



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL, UNIDAD OAXACA



**Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de
Recursos Naturales
(Biodiversidad del Neotrópico)**

Título:

**Estructura genética de *Pinus patula* Schl. et Cham. en un
gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez, Oaxaca**

PRESENTA:

Gerardo Sánchez García.

DIRECTORES DE TESIS:

M. en C. Sonia Trujillo Argueta

Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Junio 2015.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 02 del mes de Junio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "Estructura genética de *Pinus patula* Schl. et Cham. en un gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez, Oaxaca".

Presentada por el alumno:

Sánchez	García	Gerardo
Apellido paterno	materno	nombre(s)

Con registro:

A	1	3	0	0	0	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

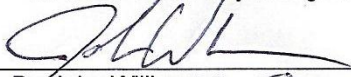
LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis



M. en C. Sonia Trujillo Argueta



Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez



Dr. John Williams



Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez



Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. José Rodolfo Martínez y Cárdenas

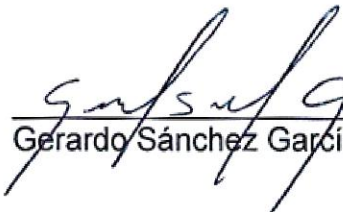


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 03 del mes de Junio del año 2015, el (la) que suscribe Sánchez García Gerardo alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A130007, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la M. en C. Sonia Trujillo Argueta y el Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez y cede los derechos del trabajo titulado: "Estructura genética de *Pinus patula* Schl. et Cham. en un gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez, Oaxaca". al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó zidabel@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Gerardo Sánchez García



Resumen

Los gradientes altitudinales y las condiciones ambientales heterogéneas afectan la distribución y diversidad genética de las poblaciones. En estos ambientes, la acción de factores evolutivos en la adaptación, divergencia y diferenciación de las poblaciones pueden estudiarse a través del estudio de variaciones demográficas en la estructura y diversidad genética, por ejemplo, entre juveniles y adultos. Este tipo de estudios cobran particular importancia ante el cambio climático, pues numerosas proyecciones señalan que en las montañas las condiciones actuales de precipitación y temperatura se ubicarán en pisos altitudinales de mayor elevación en muchas regiones del planeta como en México. *Pinus patula* es una especie monoica de México dispersada por viento con un alto valor económico y ecológico, que se distribuye en áreas montañosas a lo largo de gradiente altitudinales de más de 1 000 m. En virtud de que esa gran variación altitudinal implica variaciones climáticas importantes y que estas variaciones pueden además estar siendo alterados por el cambio climático, es importante analizar los patrones de diferenciación genética entre poblaciones de diferentes pisos altitudinales y entre diferentes etapas demográficas. Con este enfoque, el uso de marcadores neutrales como microsatélites puede ayudar a inferir los patrones de migración, deriva genética y selección que pueden estar moldeando las poblaciones e influir en su adaptación. Se usaron siete microsatélites nucleares para examinar la estructura genética de tres poblaciones de *P. patula* entre adultos y juveniles (Brinzales) en un gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Se reveló diferencias citológicas al decrecer la concentración de ADN entre los individuos (adultos y brinzales) a medida que se elevó el gradiente altitudinal. Se observó un posible ligamiento en dos loci a algún locus afectado por selección debido a un exceso de heterocigotos, resultado de una posible depresión endogámica. Se detectó diferenciación genética entre las poblaciones, y una alta diversidad dentro de ellas. Los resultados sugieren que el mayor aporte de semillas en las poblaciones proviene de individuos adultos del mismo piso. La mayor diversidad genética se encontró en la población central del gradiente, mientras que la menor diversidad se mantuvo en el piso inferior. En el piso superior se hallaron los valores más altos de endogamia en adultos y en brinzales. Los análisis mostraron una mayor similitud entre adultos de pisos superiores con los brinzales de pisos inferiores que entre los adultos de pisos inferiores con los brinzales de pisos superiores. Esto sugiere que el flujo génico preponderante entre los diferentes pisos altitudinales es de los pisos superiores a los inferiores, posiblemente por el efecto la gravedad en las semillas. Esto también podría explicar la mayor endogamia observada en el piso altitudinal más elevado. Dado que este posible desplazamiento es en dirección contraria a lo esperado por las proyecciones climáticas, es probable que el flujo genético en esta especie tenga un efecto contra-adaptativo. Bajo estas condiciones se recomienda explorar los costos y beneficios de una migración asistida o programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: Gradientes altitudinales, estructura genética, flujo génico, diversidad genética, microsatélites nucleares, *Pinus patula*, Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Abstract

Altitudinal gradients and heterogeneous environmental conditions affect the distribution and genetic diversity of populations. Such kind of studies is particularly relevant in mountainous areas. Climatic projections indicate that in the mountains the prevalent climate will be displaced at higher altitudes in many Earth regions including Mexico. *Pinus patula* is a wind-dispersed monoecious species of high ecological and economic value, distributed in mountains of southern Mexico in altitudinal gradients spanning more than 1000 m. Since, such a wide altitudinal range implies a large climatic heterogeneity and such variations can be altered by climate change, it is important to analyze the patterns of differentiation between populations of different altitudinal levels and between different demographic stages. Such kind approaches may help to infer migration patterns, genetic drift and selection that may shape the populations and affect their adaptation. We use seven nuclear microsatellites to examine the genetic structure of juveniles and adults of three populations of different altitudes of *P. patula* in Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Cytological differences were found to abate the concentration of DNA among individuals (adults and juveniles) as the altitudinal gradient rises. A possible linkage at two loci was observed to some locus affected by selection due to an excess of heterozygotes, a possible result of inbreeding depression. The studied populations were genetically differentiated, but much of the variation was detected within populations. Our results suggest that most of seed dispersal is derived from adults of the same altitude. The central population displayed the highest genetic diversity, while the lowest diversity was observed in the lowest-altitude population. Endogamy reached the highest values in the highest-altitude population for both juveniles and adults. We found a higher genetic similarity between adults of the highest altitude with juveniles of the lowest altitude than between adults of lowest altitude with juveniles of the highest altitude. This suggests that downward migration tends to be more common than upward migration in the mountains, probably because of the action of gravity in the dispersal of the seeds. This result may also explain the higher level of endogamy detected in the populations of highest altitude. Since such kind of migration is in opposite direction to that expected by climate change projections, it is possible that such kind of downward migration may be counter adaptive. Under such circumstances it would be recommended to explore the costs and benefits of assisted migration and genetic breeding programs.

Keywords: Altitudinal gradients, genetic structure, gene flow, genetic diversity, nuclear microsatellites, *Pinus patula*, Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Dedicatoria

A ti que me diste todo, sin pedir nada,

A ti que dejaste todo por mí,

A ti que entregaste todo por mí...

Gracias Mamá Malena

*Mi corazón está plenamente agradecido por haber sido bendecido por tu presencia, paciencia, fidelidad y amor. Bendito el día en el que todo poderoso decidió que tú fueras mi **hermana Bety**.*

*Estar a tu lado es como ser el protagonista de una bella historia de amor, tú eres el complemento que tanto espere. Gracias por tu amor mi amada **Mireya***

Agradecimientos

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por abrirme las puertas para la elaboración de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado (beca 354593) para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez, director de tesis, por su todo el apoyo que me brindo durante esta etapa de mi vida, por los comentarios que enriquecieron este trabajo, por sus enseñanzas y por su paciencia hacia mi persona, estaré en deuda con usted mi estimado maestro.

A la M. en C. Sonia Trujillo Argueta, directora de tesis, por todo su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo, por el constante sustento en el laboratorio y compartir sus conocimientos, así como las pláticas, consejos y amistad brindadas. Mil gracias por todo mi estimada maestra, siempre estaré en deuda con usted.

A Raúl Rivera García, por todo el apoyo incondicional en las salidas al campo, la elaboración de los mapas y todas las enseñanzas que compartiste conmigo. Que gusto conocerte y mil gracias por tu paciencia.

A la comunidad de Ixtlán de Juárez, por abrirme las puertas para poder realizar este proyecto en sus áreas conservadas. También extender mi agradecimiento al comisariado de bienes comunales de Ixtlán de Juárez y al ingeniero Julio Ruiz Aquino por facilitarme el trabajo en campo.

A las fuentes de financiamiento del IPN para poder realizar este trabajo con el: 1) proyecto 20131425: Biodiversidad vegetal y sus interacciones con el humano en sistemas forestales del sur de México, 2) proyecto 20140709: Estudios de ecosistemas naturales y sus

componentes ante cambios ambientales antrópicos, 3) proyecto 20140825: Patrones genéticos de una rosácea nativa del estado de Oaxaca, que habita en lugares altamente perturbado, y 4) proyecto 20151428: Diversidad y dinámica en sistemas fragmentados.

A los miembros del comité tutorial, de la comisión revisora y jurado de examen: Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez, M. en C. Sonia Trujillo Argueta, Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro, Dr. Rodolfo A. Solano Gómez y Dr. John N. Williams. Gracias por todas sus observaciones para mejorar este trabajo.

A todos mis amigos estudiantes y profesores del CIIDIR por las pláticas, ánimos y apoyo para la realización de este trabajo.

Agradecimientos a título personal

- A mis amadas madre (Magdalena García García) y hermana (Beatriz Pilar Sánchez García), que sin su apoyo no hubiera sido posible terminar este trabajo, muchas gracias por todo y su amor incondicional.
- A mi amada Mireya, gracias por tu gran amor y paciencia. Por todas las porras y por ser mi paño de lágrimas en los tiempos más difíciles.
- A Obed, mi mejor amigo, te agradezco el apoyo y los ánimos que me brindaste en esta etapa de mi vida
- A Yesenia Pacheco, por ser hermanitos de laboratorio y por la amistad que nació, me dio mucho gusto conocerte.
- A José Antonio Caballero, por ser un gran amigo en el CIIDIR, me dio mucho gusto conocerte.

Contenido general

Acta de revisión de tesis	I
Carta cesión de derechos	II
Resumen	III
Abstract.....	IV
Dedicatoria.....	V
Agradecimientos.....	VI
Agradecimientos a título personal	VII
Capítulo I.....	1
Marco Teórico	2
1.1 <i>Genética de Poblaciones</i>	2
1.2 <i>Fuerzas evolutivas</i>	3
1.3 <i>Diversidad Genética</i>	6
1.3.1 <i>Medidas de Diversidad:</i>	6
1.4 <i>Variabilidad Genética</i>	8
1.5 <i>Estructura genética</i>	9
1.6 <i>Marcadores Moleculares</i>	10
1.6.1 <i>Microsatélites</i>	11
1.7 <i>El género Pinus en México</i>	12
1.7.1 <i>Pinus patula (Generalidades)</i>	13
1.8 <i>Gradientes Altitudinales</i>	15
1.8.1 <i>Estudios en Sierra Juárez, Oaxaca</i>	17
Literatura citada	18
Capítulo II.....	22
Introducción.....	23
Objetivo	29
Materiales y métodos.....	29
Área de estudio	29
Especie de estudio.....	30
Colecta del material biológico vegetal.....	30

<i>Análisis Genético</i>	31
Extracción de ADN y análisis de fragmento tipo microsatélites	31
<i>Análisis estadísticos de datos genéticos</i>	35
Diversidad genética.....	35
Estructura genética entre poblaciones.....	35
Resultados.....	36
<i>ADN extraído</i>	36
<i>Fragmentos tipo microsatélites</i>	37
<i>Diversidad genética</i>	38
<i>Estructura poblacional</i>	41
Discusión	47
<i>Concentración de ADN entre poblaciones del gradiente altitudinal</i>	47
<i>Microsatélites nucleares neutros a la selección</i>	47
<i>Estructura, diversidad y flujo genético dentro y entre poblaciones en el gradiente altitudinal</i>	48
Conclusiones.....	53
Literatura citada.....	54
Apéndices	58
i) <i>Protocolo estandarizado de Extracción FastDNA SPIN kit para Pinus patula</i>	58
ii) <i>ADN extraído de Pinus patula y cuantificado con Biofotometro Eppendorf a 260/280A</i>	60
iii) <i>Revisión de estudios genéticos</i>	63

Índice de figuras

Figura 1. Macro y micro ubicación de las poblaciones muestreadas en Ixtlán de Juárez, Oaxaca.	31
Figura 2. Esquema de las etapas del termociclador y PCR para la replicación del ADN de <i>Pinus patula</i>	33
Figura 3. Ejemplo de la determinación de concentraciones e intensidad de las bandas de los amplicones con el programa ImageJ 1.47V. a) ejemplo de amplicones, b) ejemplo de porcentajes para la realización de diluciones.	34

Figura 4. Muestra de ADN corrido en un gel de electroforesis al 1% de agarosa y teñido en gel rojo.....	37
Figura 5. Ejemplo de un producto de una amplificación por PCR. Amplicón del oligonucleótido ptTX3020, visualizado en gel de agarosa al 1.4%.....	37
Figura 6. Ejemplo de un electroferograma (fragmento tipo microsatélite nuclear) visualizado con el Software Peak Scanner Versión 2.0.....	38
Figura 7. Dendrograma de distancias genéticas para las seis poblaciones en el gradiente altitudinal de <i>Pinus patula</i> en Ixtlán de Juárez.....	45
Figura 8. Dendrograma de distancias genéticas para las tres poblaciones de <i>Pinus patula</i> para a) adultos y b) brinzales en el gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez.	46

Índice de cuadros

Cuadro 1. Oligonucleótidos probados para la amplificación de fragmentos tipo microsatélites para <i>Pinus patula</i>	32
Cuadro 2. Promedio de concentración y pureza del ADN obtenido en los sitios muestreados.	36
Cuadro 3. Diversidad genética obtenida de siete microsatélites polimórficos en seis poblaciones de <i>Pinus patula</i> en un gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Donde, N_A : Número de alelos por locus; H_T : heterocigosis esperada total por locus, F_{IS} : coeficiente de endogamia intra-poblacional; F_{IT} : coeficiente de endogamia poblacional total; F_{ST} coeficiente de similitud.....	39
Cuadro 4. Porcentaje de polimorfismo obtenido de siete loci para seis poblaciones de <i>P. patula</i> en un gradiente altitudinal.	39
Cuadro 5. Diversidad genética de seis poblaciones de <i>P. patula</i> en un gradiente altitudinal. A_U : Alelos únicos en la población; N_E : Número efectivo de alelos en la población; A_S : Diversidad alélica por población; H_O : heterocigotos observado; H_E : heterocigotos esperados; F_{IS} : coeficiente de endogamia intra-poblacional; σ Desviación estándar.	40

Cuadro 6. Índices de fijación para los siete loci para toda la población de <i>P. patula</i> en el gradiente altitudinal, Ixtlán de Juárez.....	41
Cuadro 7. Índice de fijación endogámica por población (FIS) para cinco loci	42
Cuadro 8. Matriz de coeficiente de coancestría (F_{ST}) por pares para 5 loci (ptTX: 2037, 2142, 3020, 3025, y 3017) en las seis poblaciones de <i>Pinus patula</i> en el gradiente altitudinal, Ixtlán de Juárez.....	43
Cuadro 9. Matriz de coeficiente de coancestría (F_{ST}) para 2 loci en las seis poblaciones de <i>Pinus patula</i> en el gradiente altitudinal, Ixtlán de Juárez.	43
Cuadro 10. Índices de fijación para toda la población total (adultos y brinzales) con base en los cinco microsatélites neutros a la selección. Donde, F_{IT} : índice de endogamia para toda la población, F_{ST} : índice coancestría, F_{IS} : índice de endogamia, σ : desviación estándar. P:	44
Cuadro 11. Flujo génico de seis poblaciones de <i>P. patula</i> para cinco loci basado en F_{ST} por pares. Donde, F_{ST} = Índice de fijación de coancestría, y Nm = Número efectivo de migrantes	44
Cuadro 12. Revisión de estudios genéticos realizados en gradientes altitudinales.	63

Capítulo I

Revisión de Literatura

En el presente capítulo se hace una revisión de los aspectos teóricos de la genética de poblaciones, la estructura genética de poblaciones, los factores que influyen en esta estructura, la diversidad genética y las técnicas utilizadas para estimar dicha diversidad y estructura. También, se realiza una descripción general y estudios genéticos recientes de *Pinus patula*. en relación al tema.

Marco Teórico

1.1 *Genética de Poblaciones*

La genética de poblaciones, rama de la genética, tiene el objetivo de determinar la composición genética de las poblaciones (frecuencias génicas y genotípicas), así como las fuerzas que determinan y cambian dicha composición. Para cumplir el objetivo, la genética de poblaciones define a una población como un grupo de individuos de la misma especie capaces de reproducirse entre ellos y que están aislados reproductivamente de otros grupos, y por lo tanto, comparten información genética (alelos). La genética de poblaciones cuantifica la variación genética de la población a través de las frecuencias alélicas, es decir, determina la frecuencia con que aparecen los alelos en los genes. Es importante mencionar que las poblaciones están influidas por las fuerzas evolutivas (mutación, migración, deriva génica y selección) las cuales dan pie a cambios en la composición alélica, diversidad y estructura genética (Griffiths *et al.*, 2002; Klug *et al.*, 2006; Curtis *et al.*, 2007).

El modelo matemático más usado para estimar las frecuencias génicas y genotípicas en la genética de poblaciones es la “ley de Hardy–Weinberg”. Desarrollado con elegancia a principios del siglo XX de forma independiente por el matemático británico Godfrey H. Hardy y el médico alemán Wilhelm Weinberg. Este modelo describe matemáticamente el

comportamiento de los alelos y genotipos en una población "ideal", infinitamente grande, los apareamientos suceden al azar, no sufre mutaciones y no es afectada por selección natural. Es decir, el modelo se basa en el principio de que la población no está sujeta a las fuerzas evolutivas (Griffiths *et al.*, 2002; Klug *et al.*, 2006; Curtis *et al.*, 2007). Además, en esa población ideal los individuos heredan sus caracteres siguiendo las leyes de Mendel; es decir, la ley de la segregación independiente y la ley de la distribución independiente. En estas condiciones el modelo de Hardy-Weinberg hace dos predicciones:

- 1) Las frecuencias de los alelos en la reserva de genes no cambian con el tiempo.
- 2) Si se consideran dos alelos en un locus, "A" y "a", después de una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos **AA**: **Aa**: **aa** en la población pueden calcularse como:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dónde:

p = frecuencias del alelo "A" en una población

q = frecuencias del alelo "a" en una población

p^2 = frecuencia genotípica de individuos homocigóticos para un alelo (**AA=D**)

$2pq$ = frecuencia genotípica de individuos heterocigóticos (**Aa=H**)

q^2 = frecuencia genotípica de individuos homocigóticos para otro alelo (**aa=R**)

1.2 Fuerzas evolutivas

Las fuerzas evolutivas son los procesos naturales que influyen en las poblaciones a nivel genotípico y fenotípico. Además, su acción puede romper el equilibrio génico (Hardy-

Weinberg) de una población. Esas fuerzas evolutivas provocan diferentes niveles y patrones de variación genética, dando pie a que la población evolucione a través de las variaciones hereditarias de cada generación. Las fuerzas evolutivas se clasifican en selección natural, deriva génica, flujo genético, y mutación. No obstante, existe otro factor no considerado como una fuerza evolutiva pero influye en las poblaciones, la endogamia.

i) *Selección natural*. Esta es la principal fuerza que ejerce en las frecuencias alélicas de las poblaciones. La selección actúa en el fenotipo de los organismos, resultado de la interacción de los genotipos con el ambiente. La selección puede ser positiva o negativa. La selección positiva permite a los nuevos mutantes poseer una mayor adecuación y aptitud que el promedio de la población, y las frecuencias de dichos mutantes se incrementan en la siguiente generación. La selección negativa elimina a los nuevos mutantes debido a que poseen una adecuación menor que el promedio de la población, y la frecuencia de estos mutantes disminuye en las siguientes generaciones. (Curtis *et al.*, 2008; Hamilton, 2009; Allendorf *et al.*, 2013).

ii) *Deriva génica*. Ocurre cuando existen pocos individuos en las poblaciones para aparearse, cuanto más pequeñas sean las poblaciones nativas, más significativa será la deriva. Esta fuerza disminuye los niveles de heterocigotos debido a la fijación y pérdida de alelos. Solo la mutación y el flujo génico contrarrestan el proceso y lo hacen más lento. Sin embargo, si la acción de la deriva génica es muy severa, los alelos deletéreos pueden fijarse en la población, y a futuro reducir la aptitud (fitness) de la población, dando lugar a un proceso de diferenciación genética (Klug *et al.*, 2006; Eguiarte, 2009; Allendorf *et al.*, 2013).

Flujo génico. El flujo génico redistribuye alelos entre poblaciones. Éste puede darse ya sea por el movimiento físico y la reproducción de los individuos o por la dispersión de las semillas y el polen. El flujo genético es un elemento de la estructura poblacional. Teóricamente se encuentra inversamente relacionado con el grado de estructura que se desarrolla en las poblaciones y puede ser estimado con parámetros de estructura genética. El flujo genético cuando es reducido o restringido puede conducir a la endogamia local y depresión endogámica, por el contrario, altos niveles de flujo génico puede limitar la adaptación local por un empantanamiento genético y causar depresión exogámica (Klug *et al.*, 2006; Curtis *et al.*, 2008; Hamilton, 2009; Allendorf *et al.*, 2013).

iii) *La Mutación génica* es un cambio repentino al azar en el material genético (secuencia de ADN) de una célula y es heredado en todas las células hijas. La mutación es una fuerza evolutiva débil, poco importante para cambiar las frecuencias alélicas debido a las bajas tasas de mutación. Es la única fuerza evolutiva que genera la variación genética en las poblaciones (Klug *et al.*, 2006; Curtis *et al.*, 2008; Hamilton, 2009; Allendorf *et al.*, 2013).

iv) *La endogamia* o consanguinidad da lugar a la producción de individuos homocigotos. Esta ocurre cuando los individuos que se cruzan están emparentados, un limitado flujo genético (dispersión de semillas y polen en el caso de las plantas). En las poblaciones grandes, la endogamia puede ocurrir por un apareamiento aleatorio a causa de la autofertilización o por la tendencia de los individuos relacionados para aparearse entre sí. (Klug *et al.*, 2006). Si la pérdida de aptitud por cruza emparentadas (incremento de la homocigocidad) se prolonga durante generaciones, ocurre la depresión por endogamia (por ejemplo, reducción del vigor, lento desarrollo, susceptibilidad a

patógenos). Esto puede apreciarse en los índices de fijación endogámicos (F) (Curtis *et al.*, 2008; Hamilton, 2009; Allendorf *et al.*, 2013).

1.3 *Diversidad Genética*

La diversidad genética representa el número total de características genéticas heredables dentro y entre las poblaciones. La diversidad genética, dentro de las poblaciones, proporciona la materia prima para la evolución. A mayor diversidad genética, las especies tienen mayores probabilidades de sobrevivir a cambios en el ambiente. Las especies con poca diversidad genética tienen mayor riesgo frente a esos cambios. Cuando el tamaño de las poblaciones se reduce, aumenta la reproducción entre organismos emparentados (consanguinidad y endogamia) dando pie a la reducción de la diversidad genética. Para diagnosticar genéticamente a una población se tiene que estimar sus niveles de heterocigosidad, el número de alelos por locus y la magnitud de la variabilidad genética (Fisher 1930; Klug *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2008). A continuación se mencionan algunas medidas de diversidad (Hughes *et al.*, 2008).

1.3.1 *Medidas de Diversidad*

Diversidad Alélica (N_a): Un alelo es cada una de las formas alternativas que tiene un gen. La diversidad alélica es un índice de diversidad genética que incorpora información sobre el número medio y la frecuencia relativa de alelos por locus. Esta se mide típicamente usando marcadores moleculares de loci neutrales a la selección.

Riqueza Alélica: El número promedio de alelos por locus.

Riqueza Genotípica: El genotipo se refiere a la información genética que posee un organismo en particular. La riqueza genotípica es el número de genotipos dentro de una población. El genotipo se refiere a la información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN. La riqueza genotípica se puede medir como el número de haplotipos (combinación de alelos de diferentes loci) existentes en la población utilizando marcadores moleculares.

Heterocigosidad (H_O y H_E): Estimador de la proporción media de los loci que llevan dos alelos diferentes en un sitio particular del ADN dentro de un individuo. La heterocigosidad puede ser i) observada (H_O), estimada con marcadores moleculares codominantes, debido a que diferencia homocigotos de heterocigotos. No obstante las estimaciones están sesgadas por el número de individuos de la muestra dentro de una población. ii) Heterocigosidad esperada (H_E), estimada con marcadores tanto dominantes como codominantes cuando se hacen suposiciones sobre el modo de herencia, así como el tamaño y la estructura de las poblaciones.

Diversidad mutacional y tamaño efectivo de la población (Θ): Un parámetro de la diversidad de nucleótidos que proporciona una medida combinada de tamaño efectivo de la población (N_e) y la tasa de mutación. Θ es típicamente calculada usando el estimador de Watterson (1975) ($\theta = 4 N_e \mu$), el cual es igual al número esperado de sitios segregados entre dos genotipos. Las estimaciones de θ asumen un número infinito de sitios de nucleótidos y de no recombinación.

Porcentaje de loci polimórficos: El polimorfismo genético se refiere a la existencia de múltiples alelos de un gen en una población. Si por ejemplo, en un determinado gen existen

dos o más alelos, y la frecuencia de cada uno de ellos en la población es igual o mayor al 1%, se dice que el gen es polimórfico. Cuando la frecuencia de alguno de los alelos no alcanza el 1%, no constituye un polimorfismo. El porcentaje de loci se refiere a los loci que resultaron ser polimórficos (Robinson, 2003; King; et al, 2006; Hughes *et al.*, 2008).

1.4 Variabilidad Genética

La variabilidad genética se define como la variedad (número) de alelos y genotipos presentes en los individuos de una población (Toro y Caballero, 2005). Los individuos de una misma especie no son idénticos. Si bien, son reconocibles como pertenecientes a la misma especie, existen muchas diferencias en su forma, función y comportamiento. La variabilidad genética se origina por mutaciones, recombinaciones de genes heredados y alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas). La variabilidad puede incrementarse debido al flujo génico entre poblaciones vecinas. Altos niveles de variabilidad atribuyen elementos benéficos para las especies, confiriendo la capacidad de responder a amenazas tales como, enfermedades, parásitos, depredadores y cambios en el ambiente. Niveles bajos y la pérdida de variabilidad (reducción de alelos, incremento de homocigotos) limitan la eficacia biológica de las especies para responder a tales amenazas a corto, mediano y largo plazo (Wright, 1978; Amos y Harwood, 1998; Toro y Caballero, 2005).

Las principales fuerzas evolutivas que dirigen o eliminan la variabilidad genética son la selección y la deriva genética. La selección actúa sobre los caracteres de la población, es decir, en los alelos del gen que codifica ese carácter, mientras que la deriva génica reduce la heterocigosidad. Ronald Fisher demostró matemáticamente que cuantos más alelos existan para un gen, más probabilidad hay de que uno de ellos se imponga al resto (se fije). Esto

implica que cuanta más variabilidad genética exista en una población, mayor será el ritmo de la evolución (Wright, 1978; Amos y Harwood, 1998; Toro y Caballero, 2005).

1.5 Estructura genética

Regularmente a una población se le considera como una unidad. Sin embargo, por diversas circunstancias, las poblaciones se dividen en unidades de menor tamaño. Dicha segmentación puede ser el resultado de factores ecológicos, geográficos y biológicos. Si una población se fragmenta, las relaciones entre los individuos pueden variar según el grado de flujo génico que exista dentro y entre las poblaciones. Una población se considera estructurada si (1 existe deriva genética en algunas de sus poblaciones, (2 el flujo génico no es uniforme en toda la población, y (3 los apareamientos no ocurren al azar en toda la población. La estructura de una población afecta el grado de variación genética y los patrones de su distribución (Jacquard, 1974; Allendorf, 2013)

La estructura se expresa en términos de frecuencias génicas o genotípicas (Rimieri, 2013). La estructura está influenciada por la interacción de las fuerzas evolutivas, principalmente por la deriva genética, la selección y flujo génico. Por lo tanto, la estructura de una especie es el resultado de los procesos microevolutivos y demográficos, así como de la fitogeografía (Loveless y Hamrick, 1984; Wenink *et al.*, 1996). La estructura genética de las poblaciones se estima con modelos matemáticos propuestos por Sewall G. Wright (1951) a través de los coeficientes de endogamia (F_{IT} , F_{IS} y F_{ST}). Estos representan la desviación total de las proporciones de Hardy-Weinberg en los cuales existen tres parámetros en términos de una población total (T), subpoblación (S), e individuos (I) (Guries y Ledig, 1981; Slatkin, 1987).

F_{IT} (coeficiente de endogamia total) indica la correlación que existe entre los gametos de los individuos (I), en relación con los gametos de la población total (T). F_{IT} mide la reducción de la heterocigosidad de un individuo (F_{IS}) en relación a la población total (F_{ST}). Los valores varían entre -1 (exceso de heterocigotos en toda la población) y 1 (exceso de homocigotos en toda la población), respecto al equilibrio Hardy-Weinberg.

F_{IS} (coeficiente de endogamia) mide el exceso o déficit promedio de genotipos heterocigotos. Es la correlación que existe entre los genes de los individuos (I) y la subpoblación (S). Valores positivos de F_{IS} indican un exceso de homocigotos y valores negativos un exceso de heterocigotos con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg. Valores cercanos a 0 revelan que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Allendorf *et al.*, 2013).

F_{ST} (coeficiente de coancestría) es la correlación entre los genes de la subpoblación (S) en relación a la población entera (T). Este estimador mide las relaciones de divergencia entre poblaciones. Los rangos de F_{ST} van de 0, cuando todas las subpoblaciones tienen frecuencias alélicas iguales (no hay diferenciación), a 1, cuando todas las subpoblaciones son fijadas por diferentes alelos (mayor diferenciación) (Guries y Ledig, 1981; Slatkin, 1987; Allendorf *et al.*, 2013).

1.6 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son una poderosa herramienta para evaluar la diversidad y estructura genética de las poblaciones. Para que un marcador molecular sea efectivo se debe considerar lo siguiente: 1) deben reconocer la mayor distribución a lo largo del genoma; 2) los marcadores utilizados no deben estar ligados, es decir, la herencia de un marcador es

independiente de la de otro; (2) cada marcador debe ser específico para un solo locus; (3) deben ser polimórficos; 4) el marcador debe detectar un número alto de alelos de manera constante; 5) deben tener una elevada reproductividad y precisión; 6) sin presencia de alelos nulos; 7) analizarse mediante un procedimiento fácil, rápido y económico; 8) que la información del genotipo pueda ser transferida rápidamente; y 9) que la fuente de ADN no esté limitada a grandes cantidades de ADN. Actualmente, uno de los marcadores más utilizados y que cumple con la mayoría de los requisitos mencionados anteriormente son los microsatélites (Moxon y Wills, 1999; Eguiarte *et al.*, 2007; Renteria, 2007; Kalia *et al.*, 2011).

1.6.1 *Microsatélites*

Los microsatélites, o secuencias simples repetidas (SSRs), son segmentos de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases. Por ejemplo: mononucleótidos (TT)_n, dinucleótidos (AT)_n, tetranucleótidos (AAGG)_n o hexanucleótidos (ATAGTG)_n (Hancock 1999; Kalia *et al.*, 2011). Estos loci se encuentran tanto en genomas eucariontes como procariontes así como en regiones codificantes y no codificantes del ADN (Aranguren–Méndez *et al.*, 2005; Rentería, 2007). Existen tres tipos de microsatélites: del genoma nuclear (SSRsn), de cloroplastos (SSRsc) y de mitocondrias (SSRsm). Los microsatélites de ADN nuclear son detectados en múltiples grupos de plantas y animales. Estos son utilizados fundamentalmente para estudios de diversidad genética intra e interespecifica, contrastar hipótesis ecológicas demográficas, y evolutivas en poblaciones naturales (Moxon y Wills, 1999; Dewoody *et al.*, 2006; Kalia *et al.*, 2011).

1.7 *El género Pinus en México*

México es uno de los países más megadiversos en el mundo (Mittermeier *et al.*, 1999; Gaston y Spicer, 2004). El país cuenta con una superficie forestal aproximada de 138 millones de hectáreas, que representa aproximadamente el 70.4% del territorio nacional (FAO, 2011). Dentro de estos bosques, las coníferas son las más apreciadas por las comunidades indígenas y por la sociedad en general, debido a que son una fuente de servicios ecosistémicos (p.e. aporte de nutrientes al suelo, oxígeno), productos maderables (p.e. madera, leña) y productos no maderables (p.e. pulpa, resinas, semillas comestibles) (Sánchez-González, 2008). La riqueza aproximada de especies de pinos a nivel mundial es de 111 especies (Price *et al.*, 1998). México posee la mayor diversidad del género *Pinus*, con 49 taxa, de los cuales 21 son especies endémicas, por lo que se le considera como un centro de diversidad de *Pinus* (Sánchez-González, 2008). Los pinos se encuentran desde zonas áridas y tropicales a nivel del mar (e.g. *P. caribea* y *P. oocarpa*) hasta zonas altas y frías superiores a los 3000 m s.n.m. (e.g. *P. hartwegii* y *P. culminicola*) (Perry, 1991; Dvorak *et al.*, 2000).

En México, la entidad con mayor biodiversidad es el estado de Oaxaca. En el territorio existen aproximadamente 17 especies de pinos, de los cuales, la mayoría de los grupos étnicos indígenas de la entidad aprovechan estos recursos forestales (Del castillo *et al.*, 2004; García-Mendoza *et al.*, 2004). Un claro ejemplo es la comunidad de Ixtlán de Juárez, quien desde el año 2001 está certificada por el buen uso que hace a sus bosques (Smart Wood Program, 2001). Una de las principales especies maderables utilizada por la comunidad, es *Pinus patula* Schl. et Cham., una conífera endémica de México que por ser

uno de los principales elementos arbóreos en los ecosistemas forestales de Sierra Juárez, cual además es altamente apreciada y aprovechada en la región (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2011).

1.7.1 *Pinus patula* (Generalidades)

Pinus patula, es una especie endémica de México y de elevado potencial silvícola (Rzedowski, 2006). Recibe regionalmente nombres como: ocote, ocote colorado, ocote liso, ocote macho, ocote rojo, pino colorado, pino chino, pino de México, pino xalacote, peinador de neblinas, pino lacio y pino triste (Farjon *et al.*, 1997; Velázquez *et al.*, 2004); en inglés se le conoce como *Mexican weeping pine* o *patula pine* (Perry, 1991).

Esta especie forestal es de rápido crecimiento, posee un tronco recto por lo que llega a medir de 35-40 m de alto y entre 50-120 cm de diámetro a la altura del pecho (Perry, 1991; Farjon *et al.*, 1997; Velázquez *et al.*, 2004). La corteza de este árbol es gruesa de color gris-café oscuro, con profundas fisuras verticales en la parte inferior del tronco. Sin embargo, a una altura de 3.4 m, la corteza se vuelve más fina y escamosa, de color rojiza a rojo amarillento (Perry, 1991). En la etapa juvenil presenta ramillas rojizas y escamosas, con ligero tinte blanquecino en sus partes más tiernas. Las hojas (acículas) se encuentran reunidas en fascículos de 3 a 4 y raramente 5, miden de 11-30 cm de largo y 0.5-0.9 mm de ancho, son delgadas y colgantes, de color verde brillante con los bordes finamente aserrados y con estomas presentes tanto en las superficie adaxial como en la abaxial (Perry, 1991; Farjon *et al.*, 1997; Velázquez *et al.*, 2004; Ruíz, 2010).

Los conos, también conocidos como piñas, son duros, sésiles, serótinicos, encorvados, oblíquos, puntiagudos y de color amarillo–ocre con tinte rojizo lustroso. Estos miden de 5–12 cm de alto y 4–6.5 cm de diámetro. Los conos se abren parcialmente en diferentes épocas; cuando abren, son de color café–amarillento, tornándose a grises con la edad. Las piñas maduran durante los meses de invierno (noviembre–febrero) pero pueden permanecer cerrados durante años. Las semillas miden entre 5-17 mm de largo x 2-4 mm de ancho y son de color marrón oscuro a casi negro, con ala articulada de color más claro 12-18 mm x 5-6 mm (Perry, 1991; Farjon *et al.*, 1997; Velázquez *et al.*, 2004).

En México *P. patula* se extiende en sitios aislados a lo largo del este de la Sierra Madre Oriental (estados de Tamaulipas, Querétaro, Hidalgo, México, D.F., Morelos, Tlaxcala, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas) (Farjon *et al.*, 1997; Velázquez *et al.*, 2004). Se ubica en una amplitud altitudinal entre 1500 a los 3100 m s.n.m., preferentemente en las exposiciones Este–Oeste (Farjon *et al.*, 1997; Velázquez *et al.*, 2004). Esta especie es típica de zonas montañosas con climas muy húmedos, subtropicales a templado–calientes. Se desarrolla preferentemente en bosques mixtos de pino o de pino–encino; en sitios con precipitaciones que varían entre 1000 a 1800 mm anuales (Perry, 1991).

Sin embargo, recientes estudios estiman para México cambios en el clima, lo que afectará la distribución de *Pinus patula*. Por ejemplo, Sáenz–Romero y colaboradores (2010) estiman en el país un incremento anual promedio en la temperatura para el año 2030 (1.5 °C), 2060 (2.3 °C) y 2090 (3.7 °C), así como un decremento de la precipitación anual del 6.7 %, 9.0 % y 18.2 % respectivamente a los años mencionados. Otros escenarios predicen para el año 2050 un cambio en la distribución de *P. patula*, con decremento de superficie

del 35.7 % bajo un escenario de cambio climático severo (22.7 °C y 660 mm) y un decremento del 23.4 % bajo un escenario conservador (21.8 °C y 721 mm), debido a que la colonización tenderá a subir hacia la cima de las montañas. Estos posibles cambios en el clima afectarán a las poblaciones de *Pinus patula* al desplazar y modificar su distribución. Dichos procesos se notarán principalmente en gradientes altitudinales (Gómez–Mendoza y Arriaga, 2007; Gómez–Mendoza, 2008).

1.8 Gradientes Altitudinales

Un gradiente es definido como un cambio gradual, cuantitativo y susceptible de ser medido en un intervalo físico o ambiental en función de una variable dada (Whittaker, 1972; Zacarías, 2009). La altitud y latitud producen un número considerable de gradientes ambientales. Un ejemplo de ello son los gradientes de temperatura. Esta es importante biológicamente porque influye en los patrones de distribución de las especies (Lomolino, 2001; Botero, 2011).

Existen trabajos sobre gradientes altitudinales que proporcionan información para el aprovechamiento y conservación de los recursos. Por ejemplo, en bosques tropicales distribuidos en un gradiente de altitud en Manantlán (Jalisco, México), se determinó que hay menor diversidad de especies en los pisos superiores mientras que la mayor diversidad en los pisos inferiores (Vázquez y Givinish, 1998). Singh *et al.* (2010) mencionaron que el potencial de regeneración en *Pinus roxburghii*, *Quercus leucotrichophora*, y *Q. floribunda* es mayor en los pisos intermedios e inferiores del gradiente altitudinal. Maxime y Hendrik (2011), encontraron, en el sureste de los Alpes, que el desempeño en crecimiento de *Fagus*

sylvatica disminuye con la altitud. Paralelamente en el mismo estudio, se encontró en *Abies alba Mill* el mejor desarrollo en las partes intermedias (Maxime y Hendrik, 2011).

Un aspecto importante en los gradientes altitudinales es la distribución geográfica de las poblaciones (centrales y periféricas), en las cuales puede existir una diferenciación genética (Lesica y Allendorf, 1995; Lammi *et al.*, 1999). En la periferia de un gradiente en altitud regularmente las poblaciones son, aisladas, en menor abundancia y viven en hábitats ecológicamente marginales. En estas poblaciones puede existir una presión por parte de la selección natural y la deriva génica, favoreciendo a los heterocigotos u homocigotos.

Hay evidencia de que los heterocigotos proporcionan ventajas a las poblaciones periféricas, especialmente en ambientes marginales dentro de un gradiente altitudinal (Lesica y Allendorf, 1992; Lammi *et al.*, 1999). Uno de los métodos para diagnosticar genéticamente a las poblaciones en este tipo de gradientes es la estructura genética, con ayuda de marcadores moleculares. El conocimiento de la estructura genética en las poblaciones puede auxiliar en el diseño de estrategias de conservación y planes de manejo forestal (Eguiarte *et al.*, 1992).

Pocos son los trabajos orientados a gradientes altitudinales con marcadores moleculares. En *Poa hiemata* (pasto alpino) se estimó, con microsatélites nucleares, una baja diversidad genética entre las poblaciones del gradiente ($H_E = 0.515-0.769$), mientras que el flujo génico resultó alto ($N_{em} = 5.01-9.41$) (Byars *et al.*, 2009). En poblaciones de *Quercus crispula* se encontró, a través de microsatélites nucleares, que la mayor diversidad genética se presenta en las poblaciones centrales ($H_E = 0.793$), seguida de la población periférica

superior ($H_E = 0.785$), e inferior del gradiente ($H_E = 0.770$) (Ohsawa *et al.*, 2007). En *Pinus brutia*, a través de microsatélites del cloroplasto, se detectó la mayor diversidad en las poblaciones de pisos inferiores ($H_E = 0.9582$), en comparación con las centrales ($H_E = 0.9514$) y las del piso más alto ($H_E = 0.9538$) (Santiago *et al.*, 2012).

1.8.1 Estudios en Sierra Juárez, Oaxaca

En Oaxaca se pronostica para el 2030 que las condiciones actuales de precipitación y temperatura se ubicarán a altitudes, al menos 175 m por arriba de lo actual (Zacariás–Eslava y Del Castillo, 2010). Este posible desplazamiento en las condiciones ambientales modificará la diversidad y estructura genética de *Pinus patula* en los gradientes en altitud, principalmente en las zonas montañosas del Estado. No obstante pocos son los estudios genéticos en gradientes altitudinales dentro de la región. Por ejemplo, estudios de jardín común, en Ixtlán de Juárez (México) y Quebec (Canadá), determinaron la interacción genotipo–ambiente en poblaciones de *Pinus patula*, a lo largo de un gradiente altitudinal. Los autores concluyeron que los individuos de altitudes intermedias exhibieron un potencial de crecimiento más alto (Sáenz–Romero *et al.*, 2011a). Paralelamente Sáenz–Romero y colaboradores (2011b), a través de cámaras de crecimiento y genética cuantitativa, detectaron una baja variabilidad genética en poblaciones ubicadas en la cima del gradiente en comparación con las de los pisos inferiores. Hacen falta más estudios que detecten si en verdad está ocurriendo modificaciones a nivel genético de la especie. Con ello, se podrá tomar mejores decisiones de conservación y aprovechamiento de *P. patula* en la región.

Literatura citada

- Allendorf FW, Luikart G, Aitken SN. (2013). *Conservation and the genetics of populations* (2th edit). Wiley–Blackwell. UK.
- Amos W, Harwood J (1998). Factors affecting genetic diversity in natural populations. *Phi. Trans Royal Society of London B.*, 353: 177–186.
- Aranguren–Méndez JA, Román–Bravo R, Isea W, Villasmil Y, Jordana J (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos latinoamericanos de producción animal*, 13(1): 30–42.
- Batchelet D, Neilson RP (2000). Biome redistribution under climate change. *USDA Forest Service, General Technical Report TMRS-GTR*, 59: 18–33.
- Barthlott W, Lauer W, Placke A (1996). Global Distribution of Species Diversity in Vascular Plants: Towards a World Map of Phytodiversity (Globale Verteilung der Artenvielfalt Höherer Pflanzen: Vorarbeiten zu einer Weltkarte der Phytodiversität). *Erdkunde*, 50: 317–327.
- Botero A, MA (2011). Estructura de las comunidades de mamíferos carnívoros en un gradiente altitudinal en el estado de Oaxaca, México. Tesis de Maestría. CIIDIR–Oaxaca. IPN.
- Byars SG, Parsons Y, Hoffmann AA (2009). Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. *Annals of Botany*, 103: 885–899.
- Camarero JJ, Gutiérrez E (2004). Pace and pattern of recent treeline dynamics: response of ecotones to climatic variability in the Spanish Pyrenees. *Climatic Change*, 63(1-2): 181–200.
- Conde C (2006). *México y el cambio climático global*. 1ª edición. Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM. México. 28p.
- Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Massarini A (2007). *Biología* (7a ed.). Médica Panamericana Editorial.
- Del Castillo RF, Pérez de la Rosa JA, Vargas GA, Rivera GR (2004). Coníferas. *En: García-Mendoza AJ, Ordóñez MJ, Briones–Salas M (eds.), Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, pp. 141-158.
- Dewoody J, Nason JD, Hipkins VD (2006). Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes*, 6: 951–957.
- Dvorak WS, Jordon AP, Hodge GP, Romero JL (2000). Assessing evolutionary relationships of pines in the *Oocarpae* and *Austroales* subsections using RAPD Markers. *New Forests*, 20: 163–192.
- Eguiarte LE, Pérez–Nasser N, Piñero D (1992). Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity*, 69:217–228.
- Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (2007). *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología–SEMARNAT. 593p.
- FAO. 2011. *Situación de los bosques del mundo*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 193p.
- Farjon A, Styles BT (1997). *Flora Neotrópica: Pinus* (Pinaceae). New York Botanical Garden. New York. 291p.

- Fisher RA (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford.
- García-Mendoza AJ, Ordóñez MJ, Briones-Salas M (2004). Biodiversidad de Oaxaca. UNAM. 605p.
- Gaston KJ, Spicer JI (2004). *Biodiversity: An introduction* (second edition). Blackwell Publishing company, USA.
- Gehrig-Fasel J, Guisan A, Zimmermann NE (2007). Tree line shifts in the Swiss Alps: Climate change or land abandonment?. *Journal of Vegetation Science*, 18: 571–582.
- Gómez-Mendoza L, Arriaga L (2007). Modeling the Effect of Climate Change on the Distribution of Oak and Pine Species of Mexico. *Conservation Biology*, 21 (6): 1545–1555.
- Gómez-Mendoza L, Galicia L, Aguilar-Santelises A (2008). Sensibilidad de grupos funcionales al cambio climático en la Sierra Norte de Oaxaca, México. *Investigaciones Geográficas*, 67: 76–100.
- Grace J, Berninger F, Nagy L (2002). Impacts of climate change on the tree line. *Annals of Botany*, 90: 537–544.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (2002). *Genética* (7a ed.). McGraw-Hill Interamericana Editorial.
- Guries, RP, Ledig, FT (1981, April). Genetic structure of populations and differentiation in forest trees. In Conkle, MT (tech. coord.) Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects. *USDA Forest Service Genetic Technology Rep. PSW-48* (pp. 42-47).
- Hamilton MB (2009). *Population genetics* (1st edit.). Wiley-Blackwell press. UK.
- Hamrick JL, Godt MJ (1989). Allozyme diversity in plant species in: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, eds. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, Sunderland, MA: *Sinauer Associates*, 43–63.
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MT, Underwood N, Vellend M (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11: 609–623.
- Jacquard A (1974). *The Genetic Structure of Populations*. Springer New York.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan Ak (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177: 309–334.
- Kauppi P, Posch M (1988). A case study of the effect of CO₂-induced climatic warming on forest growth and the forest sector: A. Productivity reactions of northern boreal forest. *The impact of climatic variations on agriculture*, Vol. I (ed. Paary ML, Carter TR, Kinijin NT. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 183–195.
- King RC, Stansfield WD, Mulligan PK (2006). *A Dictionary of Genetics* (7th Edition). OXFORD UNIVERSITY PRESS. NY, USA. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA (2006). *Concepts of genetics* (8th ed.). Pearson Education, Inc. USA.
- Lammi A, Siikamäki P, Mustajärvi K (1999). Genetic Diversity, Population Size, and Fitness in Central and Peripheral Populations of a Rare Plant *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology*, 13(5): 1069–1078.
- Landa R, Magaña V, Neri C (2008). *Agua y clima: elementos para la adaptación al cambio climático*. 1ª edición. SEMARNAT – Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM. México. 135p.
- Lesica P, Allendorf FW (1992). Are small populations of plants worth preserving?. *Conservation Biology*, 6:135.
- Lomolino MV (2001). Elevational gradients of species-density: historical and prospective views. *Global Ecology and Biogeography*, 10: 3–13.

- Loveless MD, Hamrick JL (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of the Ecology and Systematics*, 15: 65–95.
- Maxime C, Hendrik D (2011). Effects of climate on diameter growth of co-occurring *Fagus sylvatica* and *Abies alba* along an altitudinal gradient. *Trees*, 25: 265–276.
- McDonald BA, Zhan J, Burdon JJ (1999). Genetic Structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology*, 89: 639–645.
- Mittermeier RA, Myers N, Mittermeier CG (1999). *HOTSPOTS: EARTH'S BIOLOGICALLY RICHEST AND MOST ENDANGERED TERRESTRIAL ECOREGIONS* (1th edition). CEMAX, S.A., Mexico City, 430 pp.
- Moreno L A (2007). Tamano efectivo de la población. En: *Ecología Molecular*. Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (eds.). Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, México, DF, 541-566.
- Moxon ER, Wills C (1999). DNA microsatellites: agents of evolution?. *Scientific American*, 280(1): 94–99.
- Nordborg M, Innan H (2002). Molecular population genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 69–73.
- Ohsawa T, Tsuda Y, Saito Y, Sawada H, Ide Y (2007). Altitudinal genetic diversity and differentiation of *Quercus crispula* in the Chichibu Mountains, central Japan. *International Journal of Plant Sciences*, 168(3):333–340.
- Parnesan C, Yohe G (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421; 37–42.
- Perry JP Jr. (1991). *The pines of México and Central America*. Timber Press. Portland, Oregon, USA.
- Price RA, Liston A, Strauss SH (1998). Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: M. D. Richardson (ed). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Rzedowski J (2006). Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 504 p.
- Rimieri, P (2013). La estructura genética de poblaciones de plantas condiciona la interpretación de parámetros y su alcance en caracteres ecofisiológicos. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 24(2): 5–10
- Rodríguez–Ortiz G, González–Hernández VA, Aldrete A, De Los Santos–Posadas HM, Gómez–Guerrero A, Fierros–González AM (2011). Modelos para estimar crecimiento y eficiencia de crecimiento en plantaciones de *Pinus patula* en respuesta al aclareo. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 4(3): 205–212.
- Rupp TS, Chapin FS III, Starfield AM (2000). Response of subarctic vegetation to transient climatic change on the Seward Peninsula in north-west Alaska. *Global Change Biology*, 6: 541–555.
- Sánchez–González A (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques*, 14(1): 107–120.
- Sáenz–Romero C, Rehfeldt EG, Crookston NL, Duval P, St–Amant R, Beaulieu J, Richardson BA (2010). Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Mexico and their use in understanding climate-change impacts on the vegetation. *Climatic Change*, 102: 595–623.
- Sáenz–Romero C, Ruiz–Talonía LF, Beaulieu J, Sánchez–Vargas NM, Rehfeldt GE (2011a). Genetic variation among *Pinus patula* populations along an altitudinal gradient. two environment nursery tests. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 34 (1): 19–25.

- Sáenz–Romero C, Beaulieu J, Rehfeldt GE (2011b). Variación genética altitudinal entre poblaciones de *Pinus patula* de Oaxaca, México, en cámaras de crecimiento simulando temperaturas de calentamiento global. *Agrociencia*, 45: 399–411.
- Smart Wood Program (2001). Resumen Público de Certificación de Comunidad Ixtlán de Juárez. CERTIFICADO: SW-FM/COC-147. Consejo Civil Mexicano para la Silvicultura Sostenible.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 232: 787–792.
- Toro MA, Caballero A (2005). Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Phi. Trans Royal Society of London B.*, 360: 1367–1378.
- Vázquez GJA, Givinish TJ (1998). Altitudinal gradients in tropical forest composition, structure, and diversity in the Sierra de Manatlán. *Journal of Ecology*, 86:999–1020.
- Velázquez MA, Ángeles PG, Llanderal OT, Roman JA, Reyes HV (2004). Monografía de *Pinus patula*. CONAFOR, SEMARNAT & Colegio de Posgraduados. Primera edición. 124p.
- Whittaker RH (1972). Evolution and Measurement of species diversity. *Taxón*, 21:213–251.
- Wright S (1978). Variability within and among populations volume IV. *Evolution and the genetics of populations*. The university of chicago press. USA.
- Zacarías EY (2009). Composición y Estructura del Bosque Templado de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, a lo largo de un Gradiente Altitudinal. Tesis de Maestría. IPN, CIIDIR–Oaxaca.
- Zacarías–Eslava Y, Del Castillo RF (2010). Comunidades vegetales templadas de la Sierra Juárez, Oaxaca: pisos altitudinales y sus posibles implicaciones ante el cambio climático. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 87: 13-28.

Capítulo II

Estructura genética de Pinus patula Schl. et Cham en un gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Introducción

El clima es uno de los principales factores que influyen en la distribución y la diversidad genética de las especies vegetales, al ejercer una fuerte presión selectiva (Martínez *et al.*, 2004; Eguiarte *et al.*, 2007; Byars *et al.*, 2009; Van-Zonneveld *et al.*, 2009; Sáenz-Romero *et al.*, 2010; FAO, 2011). Algunos trabajos realizados en herbáceas, plantas leñosas, en bosques tropicales, y en bosques de pino-encino, sugieren que la variación climática en zonas montañosas afectará la estructura y diversidad genética de las poblaciones (Odland y Birks, 1999; Williams *et al.*, 2003; Gómez-Mendoza y Arriaga, 2007; Gómez-Mendoza *et al.*, 2008; Inouye, 2008; ; Sáenz-Romero *et al.*, 2009; Zacarías-Eslava y Del Castillo, 2010; Boehmer, 2011; Montesinos-Navarro *et al.*, 2011; Sáenz-Romero *et al.*, 2012; Matías y Jump, 2014).

Los gradientes altitudinales imponen condiciones ambientales heterogéneas y junto con la topografía de los sitios pueden afectar el patrón de distribución y diversidad genética entre las poblaciones, así como la cantidad de hábitat disponible para las especies (Zhang *et al.*, 2006; García-Fernández, 2011). Esto podría conducir a la alteración de la capacidad adaptativa de las poblaciones, al ser afectadas por factores evolutivos como la deriva génica, endogamia y selección (García-Fernández, 2011). Las plantas tienen la capacidad de responder a los cambios generados en los gradientes a través de la plasticidad (genética), adaptación y migración. (Jump y Peñuelas, 2005; González-Martínez *et al.*, 2006; Aitken *et al.*, 2008; Byars *et al.*, 2009).

La dispersión de semillas es el medio por el cual las especies vegetales se desplazan a nuevos sitios (Nora *et al.*, 2011). Paralelamente, con la dispersión de semillas así como de polen, ocurre una transferencia de genes de una población a otra (flujo génico). Esto

implica la donación de nuevas variantes alélicas a la población receptora (Eguiarte *et al.*, 2007; Savolainen *et al.*, 2007). En gradientes altitudinales, el desplazamiento de las especies tiene importantes implicaciones en las zonas marginales o periféricas cuyas condiciones ecológicas pueden ser muy distintas a la de la zona central. Sin embargo, recibir gran cantidad de material genético de una población que albergue más diversidad a otra más pequeña, esto a través de lluvia de semilla o flujo de polen, puede ser un factor que “empantane genéticamente” la adaptación de los nuevos sitios. Esto puede suponer la donación de alelos perniciosos o simplemente de alelos no adaptados a las condiciones a las que son dispersados (Lesica y Allendorf, 1995; Robledo–Arnuncio y Gonzáles, 2009). Algunos estudios con marcadores moleculares a lo largo de gradientes han detectado que el cambio climático modifica el patrón de flujo génico. Esto porque las condiciones actuales climáticas a lo largo de un gradiente altitudinal se desplazarán a otras altitudes, como consecuencia del cambio climático. Por lo tanto, el flujo genético puede permitir que ciertos pisos altitudinales reciban genes provenientes de otras altitudes cuyas condiciones climáticas se parezcan a las nuevas condiciones climáticas que están surgiendo, (Zhang *et al.*, 2006; Ohsawa *et al.*, 2007; Schneller y Liebst, 2007; Trung *et al.*, 2007; Byars, *et al.*, 2009; Shanjani *et al.*, 2011; Unger *et al.*, 2011).

Transiciones demográficas en la estructura genética de poblaciones, por ejemplo, entre juveniles (brinzales en pinos) y adultos, pueden proporcionar información clave acerca de los papeles relativos que juegan los diferentes factores evolutivos en la estructura genética y demográfica de las poblaciones (Chung *et al.*, 2003; Truong *et al.*, 2007). Una colonización reciente, un limitado flujo genético por polen o semilla, baja densidad de individuos reproductivos o diferentes tasas de sobrevivencia entre genotipos con diferentes

adaptaciones, pueden actuar en forma aislada o en conjunto para generar una acentuada diferenciación en la estructura genética entre poblaciones (García–Fernández, 2011; Nora *et al.*, 2011). Por otra parte, si la dispersión de semilla es limitada las mayores similitudes se observarán entre adultos y brinzales del mismo sitio que entre adultos y juveniles de sitios diferentes (Chung *et al.*, 2003; Trung *et al.*, 2007). Con depresión endogámica la frecuencia de homocigotos tiende a disminuir con la edad debido al efecto de la selección natural actuando en contra de homocigotos, de manera que grupos juveniles tendrían en promedio mayores niveles de homocigosidad que grupos de mayor edad. Si la depresión endogámica es más fuerte en un piso altitudinal que en otro, entonces el piso altitudinal con mayor depresión endogámica mostrará la mayor reducción en la frecuencia de homocigotos en los adultos con respecto a los brinzales (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Robinson, 2003; Trung *et al.*, 2007; Charlesworth y Willis, 2009; García–Fernández *et al.*, 2012).

Algunos estudios de variación genética a lo largo de gradientes altitudinales reportan que la diversidad dentro de las poblaciones varía entre los pisos de los gradientes (Sáenz–Romero y Tapia–Olivares, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Byars *et al.*, 2009; Salehi *et al.*, 2011). Según estos estudios, la diversidad genética puede mostrar los siguientes patrones: 1) las poblaciones de altitudes intermedias presentan mayor diversidad en comparación con las poblaciones periféricas (Sáenz–Romero y Tapia–Olivares, 2003); 2) las poblaciones de pisos altitudinales superiores tiene menor diversidad que aquellas en la parte inferior del gradiente (Santiago *et al.*, 2012); 3) las poblaciones de los pisos inferiores presentan la menor diversidad en comparación con los pisos superiores (Ohsawa *et al.*, 2007); 4) la variación intra–poblacional no es afectada por la altitud (Ohsawa y Ide, 2008). Niveles de diferenciación genética entre adultos y brinzales, independientemente de su posición

altitudinal, podrían revelar un flujo genético poco restringido entre pisos altitudinales. Por el contrario, una mayor similitud entre adultos de pisos superiores con brinzales de pisos inferiores podría revelar que los adultos de pisos superiores contribuyen con más semilla a los pisos inferiores que los adultos de pisos inferiores a los pisos superiores. No obstante, este resultado podría indicar que si el cambio climático está desplazando las condiciones actuales a altitudes más elevadas, la dispersión de semilla puede ser un factor que contribuya a disminuir el potencial adaptativo de las especies al favorecer un movimiento de genes en sentido contrario al que se requiere por el cambio climático (Ohsawa *et al.*, 2007; Trung *et al.*, 2007).

En el caso particular de coníferas, algunos estudios han demostrado que hay diferencias genéticas entre las poblaciones ubicadas a lo largo de un gradiente altitudinal, con variaciones en su estructura genética, es decir, variaciones en las frecuencias génicas o genotípicas en sus poblaciones (Rehfeldt, 1988, 1989, 1991; Sáenz–Romero y Tapia–Olivares, 2003; Rimieri, 2013). En algunos casos, la mayor diversidad genética en especies de coníferas, se encontró en poblaciones de elevación intermedia y disminuye en aquellas ubicadas en los extremos del gradiente, por lo que la diferenciación genética es notoria entre poblaciones marginales y las centrales (Isik y Kara, 1997; Taira *et al.*, 1997; Premoli, 2003; Sáenz–Romero y Tapia–Olivares, 2003; Ohsawa *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Viveros–Viveros *et al.*, 2010). En otros casos, las poblaciones ubicadas en la cima del gradiente son las que poseen mayor diversidad genética en comparación con las ubicadas en los pisos inferiores (Wen y Hsiao 2001). Con respecto al género *Pinus*, es posible que la diversidad genética entre poblaciones esté afectada por barreras fisiográficas presentes en el gradiente de altitud, y la adaptación de los individuos a las condiciones climáticas (por

ejemplo, temperatura y precipitación) presentes en su hábitat (Rehfeldt 1988, 1989; 1991; Sáenz–Romero *et al.*, 2006; Viveros–Viveros *et al.*, 2013). Es importante señalar que los estudios en pinos, antes mencionados, analizaron solo individuos adultos, por lo que no se conoce la cantidad de diversidad genética presente en los brinzales y su contribución durante el proceso de regeneración de sus poblaciones y el bosque. Por ejemplo, en plantaciones de *Pinus pinaster* se encontró que hay diferencias en la estructura y flujo génico entre adultos y brinzales durante la regeneración (González *et al.*, 2003).

Ciertos estudios sugieren la existencia de una presión por parte del clima (p.e. temperatura y precipitación) en las poblaciones de *P. patula*, (Dime *et al.*, 1998; Sáenz–Romero *et al.*, 2010; Sáenz-Romero *et al.*, 2011a; Sáenz-Romero *et al.*, 2011b). En condiciones de crecimiento controlado para *P. patula*, los individuos provenientes de altitudes inferiores están mejor adaptados a las temperaturas elevadas, que los individuos de altitudes superiores (Sáenz-Romero *et al.*, 2011a; Morales *et al.*, 2013). Por otra parte, los individuos de esta especie que provienen de altitudes intermedias poseen un mejor desempeño en su crecimiento en comparación con aquellos que provienen de altitudes periféricas (Sáenz-Romero *et al.*, 2011b). Sin embargo, no se han evaluado la diversidad, estructura y flujo genético de las poblaciones de *Pinus patula* a lo largo de un gradiente altitudinal en respuesta a cambios en las condiciones de su hábitat.

En el estado de Oaxaca, *Pinus patula* es una especie altamente apreciada y aprovechada por las comunidades rurales debido a las características fenotípicas del pino (p.e. rápido crecimiento, auto poda, madera blanda, etc.) (Perry, 1991; Castellanos–Bolaños *et al.*, 2008). El bosque de *P. patula*, en la zona de Ixtlán de Juárez, Sierra Norte de Oaxaca, cubre una extensión aproximada de 5 000 ha (Castellanos-Bolaños *et al.*, 2008). Sin embargo, se

pronostica que para el año 2030 habría un desplazamiento de al menos 175 m hacia arriba en las condiciones actuales de precipitación y temperatura, lo que probablemente afectará la distribución de *P. patula* en la zona (Zacarías–Eslava y Del Castillo, 2010). Otro escenario sugiere que para el año 2050 habría una restricción en la distribución de géneros como *Abies* y *Pinus* hacia las clinas superiores de los gradientes de montañas (Gómez–Mendoza, 2008).

Algunos habitantes de Ixtlán de Juárez mencionan que han observado un desplazamiento de *Pinus patula* hacia pisos superiores del gradiente altitudinal (comunicación personal). Esta observación preocupa a la comunidad, ya que ésta es la principal especie en su plan de manejo forestal. Si ocurriera este desplazamiento de *P. patula* podrían presentarse procesos de deriva génica y limitación de flujo génico, lo cual podría afectar la diversidad genética de la especie y su capacidad adaptativa.. La comparación de adultos con brinzales podrá dar pauta de los factores que dominan la estructura genética y con ello tener un fundamento acerca de la capacidad de dispersión de *P. patula* en gradientes altitudinales y su influencia en la adaptabilidad.

Con base en lo precedente, se analizó la diversidad, estructura y flujo genético en adultos y brinzales de poblaciones ubicadas en un gradiente de altitud. Los resultados de este trabajo permitirán conocer los procesos por los cuales se da la dispersión y el flujo genético entre las poblaciones en este gradiente y, por otro lado, ayudarán a diseñar los programas para el manejo y conservación de la especie.

Objetivo

Estimar la estructura y diversidad genética de individuos adultos con respecto a el establecimiento de individuos juveniles dentro y entre poblaciones de *Pinus patula* Schl. et Cham. en tres pisos altitudinales en una zona montañosa en Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Objetivo específico

Estimar el flujo genético dentro y entre poblaciones de *Pinus patula* Schl. et Cham. en tres pisos altitudinales en una zona montañosa en Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Materiales y métodos

Área de estudio

Ixtlán de Juárez es una comunidad Oaxaqueña con actividad forestal que posee una superficie de 19 440 ha (Smart Wood Program. 2001; Ruíz, 2010). La comunidad se ubica entre las coordenadas de 17°18'16''–17°34'00'' de Latitud Norte y 96°31'38''–96°20'00'' de Longitud Oeste. Presenta una topografía muy accidentada cuyas pendientes más frecuentes fluctúan en un rango del 40 al 60% y una altitud de entre los 1 900 a los 3 125 m s.n.m. La precipitación pluvial varía de entre los 900 mm a los 1 100 mm al año y una temperatura promedio anual de 20° C (Smart Wood Program. 2001; TIASA, 2003).

Ixtlán de Juárez tiene inventariadas 9 435 ha de bosques mezclados de pino–encino, en donde *Pinus patula* está presente como especie dominante en 5,131 ha, seguida por *P.*

oaxacana Mirov en 2,114 ha, *P. pseudostrobus* Lindl. en 346 ha, *P. douglasiana* Martínez con 463 ha, *P. ayacahuite* C.A. Ehrenb. en 200 ha, *P. teocote* Schltdl. et Cham. en 800 ha, *P. rudis* Endl. en 281 ha, y *P. leiophylla* Schiede & Deppe en 100 ha (Castellanos–Bolaños *et al.*, 2010).

Especie de estudio

Pinus patula es una especie forestal de rápido crecimiento, de hasta 40 metros de altura, con una corteza rojiza, y hojas verde–amarillentas caídas. Ésta especie monoica es polinizada por el viento. Las semillas son dispersadas por gravedad, viento o roedores. *P. patula* se distribuye en México desde el estado de Tamaulipas hasta Oaxaca y Chiapas, con una amplitud en zonas de manejo de entre los 1500 a los 3100 metros sobre el nivel del mar y en áreas conservadas de entre los 2200 a 2800 m s.n.m. El hábitat de la especie se encuentra en zonas montañosas con climas húmedos (precipitaciones de 1000–1500 milímetros anuales) (Look ,1977; Farjon *et al.*, 1997; Velázquez *et al.*, 2004; Castellanos–Bolaños *et al.*, 2008).

Colecta del material biológico vegetal

Entre el año 2013 y 2014, se colectaron acículas (hojas) de un total de 152 individuos de *P. patula*, distribuidos en tres sitios (pisos) de muestreo fuera de las áreas de manejo forestal y localizados en la misma exposición de la montaña (noroeste). (2 400, 2 750 y 3 100 m s.n.m.). Las distancias geográficas y de altitud se determinaron con el Sistema de Posicionamiento Global (GPS Garmin 60 Csx) (Figura 1). En cada piso altitudinal se seleccionaron al azar 25 individuos adultos de *Pinus patula*, con un diámetro a la altura de

pecho (DAP) mayor a los 15 cm, y 25 individuos de regeneración natural (brinzales con un DAP menor a los 10 cm). Los individuos muestreados estuvieron separados entre ellos por al menos 20 m de distancia. Se seleccionaron hojas sanas, no plagadas, ni enfermos o secos. Las muestras se guardaron en bolsas ziploc para después ser almacenadas a -20°C hasta la extracción del ADN.

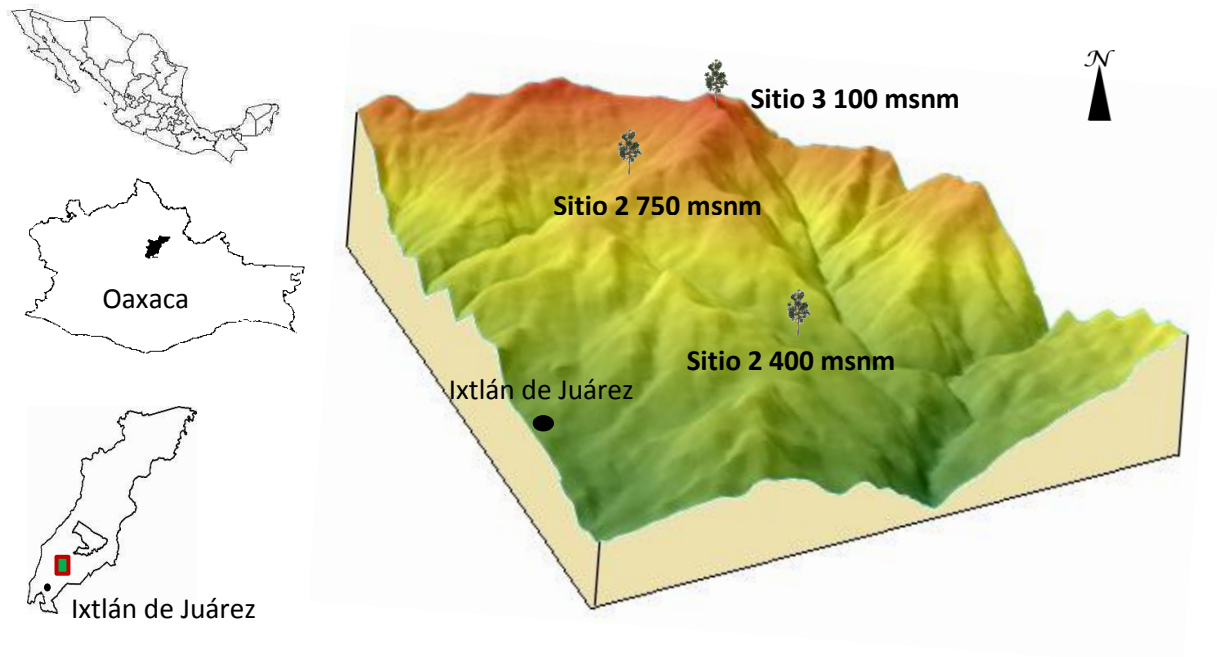


Figura 1. Macro y micro ubicación de las poblaciones muestreadas en Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Análisis Genético

Extracción de ADN y análisis de fragmento tipo microsatélites

El ADN fue extraído con el protocolo FastDNA SPIN kit y el equipo FastPrep® (MP Biomedicals, USA) (Apéndice i). La concentración y pureza del ADN se cuantificó con el Biofotometro Eppendorf, a una absorbancia de $260/280^a$ (Apéndice ii). Se seleccionaron siete oligonucleótidos con base en la literatura (Elsik *et al.*, 2000; Alfonso–Corrado *et al.*, 2014) para obtener fragmentos tipo microsatélites y analizar los locus de las poblaciones. Estos oligonucleótidos son de transferencia, debido a que fueron diseñados para *Pinus*

taeda (Elsik *et al.*, 2000), el cual es cercano filogenéticamente a *P. patula* (subsección *Australes*) (Gernandt *et al.*, 2005). De acuerdo la claridad de resolución y grado de polimorfismo, los loci seleccionados para este estudio fueron: ptTX2037, ptTX2123,

Cuadro 1. Oligonucleótidos probados para la amplificación de fragmentos tipo microsatélites para *Pinus patula*

Locus	No. de acceso a GenBank	Secuencia del Primer (5'-3')	T° (°C) reportada	T° (°C) de alineación final	Rango de tamaño (bp)	Motivos
ptTX2037	AF143959	F) GCCTTTAGATGAATGAACCCA R) TAAGCGGGATATTATAGAGTTT	63	50	197–261	(GTGA) ₈ (GT) ₁₄
ptTX2123	AF143960	F) GAAGAACCCACAAACACAAG R) GGGCAAGAATTCAATGATAA	65	50	244–274	(AGC) ₃ GGC(AGC) ₆
ptTX2142	AF143962	F) TCTCAGCAGCAGCAACAGCGACAGT R) CGACGGAAGCACCCCTACCCATCTC	57	52	244–274	(AGC) ₃ GGC(AGC) ₆
ptTX3017	AF143967	F) GGCCTCTCCAGTTGCTCAT R) AAGATAAAGAAAGTTGGAAGAC	63	50	205–222	(GAT) ₉
ptTX3020	AF143969	F) GTCGGGGAAGTGAAAGTA R) CTAGGTGCAAGAAAAGAGTAT	65	55	194–215	(CAA) ₉
ptTX3025	AF143970	F) CACGCTGTATAATAACAATCTA R) TTCTATATTCGCTTTTAGTTTC	59	45	250–280	(CAA) ₁₀
ptTX3037	AF143975	F) CGTTTGGAGCACTACTTT R) AAGTCACTTAATGCAATATGTA	51	50	101–179	(GA) ₉ ...(CAA) ₁₅

T° (°C) = Temperatura de alineación, bp=pares de bases. Cuadro modificado de Elsik *et al.*, 2000.

ptTX2142, ptTX3017, ptTX3020, ptTX302, y ptTX3037 (Cuadro 1).

Para amplificar los loci se empleó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para ello se usó un volumen de 25 µl (kit MyTaqTM DNA Polymerase Bioline) consistente en: 5 µl de 5MyTaq Buffer, 1 µl del primer Forward marcado con fluorocromo HEX o FAM, 1 µl del primer Reverse, 0.2 µl Taq Polimerasa, 15.8 µl de H₂O estéril, y 2 µl de DNA molde. La amplificación se realizó en un con el equipo GeneAmp® PCR System 2700 Termociclador (Applied Biosystems) se estandarizó las temperaturas de alineación con intervalos de cinco grados con respecto a la temperatura reportada (Elsik *et al.*, 2000). El perfil básico de ciclo del termociclador usado fue: i) 94° C durante tres minutos para la

iniciación, ii) 94° C por 10 segundos para la desnaturalización, iii) temperatura de alineamiento específica para cada par de oligonucleótidos por 10 segundos, iv) 72° C por 10 segundos para la extensión por 34 ciclos, y v) 72° C por cinco minutos para el cierre (Figura 2).

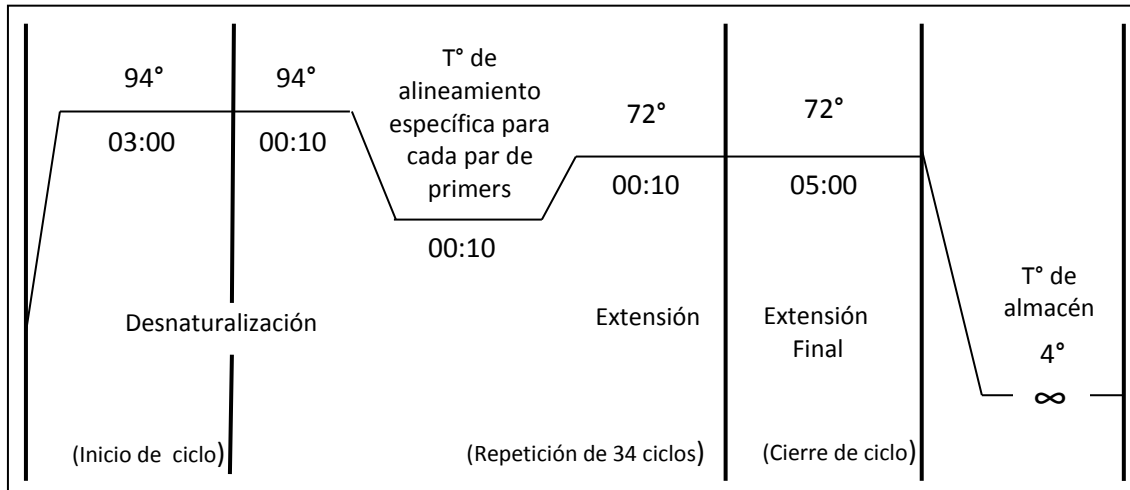


Figura 2. Esquema de las etapas del termociclador y PCR para la replicación del ADN de *Pinus patula*.

Los productos de PCR se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa a 1.4 % en TBE 0.5X, a 110 Volts durante 45 minutos. Posteriormente los geles se tiñeron con GelRed Nucleic Acid (Biotium) a una concentración de 3X durante 30 minutos en un agitador a baja velocidad (100 rpm). Los geles teñidos fueron observados con una lampara de luz ultra violeta (UV) y Las bandas visualizadas en los geles fueron analizadas con el programa ImageJ 1.47 (Rasband, 1997) para la determinación de las diluciones de las muestras (1/10 µl; 1/15 µl; 1/25 µl; 1/50 µl, sin diluir 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl y 5 µl) (figura 3). Posteriormente, cada amplicón se preparó para ser analizado por el equipo Hitachi Modelo 3130xl Genetic Analyzer de Applied Biosystems, de la siguiente manera: 1µl del amplicon,

9 μ l de Hi-Di formamida y 0.3 μ l de ROX500. Las muestras así preparadas se enviaron a analizar al Laboratorio de Bioquímica Molecular, Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Universidad Nacional Autónoma de México FES–Iztacala. Esto con la finalidad de obtener electroferogramas de análisis de fragmento tipo microsatélites.

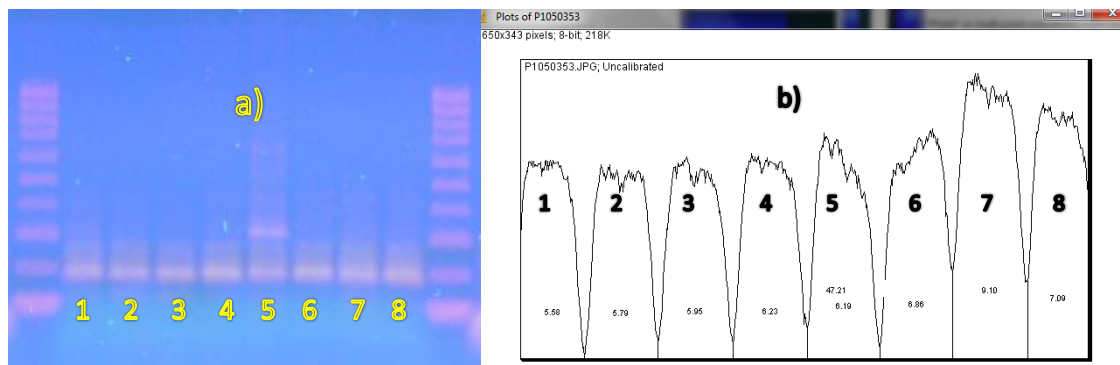


Figura 3. Ejemplo de la determinación de concentraciones e intensidad de las bandas de los amplicones con el programa ImageJ 1.47V. a) ejemplo de amplicones, b) ejemplo de porcentajes para la realización de diluciones.

Los electroferogramas de los siete oligonucleótidos, producto de la electroforesis capilar realizada por el analizador de fragmentos, se examinaron con el programa Peak Scanner, versión 2.0 (Applied Biosystems, 2012). Con el programa se determinó los genotipos de los siete loci para las seis poblaciones. La lectura de los genotipos se llevó a cabo en base a la repetición de los motivos y del tamaño de pares de base reportado en cada locus. Se puso particular énfasis en evitar la genotipificación de picos que resultan del tartamudeo genético que es común en la amplificación de marcadores como los microsatélites. Los genotipos generados para cada locus se adecuaron en una matriz especial para el análisis de cada uno de los programas estadísticos genéticos.

Análisis estadísticos de datos genéticos

Diversidad genética

Se estimaron los parámetros para conocer la diversidad total y promedio de las seis poblaciones por locus: número total de alelos detectados (N_A), número de alelos únicos (N_U), número de alelos efectivos (N_E), la riqueza alélica basada en un tamaño mínimo poblacional de 7 individuos diploides (A_S), la heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O) por cada locus por sitio y el porcentaje de polimorfismo por cada locus. Estos parámetros se calcularon mediante los programas: FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002), Arlequín 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) y GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

Estructura genética entre poblaciones

Para el análisis de la estructura genética se usaron los índices de fijación. El coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ($F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T}$), coeficiente de endogamia de poblaciones ($F_{IS} = 1 - \frac{H_I}{H_S}$) y coeficiente de endogamia total ($F_{IT} = F_{IS} + [(1 - F_{IS}) F_{ST}]$) fueron estimados con el programa FSTAT (Goudet, 2002) y Arlequín (Excoffier y Lischer, 2010), donde: H_I : Heterocigosis observada en una subpoblación. H_S : Heterocigosidad que podría esperarse si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. y H_T : Heterocigosis esperada de la población total (Freeland, 2005).

El número de migrantes por generación (Nm) se estimó con el algoritmo de Wright $[(1 - F_{ST}) / (4 * F_{ST})]$ para los índices de coancestría (F_{ST}) entre pares de las poblaciones. Este modelo contrarresta a los índices de fijación de endogamia entre poblaciones (F_{IS}) y el total (F_{IT}), porque revela si en la población existe un elevado flujo génico, previendo la consanguinidad (Hartl, 2000).

Resultados

ADN extraído

El ADN promedio total obtenido de las acículas fue de buena calidad (Figura 4), con una concentración de 63.85 ng / μ l, y una pureza de 1.56 (Cuadro 1), pues en ambos casos se obtuvieron valores óptimos sugeridos para la amplificación (concentración mínima óptima = 40 ng / μ l; pureza mínima óptima = 1.8) (Querci *et al*, 2007). El sitio que presenta la mayor concentración y pureza, entre adultos y brinzales en conjunto, es el piso bajo de 2 400 m. La concentración más alta de ADN en adultos, se encuentra en el piso medio de 2 750 m, mientras que en los brinzales, la mayor concentración de ADN se observó en el sitio medio. La concentración de ADN tendió a disminuir hacia sitios más elevados. Dentro del mismo piso altitudinal, los adultos mostraron la menor concentración de ADN en comparación con los brinzales del mismo piso.

Cuadro 2. Promedio de concentración y pureza del ADN obtenido en los sitios muestreados.

POBLACIÓN	Concentración de ADN (ng/ μ l)	Pureza de ADN 260/280
Sitio Alto Adultos (3100)	31.98	1.56
Sitio Alto Brinzales (3100)	47.49	1.58
media	39.73	1.57
Sitio Medio Adultos (2750)	59.02	1.53
Sitio Medio Brinzales (2750)	85.82	1.44
media	72.42	1.49
Sitio Bajo Adultos (2400)	74.63	1.65
Sitio Bajo Brinzales (2400)	84.18	1.68
media	79.41	1.66
media Total	63.85	1.56

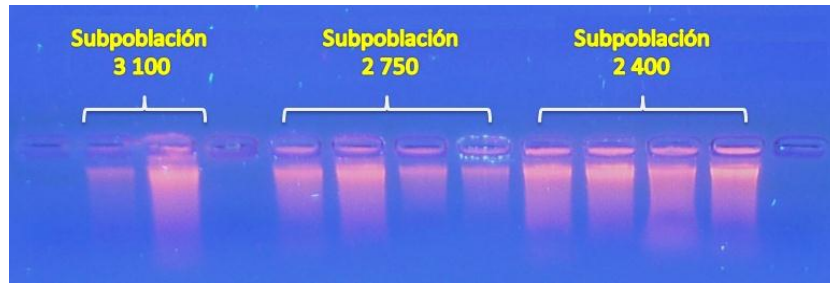


Figura 4. Muestra de ADN corrido en un gel de electroforesis al 1% de agarosa y teñido en gel rojo.

Fragmentos tipo microsatélites

Los siete oligonucleótidos probados amplificaron en *P. patula* y resultaron polimórficos. La determinación de la temperatura de alineación (T_m) de cada uno de los siete cebadores, requirió de un gran número de horas de laboratorio. Las casusas principales fueron: i) los oligonucleótidos usados son de transferencia, diseñados para otra especie (*Pinus taeda*) (Elsik *et al.*, 2000), ii) las condiciones de laboratorio y equipo de laboratorio, fueron diferentes con respecto a las reportadas. En la figura 5, se observa una muestra de amplicones obtenidos.

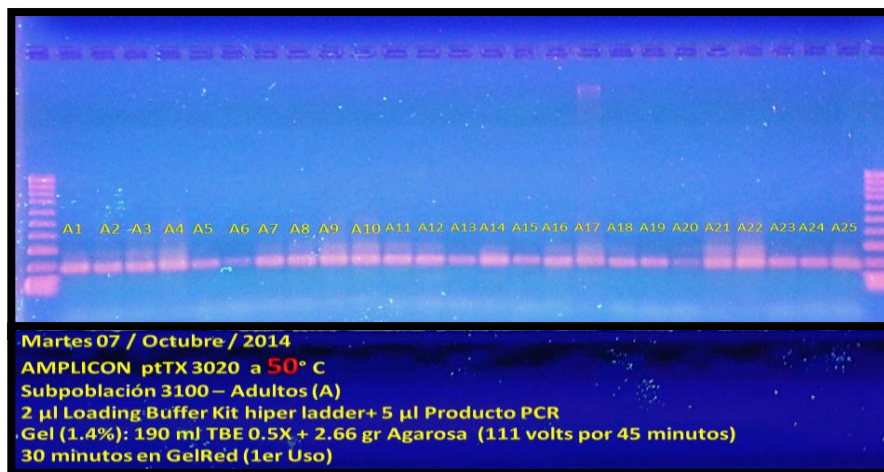


Figura 5. Ejemplo de un producto de una amplificación por PCR. Amplicón del oligonucleótido ptTX3020, visualizado en gel de agarosa al 1.4%.

Los archivos generados, por el equipo de electroforesis capilar y analizador de fragmentos, mostraron una buena resolución del tamaño de los picos en pares de bases (Figura 6). La matriz genotificada mostró buenos resultados para la diversidad y estructura genética.

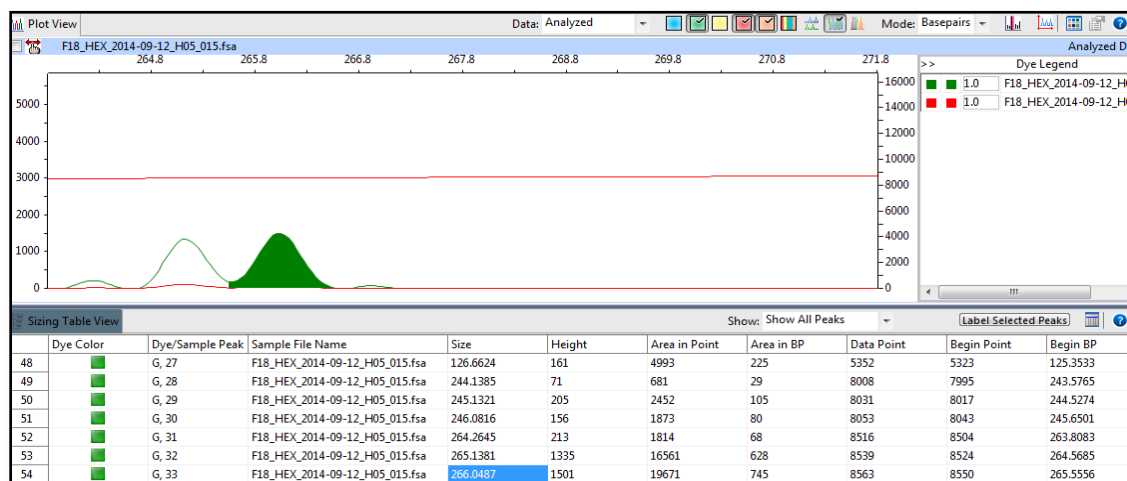


Figura 6. Ejemplo de un electroferograma (fragmento tipo microsatélite nuclear) visualizado con el Software Peak Scanner Versión 2.0.

Diversidad genética

Los siete loci de microsatélites utilizados presentaron un total de 63 alelos en los 152 individuos de *Pinus patula* examinados. Estos loci permitieron diferenciar 298 genotipos multilocus. El locus ptTX3037 presentó el mayor número de alelos ($N_A = 16.83$), mientras el locus ptTX3017 presentó el menor valor ($N_A = 2.83$) (Cuadro 3). Cinco de las seis poblaciones analizadas presentaron 100 % de polimorfismo en todos sus loci, solo la población de adultos del piso altitudinal 3 100 m s.n.m. presentó 85.71% de polimorfismo (cuadro 4).

Cuadro 3. Diversidad genética obtenida de siete microsatélites polimórficos en seis poblaciones de *Pinus patula* en un gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Donde, N_A : Número de alelos por locus; H_T : heterocigosis esperada total por locus, F_{IS} : coeficiente de endogamia intra-poblacional; F_{IT} : coeficiente de endogamia poblacional total; F_{ST} coeficiente de similitud.

Locus	N_A	H_T	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
ptTX2037	6.33	0.798	0.148	0.294	0.171
ptTX2142	3.5	0.472	0.297	0.563	0.378
ptTX3020	4.5	0.703	0.019	0.281	0.267
ptTX3025	4.33	0.67	-0.125	-0.03	0.085
ptTX3017	2.83	0.549	0.679	0.795	0.363
ptTX3037	16.83	0.938	-0.012	0.037	0.048
ptTX2123	3.66	0.561	-0.622	-0.594	0.017

Cuadro 4. Porcentaje de polimorfismo obtenido de siete loci para seis poblaciones de *P. patula* en un gradiente altitudinal.

Población	Altitud (m s.n.m.)	%P
Adultos1	3100	85.71%
Adultos2	2750	100%
Adultos3	2400	100%
Brinzales1	3100	100%
Brinzales2	2750	100%
Brinzales3	2400	100%

En el sitio medio del gradiente, tanto los adultos como los brinzales, presentaron los valores más altos de número de alelos, número de alelos únicos, número efectivo de alelos y diversidad alélica. En cambio, en el sitio bajo, se observaron los valores más bajos para los parámetros anteriores, tanto en adultos como en brinzales (Cuadro 5).

Cuadro 5. Diversidad genética de seis poblaciones de *P. patula* en un gradiente altitudinal. A_U : Alelos únicos en la población; N_E : Número efectivo de alelos en la población; A_S : Diversidad alélica por población; H_O : heterocigotos observado; H_E : heterocigotos esperados; F_{IS} : coeficiente de endogamia intra-poblacional; σ Desviación estándar.

Población	A_U	N_E	σ	A_S	H_O	σ	H_E	σ	F_{IS}	σ
Adultos 3100	4	3.67	1.59	3.894	0.49	0.14	0.53	0.1	0.07	0.21
Brinzales 3100	1	4.27	1.69	4.352	0.52	0.12	0.59	0.09	0.14	0.15
Media	2.5	3.97		4.12	0.51		0.56		0.1	
Adultos 2750	5	4.26	1.75	4.709	0.67	0.14	0.61	0.07	-0.05	0.21
Brinzales 2750	5	4.02	1.39	4.727	0.6	0.12	0.62	0.07	0.05	0.17
Media	5	4.14		4.72	0.63		0.61		0	
Adultos 2400	1	2.49	0.72	3.387	0.48	0.14	0.46	0.09	0.07	0.19
Brinzales 2400	0	2.52	0.51	3.666	0.57	0.12	0.52	0.08	-0.09	0.16
Media	0.5	2.5		3.53	0.52		0.49		-0.01	
Media Total	2.67	3.54	1.28	4.12	0.55	0.13	0.55	0.09	0.03	0.18

Estructura poblacional

La existencia de valores atípicos en ptTX2037 y ptTX2123, particularmente en F_{IS} , sugiere que las fuerzas evolutivas estén posiblemente afectando a estos genes quizás por su cercanía con algún locus afectado por selección y, particularmente, por depresión por endogamia (valores negativos de F_{IS}). Esto queda sustentado por los valores elevados y negativos de F_{IS} lo que sugiere exceso de heterocigotos. Esto es totalmente opuesto a lo observado en los otros cinco marcadores microsatelitales. Con base en lo precedente, se decidió analizar por separado estos dos loci atípicos (Bossart y Prowell, 1998). También se determinaron los índices de fijación para los loci para todas las poblaciones.

Cuadro 6. Índices de fijación para los siete loci para toda la población de *P. patula* en el gradiente altitudinal, Ixtlán de Juárez.

Locus	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
ptTX2142	0.311	0.181	0.158
ptTX3020	0.608	0.418	0.326
ptTX3025	0.306	0.286	0.028
ptTX2037	0.002	0.088	-0.094
ptTX3017	0.826	0.444	0.686
ptTX3037	0.046	0.033	0.013
ptTX2123	-0.587	0.013	-0.607

Nota: F_{IT} : índice de endogamia para toda la población, F_{ST} : índice coancestría, F_{IS} : índice de endogamia

En la matriz de cinco loci (ptTX2142, ptTX3020, ptTX3025, ptTX3017 y ptTX3037) (Cuadro 7), para el coeficiente de similitud (F_{ST}), se observó en las poblaciones de cada piso altitudinal del gradiente, una similitud genética entre los individuos brinzales con respecto de los individuos adultos del mismo piso. A su vez Los individuos adultos del piso superior presentaron una mayor similitud con los brinzales del piso inferior. Valores de F_{ST}

cercanos a cero denotan similitud, a medida que se incrementa los valores, existe una mayor disimilitud genética entre las poblaciones (Allendorf *et al.*, 2013).

Se estimaron valores de índice de endogamia intra-poblacional (F_{IS}) de adultos y brinzales por población para estimar en que piso altitudinal existe la mayor endogamia (Cuadro 7). Con estos valores también se comparó la endogamia presente entre adultos y brinzales dentro y entre poblaciones. La menor endogamia intra-poblacional se encontró en el piso intermedio; mientras que en el piso superior se observó una mayor endogamia, y aquí, los brinzales presentaron un valor más alto de F_{IS} en comparación con los adultos.

Cuadro 7. Índice de fijación endogámica por población (F_{IS}) para cinco loci.

Locus	Adultos 3100	Brinzales 3100	Adultos 2750	Brinzales 2750	Adultos 2400	Brinzales 2400
2142	0.497	0.493	-0.22	-0.014	0.362	0.085
3020	no determinable	0.476	-0.18	-0.114	1	0.656
3025	-0.433	0.388	0.307	0.315	-0.1	-0.259
3017	1	0.478	1	0.761	-0.056	-0.037
3037	0.085	0.072	-0.044	-0.071	0.06	-0.021
Media por población	0.298	0.341	0.09	0.126	0.179	0.1
Media por piso altitudinal	0.3195		0.108		0.1395	

Con respecto a los valores de coancestría entre los adultos y brinzales de las tres poblaciones calculados a partir de los cinco microsatélites neutros (cuadro 8 y 8.1) se puede observar de manera general que: (1) hay mayor similitud genética entre brinzales que entre adultos. (2) Los adultos y brinzales del mismo piso altitudinal son los pares que muestran

más similitud genética. (3) El grupo que sigue en similitud genética es el de los brinzales de pisos inferiores con adultos de pisos más elevados. (3) Los pares más disimilares fueron aquéllos entre adultos de pisos más bajos con brinzales de pisos más elevados.

Cuadro 8. Matriz de coeficiente de coancestría (F_{ST}) por pares para 5 loci (ptTX: 2037, 2142, 3020, 3025, y 3017) en las seis poblaciones de *Pinus patula* en el gradiente altitudinal, Ixtlán de Juárez.

Población	Adultos 3100	Adultos 2750	Adultos 2400	Brinzales 3100	Brinzales 2750	Brinzales 2400
Adultos 3100	0.00	0.16	0.36	0.03	0.11	0.22
Adultos 2750	0.16	0.00	0.42	0.16	0.02	0.33
Adultos 2400	0.36	0.42	0.00	0.27	0.39	0.14
Brinzales 3100	0.03	0.16	0.27	0.00	0.11	0.10
Brinzales 2750	0.11	0.02	0.39	0.11	0.00	0.29
Brinzales 2400	0.22	0.33	0.14	0.10	0.29	0.00

Cuadro 8.1. Cuadro de comparación y sumatoria de valores de F_{ST} por pares de adultos y brinzales en los tres pisos del gradiente para cinco loci.

ΣF_{ST} por pares: adultos (3100 y 2750) y brinzales (2750 y 2400)	0.66
ΣF_{ST} por pares: adultos y brinzales de cada piso	0.20
ΣF_{ST} por pares: adultos (2750 y 2400) y brinzales (3100 y 2750)	0.83

Cuadro 9. Matriz de coeficiente de coancestría (F_{ST}) para 2 loci en las seis poblaciones de *Pinus patula* en el gradiente altitudinal, Ixtlán de Juárez.

	Adultos 3100	Adultos 2750	Adultos 2400	Brinzales 3100	Brinzales 2750	Brinzales 2400
Adultos 3100	0.00	0.05	0.08	0.00	0.02	0.02
Adultos 2750	0.05	0.00	0.17	0.02	-0.01	0.09
Adultos 2400	0.08	0.17	0.00	0.09	0.11	0.01
Brinzales 3100	0.00	0.02	0.09	0.00	0.00	0.03
Brinzales 2750	0.02	-0.01	0.11	0.00	0.00	0.05
Brinzales 2400	0.02	0.09	0.01	0.03	0.05	0.00

Cuadro 9.1. Cuadro de comparación y sumatoria de valores de F_{ST} por pares de adultos y brinzales en los tres pisos del gradiente para dos loci.

ΣF_{ST} por pares: adultos (3100 y 2750) y brinzales (2750 y 2400)	0.13
ΣF_{ST} por pares: adultos y brinzales de cada piso	0.0
ΣF_{ST} por pares: adultos (2750 y 2400) y brinzales (3100 y 2750)	0.22

Los índices de fijación para la población total (adultos y brinzales) en todo el gradiente altitudinal y calculados a partir de los cinco microsatélites neutros, se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Índices de fijación para toda la población total (adultos y brinzales) con base en los cinco microsatélites neutros a la selección. Donde, *FIT*: índice de endogamia para toda la población, *FST*: índice coancestría, *FIS*: índice de endogamia, σ : desviación estándar. P:

	<i>FIT</i>	<i>FST</i>	<i>FIS</i>	Valor de P
Media total de la población	0.356*	0.234*	0.15*	$P > 0.005$
σ	0.137	0.082	0.1	

Con respecto al flujo génico (*Nm*), se calcularon los valores con base en los índices de coancestría (*FST*) por pares para cada población (adultos y brinzales) (Cuadro 11). En estos datos se puede apreciar que el mayor valor de flujo génico se presentó entre adultos y brinzales del piso 2750, seguido del piso 3100 de la misma comparación.

Cuadro 11. Flujo génico de seis poblaciones de *P. patula* para cinco loci basado en *F_{ST}* por pares. Donde, *F_{ST}*= Índice de fijación de coancestría, y *Nm*= Número efectivo de migrantes

		Brinzales	<i>Nm</i>
Adultos	3 100	3 100	8.08
		2 750	2.02
		2 400	0.89
	2 750	3 100	1.31
		2 750	12.25
		2 400	0.51
	2 400	3 100	0.68
		2 750	0.39
		2 400	1.54

En el dendrograma de las distancias génicas se puede observar una relación cercana entre los individuos adultos y brinzales de los pisos 2 750 y 3 100 m. mientras que la población de 2 400 m fue la más alejada. (Figura 7). No obstante, al visualizar solo brinzales se observó que los individuos juveniles de los pisos 3 100 m y 2 400 m están relacionados genéticamente. Mientras que en los adultos las distancias génicas son mayores (Figura 8).

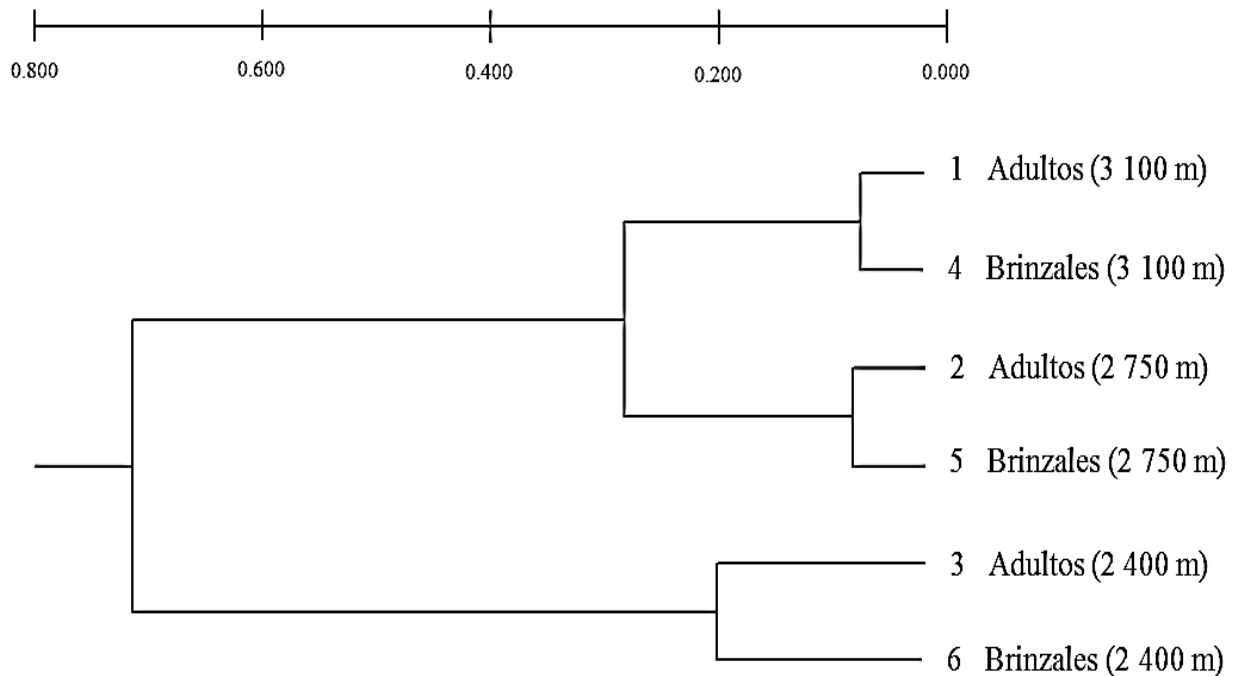


Figura 7. Dendrograma de distancias génicas para las seis poblaciones en el gradiente altitudinal de *Pinus patula* en Ixtlán de Juárez.

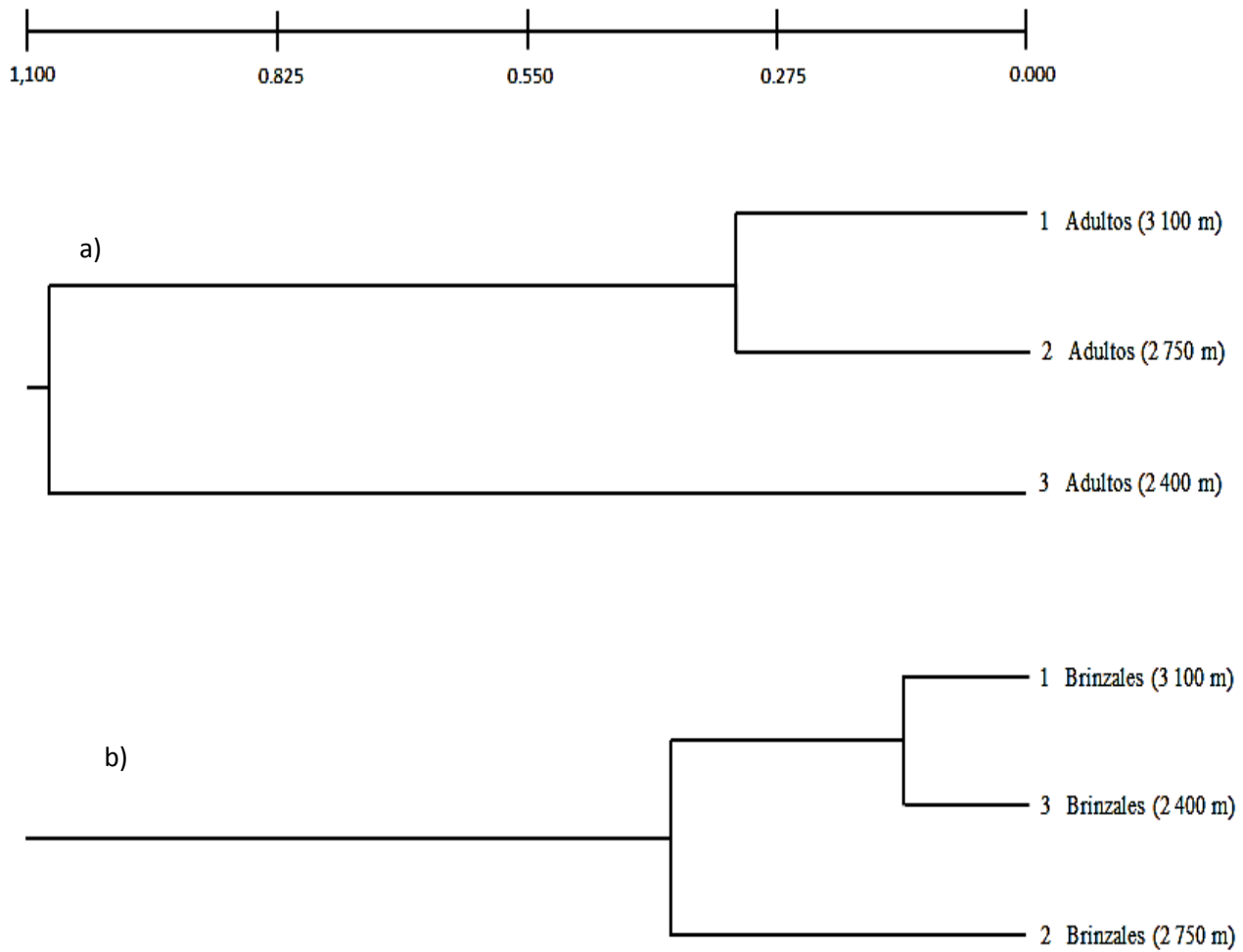


Figura 8. Dendrograma de distancias genéticas para las tres poblaciones de *Pinus patula* para a) adultos y b) brinzales en el gradiente altitudinal en Ixtlán de Juárez.

Discusión

Concentración de ADN entre poblaciones del gradiente altitudinal

La concentración de ADN de los individuos de *Pinus patula*, disminuyó al aumentar la altitud. Este patrón puede deberse a que en los sitios más altos del gradiente haya una mayor disposición de agua (Mondragón-Chaparro *et al.*, 2006; Zacarias-Eslava y Del Castillo, 2010), lo que puede influir en el metabolismo y tamaño de las células y por lo tanto en la concentración de ADN. En otras palabras, cuando existe mayor humedad relativa en el ambiente, las células pueden aumentar más el tamaño de su citoplasma con respecto núcleo. Esto implica concentraciones bajas de ADN por una unidad de tejido. Por el contrario, a menor humedad relativa en el ambiente, mayores concentraciones de ADN se detectarán por unidad de tejido, porque habrá menos citoplasma y menor tamaño de vacuolas en la células, mientras que el contenido de ADN es generalmente invariable en la células (Lehninger, 2004). Al comparar a los individuos juveniles con respecto a los adultos en los tres pisos altitudinales, se observa que los brinzales poseen concentraciones de ADN más altas que los adultos (Cuadro 2). Esto puede explicarse porque existe una mayor división celular en los brinzales, mientras que en los adultos, la tasa de reproducción celular es menor y el crecimiento se hace más por expansión de las células a través de sus vacuolas principalmente que almacenan agua en su interior, que por división celular (Benech-Arnold y Sánchez, 2004).

Microsatélites nucleares neutros a la selección

En el presente estudio, los microsatélites examinados fueron altamente polimórficos al presentar un gran número de alelos detectados por locus. En el locus ptTX3037 se detectó

la mayor diversidad genética. Esto con respecto a otros trabajos reportados con condiciones similares (apéndice iii). El alto polimorfismo puede deberse a la estructura de los motivos (Cuadro 1), motivos perfectos (trinucleotidos) e imperfectos (motivos di y tetranucleotidos), lo que proporciona una alta variación a los marcadores (Vázquez y Morales, 2014). No obstante, dos de los siete loci resultaron ser probablemente afectados por la selección indirectamente, quizás, por su proximidad física con genes afectados por selección (ptTX2037 y ptTX2123) que pudieran causar ligamiento factorial con esos loci. Combinar datos de locus discrepantes causa errores de estimación y puede revelar que los supuestos básicos de neutralidad o equilibrio genético (locus afectados por selección) hayan sido violados (Bossart y Prowell, 1998). Una posible explicación del ligamiento es que las condiciones ambientales altamente heterogéneas impuestas por gradientes altitudinales pueden afectar a los sitios neutrales estrechamente vinculados al sitio en la selección (Zhang et al., 2006). Es decir, las fuerzas evolutivas están posiblemente afectando a genes cercanos con algún locus afectado por selección y, particularmente, por depresión por endogamia. Esto queda sustentado por los valores elevados y negativos de F_{IS} (Cuadro 6), lo que sugiere exceso de heterocigotos, resultado de una posible depresión endogámica.

Estructura, diversidad y flujo genético dentro y entre poblaciones en el gradiente altitudinal

En los tres pisos del gradiente las poblaciones exhibieron una alta diversidad genética dentro de las poblaciones y una moderada diferenciación entre las poblaciones. Este patrón se ha observado en la mayoría de las especies arbóreas y se presume que se debe a su sistema anemócoro de dispersión de polen y semilla (Zhang et al., 2006; Truon et al., 2007; Salehi et al., 2011). La mayor diversidad, entre los tres pisos altitudinales, se observó en el

sitio medio (2 750 m). Este mismo patrón de mayor diversidad en los sitios intermedios se ha reportado en otros estudios en gradientes altitudinales (Jump *et al.*, 2003; Sáenz-Romero–Tapia–Olivares, 2003; Ohsawa *et al.*, 2007). Una de las causas de este patrón puede deberse a que las poblaciones periféricas estén más restringidas y se ubiquen en condiciones en las que la selección sea más intensa (Lammi *et al.*, 1999). No obstante, la población del piso superior (3 100 m) presentó valores de diversidad genética cercanos al piso intermedio, lo que puede indicar 1) que la población recibe genes de los pisos inferiores del gradiente y 2) que existen las condiciones para que los individuos se desarrollen favorablemente, producto de un posible desplazamiento de las condiciones ambientales (Saéñz–Romero *et al.*, 2011a y 2011b). Con respecto a el piso inferior (2 400 m), se observó que posee la menor diversidad, el menor número de alelos únicos y menor número efectivo de alelos en la población. Esto pudiera ser causado i) por encontrarse en un área más restringida y por tanto tener una menor tasa de migración de los otros sitios. ii) Que el tamaño efectivo de la población sea pequeño y por tanto fuerzas evolutivas como la deriva estén eliminando a los alelos únicos, los cuales pueden favorecer a la población ante fenómenos perniciosos como el cambio climático (Lamy *et al.*, 1999; Wahid *et al.*, 2004). El índice de similitud entre las poblaciones fue significativo y mostró una diferenciación genética a lo largo del gradiente ($F_{ST} = 0.234$). No obstante, Lammi y colaboradores (1999) encontraron que una alta diferenciación genética entre las poblaciones ($F_{ST} = 0.430$) refleja una limitación del flujo génico entre las poblaciones y que por tanto al menos una de las poblaciones esté más aislada de las otras. En el presente estudio no se detectó ninguna población aislada de las demás, lo que se comprueba con un flujo génico no restringido entre las poblaciones y entre los estadios de la población. Con respecto al grado de similitud genética (F_{ST}) por pares entre los adultos y brinzales de diferentes pisos

altitudinales, se observó una mayor cercanía genética entre los adultos de altitudes superiores y los brinzales de altitudes inferiores. Esto podría deberse al sistema de dispersión de las semillas del pino. A pesar de que las semillas de pino presentan alas para facilitar la dispersión por viento, la fuerza de gravedad puede influir también en su dispersión. (Velázquez *et al.*, 2004; Rzedowski, 2006). Las alas sólo contribuyen a reducir la velocidad de caída. De esta manera, es probable que las semillas de los pisos superiores hayan llegado a los pisos inferiores y aporten genes a la población al mostrarse una similitud en los brinzales de las poblaciones periféricas.

Por otro lado, se notó un mayor distanciamiento genético entre los adultos de los pisos altitudinales inferiores y los brinzales de los pisos altitudinales superiores. Estos datos parecen indicar que existe una limitada migración de semillas de las partes inferiores hacia las partes altas, tal vez por tener la gravedad en contra. Además, los vientos son más fuertes en las áreas superiores en comparación con las áreas inferiores. Por otro lado, los brinzales del piso superior e inferior tienen una mayor similitud genética que entre los individuos adultos. Estos resultados pueden sugerir que el flujo génico está homogenizando a las poblaciones a lo largo del gradiente, principalmente por la donación de genes de los pisos superiores al piso inferior. Aunado a lo anterior se encontró en la población superior mayores valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}), producto de un limitado flujo génico y una posible deriva génica, por lo que los individuos del piso superior (3 100 m) posiblemente se estén entre cruzando, lo cual incrementa la homocigocidad. Los resultados parecen indicar que en el futuro, ocurrirá una homogenización genética entre las poblaciones. Sin embargo, dado que existen proyecciones de cambio climático y que al parecer las condiciones actuales se desplazarán hacia los pisos más altos (Zonneveld *et al.*,

2009; Zacarías–Eslava y Del Castillo, 2010), y junto con las fuerza evolutivas se depuraran a los individuos con los genes menos propicios para esas nuevas condiciones, como sería el caso de la población inferior (2 400), lo cual repercutiría en el futuro de la población natural de *P. patula*.

Se estimó que la fuente principal de semillas y genes provienen de los árboles adultos de los mismos pisos altitudinales. Este patrón se ha reportado en otros estudios similares (Chung *et al.*, 2003; Truong *et al.*, 2007) y esto se puede deber a 1) que la mayor la probabilidad de que las semillas de los arboles padre caiga en el sitio de procedencia sea por efecto de la gravedad, y 2) a una limitada entrada de semillas foráneas por la densidad de las copas del dosel. Aunado a la dispersión de genes del mismo sitio, también se obtuvo evidencia de una comunicación genética entre las demás poblaciones. Esto es benéfico para las poblaciones porque se incrementa la diversidad genética (Sáenz–romero *et al.*, 2006). Sin embargo, el flujo genético puede llevar genes a condiciones donde estos genes estén poco adaptados y contribuir a disminuir la adecuación de la población. Por tanto, con el paso de las generaciones puede incrementarse la endogamia en la poblaciones, ya que la deriva génica junto con la selección en condiciones desfavorables actúan sobre los individuos (Robinson, 2003). Dado que el índice de endogamia (F_{IS}) fue más alto en las poblaciones periféricas, principalmente en el piso superior, tanto en adultos como en brinzales, pudiera indicar que los individuos esten emparentados, producto de un posible efecto fundador (Allendorf, 2013). Al existir endogamia y junto con la deriva génica y la selección, puede ocurrir una depresión endogámica (reducción de la aptitud) (Cheptou y Donohue, 2010). No obstante, con el paso de las generaciones y el flujo preponderante de

los pisos superiores hacia los bajos y del piso intermedio hacia el alto, las poblaciones periféricas se homogeneizarán.

Finalmente, de manera recapitulada, los resultados muestran la existencia de una estructura genética en los tres pisos del gradiente altitudinal, en donde los individuos adultos aportan la mayor cantidad de semillas en el mismo piso. A su vez, la población del piso intermedio 2 750 m, es la que alberga la mayor diversidad alélica la cual contribuye débilmente a las poblaciones periféricas del gradiente. Sin embargo, la población del piso superior 3 100 m refleja la mayor endogamia producto de un limitado flujo génico por parte de los pisos inferiores. Aunado a ello este piso aporta el mayor flujo génico hacia los pisos inferiores, sobre todo al piso 2400 m.

Los resultados de este trabajo evidencian que la elevación tiene un efecto en la concentración tisular de ADN en *P. patula* al disminuir en sitios de mayor elevación. Aunado a estos cambios, se detectó una diferenciación genética entre las poblaciones de *P. patula* entre diferentes pisos altitudinales, posiblemente debido al efecto de selección local y a un flujo genético restringido. Sin embargo, también existe evidencia de flujo genético entre pisos altitudinales distintos particularmente de los pisos más altos hacia los más bajos. Esto pudiera tener un efecto contra-adaptativo ante situaciones ambientales cambiantes como lo es el cambio climático que proyecta un desplazamiento de las situaciones climáticas actuales a sitios de mayor elevación. Bajo estas condiciones se recomienda explorar los costos y beneficios de una migración asistida o programas de mejoramiento genético.

Conclusiones

- Siete cebadores de transferencia de *Pinus taeda* (ptTX2037, ptTX2123, ptTX2142, ptTX3017, ptTX3020, ptTX302, y ptTX3037) amplificaron exitosamente ADN de *Pinus patula*.
- Se reveló diferencias citológicas al decrecer la concentración de ADN entre los individuos (adultos y brinzales) a medida que se elevó el gradiente altitudinal.
- Se observó un posible ligamiento en dos loci (ptTX2037 y ptTX2123) a algún locus afectado por selección debido a un exceso de heterocigotos, resultado de una posible depresión endogámica.
- El principal aporte de semillas en cada piso altitudinal, proviene de los adultos de esa altitud.
- La mayor diversidad genética se encontró en las poblaciones que crecen en la altitud media, a los 2 750 m.
- Se encontró un flujo génico preponderante de las poblaciones más altas hacia las poblaciones de pino más bajas.

Literatura citada

- Alfonso-Corrado C, Campos-Contreras J, Sánchez-García G, Monsalvo-Reyes A, 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.
- Applied Biosystems (2012). Peak Scanner versión 2.0, analizador de fragmentos. Eclipse Project. Francia.
- Boehmer FJ (2011). Vulnerability of tropical montane rain forest ecosystems due to climate change. En: Brauch HG, Spring O, Grin U, Mesjasz J, Kameri-Mbote C, Nehera P, Chourou NC, Krummenacher BH (eds.), *Coping with Global Environmental Change, Disasters and Security*, pp. 789–802. Springer, Heidelberg, Alemania.
- Bossart JL, Prowell DP (1998). Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lesson and new directions. *Trends ecology an evolution*, 13;202–205.
- Byars GS, Parsons Y, Hoffmann AA (2009). Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. *Annals of Botany*, 103: 885–899.
- Castellanos-Bolaños JF, Treviño-Garza EJ, Aguirre-Calderón OA, Jiménez-Pérez J, Velázquez-Martínez A (2010). Diversidad arbórea y estructura espacial de bosques de pino-encino en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana en Ciencias Forestales*, 1(2): 39–52.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual reviews ecology*, 18:237–268.
- Charlesworth D, Willis JH (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature reviews Genetics*, 10: 783–796.
- Dalling JW (2002). Ecología de semillas. En: *Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales* (Guariguata MR, Kattan GH, editores). Libro Universitario Regional, Cartago, Costa Rica, 345-375pp.
- Dame JF, Scholes MC, Straker CJ (1998). Litter production and accumulation in *Pinus patula* plantations of the Mpumalanga Province, South Africa. *Plant and Soil*, 203: 183–190.
- Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (2007). *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT. 593p.
- Elsik CG, Minihan VT, Hall SE, Scarpa AM, Williams CG (2000). Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*, 43: 550–555.
- Excoffier, L. y H. Lischer. 2010. Software Arlequín 3.5.1.2 - An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Institute of Ecology and Evolution & Swiss Institute of Bioinformatics. University of Berne. Switzerland.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. *Situación de los bosques del mundo*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- García-Fernández A, Iriondo MJ, Escudero A (2012). Inbreeding at the edge: does inbreeding depression increase under more stressful conditions?. *Nordic Society Oikos*, 001–011.
- Gernandt DS, López GG, García SO, Liston A (2005). Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, 54 (1): 29–42.
- Gómez-Mendoza L, Arriaga L (2007). Modeling the Effect of Climate Change on the Distribution of Oak and Pine Species of Mexico. *Conservation Biology*, 21 (6): 1545–1555.
- Gómez-Mendoza L, Galicia L, Aguilar-Santelises A (2008). Sensibilidad de grupos funcionales al cambio climático en la Sierra Norte de Oaxaca, México. *Investigaciones Geográficas*, 67: 76–100.

- González M SC, Miguel I, Allué-Andrade M, Miranda AR, Sánchez GL (2003). Estructura poblacional y flujo genético en un regenerado natural de *Pinus pinaster* ait. (coca, segovia). *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 15: 123–128.
- González-Martínez SC, Burczyk J, Nathan R, Nanos N, Gil L, Alía R (2006). Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *Molecular Ecology*, 15: 4577–4588.
- Goudet J (2002). Software FSTAT (versión 2.9.3.2), programa para la estimación y pruebas de diversidad genética e índices de fijación. Institute of Ecology and Biology (UNIL). Lausanne, Switzerland.
- Inouye DW (2008). Effects of climate change on phenology, frost damage, and floral abundance of montane wildflowers. *Ecology*, 89(2): 353–362.
- Jones fA, Hubbell SP (2006). Demographic spatial genetic structure of the Neotropical tree, *Jacaranda copaia*. *Molecular Ecology*, 15: 3205–3217.
- Jump As, Woodward FI, Burke T (2003). *Cirsium* species show disparity in patterns of genetic variation at their range–edge, despite similar patterns of reproduction and isolation. *New Phytologist*, 160: 359–370.
- Jump SA, Peñuelas J (2005). Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters*, 8: 1010–1020.
- Martínez J, Fernández A, Patricia P (2004). *Cambio Climático: Una Visión desde México*. 1ª Ed. Instituto de Ecología. SEMARNAT.
- Matías L, Jump AS (2014). Impacts of predicted climate change on recruitment at the geographical limits of Scots pine. *Journal of Experimental Botany*, 65(1): 299–310.
- Montesinos-Navarro A, Wig J, Pico FJ, Tonsor SJ (2011). *Arabidopsis thaliana* populations show clinal variation in a climatic gradient associated with altitude. *New Phytologist*, 189: 282–294.
- Odland A, Birks HJB (1999). The altitudinal gradient of vascular plant richness in Aurland, western Norway. *Ecography*, 22: 548–566.
- Ohsawa T, Tsuda Y, Saito Y, Sawada H, Ide Y (2007). Altitudinal genetic diversity and differentiation of *Quercus crispula* in the Chichibu mountains, central Japan. *International Journal of Plant Sciences*, 168(3):333–340.
- Ohsawa T, Ide Y (2008). Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecoogyl Biogeografic*, . 17: 152–163.
- Perry, J. P. Jr. (1991). *The pines of México and Central America*. Timber Press. Portland, Oregon, USA.
- Peakall, R. y P. Smouse. 2012. Software GenAIEx 6.5 (Genetic analysis in Excel- Population Genetic Analysis). Australia National University (ANU). *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Premoli AC (2003). Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity*, 94: 218–226.
- Querci M, Jermini M, Eede VG (2007). *Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos*. Manual del participante. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.
- Robledo-Arnuncio JJ, González Martínez SC (2009). Marcadores moleculares y ecología del movimiento. *Ecosistemas*, 18 (1): 44–51.
- Rasband W (1997). Software ImageJ 1.47v. National institute of Health USA.
- Rehfeldt GE (1989). Ecological adaptations in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*): a synthesis. *Forest ecology and management*, 28: 203–215.

- Rehfeldt GE (1991): A model of genetic variation for *Pinus ponderosa* in the Inland Northwest (USA): applications in gene resource management. *Canadian Journal of Forest Research*, 21: 1491–1500.
- Rentaria A M (2007) Breve revisión de los marcadores moleculares. En: *Ecología Molecular. Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (eds.). Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, México, DF*, 541-566.
- Robinson R (2003). *GENETICS* (3rd edit.). Thomson Gale Press. Canada.
- Rimieri P (2013). La estructura genética de poblaciones de plantas condiciona la interpretación de parámetros y su alcance en caracteres ecofisiológicos. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 24(2): 5–10.
- Ruiz T, LF (2010). Variación genética altitudinal entre procedencias de *Pinus patula* Schldl. & Cham., en ensayos de vivero y campo en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y forestales. México.
- Sáenz–Romero C, Guzmán–Reyna RR, Rehfeldt EG (2006). Altitudinal genetic variation among *Pinus oocarpa* populations in Michoacán, México. Implications for seed zoning, conservation, tree breeding and global warming. *Forest ecology and management*, 229: 340–350.
- Sáenz–Romero C, Tapia–Olivares BL (2007). Genetic variation in frost damage and feed zone delineation within an altitudinal transect of *Pinus devoniana* (*P. michoacana*) in Mexico. *Silvae Genetica*, 57(3): 165–170.
- Sáenz–Romero C, Rehfeldt EG, Crookston LN, Duval P, Beaulieu J (2009). Estimaciones de cambio climático para Michoacán. Implicaciones para el sector agropecuario y forestal y para la conservación de la Mariposa Monarca. Cuadernos de Divulgación Científica y Tecnológica del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Michoacán.
- Sáenz–Romero C, Rehfeldt EG, Crookston NL, Duval P, St–Amant R, Beaulieu J, Richardson BA (2010). Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Mexico and their use in understanding climate-change impacts on the vegetation. *Climatic Change*, 102: 595–623.
- Sáenz–Romero C, Beaulieu J, Rehfeldt GE (2011a). Variación genética altitudinal entre poblaciones de *Pinus patula* de Oaxaca, México, en cámaras de crecimiento simulando temperaturas de calentamiento global. *Agrociencia*, 45: 399–411.
- Sáenz–Romero C, Ruiz–Talonía LF, Beaulieu J, Sánchez–Vargas NM, Rehfeldt GE (2011b). Genetic variation among *Pinus patula* populations along an altitudinal gradient. Two environment nursery tests. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34 (1): 19–25.
- Sáenz–Romero C, Rehfeldt GE, Duval P, Lindig–Cisneros RA (2012). *Abies religiosa* habitat prediction in climatic change scenarios and implications for monarch butterfly conservation in Mexico. *Forest Ecology and Management*, 275: 98–106.
- Sánchez–González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques*, 14(1): 107–120.
- Savolainen O, Pyhäjärvi T, Knürr T (2007). Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38:595–619.
- Smart Wood Program (2001). Resumen Público de Certificación de Comunidad Ixtlán de Juárez. CERTIFICADO: SW-FM/COC-147. Consejo Civil Mexicano para la Silvicultura Sostenible.

- Taira H, Tsumura Y, Tomaru N, Ohba K (1997). Regeneration system and genetic diversity of *Cryptomeria japonica* growing at different altitudes. *Canadian Journal of Forest Research*, 27: 447–452.
- TIASA–Técnica Informática Aplicada S.A. (2003). Programa de Manejo Forestal para la comunidad de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. México.
- Truong C, Palmé AE, Felber F (2007). Recent invasion of the mountain birch *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* above the treeline due to climate change: genetic and ecological study in northern Sweden. *European society for evolutionary biology*, 20: 369–380.
- Van–Zonneveld M, Jarvis A, Dvorak W, Lema G, Leibing C (2009). Climate change impact predictions on *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* populations in Mexico and Central America. *Forest Ecology and Management*, 257: 1566–1576.
- Vázquez LAY, Morales GAE (2014). Microsatélites. En: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Cornejo RA, Serrato DA, Rendon AB, Rocha M MG (editores). pp75–100. SEMARNAT. México.
- Wahid1 N, González–Martínez SC, Hadrami IE, Boull A (2003). Genetic Structure and Variability of Natural Populations of Maritime Pine (*Pinus pinaster* Aiton) in Morocco. *Silvae Genetica*, 53(3):93–99
- Wen CS, Hsiao JY (2001). Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan lily (*Lilium longiflorum* var. *formosanum*; Liliaceae) using rapid markers and morphological characters. *International Journal of Plant Sciences*, 162(2):287–295.
- Williams G C, Elsik C G, Barnes D R (2000). Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. in Zimbabwe. *Heredity* 84: 261–268.
- Williams SE, Bolitho EE, Fox S (2003). Climate change in Australian tropical rainforests: an impending environmental catastrophe. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270: 1887–1892.
- Zacarías–Eslava Y, Del Castillo RF (2010). Comunidades vegetales templadas de la Sierra Juárez, Oaxaca: pisos altitudinales y sus posibles implicaciones ante el cambio climático. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 87: 13-28.
- Zhang X, Korpelainen H, Li C (2006). Microsatellite variation of *Quercus aquifolioides* populations at varying altitudes in the Wolong Natural Reserve of China. *Silva Fennica*, 40(3): 407–415.

Apéndices

i) Protocolo estandarizado de Extracción FastDNA SPIN kit para Pinus patula.

1. Limpiar el área de trabajo y rotular los tubos de Matriz de ruptura A (Lysing Matrix A).
2. Pesar de 180 a 200 mg de acículas de pino en la balanza analítica, cortar las acículas con bisturí y agregar al tubo de Matriz de ruptura A.
3. Rotular los tubos de recuperación (2 ml), Spin Modules (2 ml) y tubos eppendorf de 2 ml.
4. Agregar 800ul de la solución de ruptura de células para plantas CLS-VF (no agitar) y 200 μ l de PPS. Mezclar con gentileza.
5. Llevar el tubo Lysing Matrix A, al equipo FastPrep por 2 ciclos a 30 segundos por 6m/s Colocar en hielo los tubos por al menos 2 minutos entre ciclos del FastPrep.
6. Centrifugar a 9.8 rpm (14000 X) por 10 minutos.
7. Iniciar el calentamiento baño maría hasta que alcance una temperatura de 55° C.
8. Transferir el sobrenadante del tubo Lysing Matrix A (aproximadamente 500–600 μ l) al tubo de 2ml eppendorf.
9. Agregar la mismo volumen obtenido de Matriz de unión (binding matrix) (aproximadamente 500–600 μ l).
10. Incubar los tubos eppendorf en el rotor por 5 minutos a 300 revoluciones.
11. Centrifugar a 9.8 rpm (14000 X) por 10 segundos para obtener pequeñas cantidades de material aglomerado (pellet) y descartar el sobrenadante.

12. Agregar 500 μ l de la solución SEWS–M, y mezclar gentilmente con la punta de la micropipeta el pelett. Nota: agitar y cerrar herméticamente el frasco de SEWS–M cada vez que se use.
13. Incubar en el rotor por 2 minutos a 200 revoluciones.
14. Transferir la solución al tubo SPIN Module con filtro y centrifugar a 9.8 rpm (14000 X) por 1 minuto.
15. Volver a centrifugar a 9.8 rpm (14000 X) por 1 minuto y descartar el volumen líquido.
16. Transferir al tubo de captura (Catch Tube).
17. Eluir el DNA capturado en el catch tube con 100 μ l de solución DES e incubar en baño maría por 5 minutos a 55° C.
18. Centrifugar a 9.8 rpm (14000 X) por 1 minuto y tirar el Catch Tube.
19. Almacenar el ADN a –20° C para su posterior análisis.

ii) *ADN extraído de Pinus patula y cuantificado con Biofotometro Eppendorf a 260/280A*

**POBLACIÓN ADULTOS DEL PRIMER PISO
ALTITUDINAL 3 100 m s.n.m.**

ID individuo	Concentración de ADN ng/μL	Pureza de ADN 260/280 A
A01	13.4	1.87
A02	11.2	1.74
A03	11.5	1.79
A04	11.8	1.72
A05	9.1	1.66
A06	11.7	1.76
A07	11.7	1.55
A08	11.6	1.59
A09	10.5	1.64
A10	10.2	1.71
A11	10.3	1.59
A12	31.7	1.47
A13	38.7	1.39
A14	38.5	1.2
A15	34.8	1.46
A16	42.4	1.43
A17	69.3	1.66
A18	111.1	1.16
A19	54.2	1.5
A20	48	1.53
A21	46.7	1.43
A22	58.6	1.58
A23	41.4	1.57
A24	38	1.48
A25	23	1.62
Promedio	31.98	1.56

ADULTOS

**POBLACIÓN BRINZALES DEL PRIMER PISO
ALTITUDINAL 3 100 m s.n.m.**

ID individuo	Concentración de ADN ng/μL	Pureza de ADN 260/280 A
D01	12.8	1.63
D02	10.4	1.71
D03	11.8	1.81
D04	9.6	1.87
D05	30	1.06
D06	9.3	1.79
D07	12.6	1.61
D08	10.2	1.73
D09	62.2	1.23
D10	157.4	1.76
D11	38.2	1.45
D12	45	1.55
D13	78.9	1.56
D14	79.7	1.72
D15	39.8	1.43
D16	39.9	1.49
D17	92.8	1.63
D18	52.9	1.49
D19	38.2	1.6
D20	49.8	1.63
D21	49.2	1.49
D22	58.1	1.65
D23	33.3	1.47
D24	70.8	1.63
D25	68.4	1.48
D26	73.5	1.52
Promedio	47.49	1.58

BRINZALES

**POBLACIÓN ADULTOS DEL SEGUNDO
PISO ALTITUDINAL 2 750 m s.n.m.**

ADULTOS	ID individuo	Concentración de ADN ng/μL	Pureza ADN 260/280 A
	B01	99.8	1.48
	B02	77.5	1.4
	B03	75.3	1.43
	B04	71	1.45
	B05	73.1	1.42
	B06	38	1.43
	B07	52.9	1.63
	B08	61.2	1.65
	B09	57.3	1.49
	B10	47	1.6
	B11	40.7	1.54
	B12	51.6	1.66
	B13	39.2	1.56
	B14	54.8	1.62
	B15	53.8	1.54
	B16	50.1	1.52
	B17	33.5	1.53
	B18	136	1.75
	B19	49.2	1.47
	B20	111.7	1.68
	B21	56.6	1.53
	B22	42	1.44
	B23	26.8	1.66
B24	34.2	1.37	
B25	42.3	1.45	
Promedio	59.02	1.53	

**POBLACIÓN BRINZALES DEL SEGUNDO
PISO ALTITUDINAL 2 750 m s.n.m.**

BRINZALES	ID individuo	Concentración de ADN ng/μL	Pureza ADN 260/280 A
	E01	117.6	1.35
	E02	102.8	1.54
	E03	94.5	1.39
	E04	94.2	1.55
	E05	64.5	1.49
	E06	79.1	1.44
	E07	63.7	1.42
	E08	63.4	1.36
	E09	78	1.49
	E10	92.2	1.36
	E11	117.8	1.44
	E12	96.1	1.46
	E13	128.3	1.45
	E14	110.3	1.4
	E15	77.1	1.43
	E16	62.4	1.45
	E17	92.2	1.41
	E18	76	1.43
	E19	74.7	1.51
	E20	67.4	1.45
	E21	59	1.52
	E22	95.8	1.4
	E23	82	1.39
	E24	91	1.44
E25	65.4	1.38	
Promedio	85.82	1.438	

**POBLACIÓN ADULTOS DEL TERCER PISO
ALTITUDINAL 2 400 m s.n.m.**

ID individuo	Concentración de ADN ng/μL	Pureza ADN 260/280 A
C01	58.1	1.66
C02	93.1	1.71
C03	55.3	1.56
C04	80.2	1.78
C05	107	1.7
C06	37.2	1.43
C07	102.3	1.81
C08	59.2	1.7
C09	67.6	1.76
C10	111.9	1.47
C11	37.5	1.6
C12	51.5	1.64
C13	59.9	1.65
C14	78.4	1.73
C15	160	1.79
C16	75.7	1.65
C17	70.5	1.65
C18	70.6	1.67
C19	62.3	1.62
C20	74.9	1.79
C21	36.2	1.56
C22	42.2	1.43
C23	64.9	1.53
C24	102.6	1.45
C25	76.2	1.79
C26	105.2	1.73
Promedio	74.63	1.65

ADULTOS

**POBLACIÓN BRINZALES DEL TERCER PISO
ALTITUDINAL 2 400 m s.n.m.**

ID individuo	Concentración de ADN ng/μL	Pureza ADN 260/280 A
F01	79.1	1.74
F02	59.9	1.68
F03	53.2	1.64
F04	69.8	1.65
F05	74.6	1.71
F06	109.9	1.86
F07	85.6	1.84
F08	107.6	1.77
F09	109.3	1.66
F10	105.8	1.79
F11	201.9	1.83
F12	50.9	1.67
F13	205	1.73
F14	53.3	1.56
F15	93.2	1.6
F16	36.7	1.56
F17	77.7	1.6
F18	75.3	1.66
F19	98	1.67
F20	78.8	1.59
F21	59.5	1.68
F22	32.1	1.53
F23	30.5	1.56
F24	36.3	1.54
F25	120.4	1.77
F26		
Promedio	84.18	1.68

BRINZALES

iii) Revisión de estudios genéticos

Cuadro 12. Revisión de estudios genéticos realizados en gradientes altitudinales.

Especie	Zona de estudio	Marcador molecular	codigo de la población	Altitud de colecta (metros sobre el nivel del mar)	Número de alelos detectados (Na)	Heterocigosidad observada (Ho)	Heterocigosidad esperada (He)	Coefficiente de endogamia (Fis)	Autores
<i>Pinus pinaster</i> Aiton	Montañas del Atlas y RIF, Marruecos	Isoenzimas	Motañas Rif	1 064 m snm	26.67	0.301	0.371	0.190	Wahid <i>et al.</i> , 2004
			Atlas media	1 665 m snm	24.75	0.318	0.312	-0.021	
			Atlas alta	1 910 m snm	27	0.333	0.332	-0.004	
			promedio de las poblaciones agrupadas			26	0.31	0.346	
<i>Picea abies</i> (L.) Karst.	Tyrol, Austria	EST-SSRs (secuencias simples repetidas - Etiqueta de secuencia expresada)	Hauserberr1	800 m snm	20.8	0.846	0.888	0.049	Unger <i>et al.</i> , 2011
			Hauserberr2	1 200 m snm	20.8	0.847	0.878	0.028	
			Hauserberr3	1 600 m snm	21.3	0.85	0.882	0.0038	
			promedio de las poblaciones agrupadas			24.3	0.847	0.886	
<i>Fagus orientalis</i> Lipsky	vertiente norte de las montañas de Alborz, Hyrcanian, Iran	Isoenzimas	Gorgan1	1900 m snm	2	-	0.192	0.011	Salehi-Shanjani <i>et al.</i> , 2011
			Gorgan2	1400 m snm	2.375	-	0.187	0.007	
			Gorgan3	600 m snm	2.313	-	0.186	0.008	
			Sangdeh1	1900 m snm	2.250	-	0.197	0.007	
			Sangdeh2	1400 m snm	2.125	-	0.194	0.003	
			Sangdeh3	900 m snm	2.125	-	0.183	0.008	
		promedio de las poblaciones agrupadas			2.198	0.190	0.007		
		Microsatélites Nucleares	Gorgan1	1900 m snm	7.667	-	0.624	0.034	
			Gorgan2	1400 m snm	8.5	-	0.580	0.034	
			Gorgan3	600 m snm	9.833	-	0.689	0.023	
			Sangdeh1	1900 m snm	11.667	-	0.643	0.012	
			Sangdeh2	1400 m snm	10.833	-	0.660	0.013	
			Sangdeh3	900 m snm	11.667	-	0.702	0.016	
			promedio de las poblaciones agrupadas			10.028	0.650	0.022	
<i>Fraxinus mandshurica</i>	China		Microsatélites Nucleares	población L1-L4	401 m snm	97	-	0.573	0.047
		población C1-C11		451 m snm	110	-	0.580	0.034	
		población Z1-Z5		496 m snm	109	-	0.571	0.037	
		población X1-X8		628 m snm	95	-	0.537	0.051	
		población W1-W2		800 m snm	101	-	0.549	0.012	
		promedio de las poblaciones agrupadas			270	0.564	0.041		
<i>Quercus aquifolioides</i>	Reserva natural Wolong, China	Microsatélites Nucleares	población 1	2 000 m snm	7.5	0.687	0.759	-	Zhang <i>et al.</i> , 2006
			población 2	2 400 m snm	13	0.763	0.798	-	
			población 3	2 800 m snm	11.500	0.662	0.786	-	
			población 4	3 200 m snm	11.833	0.721	0.796	-	
			población 5	3 600 m snm	12.833	0.578	0.758	-	
			promedio de las poblaciones agrupadas			21.000	0.682	0.827	