía de Palmer (PDSI; Palmer, 1965), con datos espaciales mensuales obtenidos para dos periodos (1960-1990 y 1982-2012), de la plataforma Mexican Drought Atlas (Stanle *et al.*, 2016). Los mapas de proyección de sequía se generaron con el programa Arcmap versión 10.3.

IV. Resultados

Variación genética

Los seis loci amplificados fueron polimórficos, cada locus tuvo de tres a ocho alelos y un total de 34 alelos fueron identificados en los seis loci. Con la combinación de los diferentes alelos se construyeron 121 haplotipos (Apéndice 1), con cinco a 15 haplotipos por población. Sin embargo, más de la mitad de los haplotipos fueron privados (69%), con una mayor presencia en la población de Creel (10; Chihuahua). El haplotipo con la frecuencia más alta fue el H78 presente en las poblaciones: Yecora de Sonora, San Juanito, Creel, Batopilas, Guachochi de Chihuahua, Sitios Negros, San Diego y El Salto de Durango. Otros haplotipos frecuentes fueron; el H96 (Yecora, Batopilas, Guachochi, Meza de Baqueriche, El Salto y Capillas) y el H112 (Maderas, Bassaseachi, San Juanito, Guachochi, Sitios Negros y San Diego). La riqueza haplotípica (Rh) media fue de 5.8, varió de 3.00 a 7.30 entre las poblaciones, de las cuales Temazcal presentó el valor más alto ($Rh= 8.0$) y San Juan Nuevo presentó el valor más bajo ($Rh= 3.0$).

El promedio más alto en el número de haplotipos se encontró en las poblaciones de *P. martinezii*, con un valor de 11 en comparación con *P. duranguensis* que presentó un valor de 9.5 haplotipos. La población de Temazcal de Michoacán es la que registró mayor riqueza haplotípica y mayor diversidad genética, esto, debido a que cada individuo presentó un haplotipo diferente (15).

Todas las poblaciones de *P. duranguensis* ($H= 0.904$) y *P. martinezii* ($H=0.906$) mostraron un valor alto de diversidad genética de Nei con $H= 0.906$ en promedio, así como valores altos de diversidad genética dentro de las poblaciones y diversidad genética total, $H_s=0.845$ y $H_t=0.978$ respectivamente. El tamaño poblacional histórico de *P. duranguensis* ($N_e=16,759.52$) fue ligeramente menor al de *P. martinezii* ($N_e =19,324.12$) (Tabla 3).

Tabla 3. Población, tamaño de la muestra (N), riqueza haplotípica (Rh), diversidad genética imparcial de Nei (H), valor de theta bajo el modelo de mutación paso a paso (Θ_{SMM}) y el tamaño poblacional (N_e).

Especie/ Población	N	No. Haplotipos	H. Privados	Rh	H	Θ_{SMM}	N_e
<i>Pinus durangensis</i>							
YC	16	9	4	5.13	0.88	1.96	17,773.90
AHM	14	11	4	6.65	0.96	1.53	13,873.90
BS	13	6	4	3.76	0.77	2.21	20,124.09
SJ	17	14	7	7.21	0.98	1.50	13,647.27
CRL	16	14	10	7.25	0.98	1.58	14,350.81
BT	9	8	5	7.00	0.97	1.57	14,282
GH	17	10	4	5.20	0.88	2.10	19,091.09
MB	16	6	2	3.49	0.77	2.02	18,397.81
SN	13	8	3	5.36	0.91	1.68	15,260.09
SD	15	11	2	6.25	0.93	1.60	14,609.54
STO	19	7	0	4.36	0.87	2.37	21,509.63
FE	14	11	6	6.65	0.96	1.89	17,160.36
CAP	18	9	1	5.35	0.92	1.96	17,793.18
Media		9.5	4	5.66	0.904	1.84	16,759.52
<i>Pinus martinezii</i>							
SNVO	13	5	3	3.00	0.63	4.17	37,951
CH	19	15	9	7.03	0.97	1.52	13,803.72
TM	15	15	6	8.00	1.00	1.65	14,992.90
PÑ	15	7	2	4.78	0.90	2.21	20,065.63
SPJ	15	10	2	5.97	0.93	1.92	17,438.45
AH	17	14	5	7.06	0.97	1.62	14,749.54
AZ	16	11	4	6.35	0.95	1.79	16,267.54
Media		11	4.4	5.79	0.905	1.51	19,324.12

Estructura geográfica de la variación genética

El análisis Bayesiano de estructura poblacional (BAPS) dio como óptimo la partición de las poblaciones en dos zonas geográficas: el Norte (Sonora, Chihuahua, Durango y Jalisco) y el Sur (Michoacán) y siete grupos genéticos. La zona del Norte se divide en cuatro grupos genéticos correspondientes a *P. durangensis*; grupo I integrado por Yecora, Creel y Batopilas. Grupo II por Maderas, Bassaseachic, San Juanito, Sitios Negros y San Diego. Grupo III compuesto solo por dos poblaciones Guachochi y Flor Espinoza, y por último el Grupo IV por M. de Baqueriche, El Salto y Capillas. La zona del Sur por su parte se integra por tres

grupos genéticos correspondientes a poblaciones de *P. martinezii*; San Juan Nuevo, Peñuelas y San Pedro Jacuaro forman el grupo I, Chilar y Alta Huerta el grupo II y Temazcal y Los Azufres el grupo III (Figura 7).

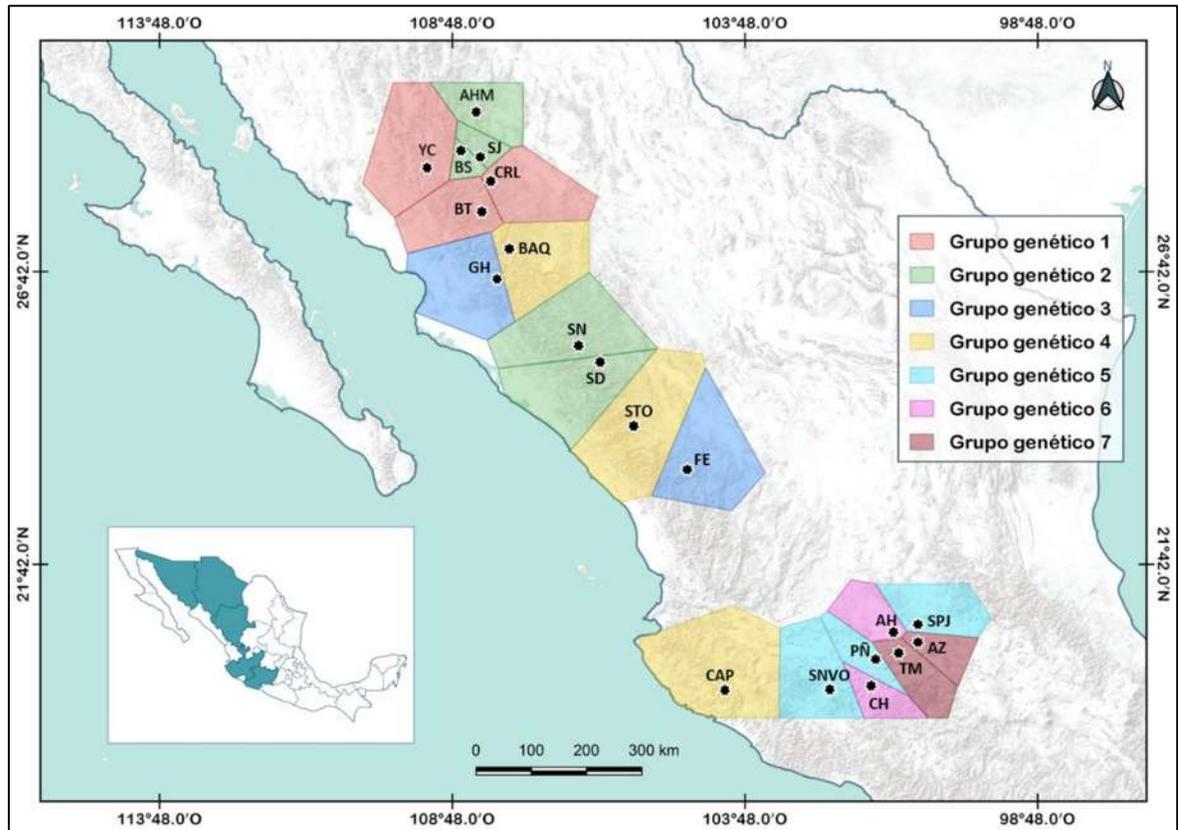


Figura 7. Resultado del análisis bayesiano de estructura poblacional (BAPS). YC, Yecora; CRL, Creel; BT, Batopilas (ROJO). AHM, Maderas; BS, Bassaseachic; SJ, San Juanito; SN, Sitio Negro; SD, San Diego (VERDE). GH, Guachochi; FE, Flor Espinoza (AZUL). BAQ, Meza de Baqueriche; STO, El Salto; CAP, Capillas (AMARILLO). SNVO, San Juan Nuevo; PÑ, Peñuelas; SPJ, San Pedro Jacuaro (AZUL AGUA). CH, Chilar; AH, Alta Huerta (ROSA). AZ, Azufres; TM, Temazcal (CAFÉ).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) a nivel de las poblaciones indica que la mayor proporción de varianza se encuentra dentro de las poblaciones con ambos estadísticos ($F_{ST}= 67.7\%$ y $R_{ST}= 50.39\%$) que entre las poblaciones ($F_{ST}= 32.4\%$ y $R_{ST}= 49.61\%$) (Tabla 4).

Los resultados de AMOVA con los grupos definidos por BAPS para F_{ST} , mostraron que una proporción considerable se explica por las diferencias entre los grupos (24.88%). Sin embargo, la mayor proporción de varianza se localizó dentro de las poblaciones (65.73%)

mientras que la proporción de varianza fue menor entre poblaciones dentro de grupos (9.39%). Los resultados de R_{ST} coinciden con los de F_{ST} .

Tabla 4. Análisis de varianza molecular con valores de F_{ST} y R_{ST} . En letras bold se indican los valores más altos para cada grupo de análisis. La significancia estadística fue obtenida con 10000 permutaciones no-paramétricas (Excoffier y Lischer, 2010).

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de variación	(F_{ST}/R_{ST})
a) Poblaciones tratadas como un solo grupo					
F_{ST}					0.324
Entre poblaciones	19	155.79	0.47	32.4	
Dentro poblaciones	287	281.85	0.98	67.7	
Total	306	437.65	1.45		
R_{ST}					0.503
Entre poblaciones	19	605.43	1.95	49.61	
Dentro poblaciones	287	551.71	1.92	50.39	
Total	306	1157.14	3.87		
b) Zonas geográficas (Norte-Sur)					
F_{ST}					0.394
Entre grupos	1	52.13	0.32	20.19	
Entre poblaciones dentro de grupos	18	103.65	0.31	19.24	
Dentro poblaciones	287	281.85	0.98	60.56	
Total	306	437.65	1.62		
R_{ST}					0.643
Entre grupos	1	425.66	2.94	54.58	
Entre poblaciones dentro de grupos	18	179.76	0.52	9.77	
Dentro poblaciones	287	551.71	1.92	35.65	
Total	306	1157.14	5.39		
c) Grupos formados por BAPS					
F_{ST}					0.342
Entre grupos	6	115.43	0.37	24.88	
Entre poblaciones dentro de grupos	13	40.35	0.14	9.39	
Dentro poblaciones	287	281.85	0.98	65.73	
Total	306	437.65	1.49		
R_{ST}					0.528
Entre grupos	6	512.27	1.8	44.33	
Entre poblaciones dentro de grupos	13	93.15	0.34	8.51	
Dentro poblaciones	287	551.71	1.92	47.17	
Total	306	1157.14	4.07		

Finalmente, cuando las poblaciones se dividieron en zonas geográficas (norte y sur), el mayor porcentaje de variación de F_{ST} se encontró dentro de poblaciones (60.56%) seguido de entre grupos (20.19%) y en menor porcentaje entre poblaciones dentro de grupos (19.24%). En Contraste R_{ST} presentó el valor más alto de diferenciación entre grupos (54.58%), en segundo lugar, dentro de poblaciones (35.65%) y el valor más bajo entre poblaciones dentro de grupos (9.77%). Para todos los casos el valor de R_{ST} , fue mayor al de F_{ST} $P < 0.05$.

De acuerdo a las distancias pareadas de R_{ST} , BARRIER sugirió la presencia de una muy marcada discontinuidad genética. La barrera principal (a) divide claramente las poblaciones del Norte (Sonora, Chihuahua, Durango y Jalisco) de las poblaciones del Sur (Michoacán) (Figura 8). Los resultados se observan tanto al considerar las 20 poblaciones como un solo grupo, como al definir los siete grupos genéticos sugeridos por BAPS, lo que sustenta la hipótesis de que existe una diferenciación genética de las poblaciones del norte de las del sur, es decir, entre *P. durangensis* y *P. martinezii*.

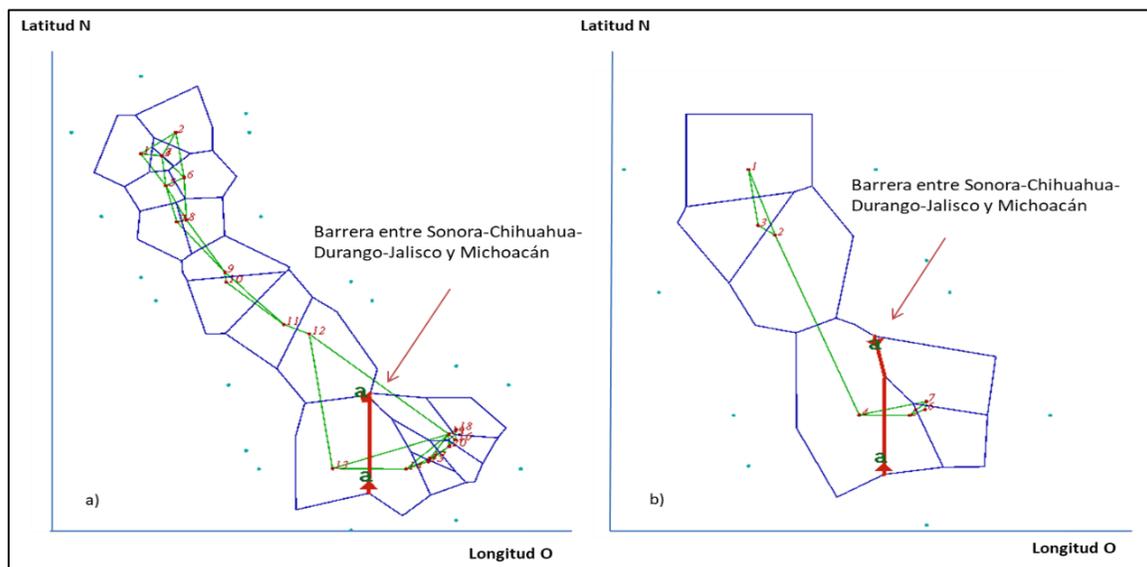


Figura 8. Mapa de barreras genéticas estimadas con BARRIER. a) R_{ST} para 20 poblaciones, y b) R_{ST} para siete grupos genéticos. La barrera a, es la de mayor probabilidad.

Aislamiento por distancia y por ambiente

El promedio del flujo genético entre todas las poblaciones fue bajo ($N_m = 1.155$). Entre especies, el flujo genético fue mínimo con valores menores a 1.0, es decir las poblaciones de *P. durangensis* no se comunican genéticamente con las de *P. martinezii*. Sin embargo, se encontró un flujo genético infinito entre varias poblaciones del grupo norte: YC con SJ, BT y SN, SJ con SD y El STO, y SD con El STO. *P. durangensis* mantiene un flujo muy alto entre sus poblaciones, las de Sonora y Chihuahua intercambian migrantes con las de Durango, incluso con la población de Capillas en Jalisco. Para el sur, el mayor flujo genético se encontró entre la población de TM con CH y AZ ($N_m = 4.90$ y 4.96) (Figura 9, Apéndice 2 y 3).

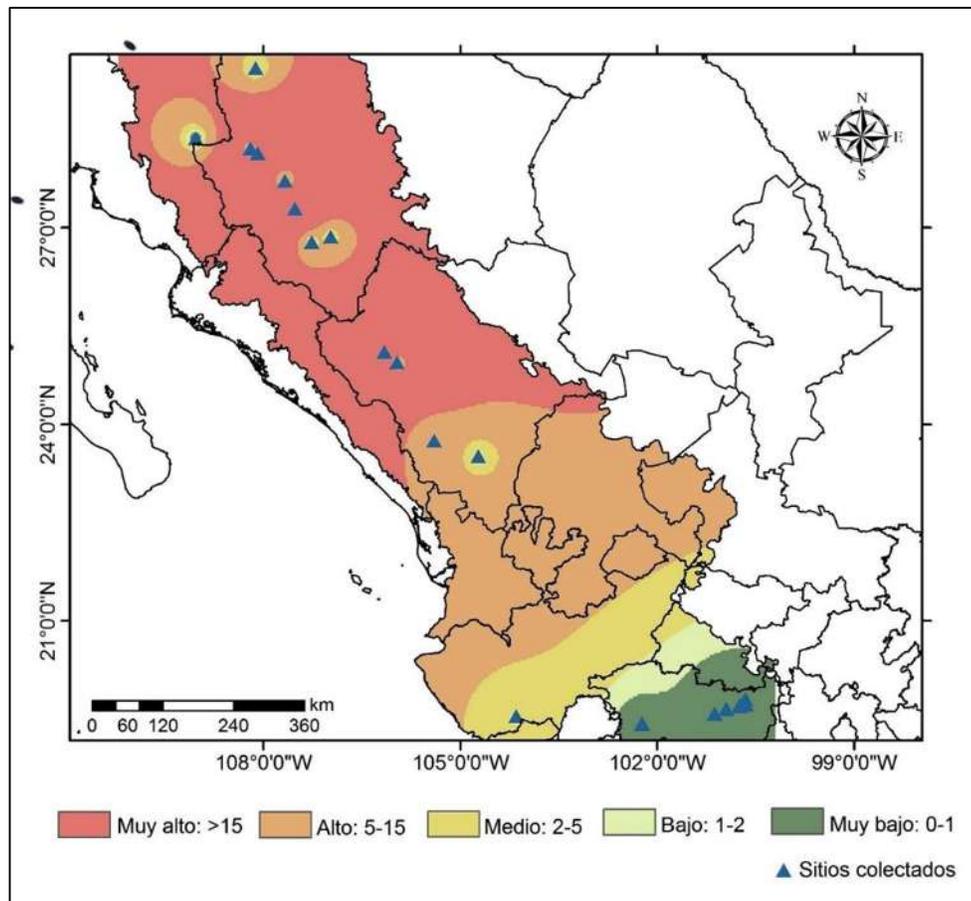


Figura 9. Flujo filogenético N_m entre y dentro poblaciones de *P. durangensis* y *P. martinezii*. El traslape de colores indica la existencia de flujo genético entre las poblaciones ubicadas en sitios diferentes y cuya intensidad varía acorde con la nomenclatura señalada en los colores del mapa y que van de muy alto a muy bajo intercambio genético.

El aislamiento por distancia (IBD) entre las distancias genéticas y geográficas (R_{st}) de poblaciones pareadas, resultó significativa ($Z= 58663.41$, $r= 0.5607$, $P<= 0.0010$), con una contribución del 56% de la diferenciación genética debida a la distribución geográfica de las poblaciones (Figura 10). Sin embargo, cuando se hizo el análisis a nivel de poblaciones por grupo no se presentó un resultado significativo ($p <= 0.6550$ y $p <= 0.1170$, zona norte y zona sur, respectivamente).

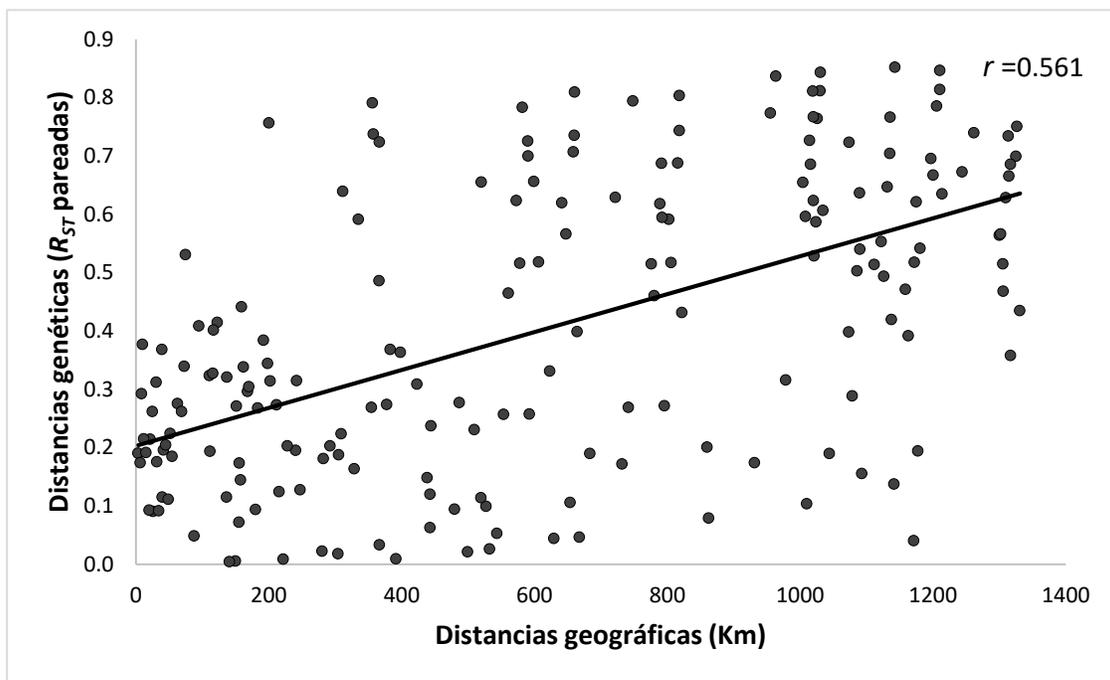


Figura 10. Patrón de aislamiento por distancia (IBD) entre las poblaciones de *P. durangensis* y *P. martinezii*, distribuidas en la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur y en la Faja Volcánica Transmexicana, respectivamente.

De acuerdo al índice de severidad de sequía de Palmer (PSDI), las poblaciones de *P. durangensis* para el periodo de 1960-1990 presentaron un promedio más seco del índice (PSDI= -0.068) que *P. martinezii* (PSDI=0.72). En el periodo reciente (1982-2012) se observó un patrón similar, *P. durangensis* presentó mayor grado de sequía respecto al periodo anterior con un promedio de -0.511. En contraste, *P. martinezii* mantuvo valores positivos (0.26 a 0.33), con un promedio de sequía de 0.23 (Figura 11).

El aislamiento por ambiente (IBA) también resulto positivo y significativo ($Z = 43.4436$, $r = 0.5148$, $p \leq 0.0010$) entre todas las poblaciones, donde el 51% de la diferencia genética puede ser atribuible al ambiente (Figura 12). A nivel de grupo por zonas no se encontró una asociación significativa ($p \leq 0.6312$, norte; $p \leq 0.4437$, sur).

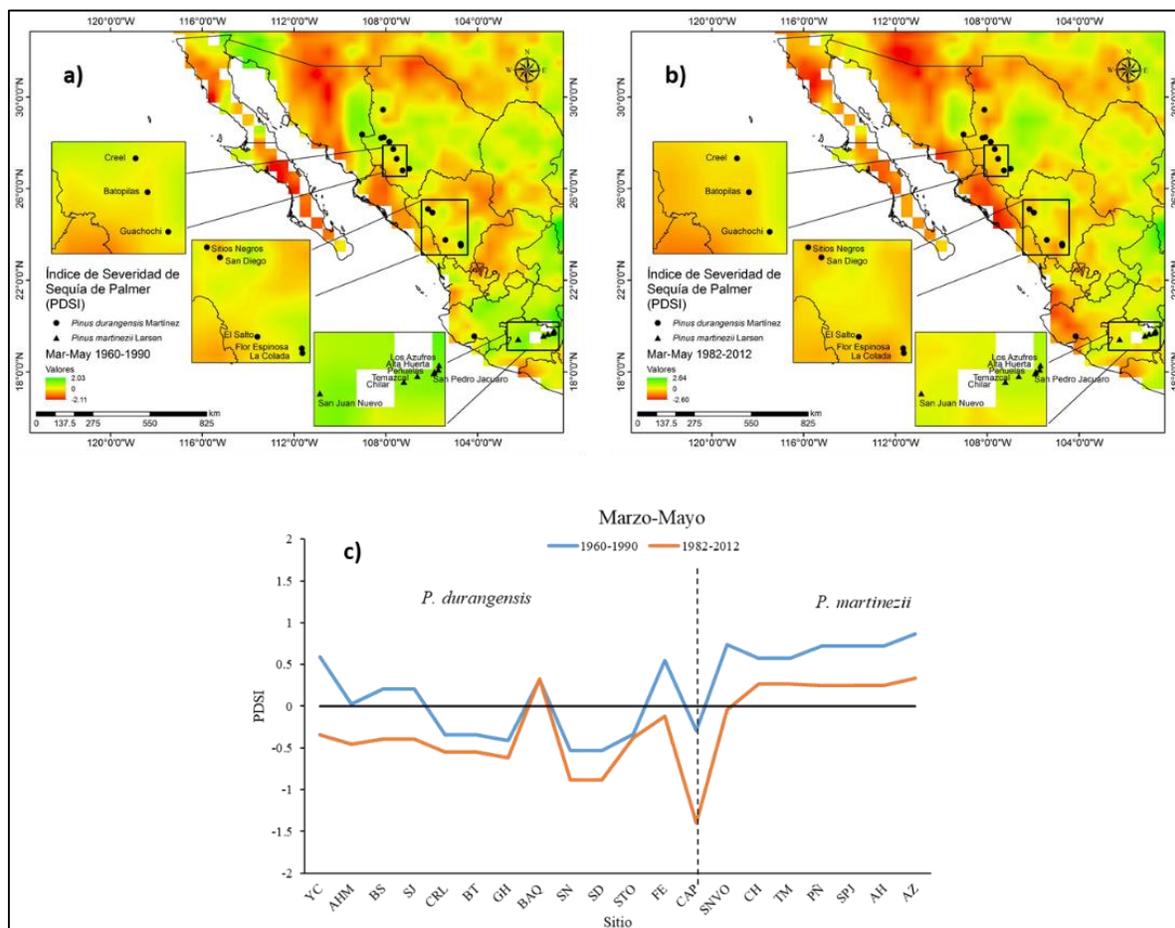


Figura 11. Índice de severidad de sequía de Palmer (PSDI) de las poblaciones de *P. durangensis* y *P. martinzeii*. a) Periodo de 1960-1990, b) Periodo de 1980-2012, c) 1960-1990 vs.1980-2012.

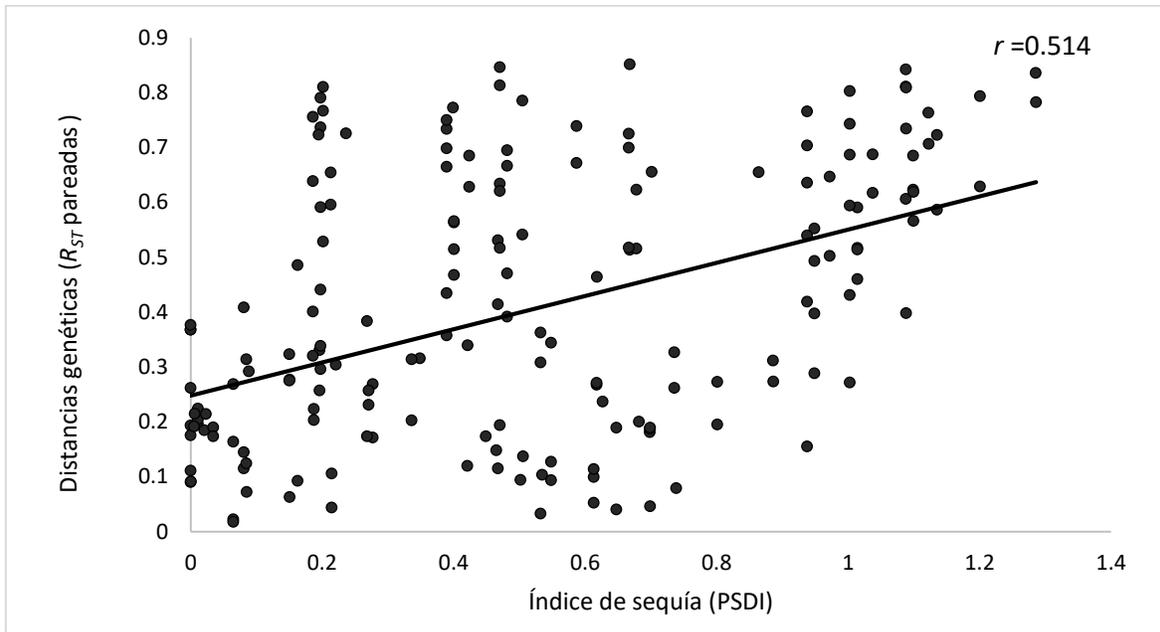


Figura 12. Patrón de aislamiento por ambiente (IBA) entre las poblaciones de *P. duranguensis* y *P. martinezii* distribuidas en México.

V. Discusión

Diversidad genética

La diversidad genética de *P. durangensis* y *P. martinezii* fue alta, lo que concuerda con su sistema ventajoso de entrecruzamiento por polinización anemófila (Plomion *et al.*, 2007). El número de alelos por locus fue más alto en comparación con otras especies de pinos (hasta ocho). Sin embargo, el número de haplotipos (121) resultó menor que en especies como *P. hartwegii*, *P. monteuzame* y *P. pseudostrobus* (Obregón, 2010; Delgado *et al.*, 2007) que fueron analizados con igual/mayor número de loci de cpSSR, pero mayor que en *P. ayacahuite* var. *ayacahuite*, *P. strobiformis* y *P. nelsonnii* (Ortíz-Medrano *et al.*, 2008; Moreno-Letelier y Piñero, 2009; Cuenca *et al.*, 2003), analizados con menor número de microsatélites. Es probable que estas diferencias entre la diversidad haplotípica de las especies pueda deberse al número de microsatélites empleados en cada estudio, sin embargo, se ha asociado más esta diversidad a las diferencias del rango de distribución geográfica de las especies; con mayor diversidad genética en especies de distribución amplia y continua, seguido de especies de distribución amplia pero fragmentada y la menor diversidad en especies de distribución restringida (Ledig *et al.*, 2001; Delgado y Piñero, 2008) De estas categorías, se podría considerar a *P. durangensis* como de distribución amplia pero fragmentada con una diversidad genética alta ($H= 0.904$) similar a especies de pinos con este tipo de distribución, como son *Pinus strobiformis* ($H= 0.858$; Moreno-Letelier y Piñero, 2009), y *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite* ($H=0.705$; Ortíz-Medrano *et al.*, 2008).

Se ha llegado a considerar a la variación genética como indicador de la buena “salud” de una población, mientras que su ausencia limita la capacidad de respuesta de una población a un medio cambiante en el corto y largo plazo (Amos y Harwood, 1998; Moreno-Letelier, 2007). Sin embargo, los niveles de variabilidad no siempre corresponden a lo predicho por la teoría, ya que algunas especies con alta variación tienen poblaciones pequeñas y están demográficamente en peligro (Eguiarte *et al.*, 2007; Moreno-letelier, 2007), como podría ser el caso de *P. martinezii* que contiene valores altos de diversidad genética ($H= 0.906$) comparados con los reportados para *P. nelsonnii* ($H= 0.640$; Cuenca *et al.*, 2003) o *P.*

pinceana ($H= 0.824$; Escalante, 2001), especies con distribución restringida, fragmentada y consideradas en peligro de extinción.

Acorde con los resultados, la alta diversidad genética en *P. martinezii* podría deberse en gran parte a tres aspectos centrales: La fragmentación de las poblaciones puede ser muy reciente y todavía no se ve reflejado genéticamente (Barrett y Kohn 1991; Montgomery *et al.*, 2000; Cruzan, 2001, Moreno-Letelier y Piñero, 2009). Los tamaños efectivos de las poblacionales fueron grandes en el pasado (16,759.52 y 19,324.12) en ambas especies, por lo que aún mantienen su variabilidad genética en cantidades considerables, y la mayoría de las poblaciones que existen actualmente, aún mantienen un flujo genético alto y constante (> 1.5 unidades), probablemente debido a la cercanía entre ellas, ayudado por la dispersión anemófila de las semillas (Perry 1991; Ledig *et al.*, 2001). En este punto es necesario considerar que el proceso de mutación es el único que puede generar nueva variación dentro de una población, sin embargo, la migración también puede aportar esa variación proveniente de otros sitios, por lo que no sólo el tamaño efectivo de la población es determinante para el mantenimiento de la variación genética y la adecuación, sino también la posibilidad de intercambiar genes por migración de individuos o gametos de poblaciones cercanas. Esto hace posible que poblaciones muy pequeñas puedan persistir a lo largo del tiempo gracias al efecto de rescate de los migrantes (Cruzan, 2001; Moreno-Letelier, 2007).

Aunque es escasa la información sobre *P. martinezii*, para dos poblaciones del Mpio. de Hidalgo se reportan tamaños censales grandes (263 y 190), con presencia de individuos de diferentes edades, por lo que se encuentran en un buen estado de conservación (Leal-Nares *et al.*, 2012). Las poblaciones de Peñuelas, Alta Huerta y San Pedro Jacuaro de mayor variación genética, se encuentran en ese Mpio de Hidalgo, que es una zona de mayor aptitud para el establecimiento y colonización. Se cree que anteriormente las poblaciones pudieron haber estado juntas en manchones más grandes (Leal-Nares *et al.*, 2012). En contraste en otras poblaciones como el caso de San Juan Nuevo, se detectaron niveles de variación genética más bajos, debido a que se encuentra aislada y alejada de las demás

poblaciones. Es decir que el efecto de la fragmentación y aislamiento geográfico podría estar influyendo de manera importante sobre la cantidad y distribución de la variación genética.

Estructura geográfica de la variación genética

El análisis de agrupamiento Bayesiano BAPS, confirma la existencia de dos zonas geográficas (Norte y Sur), diferenciadas genéticamente: El norte que incluye las poblaciones de *P. durangensis* y el Sur donde se concentran las de *P. martinezii*, siendo más similares entre sí que con las poblaciones de la otra especie. De igual manera el AMOVA muestra que el porcentaje más alto de variación genética se encuentra entre grupos geográficos (54.58%). Los valores de R_{ST} resultaron para todos los casos más altos que los de F_{ST} lo que sugiere que la tasa de mutación no es despreciable y que la diferenciación genética entre grupos no es reciente. El modelo de mutación paso a paso (SMM), considera la historia de los alelos, siendo los grupos menos diferentes, aquellos en los que sus alelos tengan la menor varianza en su tamaño (Ortíz-Medrano *et al.*, 2008; Moreno-Letelier y Piñero, 2009; Escalante, 2001). Estos resultados también se corroboran con la barrera genética revelada por BARRIER que dió como más probable una división de las poblaciones del complejo Sonora-Chihuahua-Durango-Jalisco de las de Michoacán, tanto a nivel de poblaciones como de grupos genéticos reconocidos por BAPS, comprobando que las poblaciones de la FVTM son genéticamente diferentes a las de la SMOC y SMS, conteniendo a los dos linajes o especies de manera diferencial.

A nivel de los grupos Norte y Sur, representados por *P. durangensis* y *P. martinezii* respectivamente, los haplotipos más abundantes en las poblaciones del Norte fueron H78, H96 y H112, y el H39 y H53 en el Sur. La mayor presencia de haplotipos privados se encontró en los grupos del norte con 52 de los 84. Esto pudo deberse principalmente a que el número de poblaciones muestreadas de *P. durangensis*, es casi el doble de las de *P. martinezii* ya que el promedio de haplotipos por población fue igual en ambas especies (4 haplotipos privados). La población del Salto fue la única que no presentó haplotipos privados, y Creel

(del grupo norte) la que presento más (10), seguida de Chilar (9) de distribución más al sur de este grupo. La gran cantidad de haplotipos únicos de ambos grupos indica que el flujo de genes entre especies ha sido nulo o muy bajo en la historia evolutiva reciente de los dos linajes.

La colonización de los pinos en México ha sido en dirección Norte-Sur, el avance y retroceso de los grandes glaciares favoreció la migración, muchas especies de pinos tomaron ventaja de los periodos de calor y clima seco del norte y ocuparon los espacios abiertos (Eguiluz-Piedra, 1985; Perry, 1991; Axelrod, 1986; Rzedowski, 1998; Sánchez-González, 2008).

Por ello, la migración de *P. durangensis* pudo estar dada desde el norte de Chihuahua y Sonora en dirección sur hasta Jalisco, a través de la SMOC. Las poblaciones de este grupo presentan una continuidad genética con valores altos de N_m (incluso infinito en algunas poblaciones). Posteriormente migran hasta la región de Michoacán, sin embargo, las poblaciones de Michoacán pudieron quedar aisladas debido a la formación de la FVTM y a la presencia de un valle de más de 70 km de extensión con altas temperaturas ($\geq 21^\circ\text{C}$) y de menor altitud (entre 600 y 1100 msnm) que separó ambiental y espacialmente a las poblaciones de Jalisco y Michoacán (Apéndice 5). Esto provocó su aislamiento a territorio restringido, la inexistencia de flujo de genes, con valores bajos de N_m entre zonas, y en consecuencia, se generó la divergencia de un nuevo linaje, *P. martinezii*. Este sistema volcánico pudo funcionar como barrera biogeográfica entre las dos especies tal como se ha documentado en un complejo de especies de *Magnolia* (*M. pugana*, *M. pacifica* y *M. vallartensis*; Muñoz-Castro *et al.*, 2020) y en poblaciones de *Acer saccharum* (maple azucarero; Vargas-Rodríguez *et al.*, 2015). Este patrón de aislamiento también se ha observado entre una población de la Sierra de El Cuale de *Pinus strobiformis* var. *strobiformis* y poblaciones de *Pinus strobiformis* var. *veitchii* de la FVTM (Moreno-Letelier y Piñero, 2009).

Interesantemente y contrario a lo que se pensaba sobre la población de Capillas de la Reserva de Manantlán en Jalisco, que formaría parte del grupo genético de la zona sur al distribuirse más cerca de las poblaciones de Michoacán, el análisis de BAPS indica que forma parte del grupo genético del Norte. Esta población se distribuye en una zona donde inicia la Sierra Madre del Sur (SMS), limita con el extremo oeste de la FVTM y se encuentra dentro del elemento geológico Bloque Jalisco (JB), un sistema montañoso con asociación biogeográfica incierta y separado de otras tierras altas por dos cuencas con altitudes inferiores a 500 m s.n.m. (Rosas-Elguera *et al.*, 1996; Rutz-López y Núñez-Cornú, 2004; Salas-Lizana *et al.*, 2011). Por ello, la presencia de las sierras posiblemente contribuyó de manera importante al aislamiento genético y geográfico de esta y de muchas de las poblaciones analizadas, en diferentes intensidades y diferentes épocas geológicas, con los efectos genéticos que observamos. Para la SMOC se ha estimado un origen entre 55 a 27.5 MYA en el Eoceno, sugiriendo que para la parte sur más extrema que incluye Jalisco su origen es del Mioceno temprano (23.5 mya) (Ferrari *et al.*, 2005; Cather *et al.*, 2003), mientras que la SMS la ubica en un tiempo un poco más reciente dentro del Oligoceno temprano (34-23Mya), sin embargo, reportan afloramientos rocosos del mesozoico mucho más antiguos (>200 Mya) (Ferrari *et al.*, 2005). El origen de la FVTM, es el más reciente de finales del Plioceno (5.3 a 1.8 Mya) pero todas ellas dentro del periodo terciario (Ferrari, 2000).

Estos acontecimientos geológicos pudieron influir de manera determinante en la diversificación de muchas especies de plantas, incluidos los dos linajes estudiados, y a través del tiempo el aislamiento geográfico pudo haber tenido una dinámica con dos umbrales que acentuaron esta diferenciación. Uno que tiene que ver con todos los procesos geológicos de origen y formación de las Sierras con actividad volcánica y tectónica hasta nuestros días, y el segundo y más importante asociado a los eventos glaciares del pleistoceno (1.7-0.1 Mya), que, junto con el surgimiento de la FVTM, muchas especies de pinos pudieron ocupar nuevos escenarios que impulsaron su radiación y diversificación en México (Ferrari *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2012).

Las poblaciones y especies de pinos migraron hacia el sur o hacia el norte, de acuerdo con los ciclos glaciares e interglaciares. Estas fluctuaciones climáticas pudieron influir en el origen de nuevas especies o al menos afectar a la diversidad genética del género (Richardson y Rundel, 1998; Sánchez-González, 2008). Además, la FVTM tiene una gran heterogeneidad ambiental y ha experimentado importantes cambios climáticos desde el Plioceno y el Pleistoceno hasta el presente (Gómez-Tuena *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2012).

Varios estudios han encontrado que el contexto fisiográfico de la FVTM ha sido importante en la estructuración genética y la divergencia fenotípica de diferentes especies y cómo los eventos climáticos y geológicos han modificado su distribución en varios tiempos y períodos (Jaramillo-Correa *et al.*, 2008; Gámez *et al.*, 2012; Ruiz-Sánchez y Specht 2013; Torres-Miranda *et al.*, 2013; Mastretta-Yanes *et al.*, 2015; Rodríguez-Gómez y Ornelas, 2015). Desafortunadamente, con los marcadores usados no fue posible fechar el tiempo de diversificación de los linajes obtenidos, por lo que es importante complementar el estudio con el uso de secuencias de núcleo para obtener estimaciones del tiempo de divergencia de manera confiable.

Aislamiento por distancia y por ambiente

Los resultados de diferenciación genética de los dos linajes se refuerzan con el análisis de aislamiento por distancia (IBD) que fue significativo ($r= 0.561$), y sugiere que las poblaciones de la zona norte están más relacionadas entre sí que con las poblaciones de la zona sur, es decir, que las poblaciones de *P. durangensis* presentan mayor afinidad genética entre ellas, que con las poblaciones de *P. martinezii*. No obstante, dentro de cada grupo (norte y sur) la diferenciación genética no está asociada a la distribución geográfica de sus poblaciones, lo que sugiere flujo génico intenso (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2017; Montalvo-Fernández *et al.*, 2019).

Para el análisis de aislamiento por ambiente (IBA), el método que se usó (PDSI) es muy confiable, se basa en el concepto de demanda-suministro de agua y toma en cuenta el déficit entre la precipitación real y la precipitación necesaria para mantener las condiciones de humedad climática o normal. Además de contemplar la capacidad de almacenamiento o retención de agua en el suelo. La gravedad de la sequía se expresa en valores de 4 a -4, (humedad y sequía respectivamente) (Palmer, 1965). Para el periodo de 1960-1990 las poblaciones de ambos grupos se encontraban dentro de la humedad normal o cercano a ella. En el periodo reciente (1982-2012) la intensidad de la sequía aumentó considerablemente y todas las poblaciones de *P. durangensis* presentaron valores negativos, de -0.124 (Flor Espinosa) hasta -1.401 (Capillas) y un promedio de -0.511, que revela sitios con una sequía incipiente. En contraste, *P. martinezii* se distribuye mayormente en sitios con valores positivos (0.26 a 0.33) a excepción de San Juan Nuevo que presentó -0.04. El promedio de sequía para esta especie es de 0.23, lo que indica que las poblaciones se encuentran dentro de una humedad normal u óptima para la especie. La discrepancia entre los resultados de ambas especies es de esperarse ya que las regiones más afectadas por sequía en México son las del norte, noreste y noroeste; éstas constituyen 70% del país y reciben menos de 40% de la precipitación (Rivera del Río *et al.*, 2007; Esparza, 2014). Aunado a esto, el nivel de sequía está siendo favorecido por el cambio climático y en años posteriores las regiones áridas del norte-centro de México, que abarca los estados de Chihuahua, Durango, Coahuila, se expandirá hacia ambas costas y hacia el sureste (Sáenz-Romero *et al.*, 2010).

Esto se observó en el análisis de IBA, donde la correlación entre las distancias genéticas con las ambientales dadas por el índice de sequía, fue positiva y significativa. Los valores altos de sequía podrían estar contribuyendo también en la diferenciación genética observada en las especies. Sin embargo, al ser estimaciones relativamente recientes el efecto sobre la diferenciación de los linajes puede estar más relacionado con la diferenciación a nivel morfológico de las especies, las cuales a futuro y por las condiciones de sequía que se

predicen, podrían impactar a nivel molecular (Breshears *et al.*, 2005; Castellanos–Acuña *et al.*, 2015; Rodríguez–Gómez *et al.*, 2017).

Es evidente que para precisar la taxonomía de especies y subespecies de forma adecuada ha sido necesario el uso de caracteres morfológicos tradicionales en apoyo a los métodos filogeográficos, a pesar de que a la fecha los caracteres morfológicos han sido devaluados y considerados no fiables en ascendencia compartida, debido a la influencia de la variación ambiental sobre ellos (Gernandt *et al.*, 2003; Domínguez–Domínguez y Vázquez–Domínguez, 2009). Durante el desarrollo de este estudio se lograron reconocer características morfológicas que respaldan los resultados moleculares: La longitud mayor (25 cm) en acículas de *P. martinezii* que en las de *P. durangensis* (13 cm) número de estas por fascículo 6 y 7 (en su mayoría) en *P. martinezii* y 5 *P. durangensis*; presencia de un pedúnculo no caedizo de los estróbilos femeninos de *P. martinezii* contra la apariencia sésil en los conos de *P. durangensis* y una corteza más pronunciada (en forma de placas) y oscura en *P. durangensis*, así como una variación en el número de canales resiníferos (2, 3 y 4) en *P. durangensis* y solo 3 en *P. martinezii*. Por tanto, ambos tipos de evidencias permiten sustentar de manera robusta la divergencia entre estos dos taxa. En general, se puede considerar que *P. durangensis* y *P. martinezii* muestran diferencias genéticas, geográficas, ambientales y morfológicas que sustentan la hipótesis de que son dos linajes divergentes.

Prioridades de conservación

Uno de los objetivos principales de la biología de la conservación es conservar procesos evolutivos. Para cumplir este objetivo, poder identificar de manera correcta las poblaciones que constituyen linajes independientes es esencial. Este trabajo demostró que *P. duranguensis* y *P. martinezii* son en efecto linajes independientes, genética y ambientalmente diferenciados. Esto implica que ambas especies tendrán que manejarse de manera individual. Por un lado, se debe de considerar la conservación *in situ* de las poblaciones más diversas genéticamente como son; Temazcal de *P. martinezii*, que a pesar

de tener una distribución restringida contiene los mayores valores de H y de haplotipos. Para *P. duranguensis* se recomienda conservar a Flor Espinoza de Durango y Creel de Chihuahua que, además, es la población que presenta el mayor número de haplotipos privados. Así mismo se debe de considerar la protección de poblaciones aisladas como San Juan Nuevo, que presentó una baja diversidad genética y poblaciones con N_e pequeños como son todas las poblaciones de *P. martinezii*, priorizando a la de Chilar en la que se observó el valor más bajo de N_e . Para *P. duranguensis* las Población de Guachochi y Flor Espinoza a pesar de contener niveles considerables de variación genética, esta no se comparte con las demás poblaciones (acorde con el análisis de BAPS), por lo que contiene haplotipos valiosos y únicos de la especie.

Actualmente, algunas de las poblaciones de ambas especies se encuentran dentro de reservas, parques naturales o tienen algún programa de manejo adecuado, que han ayudado a su mantenimiento y conservación (San Juanito y Guachochi Chihuahua, El Salto Durango, Capillas-Reserva de Manantlán Jalisco y Parque Los Azufres Michoacán). Sin embargo, es necesario contar con información ecológica que, junto con la información genética generada en este estudio, permitan desarrollar programas de manejo y conservación puntuales, principalmente de *P. martinezii*, que como se comentó anteriormente, no se conocen todas las poblaciones que la representan, ni su densidad y/o su estatus demográfico actual, pero si se conoce que se tiene una sobre explotación de madera de las poblaciones registradas (Leal-Nares *et al.*, 2012). Por ello, es emergente implementar esta propuesta para lograr que a mediano plazo las poblaciones de *P. martinezii* formen parte de una nueva Reserva Ecológica o una Unidad de Manejo Forestal (UMAFOR).

Ambientalmente, el mayor riesgo de extinción acorde con el PSDI, se observa para la zona norte, donde las condiciones de sequía se incrementarán en un futuro cercano. Castellanos-Acuña *et al.* (2018), mencionan en las proyecciones de cambio climático para 2050, un incremento de la temperatura en 1.7° para México, y como consecuencia los valores de

aridez y sequia se acentuarán. Por ello, y a pesar de que en esta región si se tienen programas de manejo con bosques certificados y de conservación exitosos (Guachochi Chihuahua y en El Salto Durango; CONAFOR 2019), la manera más segura y objetiva para su recate es a través de la conservación *ex situ*, con programas de migración asistida de material genético representativo de las especies, trasladando planta hacia otras áreas que en un futuro tengan las condiciones climáticas que hoy son óptimas para las especies y con ello, tratar de compensar los efectos del cambio climático (Sáenz Romero *et al.*, 2009; Castellanos-Acuña *et al.*, 2018), de tal manera que se pueda proteger este recurso genético de gran valía evolutiva para el género *Pinus*.

VI. Conclusiones

- *Pinus durangensis* y *p. martinezii* muestran niveles altos de variación genética y tamaños efectivos grandes, superior a los obtenidos en la mayoría de especies de pino estudiadas conSSRcp.
- La estructura genética de las especies es marcada y diferenciada en siete grupos, los cuales no se comparten entre las dos taxa estudiados.
- La diversidad genética obtenida se ajusta tanto a un patrón de aislamiento por distancia, como por ambiente, claramente asociados a la distribución geográfica de las especies.
- *Pinus durangensis* y *P. martinezii*, son dos linajes genéticos independientes que no comparten haplotipos, por lo que se encuentran aislados por barreras genéticas, geográficas y climáticas.
- Es posible que la divergencia de estos dos linajes esté asociada a eventos climáticos históricos del pleistoceno, por el aislamiento y fragmentación de la continuidad de su distribución, así como por el origen de condiciones ambientales diferentes que permitieron su adaptación y diversificación.
- La estrategia de conservación que se plantea considera el rescate y mantenimiento de las poblaciones más diversas genéticamente, aisladas y diferenciadas, así como de mayor riesgo ambiental (por sequía extrema), que a corto plazo pudiera originar la extinción local de algunas de ellas.

Literatura Citada

- Alfonso-Corrado, C., Campos-Contreras, J., Sánchez-García, G., Monsalvo-Reyes, A. y Clark-Tapia, R. 2014. Manejo forestal y diversidad genética de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl, & Cham, en Sierra Juárez, Oaxaca. *Madera y bosques*, 20(2): 11-22.
- Amos, W. y J. Harwood. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Phylosophical Transactions of the Royal Society of London*, 353:177- 186.
- Avise J. C., M. H. Smith, Robert K. Selander. 1979a. Biochemical Polymorphism and Systematics in the Genus *Peromyscus* VII. Geographic Differentiation in Members of the *Truei* and *Maniculatus* Species Groups. *Journal of Mammalogy*, 60(1): 177–192.
- Avise, J.C., Giblin-Davidson, C., Laerm, J., Patton, J.C. and Lansman, R.A. 1979. Mitochondrial DNA clones within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 6694–6698.
- Avise, J. C., R. M. Ball, Jr. y J. Arnold. 1988. Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: A comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Mol. Biol. Evol.* 5: 331- 344.
- Avise J. C. 2000. *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge, M.A.
- Avise J. C. 2009. *Phylogeography: retrospect and prospect*. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Axelrod, D. I. 1986. Cenozoic history of some western american pines. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 73: 565-641.
- Applied Biosystems. 2012. Peak Scanner software v. 1. Live technologies. Carlsbad, CA, USA.
- Barrett, S. C. H., and J. R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Pp. 3–30 in D. A. Falk and K. E. Holsinger, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford Univ. Press, New York.
- Berli P. 2008. *Migrate version 3.0*, a maximum likelihood and Bayesian estimator of gene flow using the coalescent.
- Breshears, D. D., N. Cobb, P. M. Rich, K. P. Price, C. D. Allen, R. G. Balice, W. H. Romme, J. H. Kastens, M. L. Floyd, J. Belnap, J. J. Anderson, O. B. Myers, Meyer, C. W. and C. W. 2005. Regional vegetation die-off in response to global-change-type drought. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 102: 15144– 15148.
- Brow, A. H. D, O. H. Frankel, D. R. Marshall and J. T. Williams. 1989. *The use of plants genetic resources*. Cambridge University Press. New York USA. 382 pp.
- Cather, S. M., Dunbar, N. W., McDowell, F. W., McIntosh, W. C., Sholle, P. A. 2003. Early Oligocene global cooling, volcanic iron fertilization, and the ignimbrite flare-up of southwestern North America. *Geological Society of America Abstracts with Programs*, 35: 255-285
- Castellanos-Acuña, D., R. Lindig-Cisneros, y Sáenz-Romero, C. 2015. Altitudinal assisted migration of Mexican pines as an adaptation to climate change. *Ecosphere*, 6(1):2. <http://dx.doi.org/10.1890/ES14-00375.1>.
- Castellanos-Acuña, D., K. W. Vance-Borland, J. Bradley St. Clair, A. Hamann, J. López-Upton, E. Gómez-Pineda, J. M. Ortega-Rodríguez y C. Sáenz-Romero. 2018. Climate-based seed zones for Mexico: guiding reforestation under observed and projected climate change. *New Forests*, 49(3): 297-309. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-017-9620-6>

- Cerda-Granados, D. 2007. Evaluación de la Diversidad Genética de Poblaciones Naturales de *Pinus tecunumanii* Eguliz & J.P. Perry de Nicaragua Mediante el Uso de Marcadores RAPDs.10.13140/RG.2.1.3393.3925.
- Corander J. Sirén J. and E. Arjas. 2008. Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics*, 23: 111-129.
- Correa J. C. 2005. Distribución de la biomasa en plántulas de procedencia de *Pinus pseudostrabus* Lindl. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología UMSNH. 38 pp.
- CONABIO, 2019. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. <http://enciclovida.mx/especies/155263-pinus-durangensis>
- CONAFO. 2019. Comisión Nacional Forestal, Ayuntamiento de Guachochi, Chihuahua. Consultado 22 de febrero de 2021: <https://www.gob.mx/conafor/prensa/guachochi-chihuahua-se-convierte-en-el-primer-municipio-que-firma-politica-de-compras-verdes>
- CONAFOR. 2020. Comisión Nacional Forestal. El mejoramiento genético y la producción de semilla mejorada en áreas productoras en Durango. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/573696/31_Presentacion_-_WEBINAR_-_CONAFOR__2020_-_MC_Santiago_Solis_G._2020.pdf
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ, Guillemaud T, Estou A. 2008. Inferring population history with DIYABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*, 24(23):2713–2719.
- Cruzan, M.B. 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution*, 55:1569-1580
- Cuenca A., A.E. Escalante y D. Piñero. 2003. Long distance colonization, isolation by distancia, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSrS). *Molecular Ecology*, 12:2087-2097.
- Crandall, K. A., A. R. Templeton, and C. F. Sing. 1994. Intraspecific phylogenetics: problems and solutions, p. 273–297. In R. W. Scotland, D. J. Siebert, and D. M. Williams (ed.), *Models in phylogeny reconstruction*. Clarendon Press, Oxford.
- Cruzan, M. B. and A. R. Templeton. 2000. Paleoecology and coalescence: Phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(12): 491- 496.
- Delgado, P. y Piñero, D., 2002. Sistemática Filogeográfica y sus Aplicaciones a la Evolución y Conservación de los Bosques de Coníferas en México: El Caso de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrabus*. *Acta Universitaria*, 12(2): 3-19.
- Delgado, P., Salas-Lizana R, Vazquez-Lobo A, Wegier A, Anzidei M, E. R. Álvarez-Buylla, G. G. Vendramin and Piñero D. 2007. Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb and *Pinus pseudostrabus* Lindl. (Pinaceae): Morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences* 186: 861–875.
- Delgado, P. y D. Piñero. 2008. Marcadores moleculares, variación genética y filogeografía en árboles forestales. In: Sánchez V., L. R. (ed.). *Ecología, Manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México*. Editorial MundiPrensa México, S. A. de C. V. México, D. F., México. pp. 1-19.
- Demant, A. 1978. Características del eje neovolcánico transmexicano y sus problemas de

- interpretación: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología, Revista, v. 2, p. 172–187.
- Díaz-Cárdenas, B., Ruiz-Sanchez, E., Gadsden, H. 2019. Physiographic and climatic events in the Chihuahuan Desert lead to the speciation and distinct demographic patterns of two sister *Sceloporus* lizards. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 57: 864– 876. <https://doi.org/10.1111/jzs.12296>
- Domínguez-Domínguez, O. y Vázquez-Domínguez, E. 2009. Filogeografía; aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32. 1: 59-70.
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Liguori, J. A., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E., y Souza, V. 2013. Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(1),42-56.
- Eguiluz-Piedra, T. 1985. Origen y evolución del género *Pinus* (con referencia especial a los pinos mexicanos). *Dasonomía Mexicana* 6: 531.
- Eliades, N. GH and Eliades, D.G. 2009. HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg #ugust University Goettingen, Germany.
- Escalante, A. E. 2001. Estructura genética de poblaciones de *Pinus pinceana* G. Gordon y Glendinning, usando como marcadores moleculares microsateélites de cloroplasto (cpSS´Rs). B. Sc. Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, México. 95 p.
- Esparza, M. 2014. La sequía y la escasez de agua en México: Situación actual y perspectivas futuras. *Secuencia*, (89): 193-219.
- Excoffier, L. P. Smouse. and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier L. and Lischer H.E. 2010. Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Eveno E, Collada C, Guevara MA, Léger V, Soto A, Díaz L, Léger P, González-Martínez SC, Cervera MT, Plomion C, Garnier-Gere PH. 2008. Contrasting patterns of selection at *Pinus pinaster* Ait. Drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 25:417–437.
- Farjon, A. F. and B. T. Styles. 1997. Flora Neotropica, *Pinus* (Pinaceae). The New York Botanical Garden. Nueva York.
- Ferrari, L. 2000. Avances en el conocimiento de la Fja Volcánica Transmexicana durante la última década. *Boltín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 3:84-92.
- Ferrari, L., Valencia-Moreno, M. y Scott, E. B. 2005. Magmatismo y tectónica en la Sierra Madre Occidental y su relación con la evolución de la margen occidental de Norteamérica. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana Volumen Conmemorativo del Centenario Temas Selectos de la Geología Mexicana I* (3): 343-378
- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., and Manea, M. 2012. The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics*, 522: 122–149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tecto.2011.09.018>

- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., and Manea, M. 2012. The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics*, 522: 122–149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tecto.2011.09.018>
- Flores-Rentería LI, A. Wegier, D. O. Del Vecchyo, A. Ortiz-Medrano, D. Piñero, A. V. Whipple, F. Molina-Freaner, C. A. Domínguez. 2013. Genetic, morphological, geographical and ecological approaches reveal phylogenetic relationships in complex groups, an example of recently diverged pinyon pine species (Subsection Cembroides). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3): 940-949.
- Fu, Y. X., and W. H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693–709.
- Fu, Y.-X. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*: 147: 915–925.
- Fuentes-Amaro, S. L., Legaria-Solano, J. P., y Ramírez-Herrera, C. 2019. Estructura genética de poblaciones de *Pinus cembroides* de la región central de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(1): 57-65.
- Gámez, N., Escalante, T., Rodríguez, G., Linaje, M., and Morrone, J.J. 2012. Caracterización biogeográfica de la Faja Volcánica Transmexicana y análisis de los patrones de distribución de su mastofauna. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(1): 258-272.
- García-Gómez, V., Ramírez-Herrera, C., Flores-López, C. y López-Upton, J. 2014. Diversidad y estructura genética de *Pinus johannis*. *Agrociencia*, 48(8): 863-873.
- Gao, J., B. Wang, J. F. Mao, P. Ingvarsson, Q. Y. Zeng, and X. R. Wang. 2012. Demography and speciation history of the homoploid hybrid pine *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *Molecular Ecology*, 21:4811–4827.
- GBIF. 2020. Global Biodiversity Information Facility
<https://www.gbif.org>
- Gernandt, D. S., D. Piñero y A. Liston. 2003. Phylogenetics of *Pinus* subsections Cembroides and Nelsoniae inferred from cpDNA sequences. *Systematic Botany*, 28:657-673.
- Gernandt, D. S., S. Hernández-León, E. Salgado-Hernández and A. Pérez-de la Rosa. 2009. Phylogenetic relationships of *Pinus* subsection Ponderosae inferred from rapidly evolving cpDNA regions. *Systematic Botany*, 34:481-491.
- Gernandt D. S. y Pérez-de la Rosa J. A. 2014. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: S126-S133.
- Gomez, A., Aguiriano, E., Alia, R. y Bueno, M. 2002. Análisis de los recursos genéticos de *Pinus pinea* L. en España mediante microsatélites del cloroplasto. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*. 11.
- González-Martínez S.C, E. Ersoz, G.R. Brown, N.C. Wheeler y D.B. Neale. 2006. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics*, 172:1915–1926.
- Grivet D, Sebastiani F, Alía R, Bataillon T, Torre S, Zabal-Aguirre M, Vendramin GG, González-Martínez SC. 2011. Molecular footprints of local adaptation in two Mediterranean conifers. *Molecular Biology and Evolution*, 28:101–116.
- Hardy O.J. and Vekemans X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618–620.

- Hartl D.L. and Clark A.G. 1997. Principles of population genetics. 3rd Ed. Sunderland (MA), Sinauer Associates.
- Hedrick P.W. 1983. Genetics of populations. Science Books Internacional. Boston.
- Heuertz, M. Carnevale, S. Fineschi, S. Sebastiani, F. Hausman, J.F. Paule, L. and Vendramin, G.G. 2006. Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology*, 15: 2131–2140.
- Hudson R. R. 1990. Gene genealogies and coalescent process. Pages 1-42 *in* D. Futuyma and J. Antonovics editors. *Surveys in Evolutionary Biology*, oxford University Press, Oxford.
- INEGI, 2001. Conjunto de datos vectoriales Fisiográficos, Continuo Nacional escala 1:1,000,000 serie 1, Subprovincias fisiográficas. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México, D.F., México.
- IPNI. 2019. International Plant Name Index.
<https://www.ipni.org>
- IUCN. 2016. The IUCN Red List of Threatened Species, version 2016.3.
<http://www.iucnredlist.org>
- Jaramillo-Correa, J. P., Aguirre-Planter, E., Khasa, D. P., Eguiarte, L. E., Piñero, D., Furnier, G. R., and Bousquet, J. 2008. Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern Mexico and Guatemala. *Molecular Ecology*, 17(10): 2476–2490.
- Jardón-Barbolla L. Delgado-Valerio P. Geadá-López G. Vázquez-Lobo A. and Piñero D. 2011. Phylogeography of *Pinus* subsection Australes in the Caribbean Basin. *Annals of Botany*, 107: 229-241.
- Jiménez, J. F., Sánchez-Gómez, P., Martínez, J. F., Molins, A., y Rosselló, J. A. 2005 Variabilidad genética de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* en la región de murcia mediante microsatélites cloroplásticos. *Anales De Biología*, (27): 105-112.
- Jiménez, R. A. and Ornelas, J. F. 2016. Historical and current introgression in a Mesoamerican hummingbird species complex: a biogeographic perspective. *PeerJ*, 4: e1556. Available from <https://doi.org/10.7717/peerj.1556>
- Kimura, M. y Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-38.
- Krutovsky, K.V., Troggio, M., Brown, G.R., Jermstad, K.D., Neale, D.B., 2004. Comparative mapping in the Pinaceae. *Genetics* 168, 447–461.
- Larsen E. 1964. A new species of pine from Mexico. *Madroño*. 17:217-8.
- Leal-Nares C. Mendoza M. E. Pérez-Salicrup D. Geneletti D. López-granados E. y Carranza E. 2012. Distribución potencial del *Pinus martinezii*: un modelo espacial basado en conocimiento ecológico y análisis multicriterio. *Revista mexicana de Biodiversidad*, 83: 1152-1170.
- Ledig, F.T., M.A. Capo-Arteaga, P.D. Hodgskiss, H. Sbay, F.L. C., M.T. Conkle, and B. Bermejo-Velázquez, 2001. "Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican pynon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae)". *American Journal of Botany*, 88: 1977-1987.
- Librado, P. Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism *Bioinformatics*, 25: 1451–1452. data.

- López, M. y F., Núñez-Cornú. 2004. Sismotectónica del norte y oeste del Bloque de Jalisco usando datos sísmicos regionales. *GEOS* 0186-1891. 24. 2-13.
- Madrigal S. X. 1986. Claves para la identificación de las coníferas silvestres del estado de Michoacán. Escuela de Biología, UMSNH. México. Pag. 101.
- Madrigal- Sánchez X. y Guridi-Gómez, L. I. 2005. Especies arbóreas y arborescentes en estado crítico de conservación. En: Biodiversidad en Michoacán: Estudio de Estado. Villaseñor G. L. E. y O. A. Leal-Nares (Eds). CONABIO, UMSNH, SUMA. México.
- Manni, F. Guèrard, E. Heyer, E. 2004. Geographic Patterns of (Genetic, Morphologic, Linguistic) Variation: How Barriers Can Be Detected by Using Monmonier's Algorithm. *Human Biology* 76: 173–190.
- Manzanilla U., Delgado, P., Hernández, J., Molina Sánchez, A., Garcia J. J. y Rocha, M. C. 2019. Similar del nicho ecológico de *Pinus montezumae* Lamb and *Pinus pseudostrobus* Lindl (Pinaceae) en México: implicaciones para la selección de áreas productoras de semillas y de conservación. *Acta Botanica Mexicana*, 126: e1398. DOI: 10.21829/abm126.2019.1398
- Martínez-Méndez, N., E. Aguirre-Planter, L. E. Eguiarte y J. P. Jaramillo-Correa. 2016. Modelo de nicho ecológico de las especies del género *Abies* (Pinaceae) en México: Algunas implicaciones taxonómicas y para la conservación. *Botanical Sciences*, 94(1): 5-24. DOI: <https://dx.doi.org/10.17129/botsci.508>
- Mastretta-Yanes, A., Moreno-Letelier, A., Pinero, D., Jorgensen, T. H., and Emerson, B.C. 2015. Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the TransMexican Volcanic Belt. *Journal of Biogeography*, 42(9): 1586-1600. doi:10.1111/jbi.12546.
- MEXU. 2020. Herbario Nacional de México. Instituto de Biología. <http://www.ib.unam.mx>
- Millar, C. C. 1993. Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80: 471-498.
- Montalvo-Fernández, G., L. F., Sánchez-Teyer, G., Carnevali, A.P., Vovides, R., Gaytán-Legaria, M.M., Ortiz-García, J.A., Muñoz-López y J., Martínez-Castillo. 2019. Impact of late Pleistocene-Holocene climatic fluctuations on the phylogeographic structure and historical demography of *Zamia prasina* (Cycadales: Zamiaceae). *Botanical Science* 97(4): 588–608.
- Montgomery, M. E., L. M. Woodworth, R. K. Nurthen, D. M. Gil-ligan, D. A. Briscoe, and R. Frankham. 2000. Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparison of experimental results with theoretical predictions. *Conservation Genetic*, 1:33–43.
- Morán-Zenteno, D.J., Martiny, B., Tolson, G., Solís-Pichardo, G., AlbaAldave, L., Hernández-Bernal, M.S., Macías-Romo, C., MartínezSerrano, R.G., Schaaf, P., Silva Romo, G., 2000, Geocronología y características geoquímicas de las rocas magmáticas terciarias de la Sierra Madre del Sur: *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 53 (1): 27–58.
- Moreno, L. A. 2007. Tamaño efectivo de la población. Pp. 63-86. In: L. Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre (eds.). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F.
- Moreno-Letelier A, Piñero D. 2009. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography* 36: 121–131.

- Moreno-Letelier A, Ortíz-Medrano A, Piñero D. 2013. Niche Divergence versus Neutral Processes: Combined Environmental and Genetic Analyses Identify Contrasting Patterns of Differentiation in Recently Diverged Pine Species. *PLoS ONE* 8(10): e78228. doi: 10.1371/journal.pone.0078228.
- Moreno-Letelier, A, T, Barraclough. 2015. Mosaic genetic differentiation along environmental and geographic gradients indicate divergent selection in a white pine species complex. *Evolutionary Ecology*, 10.1007/s10682-015-9785-4.
- Morrone, J. J. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 76(2): 207-252. Recuperado en 28 de enero de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S187034532005000200006&lng=es&tlng=es.
- Mirov, N. T. 1967. The genus *Pinus*. Ronald Press. New York, USA. 602 p.
- Muñiz-Castro, M., A., Castro-Félix, A. S., Carranza-Aranda., A., Vázquez-García y A., Santerre. 2020. Population genetics, species boundaries, and conservation in the *Magnolia pacifica* species complex along a continentality and moisture gradient in western Mexico. *Botanical Sciences*, 98(3): 500-516. <https://doi.org/10.17129/botsci.2551>
- Navascués M. and Emerson B. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Molecular Ecology* 14: 1333-1341.
- Nei M 1987 Estimation average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- Newton, A. C. T. R. Allnut, A. C. M. Gilles, A. J. Lowe, and R. A. Ennos. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and conservation of tree species. *Tree* 14: 140-146.
- Obregón, M. G. 2010. Estudio filogeográfico de *Pinus hartwegii* Lindley (Pinaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Químico-biológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. 82 pp.
- Ortíz-Medrano A., A.M. Letelier y D. Piñero. 2008. Fragmentación y expansion demográfica en las poblacones mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 83: 25-36.
- Palmer WC. 1965. Meteorological drought. US Weather Bureau, Research Paper No. 45, 58 pp
- Perry JL. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon.
- Piñero et al. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In: *Capital Natural de México Edición: Vol. I: Conocimiento actual de la Biodiversidad CONABIO, México*.
- Petit R. J. J. Duminil, S. Fineschi, A. Hampe, D. Salvini y G. G. Vendramin. 2005a. Comparative organisation of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689–701.
- Piry S. Luikart G. and Cornuet J.-M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502–503.
- Plomion, C., D., Chagne, D., Pot, S., Kumar, P., Wilcox, R., Burdon, D., Prat, D., Peterson, J., Paiva, P., Chaumeil, G., G., Vendramin, F., Sebastiani, C., Nelson, C., Echt, O., Savolainen,

- T. L., Kubisiak, M.T., Cervera, N., De María, y N., Faridi. 2007. Chapter 2 The Pines. 10.1007/978-3-540-34541-1_2.
- Price, R.A., A. Liston y S.H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. En: M. D. Richardson editorial. Ecology and Biogeography of Pinus. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Pp: 49-68.
- Pritchard, J. K, M. Stephens and P. Donnelly. 2002. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Posada D. K. A. Crandall and A. R. Templeton. 2000. GeoDis: a program for the cladistic analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9: 487-488.
- Provan J, N Soranzo, NJ Wilson, DB Golstein, W Powell 1999 A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153: 943-947.
- Rambaut A. 1996. SE-AL: sequence alignment editor, versión 2.0a11. Available from <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>.
- Rebolledo, V., L. Jardón, I. Ramírez, A. Vázquez-Lobo, D. Piñero and P. Delgado. 2018. Genetic variation and dispersal patterns in three varieties of *Pinus caribaea* Morelet (Pinaceae) in the Caribbean Basin. *Plant Ecology and Evolution* 151 (1): 61-76.
- Rivera del Río, R., P. Crespo, G. A., Ramírez, R. Q., Nolasco. 2007. Comportamiento espacio temporal de la sequía en el estado de Durango, México terra-latinoamericana, vol. 25, núm. 4, pp. 383-392 Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México.
- Roderick, G. K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review. Entomology*, 41: 325-352.
- Rodríguez-Correa H., A. González-Rodríguez & K. Oyama. 2017. Perspectivas de la Ecología Molecular en un país megadiverso. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88: 3-13. <https://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.002>.
- Rodríguez-Gómez, F., and Ornelas, J. F. 2015. At the passing gate: past introgression in the process of species formation between *Amazilia violiceps* and *A. viridifrons* hummingbirds along the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*. 42(7): 1305-1318. doi:10.1111/jbi.12506
- Rodríguez-Gómez, F., K., Oyama, M. Ochoa-Orozco, L., Mendoza-Cuenca, R., Gaytán-Legaria y A., González-Rodríguez. 2017. Phylogeography and climate-associated morphological variation in the endemic white oak *Quercus deserticola* (Fagaceae) along the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Botany*, 96(2): 1916-2790.
- Rosas-Elguera J, Ferrari L, Garduño-Monroy VH, Urrutia-Fucugauchi J. 1996. Continental boundaries of the Jalisco Block and their influence in the Pliocene-Quaternary kinematics of western Mexico. *Geology*, 24: 921-924
- Ruiz-Sánchez, E., and Specht, C.D. 2013. Influence of the geological history of the Trans-Mexican Volcanic Belt on the diversification of *Nolina parviflora* (Asparagaceae: Nolinoideae). *Journal of Biogeography*, 40(7): 1336-1347. doi:10.1111/jbi.12073
- Rzedowski, J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. In: T. P. Ramamorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds). La diversidad biológica de México, orígenes y distribución, Instituto de Biología, UNAM, México. pp. 129-145.

- Sáenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval., R. St-Amant, J. Bealieu y B. Richardson. 2010. Contemporary and projected spline climate surfaces for México and their use in understanding climate-plant relationships. *Climatic Change* 102: 595– 623.
- Salas-Lizana, R., N., Santini, A., Miranda-Pérez y D., Piñero. 2012. The Pleistocene glacial cycles shaped the historical demography and phylogeography of a pine fungal endophyte. *Mycological Progress - MYCOL PROG.* 11. 10.1007/s11557-011-0774-x.
- Sánchez-González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques*, 14(1): 2008:107-120.
- Scataglini, M. A. A. Lanteri y V. A. Confalonieri. 2001. Origin of the Boll Weevil populations of Argentina, Brazil and Paraguay: Hypothesis based on the study of two mitochondrial genes, pp. 19-20. In: *Integrated Pest Management of the Cotton Boll Weevil in Argentina, Brazil and Paraguay- CFC-ICAC/04, Final International Workshop.*
- Schaal B. A., D. A. Haywordth, K. M. Olsen y T. J. Rauscher. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects, *Molecular Ecology* 7: 465–474.
- Silva, M. A. 2005. Distribución y aspectos ecológicos de *Pinus martinezii* Larsen, en el Eje Neovolcánico, Estado de Michoacán, México. Tesis, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. 88 p
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics*, 139: 457-462.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis y I. J. Doyle. 1998. *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing.* Kluwer Academic Publishing, Boston, Dordrecht y Londres.
- Soberón, J. y A. T. Peterson. 2005. Interpretation of Models of Fundamental Ecological Niches and Species' Distributional Areas. *Biodiversity Informatics* 2: 1-10.
- Spencer, H.G. 2004. Population genetics. *BIOMETRICS – Vol. II.* 34: 457-477.
- Swofford, D, L. 1996. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4.0.* Sinauer, Sunderland.
- Syring J, Willyard A, Cronn R, Liston A. 2005. Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci. *American Journal of Botany*, 92: 2086–2100.
- Syring J, Del Castillo RF, Cronn R, Liston A. 2007. Multiple nuclear loci reveal the distinctiveness of the threatened, Neotropical *Pinus chiapensis*. *Systematic Botany*, 32: 703–717.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-008-RECNAT-96, (D.O.F. 24-VI-1996).
- Takezaki N. Nei M. and K. Tamura. 2010. POPTREE2: software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 747-752.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Temesgen, B., Brown, G.R., Harry, D.E., Kinlaw, C.S., Sewell, M.M., Neale, D.B., 2001. Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Theoretical Applied Genetic*, 102: 664–675.
- Templeton, A. R. y C. F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659-669.

- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.
- Templeton A. R., E. Routman y A. C. Phillips. 1995. Separating Populations Structure from Populations History: A Cladistics Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 761-782.
- Torres-Miranda, A., Luna-Vega, I., and Oyama, K. 2013. New approaches to the biogeography and areas of endemism of red oaks (*Quercus* L., Section *Lobatae*). *Systematic Biology*, 62(4): 555-573.
- TROPICOS.ORG. 2019. Missouri Botanical Garden.
<http://www.tropicos.org>
- TPL. 2013. The plant list. Version 1.1
<http://www.theplantlist.org>
- Vargas-Rodriguez, Y., William, P., Urbatsch, L. y D., Foltz. 2015. Large scale patterns of genetic variation and differentiation in sugar maple from tropical Central America to temperate North America. *BMC. Evolutionary Biology*. 15. 10.1186/s12862-015-0518-7.
- Vázquez-Lobo. A. 1996. Evolución de hongos endófitos del género *Pinus* L: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Vendramín, G. G., L. Lelli., P. Rocci. y M., Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5: 595-598.
- Watson, D. F. y G., M. Philip. 1985. A refinement of inverse distance weighted interpolation. *Geoprocessing* 2(4): 315-327.
- Willyard A, Syring J, Gernandt DS, Liston A, Cronn R. 2007. Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 90–101.
- Willyard A, Cronn R, Liston A. 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52: 498–511. 20.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.

Apéndice 1. Frecuencia relativa de los haplotipos.

SSRcp						Población																						
Pt36480	Pt871329	Pt63718	Pt100783	Pt30204	Pt15169	Número de Haplotipo	1. Yecora, Sonora.	2. Maderas, Chihuahua.	3. Bassaseachic, Chihuahua.	4. San Juanito, Chihuahua.	5. Creel, Chihuahua.	6. Batopilas, Chihuahua.	7. Guachochi, Chihuahua.	8. M.eza de Baqueriche, Chihuahua.	9. Sitios Negros, Durango.	10. San Diego, D Urango.	11. El Salto, Durango.	12. Flor Espinosa, Durango.	13. Capillas, Jalisco	14. San Juan Nuevo, Michoacán.	15. Chilar, Michoacán.	16. Temascal, Michoacán	17. Peñuelas, Michoacán.	18. San Pedro Jacuaro, Michoacán.	19. Alta Huerta, Michoacán.	20. Azufres, Michoacán.	Frecuencia total	
139	159	86	108	137	122	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.0526
139	160	85	108	137	122	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0588
139	161	86	108	139	123	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0625
139	161	87	108	137	123	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0556
139	162	86	108	138	125	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0588
139	162	87	108	137	122	6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0625
140	160	87	108	137	123	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0588
140	161	85	108	137	122	8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1111
140	161	86	108	137	122	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0667
140	161	86	108	137	123	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0625
140	161	86	108	137	124	11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0625
140	161	86	108	138	124	12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0625
140	161	86	109	137	123	13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0625
140	161	87	109	137	123	14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0625
140	162	87	108	137	123	15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0769
141	158	86	108	137	122	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1213	
141	158	86	108	137	124	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.0667	
141	158	86	108	138	122	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0.2401	
141	158	86	108	138	123	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.0625	
141	158	86	108	139	122	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.0667	
141	158	86	108	139	123	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.1250	
141	158	86	108	140	122	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.1250	

Apéndice 2. Matriz de flujo genético (N_m) entre las poblaciones de *P. durangensis* y *P. martinezii*.

	<i>P. durangensis</i>													<i>P. martinezii</i>							
	YC	AHM	BS	SJ	CRL	BT	GH	BAQ	SN	SD	STO	FE	CAP	SNVO	CH	TM	PÑ	SPJ	AH	AZ	
YC	0.00																				
AHM	2.08	0.00																			
BS	0.72	3.84	0.00																		
SJ	inf	2.96	0.86	0.00																	
CRL	4.82	0.95	0.44	3.84	0.00																
BT	inf	3.42	0.71	inf	3.99	0.00															
GH	2.26	2.16	1.37	1.34	1.05	1.32	0.00														
BAQ	1.96	1.73	0.80	2.38	1.03	1.41	1.10	0.00													
SN	inf	3.89	0.88	14.54	2.55	21.93	3.52	1.33	0.00												
SD	4.53	8.99	1.12	inf	1.36	27.07	1.09	2.06	5.03	0.00											
STO	10.31	2.13	0.58	inf	1.30	7.47	0.86	1.33	6.44	inf	0.00										
FE	2.41	1.36	1.01	1.44	1.45	1.66	3.66	2.86	1.97	1.09	0.97	0.00									
CAP	3.13	11.89	2.14	4.31	1.08	2.38	1.99	5.82	4.22	10.87	4.80	1.61	0.00								
SNVO	0.24	0.18	0.09	0.47	0.19	0.35	0.10	0.15	0.13	0.30	0.14	0.26	0.16	0.00							
CH	0.39	0.38	0.22	0.56	0.40	0.76	0.23	0.26	0.35	0.47	0.31	0.30	0.28	0.75	0.00						
TM	0.57	0.47	0.25	0.78	0.51	1.23	0.30	0.34	0.47	0.59	0.38	0.47	0.35	1.06	4.90	0.00					
PÑ	0.18	0.17	0.09	0.30	0.15	0.29	0.09	0.12	0.12	0.23	0.12	0.19	0.13	0.63	2.05	1.83	0.00				
SPJ	0.25	0.22	0.11	0.47	0.21	0.43	0.12	0.15	0.17	0.34	0.18	0.21	0.18	0.98	1.94	1.41	2.13	0.00			
AH	0.90	0.65	0.29	2.08	0.69	2.72	0.32	0.45	0.66	1.34	0.75	0.47	0.53	1.19	1.73	2.35	0.83	2.37	0.00		
AZ	0.30	0.23	0.14	0.42	0.27	0.49	0.15	0.19	0.23	1.34	0.21	0.26	0.19	1.14	2.20	4.96	2.11	1.82	1.21	0.00	

Apéndice 3. Interpolaciones de IDW, de flujo genético de *P. durangensis* y *P. martinezii*, de norte a sur.

Valores Norte a Sur	
AHM	0.00
YC	2.08
BS	0.72
SJ	99*
CRL	4.82
BT	99*
GH	2.26
BAQ	1.96
SN	99*
SD	4.53
STO	10.31
FE	2.41
CAP	3.13
SNVO	0.24
CH	0.39
TM	0.57
PÑ	0.18
SPJ	0.25
AH	0.90
AZ	0.30

Apéndice 4. Provincias y subprovincias fisiográficas utilizadas para la delimitación del área M de *P. durangensis* y *P. martinezii*.

Provincia	Subprovincia	Registro	<i>P. durangensis</i> Martínez	<i>P. martinezii</i> E. Larsen
Sierra Madre Occidental (SMOC)	Sierras y Valles Del Norte			
	Sierras y Cañadas Del Norte	15	15	
	Sierras y Llanuras Tarahumaras	1	1	
	Pie De La Sierra			
	Gran Meseta y Cañones	25	25	
	Chihuahuenses	1	1	
	Sierras y Llanuras De Durango	79	79	
	Gran Meseta y Cañadas	27	27	
	Duranguenses	2	2	
	Mesetas y Cañadas Del Sur			
Sierras y Valles Zacatecanos				
Sierra Madre del Sur (SMS)	Sierras De La Costa De Jalisco Y Colima	5	5	
	Depresión Del Balsas			
Faja Volcánica Transmexicana (FVTM)	Sierras Neovolcánicas Nayaritas			
	Sierras De Jalisco			
	Guadalajara			
	Volcanes De Colima			
	Chapala			
	Altos De Jalisco			
	Bajío Guanajuatense			
	Sierras y Bajíos Michoacanos	1		1
	Neovolcánica Tarasca	3		3
	Escarpa Limítrofe Del Sur			
Mil Cumbres	7		7	

Apéndice 5. Barreras geográficas entre *P. durangensis* y *P. martinezii*.

