

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMIA



Diversidad y Grado de Aislamiento Genético en dos Poblaciones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski, utilizando RAPD

Por:

FLOR DE MARÍA HERNÁNDEZ RUÍZ

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO FORESTAL

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO FORESTAL

Diversidad y Grado de Aislamiento Genético entre dos Poblaciones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski, utilizando RAPDs

Por:

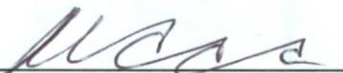
FLOR DE MARÍA HERNÁNDEZ RUIZ

Tesis

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO FORESTAL

Aprobada



Dr. Miguel Ángel Capo Arteaga

Asesor principal



Dr. Edmundo Rodríguez Campos

Coasesor


M.C. Celestino Flores López

Coasesor

Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2012

DEDICATORIA

A **Dios**

Agradezco su bendición y por permitirme llegar a este día especial en mi vida y hacer realidad este sueño. Gracias por mantenerme en la fe, la esperanza y el amor, deseo que guíe mi camino y me acompañe siempre en este comienzo de mi carrera profesional.

A mi **Madre**

Dionisia Ruiz López

Gracias Mamá por tu cariño, tu dulce amor, tus palabras de aliento y por tu infinito amor, gracias por estar conmigo en la distancia pero siempre conmigo.

A mi **Padre**

Pedro Hernández Díaz

Gracias Papá por tu confianza, agradezco a Dios por tener la dicha de ser tu hija, tú eres mi mayor admiración, mi modelo a seguir. Papá tú fuiste la chispa que mantuvo vivo este sueño, agradezco tu apoyo incondicional en este proyecto, este logro también es tuyo.

A mi **Abuela**

Juana López Ruíz

Mil gracias Abuela por tus gestos de amor, tu delicadeza en tus palabras, tus cuidados y tus sabios consejos.

A mis **Hermanos**

Amado, Sandra, Esperanza, Sofía y Guadalupe.

Gracias por regalarme tantos momentos de alegría, palabras de aliento, pero sobre todo por estar unidos en la Fe, el Amor y la Oración.

A mis **Sobrinos**

Fabián, Eyber, Alexander, Lizet y Andrea

Gracias por alegrar mi vida en todo momento, soy feliz por tenerlos. Siempre agradeceré sus gestos de amor y su paciencia al esperarme cuando nos tenemos que separar.

A mi **Familia**

Abuelos (as), tíos (as), primos (as). Agradezco sus palabras, sus consejos en todo momento y que de alguna u otra forma estuvieron siempre conmigo en todo momento.

A la **Generación 2007-2012**

A mis compañeros de generación; el esfuerzo de cada uno de ustedes fue mi motivación para concluir mi trabajo, siempre con diferentes formas de pensar, pero unidos en un mismo objetivo. A ustedes mi mayor agradecimiento y admiración por concluir este objetivo en común.

A mis **Amigos**

Roberto Morales, Lizet Muñoz, Ángela Ortiz, Ino Matus, Adrián Hernández, Aristeo Jacobo, Gamaliel Martínez, Saúl Mejía, Antonio Alfaro, Maybet Mendoza, Rosalina Vázquez, Angelina y Verónica.

Gracias por hacer divertida mi estancia en la Universidad, su amistad fue el motor que me devolvió la energía en momentos difíciles. Mas que amigos fuimos hermanos luchando por el mismo sueño.

Al **Laboratorio de Agrobiotecnología**

Amigos: Gilberto Santiago, Alejandro García, Ana Laura, Dagoberto Flores, José de la Cruz, Abel Salas, Lourdes y Mary.

Gracias por regalarme su amistad, su cariño y muchos momentos de alegría; los guardo con mucho cariño.

A **Eloy Cuevas**

Gracias por estar ahí en todo momento, en el cansancio, en la agonía, en la tristeza y en la alegría.

AGRADECIMIENTOS

A mi **Alma Terra Mater**

Por darme la oportunidad de prepararme profesionalmente y por brindarme una cálida y amable hospitalidad durante mi estancia. Gracias por permitirme formar parte de esta casa de estudios.

Al Dr. **Miguel Ángel Capo Arteaga**

Profesor Investigador del Departamento Forestal, por su confianza para realizar este trabajo de investigación y por su disposición e intervención en todo momento para concluir el trabajo. Sin duda sus aportaciones fueron importantes para concluir este trabajo.

Al Dr. **Edmundo Rodríguez Campos**

Profesor Investigador del Departamento de Ciencias Básicas, por compartir sus conocimientos en este trabajo de investigación, por su apoyo, confianza, pero sobre todo su paciencia en la realización de los trabajos en el laboratorio en Agrobiotecnología de la UAAAN. Sus conocimientos en Biología fueron indispensables para realizar y concluir este trabajo.

Al MC. **Celestino Flores López**

Profesor Investigador del Departamento Forestal, por su contribución, sus aportaciones en la revisión del trabajo y por brindarme su apoyo incondicional durante mi formación en la Universidad.

A la Dra. **Susana Favela y Verónica Aguirre Fuentes**

Por brindarme hospitalidad y asesoría sobre marcadores moleculares en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Al Mc. **Andrés Nájera Díaz**

Por ser un amigo incondicional durante la carrera, gracias por sus consejos en todo momento y por enseñarme a luchar para realizar mis sueños.

Al maestro **Francisco A. Esquivel Sánchez**

Por ser maestro, amigo y guía en mi caminar por la Narro. Gracias profe por motivarme en todo momento y descubrir conmigo el amor al arte (fotografía), siempre agradecida con Dios por ponerlo en mi camino y por estar ahí siempre.

A **Miguel Sosa y Juan Sosa**

Por su trabajo en las colectas de las muestras en las diferentes localidades y por ser mis guías en la colecta de Zacatecas.

A todas aquellas personas que estuvieron involucradas de alguna manera en la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVO GENERAL.....	4
III HIPÓTESIS	4
IV REVISION DE LITERATURA.....	5
4.1 Origen y evolución de las coníferas	5
4.2 Distribución del género Pinus en México	6
4.3 Historia de los pinos piñoneros	7
4.4 Subsección Cembroides Engelm.....	7
4.5 Ecología	9
4.6 Marcadores moleculares	10
4.7 Variación Genética	11
4.8 Distancia Genética	12
4.9 <i>Pinus maximartinezii</i> Rzedowski.....	13
4.10 Descripción de la especie	17
4.11 Estado de conservación.....	18
4.12 Relaciones filogenéticas	18
4.13 <i>Pinus pinceana</i> Gordon.....	20

4.14 Trabajos afines	21
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1. Descripción del área de estudio.....	23
5.1.1 Ubicación	23
5.1.2 Colecta de muestras	24
5.1.3. Extracción de ADN.....	25
5.1.4. Cuantificación del ADN.....	26
5.1.5. Calidad del ADN	26
5.1.6. Condiciones de PCR.....	27
5.1.7 Análisis de Datos.....	28
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1 Selección de primers (cebador)	30
6.2 Variación Genética	34
6.2.1 <i>Pinus maximartinezii</i>	34
6.2.2 <i>P. maximartinezii</i> y <i>P. pinceana</i>	36
6.3 Distancia Genética	37
6.3.1 <i>Pinus maximartinezii</i>	37
6.3.2 <i>P. maximartinezii</i> y <i>P. pinceana</i>	38
VII CONCLUSIONES	40
VIII RECOMENDACIONES.....	41
IX LITERATURA CITADA.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Localización geográfica de las localidades donde se colectaron las muestras (acículas).....	24
Cuadro 2. Lista de los 38 primers analizados.....	30
Cuadro 3. Lista de los 7 primers seleccionados.....	32
Cuadro 4. Cuadro de comparación de medias y desviación estándar en alelos de <i>Pinus maximartinezii</i>	35
Cuadro 5. Análisis estadístico AMOVA	35
Cuadro 6. Cuadro de comparación de medias y desviación estándar en alelos de <i>P. maximartinezii</i> y <i>P. pinceana</i>	36
Cuadro 7. Distancia Genética de Nei en cuatro poblaciones: <i>P. maximartinezii</i> y <i>P. pinceana</i> (1) La Muralla Durango, (2) Cerro de Piñones, Zac., (3) La Zarca Dgo., (4) La Yesera S.L.P.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>P. maximartinezii</i> Rzed., en la población de La Muralla, Dgo. A. rama y conos; B. cono; C. ramilla; D. semillas; E. plántula. (Fotografía: Elizondo <i>et al</i> 2011).....	15
Figura 2. Hábitat de <i>Pinus maximartinezii</i> Rzed., en la población de la Muralla, Dgo. (Fotografía: Elizondo <i>et al</i> 2011).....	16
Figura 3. Ubicación geográfica de las 4 poblaciones muestreadas. (1) La Zarca Dgo, (2) La Muralla Dgo, (3) Cerro de Piñones, Zacatecas, (4) La Yesera S.L.P.	23
Figura 4. La imagen muestra los fragmentos de ADN, producto de la extracción de tejido deshidratado de <i>P. maximartinezii</i> , localidad; La Muralla, Durango, en gel de agarosa al 1%, con 2 µL de Buffer de Carga (azul de Bromofenol + Sybergold), visualizados en un transiluminador UV.	27
Figura 5. La imagen es una captura de pantalla del Software PyElph., <i>P. maximartinezii</i> (Zacatecas), primer OPA-08 en gel de agarosa, se observan los carriles de bandas (líneas azules), detección de bandas (puntos amarillos y rojos) y coincidencia de bandas (líneas horizontales).....	29
Figura 6. Polimorfismos detectados con el primers OPA-08.	31
Figura 7. Polimorfismos detectados con el primers OPG-11.....	32
Figura 8. La imagen muestra la reproducibilidad del primers OPG-11, en 3 diferentes individuos con tres repeticiones.....	33
Figura 9. Muestra la reproducibilidad de algunos primers seleccionados para el estudio. OPA-11, OPA-07 y OPA-08.....	33
Figura 10. La imagen muestra los fragmentos amplificados con PCR, primer OPA-08, en individuos de <i>Pinus maximartinezii</i>	34

Figura 11. Porcentaje de Variación Molecular en <i>P. maximartinezii</i> dentro y entre la población; análisis estadístico AMOVA	35
Figura 12. Muestra los patrones totales de bandeo en <i>Pinus maximartinezii</i> (1) Durango; (2) Zacatecas.....	37
Figura 13. Muestra los patrones totales de bandeo en: <i>Pinus maximartinezii</i> ; Durango (p1) y Zacatecas (p2). <i>Pinus pinceana</i> ; La Zarca (p3), La Yesera (p4). ...	39

RESUMEN

En el 2010 se confirma la existencia de una nueva población de *Pinus maximartinezii* al sur del estado de Durango, esto representa la primera población en estado silvestre fuera de la localidad tipo en el sur de Zacatecas.

El presente estudio pretende determinar la diversidad genética y el grado de aislamiento genético en las dos poblaciones de *P. maximartinezii*, utilizando RAPDs. Se tomaron muestras de acículas en las dos localidades conocidas de la especie y se complementó el análisis con muestras de *P. pincenana* de dos localidades cercanas a las de *P. maximartinezii*.

Los cuatro primers probados para el análisis de *P. maximartinezii* mostraron patrones de bandeo con un alto grado de reproducibilidad y una resolución clara de las bandas. Estos primers arrojaron un total de 44 bandas distintas, de las cuales fueron 11 polimórficas a través de todas las muestras. La variación genética dentro y entre las poblaciones de *P. maximartinezii* es alta, la localidad de Durango presentó el mayor porcentaje de polimorfismo (86.36%), el grado de diversidad genética en las dos poblaciones fue de 0.367 calculado por distancias genéticas de Nei. El total de variación encontrada entre las dos poblaciones fue de (68.18%). La distancia genética fue baja, pero mayor a los valores registrados para otras especies de coníferas. Lo anterior puede traducirse en una separación de las dos poblaciones hace pocas generaciones.

Todos los alelos encontrados en la población de Zacatecas se encuentran en la localidad de Durango. Con base a estos resultados obtenidos se generan hipótesis para explicar como la población de Zacatecas pudo descender de la de Durango.

Palabras clave: variación genética, distancia genética, RAPD, distribución restringida.

ABSTRACT

Pinus maximartinezii Rzedoski was recorded from southern Durango in 2010. It represent the first known record outside the type locality in southern Zacatecas. Data about the new population are presented and the conservation implications for the species are discussed.

This study aims to determine the genetic diversity and degree of genetic isolation in both *P. maximartinezii* populations, using RAPDs. Needles were also sampled in two populations of *P. pinceana*, to complement the analysis.

The four primers tested for analysis of *P. maximartinezii* shown banding patterns with high degree of reproducibility and a clear resolution between the bands. These primers yielded a total of 44 different bands, of which 11 were polymorphic through all samples. Genetic variation within and among populations of *P. maximartinezii* is high. The Durango population presented the highest percentage of polymorphism (86.36%). The genetic diversity in the two populations was 0.367 calculated by Nei genetic distances. The total variation found between the two populations was (68.18%). The genetic distance was low, but higher than the values reported for other conifer species. This could mean that separation of the two populations occurred few generations ago.

All the alleles found in the population of Zacatecas are present in the Durango population. Based on these results two hypotheses are generated to explain haw the population of Zacatecas could descend from the Durango's.

Keywords: *Pinus maximartinezii*, genetic variation, genetic distance, RAPD, restricted distribution.

I INTRODUCCIÓN

La variabilidad o diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones.

De ahí que su conocimiento y comprensión sea de vital importancia tanto para la conservación y el avance de la genética evolutiva, como para la salud pública, la sustentabilidad, la productividad agrícola, pecuaria, pesquera y forestal, la domesticación y la biomedicina (Piñero, D., *et al.*, 2008). Específicamente este conocimiento puede ser utilizado para planear estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos.

Nuestro país cuenta con la mayor riqueza de especies del género *Pinus* en el mundo; de las más de cien especies reconocidas, aproximadamente 50 % son nativas de México (Price *et al.* 1998) y un alto grado de endemismos (34 especies; Perry, 1991), lo que lo convierte en el segundo centro de diversidad de este género.

De esta diversidad, ocho especies y una variedad son raras, endémicas o están amenazadas con su extinción, y cerca de una docena son pinos piñoneros que producen semillas con nuez comestible y excelente calidad alimenticia.

La conservación de la diversidad biológica forestal, incluidos los recursos genéticos forestales, es fundamental para sostener los valores productivos de los bosques, para mantener el estado sanitario y la vitalidad de los ecosistemas forestales, y de este modo, mantener sus funciones protectoras y ambientales. FAO (2001).

Los marcadores moleculares constituyen en la actualidad una herramienta importante en el mejoramiento genético forestal (Neale *et al.*, 1992; Iglesias y García, 1999; Ahuja, 2001). Dentro de ellos se ha resaltado particularmente la utilidad que brinda la técnica de RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA) en estudios genéticos de diversas especies forestales (Bucci *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1999).

P. maximartinezii Rzedowski, conocido como Pino azul; es el piñonero con conos y semillas más grandes del mundo. Es una especie catalogada como rara, endémica y en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT 2010 (Anónimo, 2010b) y como "en peligro B1+2bc" en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza (UICN). (Anónimo, 2010a, 2010b). Anteriormente, su área de distribución se le atribuía únicamente a la Sierra de Morones, municipio de Juchipila, Zacatecas.

Esta especie se distribuye entre las coordenadas (21° 19' 60" N y 103° 14' 00" W, a una altitud de 1700 a 2300 msnm. Rzedowski (1964), sugirió que además de Zacatecas, esta especie pudiera encontrarse en otros sitios, en cañones, donde participan los estados de Zacatecas, Jalisco, Nayarit y Durango.

En el 2010 se confirmó la existencia de otra población de *Pinus maximartinezii* al sur del estado de Durango, esto representa la primera población en estado silvestre fuera de la localidad tipo en el sur de Zacatecas. (Elizondo *et al.*, 2010, p. 33-48). La segunda población se encuentra al sur del estado de Durango, cerca del poblado La Muralla, perteneciente a la comunidad indígena de Santa María de Ocotán y Xoconoxtle, municipio de El Mezquital, a 190 km al NW de la localidad tipo.

Han pasado casi cinco décadas después del descubrimiento de la especie por Rzedowski (1964) y casi dos de la aseveración de Carvajal y McVaugh para encontrar una segunda población de *P. maximartinezii*, después de una búsqueda propiciada por informes vagos sobre su existencia al sur del estado de Durango. Existe la probabilidad de que las nuevas rutas que se abren a través de la Sierra

Madre Occidental permitirán encontrar poblaciones adicionales (Elizondo *et al.*, 2010).

Las implicaciones de conocer una segunda población de *P. maximartinezii* son de gran interés biogeográfico, ecológico y para la conservación de esta enigmática especie. Independientemente de que *P. maximartinezii* represente a un paleorrelicto o un neorrelicto, y ya sea que la población de Zacatecas sea ancestral o sea derivada de la de Durango, la cruce artificial de individuos provenientes de ambos sitios podría ayudar a incrementar su variación genética.

Estudios moleculares indican que *P. maximartinezii* y *P. pinceana* comparten secuencias de ADN de cloroplasto (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995) y varios loci polimórficos, por lo que Ledig *et al.* (2001) han postulado a *P. pinceana* como probable progenitor de *P. maximartinezii*. Un esquema filogenético basado en una región del ADN ribosomal nuclear agrupa a *P. maximartinezii* con *P. pinceana* y con *P. rzedowskii* (Liston *et al.*, 1999).

El presente estudio pretende determinar la diversidad y el grado de aislamiento genético en dos poblaciones de *Pinus maximartinezii* Rzedowskii. Incluyendo poblaciones de *P. pinceana* Gordon, por ser la especie más emparentada con *P. maximartinezii*; utilizando la técnica RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA).

La fragmentación de hábitat tiene consecuencias muy directas sobre las poblaciones de plantas ya que aumenta significativamente el peligro de extinción local (Young y Clarke 2000). En particular, la fragmentación conlleva una reducción del tamaño efectivo poblacional y un aumento del grado de aislamiento entre poblaciones. El efecto inmediato del aumento de la fragmentación es que los individuos que quedan en las poblaciones tienden a incrementar el grado de endogamia dado que aumentan los cruces entre individuos emparentados así como también las autofecundaciones (Crawley, 1997, Young y Clarke, 2000).

Aunque la población de *P. maximartinezii* Zacatecas mantiene una buena estabilidad demográfica, la población es saludable, el peligro para la especie se deriva más bien de las amenazas a su hábitat, de manera que la cruce de individuos de ambas zonas podrá ayudar a fortalecer su poza génica y a desarrollar nuevas estrategias de conservación (López Mata, 1998).

Las plantaciones son una alternativa de conservación *ex situ* muy importante, especialmente cuando se trata de especies que tienen una distribución natural muy restringida o en los casos donde el hábitat de la especie se encuentra seriamente amenazado. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de especies endémicas existentes en México, con hábitat restringido o amenazado por diferentes causas, esta opción ha sido poco utilizada en la región norte.

II OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad genética y el grado de aislamiento genético en dos poblaciones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski, utilizando RAPD

III HIPÓTESIS

H0:

No existen diferencias en la diversidad genética entre las dos poblaciones de *P. maximartinezii* Rzedowski.

H1:

Existen diferencias en la diversidad genética entre las dos poblaciones de *P. maximartinezii* Rzedowski.

IV REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Origen y evolución de las coníferas

El género *Pinus* es considerado el más antiguo de la familia *Pinaceae* en cuanto al nivel de organización (Martínez, 1948). Posiblemente apareció a finales del periodo Triásico de la Era Mesozoica hace 180 millones de años en el norte de Asia (Lanner, 1981). También se postula que pudo originarse en el Hemisferio Norte hace 65 millones de años (Cronquis, 1977 y Perry, 1990).

En la distribución actual de este género influyeron notablemente los cambios en la masa terrestre, el clima y vegetación, en las distintas eras geológicas desde el Mesozoico y el Cenozoico, hasta mediados del Pleistoceno, cuando América del Norte permanecía unida a Asia por el Mar de Bering y con Europa por Islandia y Groelandia, lo que propició el establecimiento de rutas de migración de los pinos entre estos lugares (Perry, 1990).

A principios del periodo Terciario, los mares cubrieron el oeste y centro de Canadá hasta Guatemala, lo que favoreció la migración de plantas desde Centroamérica hacia el oriente del Hemisferio Norte. A finales de este periodo emergieron las cordilleras del oeste de América del Norte, lo que alteró radicalmente la topografía y afectó la distribución de los bosques de esa región. La principal ruta de migración fue a través de las montañas del oeste que se extienden desde Alaska, Canadá y Estados Unidos de Norte América y continúan por la Sierra Madre Occidental. Otra vía la constituyó la Sierra Madre Oriental la cual une las Montañas Rocallosas y la gran faja de Texas (Perry, 1990).

Posteriormente, los periodos con climas más cálidos permitieron el avance de la flora y fauna tropical del sur hacia las altas latitudes. Durante el periodo Cuaternario las glaciaciones que cubrieron de hielo Norteamérica ocasionaron el retraimiento de especies tropicales y la consecuente expansión de la flora boreal (Raven, 1969, citado por Toledo, 1988).

Los estudios sobre fósiles vegetales muestran que ciertos géneros alcanzaron una distribución más amplia en el pasado que en el presente. Desde la época glacial más reciente, hace 20,000 años, las zonas climáticas y vegetales han disminuido 1000 m de altitud. Como resultado de las migraciones laterales y altitudinales, la distribución actual es irregular, mostrando poblaciones discontinuas (Little, 1987).

4.2 Distribución del género *Pinus* en México

La conformación del territorio nacional, la ubicación geográfica, el relieve y las corrientes marítimas influyen en las variadas condiciones ecológicas y climáticas del país. Esto favorece la existencia de distintos ecosistemas y la presencia de una flora y fauna notable por su riqueza biológica (Sánchez, 1986; Toledo, 1988).

De acuerdo con Eguiluz (1982) el país es un importante centro de diversificación del género *Pinus*, donde se encuentran 79 de las 110 taxa existentes a nivel mundial. Además, están presentes la mayoría de los pinos piñoneros reportados, por lo que es considerado centro secundario específico para el desarrollo de híbridos y mutantes que recombinados naturalmente han incrementado la diversificación.

El mayor número de taxa se localiza en la Sierra Madre Occidental, seguido por el Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental y en menor proporción en la Sierra Madre del Sur, Macizo de Oaxaca, Sierra Madre de Chiapas y las Sierras de Juárez y San Pedro Mártir. Generalmente los bosques de pino que se desarrollan sobre las montañas presentan una mayor diversidad de especies comparados con los de valles y mesetas donde los rodales son monoespecíficos (Eguiluz, 1982).

4.3 Historia de los pinos piñoneros

Los pinos piñoneros han estado muy ligados a la historia de los hombres desde tiempos remotos, ya que se encontraban sobre las rutas de migración que emplearon los primeros pobladores de Mesoamérica. Para algunas etnias y comunidades indígenas del norte de México y suroeste de los Estados Unidos de América, las semillas representaron una fuente alimenticia importante de proteínas y grasas, ya que éstas contienen un 37% y un 49.1 %, respectivamente.

También la madera ha servido como material de construcción, la leña ha sido utilizada para combustible y la resina para uso medicinal y ceremonial. Además conforman otros beneficios diversos para las comunidades bióticas (Lanner, 1981).

Según Perry (1990), fue Bernal Díaz del Castillo quién señaló que los primeros Europeos que observaron los bosques de pinos en México fueron Hernán Cortés y sus acompañantes, en el año 1519, cuando iniciaron su recorrido desde Veracruz hasta Tenochtitlán, la antigua capital de los aztecas.

4.4 Subsección Cembroides Engelm

Actualmente todas las especies de pinos piñoneros se ubican dentro del grupo Cembroides, debido a que tienen por lo menos un carácter en común, como son los conos subglobosos y con el pedúnculo corto o ausente (Shaw, 1914, citado por Rzedowski, 1964). De acuerdo con la clasificación de Little y Critchfield (1969) y modificada por (Eguiluz, 1987).

En la diferenciación de las especies se han utilizado diversas estructuras como conos, semillas, acículas, madera y polen. Aunque recientemente también se ha aplicado la quimiotaxonomía y el análisis de terpenos de la resina del tronco

(Mirrov, 1962, citado por García, 1985; Perry, 1990). La clasificación de piñoneros se presenta a continuación.

Orden Coniferales

Familia Pinaceae

Sección Parrya Mayr.

Subsección Cembroides Engelm.

Género Pinus L.

Subgénero Strobilus Lem.

Subsección Cembroides Engelm.

Especies:

1. *Pinus cembroides* Zucc.
2. *P. cembroides* var. *Lagunae* Robert-Passini.
3. *P. catarinae* Robert-Passini
4. *P. discolor* Bailey & Hawks.
5. *P. culminicola* Andersen & Beaman.
6. *P. edulis* Engelm.
7. *P. johannis* Robert
8. *P. juarezensis* Lanner
9. *P. monophylla* Torr. & Frem.

10. *P. quadrifolia* Torr. & Frem.

11. *P. nelsonii* Shaw.

12. *P. pinceana* Gordon.

13. *P. remota* Bailey & Hawks.

14. *P. maximartinezii* Rzed.

4.5 Ecología

Los pinos del grupo *Cembroides* tienen una distribución muy amplia, desde los 18° hasta los 40° de latitud (Passini, 1985). A continuación se describen algunos aspectos ecológicos donde se desarrollan los ecosistemas piñoneros en la República Mexicana.

A) Suelo. Los piñonares se desarrollan donde pocos árboles prosperan, sobre todo en terrenos pedregosos y erosionados, de topografía muy abrupta. Están en suelos aridsoles, inceptisoles, molisoles y calcáreos con alto contenido de yeso. La textura puede ser franca, limosa y arenosa. Se reportan suelos con pH de 4.85 a 5.56 para las serranías meridionales, de 7.3 a 7.7 en el noreste de Zacatecas y de 7.6 a 8.4 para los piñonares de Tamaulipas. Generalmente estos suelos son de baja fertilidad, deficientes de nitrógeno y ricos en fósforo (Rebolledo y Aldrete, 1982, Basañes, 1983, citados por García, 1985). En los pinos piñoneros ocurre una interacción positiva de tipo simbiótica entre la raíz y una micorriza, esto incrementa la capacidad de extraer algunos materiales del suelo.

B) Clima. Los piñonares se desarrollan en clima templado seco y subhúedo, donde son frecuentes los fuertes vientos y las bajas temperaturas, como sucede en las zonas marginales donde la precipitación pluvial es de 700 mm, aunque en algunos lugares llega a rebasar los 1000 mm (Miranda y

Hernández, 1963, y Robert, 1977, citados por Eguiluz, 1982 y García, 1985).

- C) Altitud. El rango altitudinal para el género *Pinus* es muy amplio, variando desde 120 hasta 4000 msnm, como ocurre en Quintana Roo y en los volcanes más altos del eje Neovolcánico, respectivamente (Chavelas, 1998, citado por Eguiluz, 1982). Aunque los piñonares mas frecuentemente se localizan en altitudes de 950 a 3650 msnm (García, 1985).
- D) Vegetación. Los piñonares colindan en su límite inferior con pastizales y matorrales xerófilos, mientras que el límite superior con los encinares y chaparrales, formando amplias e intrincadas ecotonías con estos tipos de vegetación. Los bosques pueden estar compuestos por masas puras de especies piñoneras o mezclado con *Pinus engelmannii*, *P. chihuahuana*, *Quercus spp* y *Juniperus flaccida* (Rzedowski, 1964).

4.6 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares constituyen métodos de análisis genético-moleculares que se basan en la detección de polimorfismos de proteínas y en ADN. Sus principios y técnicas se han utilizado para resolver problemas específicos en genética y ecología de poblaciones, evolución de sistemas reproductivos, mapeo genético de caracteres de interés agronómico, procesos de hibridación e introgresión, determinación de patrones biogeográficos, resolución e identificación de relaciones taxonómicas, reconstrucción de filogenias y biología de la conservación (Parker *et al.*, 1998; Soltis y Soltis, 1989; Otero *et al.*, 1999; Nybom, 2004; Schlotterer, 2004).

También son definidos como “todo y cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o estado alelico” (Ferreira & Grattapaglia, 1998); son herramientas que permiten conocer la variabilidad genética de un germoplasma.

Existen diferentes tipos de marcadores: morfológicos, se refieren a rasgos fenotípicos, bioquímicos, incluyen variantes alelicas de enzima llamadas isoenzimas; y marcadores de ADN que revelan sitios de variación en el ADN.

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Polymerase Chain Reaction), es un método *in vitro* de amplificación enzimática de segmentos específicos de ADN que ha simplificado el estudio de la variación genética y ha transformado la manera en que se llevan a cabo los análisis genéticos (Saiki *et al.*, 1988; Otero *et al.*, 1999). Entre las técnicas más utilizadas de este tipo en el análisis de la variación genética tenemos a los RAPD's, que emplean oligonucleótidos o primers al azar sin previo conocimiento de las secuencias de los genes que se quiere estudiar (Williams *et al.*, 1990). Son altamente polimórficos, relativamente fáciles y rápidos de realizar, pero poseen baja reproducibilidad y poca especificidad, debido a las bajas temperaturas de alineación de los primers (Parker *et al.*, 1998; Nybom, 2004; Schlotterer, 2004):

4.7 Variación Genética

Los estudios de genética de poblaciones pretenden determinar cuanta variación genética existe en las poblaciones y a explicarlas en términos de su origen, mantenimiento e importancia evolutiva (Hartl y Clark, 1997). Estas variaciones son cuantificadas en función de la estructura genética, lo que permite determinar y predecir el estado actual de las poblaciones, hacer predicciones o reconstruir su historia evolutiva (Hedrick, 2000).

Las fuerzas evolutivas afectan la variación genética en las poblaciones naturales, la endogamia y la deriva génica disminuyen la variación. La selección y el flujo génico pueden aumentar o disminuir los niveles de variación dependiendo de cada situación en particular (Hedrick, 2000). El resultado final de variación

genética en las poblaciones se deberá, en gran medida, a la acción de una o de varias fuerzas evolutivas.

La variación genética de una población se puede medir como la cantidad de heterocigotos que está presente y a esta medida se le denomina heterocigosis esperada (HE); parámetro conocido también como “diversidad genética” (Nei, 1978). La heterocigosis esperada para un locus cualquiera con n alelos en una población en equilibrio H-W es la probabilidad de que al tomar dos alelos al azar de una población, éstos sean iguales.

Otra medida común para cuantificar la variación genética es el porcentaje de loci polimórficos (%P), que es la proporción de loci en los cuales el alelo más común se encuentra en una frecuencia igual o menor a 0.95 (Hedrick, 2000).

4.8 Distancia Genética

La distancia genética representa las diferencias de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Permite evaluar la cantidad y el patrón de variación compartida entre diferentes grupos. La existencia de distancias genéticas pequeñas puede deberse a que la separación de las poblaciones es reciente. También puede deberse a que las poblaciones son grandes o a que representan el flujo génico suficientemente alto para contrarrestar los efectos de la deriva génica. Si las distancias genéticas son grandes puede deberse a que las poblaciones se separaron mucho tiempo atrás, el flujo génico es limitado, permitiendo que la deriva génica genere grandes diferencias entre las poblaciones.

Cuando la estructura genética está fuertemente influenciado por distribución geográfica de las poblaciones, es de esperarse que las poblaciones más cercanas presenten menores distancias genéticas que aquellas poblaciones que se encuentran más alejadas entre sí geográficamente. A este principio se le conoce como “aislamiento por distancia” (Wright, 1951) e indica que los individuos tienden

a aparearse más con aquellos más cercanos geográficamente de los que se esperaría al azar.

4.9 *Pinus maximartinezii* Rzedowski

Rzedowski (1964), registró este taxón con el # 18,258 en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la U.N.A.M. El taxón se denomina en honor y en reconocimiento de la labor científica del profesor Maximino Martínez, decano de los botánicos mexicanos.

Otros nombres comunes registrados para la localidad de Zacatecas son: pino, piñón real, pino azul, piñón azul, piñonero de Zacatecas, piñón de Zacatecas, pino de Zacatecas (Eguiluz Piedra, 1978; Arteaga Martínez *et al.*, 2000); algunas formas de llamarlas en la literatura en inglés son: big-cone pinyon, Maxi pinyon y Martínez pinyon.

De acuerdo con informaciones obtenidas de los habitantes de la región de Juchipila, la población de *P. maximartinezii* (Zacatecas); está restringida al macizo del Cerro de Piñones, donde se extiende sobre un área de pocos kilómetros cuadrados, en altitudes de 1700 y 2100 msnm (Rzedowski, 1964).

Es una especie que forma pequeños manchones de individuos, Rzedowski (1964) menciona que *P. maximartinezii* (Zacatecas) convive con *Quercus macrophilla* Nee y con algunos otros arbustivos de porte semiarbustivos, así como con *Pinus humholtzii* Rob. *et. Fern.*, la vegetación predominante corresponde a un matorral subtropical, dominada por arbustivos altos o árboles pequeños de 3 a 5 m de alto. La mayor parte de las plantas pierden su follaje durante un periodo de 7 a 9 meses. Se extiende en un área de aproximadamente 6km², en altitudes que van de 1700 a 2100 msnm.

La temperatura media anual calculada a través del gradiente térmico que fue de 0.54 para la zona es de 19.19 ° C para una altura de 2000 msnm. La

precipitación total anual es de 704.5 mm; por las condiciones altitudinales podríamos extrapolar esta cantidad a 800 mm con 50 mm más o menos, para el Cerro de Piñones (Eguiluz, 1978).

De acuerdo con la clasificación de García (1973), se presenta un clima BS1 hw (w) (e) que es un clima seco, con otoño, invierno y primavera seco, sin cambio invernal bien definido (Eguiluz, 1978). La estación climatológica más cercana a la zona se encuentra en Juchipila, a 12 km aproximadamente del Cerro de Piñones.

Se encuentra en pendientes pronunciadas y exposiciones este, sureste y suroeste (Arteaga, 1999). En Juchipila se registra una precipitación media anual de 672 mm, y puede extrapolarse una cantidad comprendida entre 750 y 900 mm anuales para el área del Cerro de Piñones. La temperatura media anual debe calcularse entre 17° C y 18° C.

Rzedowski (1964). Sugirió la posibilidad de que esta especie se encontrara en otros sitios de la región de los cañones profundos, en las que participan los estados de Zacatecas, Jalisco, Nayarit y Durango. En el 2010 se confirma la existencia de una nueva población de *P. maximartinezii* al sur del estado de Durango, esto representa la primera población en estado silvestre fuera de la localidad tipo en el sur de Zacatecas. (Elizondo *et al.*, 2010).

La segunda población se encuentra al sur del estado de Durango, cerca del poblado La Muralla, perteneciente a la comunidad indígena de Santa María de Ocotán y Xoconoxtle, municipio de El Mezquital, a 190 km al NW de la localidad tipo. Aun no se tiene una estimación precisa de la superficie ocupada por esta especie, puesto que existe una serie de trabajos que reportan cifras completamente diferentes desde las 400 hasta las 150,000 ha (Arteaga *et al.*, 2000), crece en el este, sur y suroeste del Cerro de Piñones, de acuerdo a los datos que se tiene, el número total de árboles maduros es de aproximadamente 2000 a 2500 en el Estado de Zacatecas, y en el Estado de Durango se desarrolla en una superficie de aproximadamente 110 ha, con más de 900 individuos maduros, esto debido a la destrucción frecuente de la regeneración natural por

incendios, el sobrepastoreo así como a la venta ilegal de la semilla (Donahue y Mar, 1995; Dvorak *et al.*, 2000; González-Elizondo, 2011).



Figura 1. *P. maximartinezii* Rzed., en la población de La Muralla, Dgo. A. rama y conos; B. cono; C. ramilla; D. semillas; E. plántula. (Fotografía: Elizondo *et al* 2011).



Figura 2. Hábitat de *Pinus maximartinezii* Rzed., en la población de la Muralla, Dgo. (Fotografía: Elizondo *et al* 2011).

La propiedad donde se encuentra esta población de La Muralla se maneja bajo el régimen de bienes comunales. La cañada es usada para pastoreo de caprinos, aunque no de forma intensiva como ocurre en las mesas de las partes más altas, de manera que si se observa regeneración y algunos individuos juveniles. Debido al crecimiento irregular del fuste y a la dificultad para llegar a los sitios donde se desarrolla la especie, ésta no se explota para la extracción de madera ni de leña, contribuyendo de manera importante a la regeneración y conservación de suelo, así como alimento y ambiente apropiado para fauna silvestre.

El hábitat de *P. maximartinezii* en Durango se comparte con otra especie de interés para la conservación: la cotorra serrana occidental o guacamaya enana (*Rhynchopsitta pachyrhyncha*), en peligro de extinción de acuerdo con la NOM 059 (Anónimo, 2010b) y la IUCN (Anónimo, 2010a). No se ha encontrado puma, el cual se registra para la localidad de Zacatecas (Durán, 1997 citado por Palacios Vázquez, 2008), pero los comuneros de La Muralla mencionan la presencia de jaguar.

4.10 Descripción de la especie

Árbol de 6 a 10 m de altura, pero frecuentemente mas ancho que alto; con copa redondeada, de color verde-azuloso a distancia. Tronco hasta de 0.5 m de diámetro, con corteza irregularmente cuadrículada; ramificado desde bastante abajo y con tendencia manifiesta a formar un simposio. Ramillas lisas, de color gris, algo brillantes. Hojas en fascículos de 5, rara vez de 3 o 4; aglomeradas y colocadas en las extremidades de la ramillas; de 7 a 11 cm de largo, por 0.4 a 0.6 mm de ancho, triangulares en corte transversal, flexibles de color verde intenso y brillantes en la cara exterior.

Vainas caedizas, de color castaño claro y brillante, de 7 a 8 mm de largo en las hojas muy jóvenes, constituidas por escamas imbricadas con bases no

decurrentes. Estróbilos masculinos al igual que los femeninos jóvenes desconocidos. Semillas 2 o a veces 1, colocadas en las depresiones de la escama, desprovistas de ala, oblongas a ovado-oblongas, generalmente de 22 a 26 mm de largo (las mayores en todos los pinos), por 10 a 12 mm de ancho y 7 a 10 mm de grueso, de color castaño o negruzco, 18-24 mm de largo, aceitosa y de sabor resinoso y agradable. Embrión con 15 a 30 cotiledones (Rzedowski., 1964).

4.11 Estado de conservación

Enlistada como especie endémica y en peligro de extinción en la NOM–059–SEMARNAT 2010 (Anónimo, 2010b) y como "en peligro B1+2bc" en la Lista Roja de Especies Amenazadas (Anónimo, 2010a, 2010b), el descubrimiento de una segunda población de *Pinus maximartinezii* no modifica su estatus de conservación. El pequeño tamaño de las dos poblaciones conocidas y la baja variabilidad genética que se ha registrado para la población de Zacatecas hacen al árbol altamente susceptible a los cambios ambientales, aunque éstos sean de poca magnitud.

4.12 Relaciones filogenéticas

Pinus maximartinezii presenta características únicas tiene 15 a 30 hojas cotiledonares (García y Eguluz P., 1986), la mayor cantidad registrada para cualquier conífera. Sus relaciones evolutivas han sido abordadas con diferentes enfoques pero no existe aún información concluyente sobre su ascendencia, aunque diversas líneas de investigación sugieren que la especie es muy cercana a *P. pinceana* Gordon. Rzedowski (1964) hipotetizó que la población de Zacatecas podría constituir un vestigio de una distribución más amplia (paleoendemismo), relacionándolo con *P. pinceana* y *P. cembroides*.

Morfológicamente *P. maximartinezii* Rzed., está estrechamente relacionado con *P. pinceana* Gordon, que con cualquier otra especie, porque ambas tienen en común: ramillas lisas, hojas delgadas, flexibles y glaucas en la parte interna, presencia del endospermo sobre la testa de la semilla, forma ovada del cono, vaina foliar caediza, margen entero de la hoja, estomas en el interior de las hojas. Aunque también es notable la semejanza de los conos y de las semillas de *Pinus gerardiana* Wallich, de Asia Central y con *Pinus coulteri* D. Don, del extremo boreal de Baja California, y del sur y centro de California (Rzedowski, 1964; Eguluz, 1985) e interpretadas como resultado de posible convergencia evolutiva, lo que se confirma en recientes esquemas filogenéticos obtenidos mediante estudios moleculares (Gernandt *et al.*, 2003, 2005; Zhang y Li, 2004).

Martínez (1945) considera los siguientes aspectos de *P. maximartinezii* Rzed. Para incluirlo en la Subsección Paracembra, la semilla sin ala; comestible, vaina caediza, escamas y umbo dorsal, con hojas hasta de 9 cm y canales resiníferos y la distribución geográfica. Para Eguluz (1977) pertenece al subgénero *Strobus*, por presentar cinco acículas en el fascículo, el porte del árbol, la coloración del cono y la falta del pedúnculo.

Los análisis de cromatografía de gases en *P. maximartinezii* indican que en la trementina de la madera el principal componente es el limoneno, en un 88.6% y en similares proporciones se encuentra en *Pinus pinceana* Gordon (Zavarin y Snajberk, 1980; Zavarin y Snajberk, 1987). Comparten secuencias de ADN de cloroplasto (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995) y varios loci polimórficos, por lo que Ledig *et al.* (2001) han postulado a *P. pinceana* como probable progenitor de *P. maximartinezii*. Un esquema filogenético basado en una región del ADN ribosomal nuclear agrupa a *P. maximartinezii* con *P. pinceana* y con *P. rzedowskii* (Liston *et al.*, 1999).

4.13 *Pinus pinceana* Gordon

La especie *Pinus pinceana* Gordon es endémica de México y se encuentra citada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, como sujeta a protección especial (SEMARNAT, 2001). De acuerdo con Perry (1991), esta especie se encuentra en pequeñas poblaciones aisladas entre sí, en los estados de Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas y Coahuila. Favela et al. (2009) mencionan que también se encuentra en el estado de Nuevo León, en el cañón “El Montoso”, en el municipio de Santa Catarina.

Las poblaciones de *P. pinceana* se desarrollan en suelos someros de origen sedimentario con dominancia de calizas, generalmente en las laderas norte de los cañones (Villareal et al., 2009). Favela et al. (2009) también mencionan esta condición para la población del estado de Nuevo León, describiendo que los grupos e individuos de *P. pinceana* se restringen a laderas y cañadas con exposición norte a una altitud entre 1100 y 1700 msnm.

El clima del área de distribución de esta especie es seco (BS) extremoso. En algunos lugares templado (C), con lluvias en verano, con precipitación media anual que va desde los 350 hasta los 650 mm y una temperatura media anual de 14 a 18° C (García, 1987).

Las comunidades de *P. pinceana* muestran una composición florística propia de los bosques de encino, con elementos de matorral xerófilo, y se presentan como una forma de transición entre comunidades de vegetación xerófila y mesófilo (Villareal et al., 2009) Estas comunidades vegetales, tienen una capacidad baja, e cuanto a madera, sin embargo producen servicios ambientales como: protección al suelo de la erosión; la regulación del ciclo hidrológico; además de diversos productos como leña, fibras, postes, madera para muebles rústicos, semillas comestibles (piñones), entre otros (Universidad autónoma de Nuevo León, 1985).

Se encuentra formando masas puras abiertas, a veces en manchones pequeños; pero también se le ve asociado con otras especies, propias de los matorrales desérticos tales como: *Mimosa zygophyla*, *Karwinskia humboldtiana*, y *Cephalocereus senilis*, también con *Juniperus sp.*, *Pinus cembroides*, *Pinus nelsonii* (muy rara vez) y con *Yucca sp.* Otras veces se le ve junto con *Quercus crassifolia*, *Prosopis laevigata* y *Pinus teocote*. Prospera en suelos calizos, pedregosos, muy delgados y pobres en materia orgánica, en laderas montañosas y lomeríos. Se considera una especie de clima semidesértico.

4.14 Trabajos afines

Ledig (1999) Realizo un estudio sobre la posible evidencia de un cuello de botella en *P. maximartinezii*. La diversidad genética encontrada fue de 0.22 que es lo normal en pinos. Sin embargo el porcentaje de polimorfismo fue bajo, solo 30.3%, con un índice de fijación (F) de 0.08. Los resultados nos indican que existe una ligera deficiencia de heterocigotos. Las características llamativas en *P. maximartinezii* fue que ningún locus polimórfico tuvo más de dos alelos y la mayoría de los alelos fueron a frecuencias intermedias, a diferencia de otros pinos, donde a menudo tienen de cinco o más alelos, su distribución de frecuencias de los alelos es en forma de U. Una población con sólo dos alelos en frecuencias intermedias podría ocurrir si la población se ha reducido a un cuello de botella, un nuevo origen de un evento de hibridación también explicaría los resultados, con base al cálculo del número de generaciones a partir del desequilibrio de medias observadas, sugieren que *P. maximartinezii* es derivado de un cuello de botella hace cuatro a cinco generaciones atrás.

Ledig *et al* (2001) Realizaron un estudio sobre la diversidad genética en *P. pinceana* y una comparación con *P. maximartinezii*. Este trabajo se basó en 27 loci isoenzimáticos de 18 sistemas enzimáticos, encontrando un alto grado de diversidad genética en el Norte de México, esto indica que existen niveles

razonables de flujo de genes y el cruzamiento lejano es alto. *P. pinceana* fue variable en todos los loci polimórficos de *P. maximartinezii*, por lo tanto se considera como un posible progenitor de *maximartinezii*.

En el Norte de México se han realizado estudios para examinar niveles de variación genética, utilizando marcadores moleculares RAPDs. Favela (2010) estudio dos localidades de *P. culminicola* en su área de distribución restringida en la Sierra Madre Oriental, probó los siguientes primers (OPC-06, OPG-05, OPG-09, OPP-12 y OPP-14); obtuvo un total de 72 bandas distintas, 52 polimórficas, la diversidad genética fue alta en las dos poblaciones, con un porcentaje de polimorfismo de 53.7% y un grado de diversidad genética de 56%, la variación entre las dos poblaciones fue de 5.98% ($P=0.0001$). La mayor variación fue dentro de las poblaciones (94.02%), contrario a lo esperado, los niveles de variación entre las poblaciones aisladas de *P. culminicola* fue baja. Esto significa que a pesar de que la especie presenta una distribución restringida, el flujo genético entre las poblaciones ha sido suficiente para prevenir una pérdida dramática de variación y deriva genética.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Descripción del área de estudio

5.1.1 Ubicación

El área de estudio comprende 4 localidades ubicadas en los estados de Durango, Zacatecas y San Luis Potosí. Las dos localidades naturales de *P. maximartinezii* y una localidad de *P. pinceana* La Zarca se ubican en las cordilleras de la Sierra Madre Occidental. Únicamente la población de *P. pinceana* La Yesera se ubica en la Sierra Madre Oriental.

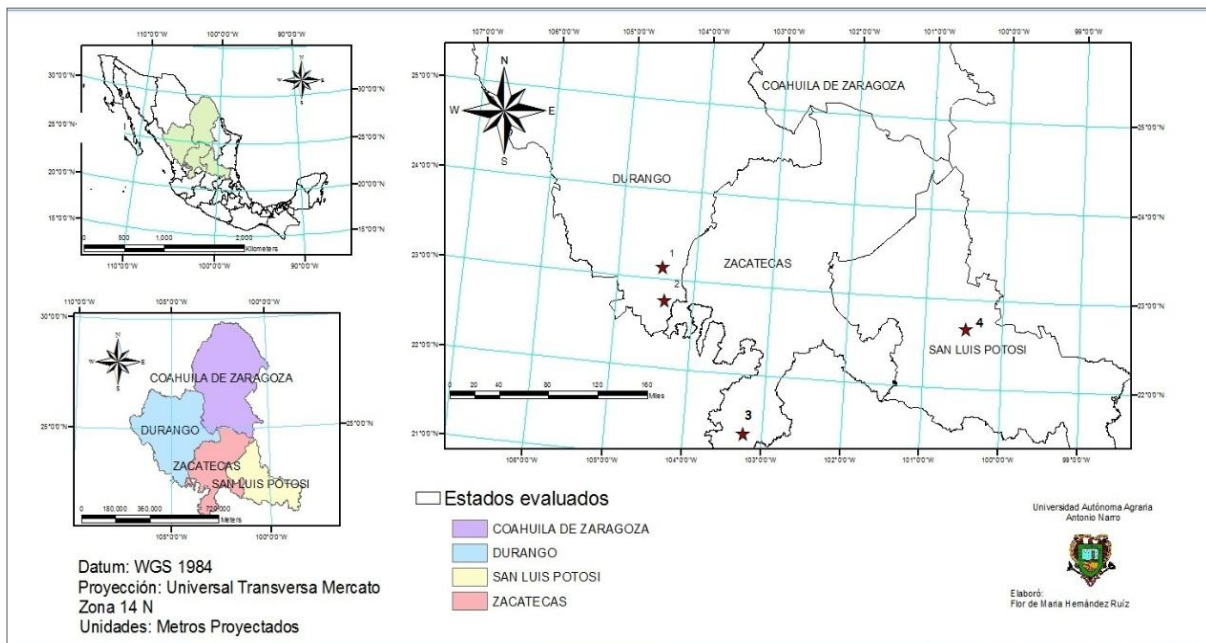


Figura 3. Ubicación de las 4 poblaciones muestreadas. (1) La Zarca Dgo, (2) La Muralla Dgo, (3) Cerro de Piñones, Zacatecas, (4) La Yesera S.L.P.

5.1.2 Colecta de muestras

El material biológico en este estudio fueron acículas de pino en cantidades pequeñas. Se colectaron acículas de diferentes individuos, los muestreos se realizaron a una distancia de aproximadamente 20m. La distancia entre individuos muestreados nos ayuda a eliminar alguna relación de parentesco entre los individuos. Tomamos de 3 a 6 fascículos jóvenes en cada individuo; aproximadamente 150 µg de acículas. Estas muestras fueron depositadas en bolsas herméticas con 10 g de Sílica Gel.

Cuadro 1. Localización geográfica de las localidades donde se colectaron las muestras (acículas).

Especie	Población	Latitud N	Longitud W	Altitud (msnm)
<i>Pinus maximartinezii</i>	La Muralla, Durango	22°45'25"	104°22'05"	2212
	Cerro de Piñones, Zacatecas.	21°19'60"	103°14'00"	1700
<i>Pinus pinceana</i>	La Zarca, Durango	25°43'51.80"	104°51'52.53"	1887
	La Yesera S.L.P	22°40'19.1"	100°26'53.4"	1900

5.1.3. Extracción de ADN

Los trabajos se realizaron en el Laboratorio de Agrobiotecnología, Departamento de Ciencias Básicas, ubicada en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Las extracciones de ADN genómico se realizó siguiendo la metodología descrita por Doyle y Doyle (1997). El Buffer de extracción contiene: 100mM Tris Hcl pH 8, EDTA pH 20 mM, 1.4 M Nacl y 1% PVP. Tomamos 50 µg de tejido deshidratado y molimos con Nitrógeno líquido, obteniendo una muestra pulverizada y congelada, estas muestras se depositaron en tubos Eppendorf (previamente enfriados). A cada tubo agregamos 1 ml de Buffer de extracción y 2 µl de 2-β Mercaptoetanol previamente incubados a 65°C. Posteriormente agitamos vigorosamente, logrando una muestra homogénea e incubamos a 65°C por 45 min.

Separamos el ADN agregando 500 µl de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1), mezclamos y centrifugamos a 10,000 rpm/10min. Posteriormente en un tubo Eppendorf se recuperó 400 µl del sobrenadante y agregamos un volumen de 0.5 de acetato de amonio y 0.6 de isopropanol. En este paso se observan las cadenas de ADN, por eso es importante revolver las muestras por pequeñas inversiones y dejar precipitar a temperatura ambiente por 30 min.

Enseguida centrifugamos a 10,000 rpm por 20 minutos; en este paso se observa la pastilla de ADN, esto, es un buen indicador de que la extracción se realizó correctamente; cuidadosamente eliminamos el sobrenadante, lavamos la pastilla (dos veces) con 1 ml de Etanol al 70% y centrifugamos 10 min. El último paso es secar a temperatura ambiente y resuspender en 50 µl de TE 0.1X, o bien con Agua grado Biología Molecular y almacenar a -4°C.

5.1.4. Cuantificación del ADN

La extracción del ADN requiere de una medición mediante el espectrofotómetro para conocer la cantidad y/o la calidad del ácido nucleico obtenido. Para ello se realizaron mediciones de la cantidad de irradiación ultravioleta absorbida por la base (ADN).

La calidad del ADN fue determinada a través de la relación de absorbancia a longitudes de onda de 260nm y 280nm con un espectrofotómetro Genesys 10UV. La lectura a 260 nm permitió calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra, mientras que a 280 nm se calculan las proteínas.

La concentración de ADN se midió en el espectrofotómetro a 260 nm, utilizando la constante: 1 unidad de absorbancia =50 µg/mL de ADN

$$1=50 \mu\text{g} /\text{ml de ADN}$$

La proporción de la lectura entre 260 y 280 proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico. Es así como preparaciones puras de ADN tienen mayor o igual a 1.8, esto significa que la cantidad y/o calidad de la muestra están libres de contaminantes. Enseguida se preparan alícuotas de trabajo y se almacenan a -4°C.

5.1.5. Calidad del ADN

La calidad del ADN se valoró visualmente mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (0.4 g Agarosa y 40 µl Buffer TAE 1X). Para visualizar los fragmentos de ADN bajo luz ultravioleta se preparó un Buffer de carga que contiene (Azul de Bromofenol y Sybergold); las muestras se corrieron a 90 volts por 45 minutos. El uso del Sybergold sustituye el uso de otros colorantes tóxicos, sustancias teratogénicas ó mutagénicas, como el Bromuro de Etidio.

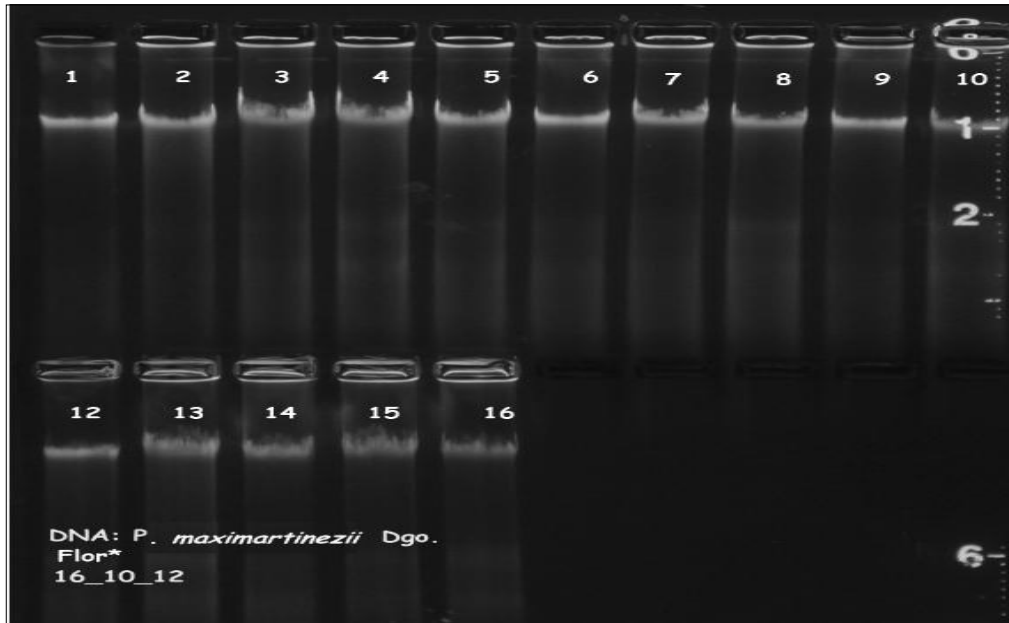


Figura 4. La imagen muestra los fragmentos de ADN, producto de la extracción de tejido deshidratado de *P. maximartinezii*, localidad; La Muralla, Durango, en gel de agarosa al 1%, con 2 µl de Buffer de Carga (azul de Bromofenol + Sybergold), visualizados en un transiluminador UV.

5.1.6. Condiciones de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron con el kit de reactivos de la marca Bioline: Buffer de reacción 1X, 4 mM MgCl₂, 0.1Mm dNTPs (dinucleótidos), 0.5U Taq Polimerasa (Hot Start, Immosase®), 0.2 mM primer, 20 ng ADN, Solución enhancer1x y Agua Grado Biología Molecular. El volumen total por muestra fue de 25 µl, los controles positivos de ADN se incluyeron en los ciclos de PCR.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Multigene, marca Labnet. El programa empleado fue el descrito por (Favela 2010); con algunas modificaciones: 5 minutos a 95° C; 4 Ciclos de 30 segundos a 95° C, 1 minuto a

37° C, 2 minutos a 72° C ;36 Ciclos de 30 segundos a 95° C, 1 minuto a 35° C, 2 minutos a 72° C, 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.8% (1.8 g de agarosa y 100 µl de Buffer TBE 1X), teñido con un buffer de carga (Glicerol 50 %, EDTA 1 Mm, Azul de Bromofenol 0.2% SyberGold 1:10000 y Agua Grado Biología Molecular), visualizados en el transiluminador, mediante luz UV.

Para poder determinar el peso aproximado de las bandas se empleo un marcador con un peso molecular de 200 a 2000 pares de bases (HyperLadder II, Bioline) de 250 µg, (4 µ/ul) que corría junto con las muestras.

5.1.7 Análisis de Datos

Los análisis genéticos de diversidad y distancia genética se realizaron usando el software GenALEx 6.5, Genetic Analysis in Excel (Peakall and Smouse 2010).

El estudio se dividió en dos análisis estadísticos: Las poblaciones de *P. maximartinezii* se analizaron con cuatro primers (OPA-07, OPA-08, OPG-05 y OPG-09).

Se realizó otro análisis donde se incluyo a *P. pinceana*; En este análisis se usaron tres primers (OPA-07, OPG-05 y OPG-09). Se descarto el OPA-08 por su baja reproducibilidad de bandas en esta especie.

Las bandas RAPD se detectaron mediante el uso del Software PyElph (Pavel & Vasile 2012). Con este Software se construyó una matriz binaria de presencia y/o ausencia de bandas, presentes (1) (homocigotos dominantes (AA) y heterocigotos (Aa)) o ausentes (0) (homocigotos recesivos (aa)). Las muestras que no se pudieron amplificar se evaluaron como datos ausentes.

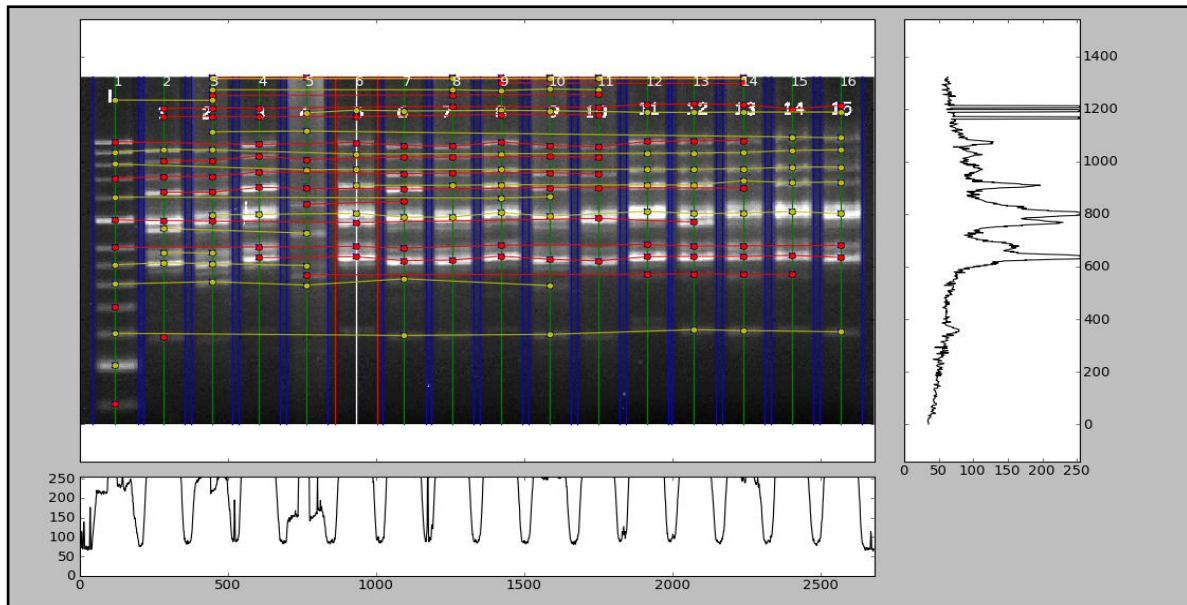


Figura 5. La imagen es una captura de pantalla del Software PyElph., *P. maximartinezii* (Zacatecas), primer OPA-08 en un gel de agarosa, se observan los carriles de bandas (líneas azules), detección de bandas (puntos amarillos y rojos) y coincidencia de bandas (líneas horizontales).

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Selección de primers (cebador)

Se realizó una selección inicial de 38 primers RAPD; marca Sigma Genosys. Estos fueron seleccionados con base a registros encontrados sobre su buena reproducibilidad en Pinos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Lista de los 38 primers analizados.

Nombre Oligo	Secuencia	Número de bases
OPG-02	GGCACTGAGG	10
OPG-03	GAGCCCTCCA	10
OPG-05	CTGAGACGGA	10
OPG-06	GTGCCTAACC	10
OPG-07	GAACCTGCGG	10
OPG-09	CTGACGTCAC	10
OPG-10	AGGGCCGTCT	10
OPG-11	TGCCCGTCGT	10
OPG-13	CTCTCCGCCA	10
OPG-16	AGCGTCCTCC	10
OPF-01	ACGGATCCTG	10
OPF-02	GAGGATCCCT	10
OPF-03	CCTGATCACC	10
OPF-04	GGTGATCAGG	10
OPF-05	CCGAATTCCC	10
OPF-06	GGAATTCGG	10
OPF-07	CCGATATCCC	10
OPF-08	GGGATATCGG	10
OPF-09	CCAAGCTTCC	10
OPF-10	GGAAGCTTGG	10
OPF-11	TTGGTACCCC	10
OPF-12	ACGGTACCAG	10
OPF-13	GGCTGCAGAA	10

OPF-14	TGCTGCAGGT	10
OPF-17	AACCCGGGAA	10
OPF-18	TTCCCGGGTT	10
OPA-01	CAGGCCCTTC	10
OPA-02	TGCCGAGCTG	10
OPA-05	AGGGGTCTTG	10
OPA-06	GGTCCCTGAC	10
OPA-07	GAAACGGGTG	10
OPA-08	GTGACGTAGG	10
OPA-09	GGGTAACGCC	10
OPA-10	GTGATCGCAG	10
OPA-11	CAATCGCCGT	10
OPA-12	TCGGCGATAG	10
OPA-13	CAGCACCCAC	10
OPA-14	TCTGTGCTGG	10

De los 38 primers se seleccionaron siete, estos mostraron bandas claras y reproducibles, se obtuvieron 49 bandas distintas y 20 polimórficas (Figura 6,7).

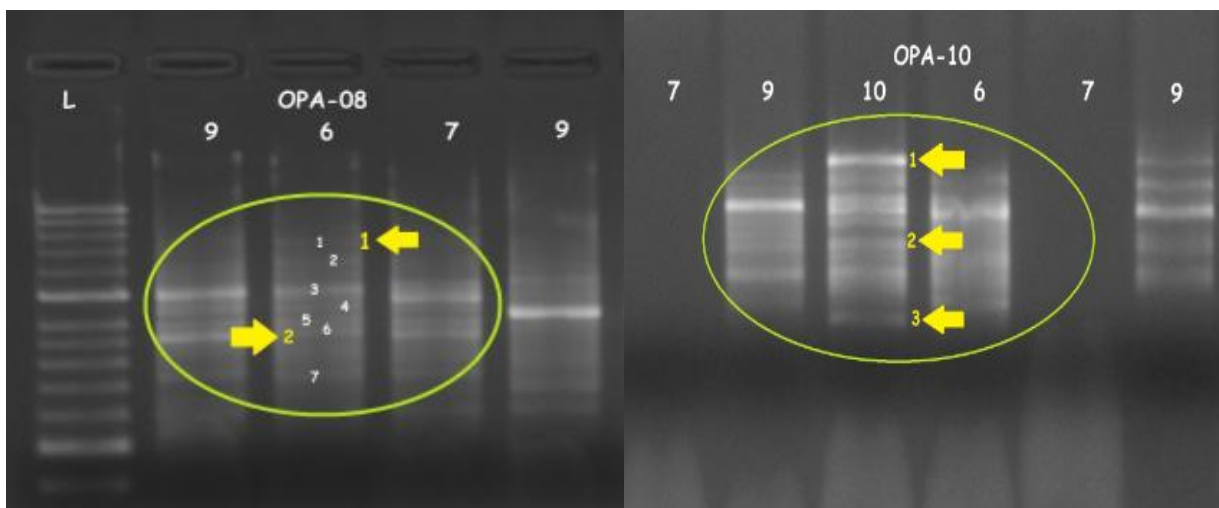


Figura 6. Polimorfismos detectados con el primers OPA-08. El número de bandas se han enumerado en número consecutivo.

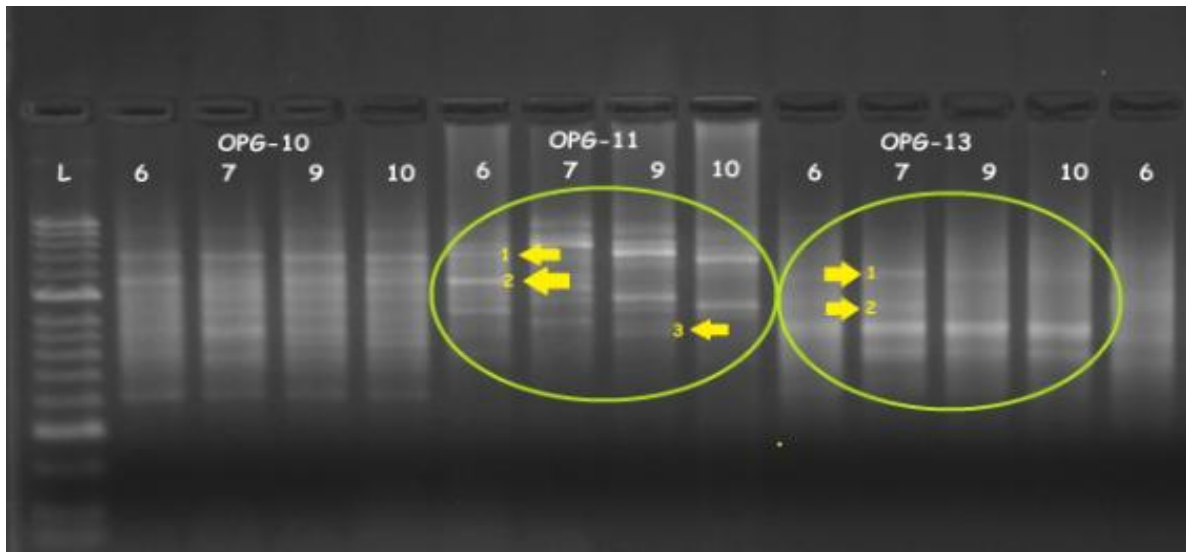


Figura 7. Polimorfismos detectados con el primers OPG-11 y OPG-13.

La figura 6 y 7 muestra los polimorfismos detectados por algunos primers seleccionados. El número de polimorfismos se indican con números en color amarillo.

Cuadro 3. Lista de los 7 primers seleccionados.

Selección de primers						
#	Primers	# Bandas (total)	# Bandas Polimórficas	Tamaño de las bandas en pb		
1	OPA-07	7	2	300	600	200
2	OPA-08	7	2	100	100	200
3	OPA-11	8	3	50	100	50
4	OPG-05	9	4	200	500	100
5	OPG-09	7	3	100	200	200
6	OPG-11	4	3	200	500	100
7	OPF-07	7	3	200	100	200
Total		49	20			

La reproducibilidad de los primers fue comprobado con tres repeticiones de 4 individuos de *P. maximartinezii* (Figura 8 y 9). Los siete primers seleccionados no fueron probados para comprobar su reproducibilidad en las poblaciones de *P. pinceana*, a esto se le atribuye que la amplificación en PCR en esta especie no fue muy favorable.

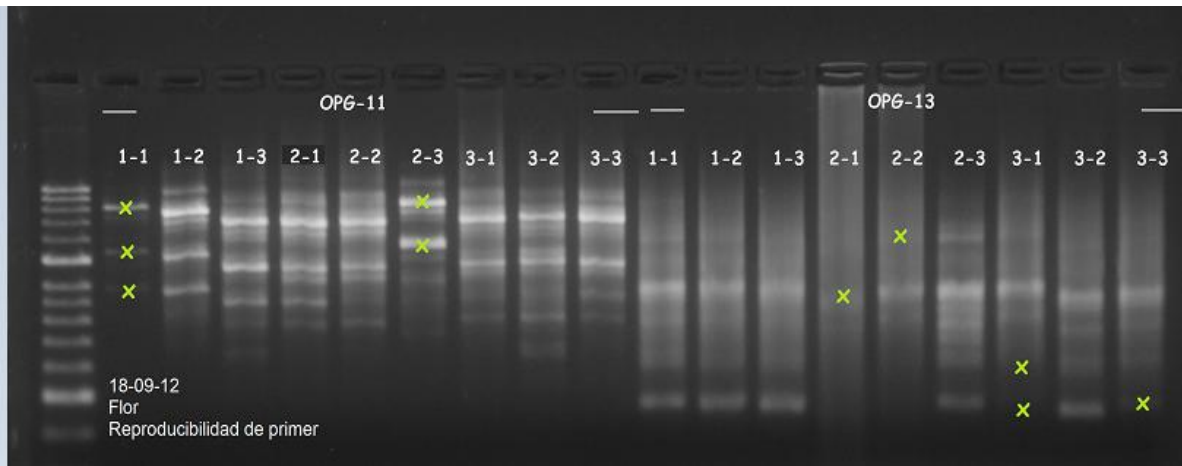


Figura 8. La imagen muestra la reproducibilidad del primers OPG-11, en 3 diferentes individuos con tres repeticiones.

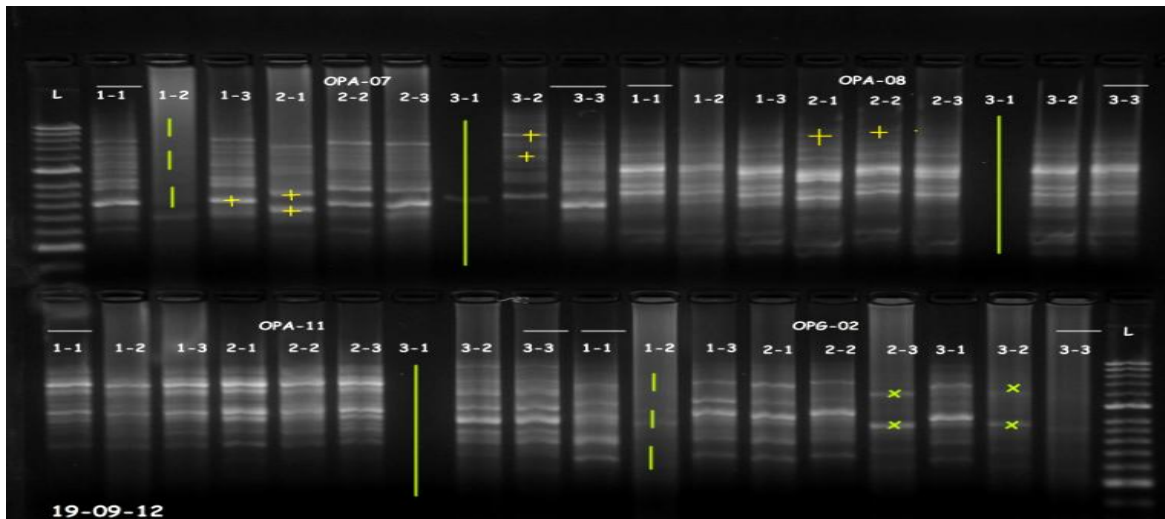


Figura 9. Muestra la reproducibilidad de algunos primers seleccionados para el estudio. OPA-11, OPA-07 y OPA-08.

El análisis final se realizó con cuatro con primers (OPA-07, OPA-08, OPG-05 y OPG-9). Estos nos dieron un total de 44 alelos diferentes y 11 polimórficos (Figura 10).

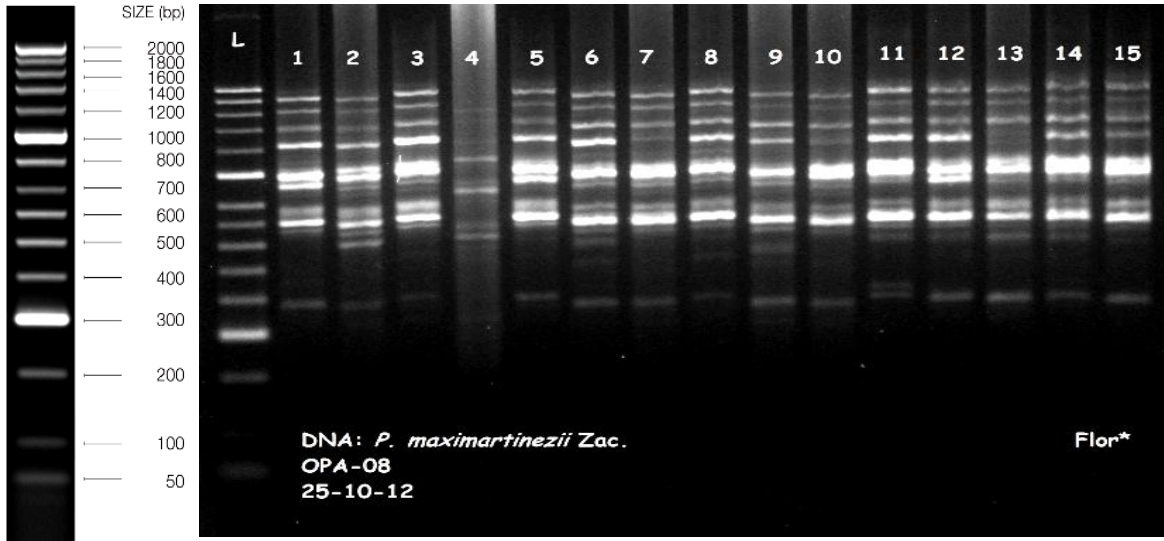


Figura 10. La imagen muestra los fragmentos amplificados con PCR, primer OPA-08, en individuos de *Pinus maximartinezii*.

6.2 Variación Genética

6.2.1 *Pinus maximartinezii*

Se encontraron niveles de variación genética relativamente altos (Cuadro 4). La población de *P. maximartinezii* (Durango) presento mayores niveles de diversidad ($H_E= 0.303$; %P= 86.36) a diferencia de la población de *P. maximartinezii* (Zacatecas) ($H_E= 0.188$; %P= 50.00). En general los valores que se obtienen son generalmente mayores con respecto al promedio que se reporta con isoenzimas en *P. maximartinezii* ($H_E= 0.137$; Ledig *et al.*, 2001) y con SSRcp ($H_E= 0$, Delgado, 2002). De manera general, el promedio de la heterocigosidad

encontrada para *Pinus* es de $H_E = 0.251$ con isoenzimas y $H_E = 0.296$ con microsatélites. Piñero, D., *et al.* (2008).

Cuadro 4. Cuadro de comparación de medias y desviación estándar en alelos en *Pinus maximartinezii*.

Población		N	Na	Ne	I	He	UHe
Durango	Media	15.000	1.841	1.503	0.456	0.303	0.314
	σ	0.000	0.065	0.046	0.034	0.024	0.025
Zacatecas	Media	15.000	1.159	1.328	0.277	0.188	0.194
	σ	0.000	0.138	0.059	0.045	0.032	0.033

Na= Número de alelos diferentes, Ne = número de alelos efectivos, I = índice de de Shannon, He = heterocigosidad esperada, UHe = heterocigosidad imparcial esperada.

El grado de diversidad de este taxón, medida por el índice de Shannon (Shannon 1948) fue de 0.366. El análisis de varianza se realizó utilizando con el análisis estadístico AMOVA (cuadro 5 y Figura11). Los resultados indican que no existe variación dentro y/o entre las dos poblaciones de *P. maximartinezii*.

Cuadro 5. Análisis estadístico AMOVA

AMOVA					
Población	df	SS	MS	Est. Var.	%
entre p.	1	92.167	92.167	5.763	50%
dentro p.	28	160.000	5.714	5.714	50%
Total	29	252.167		11.478	100%

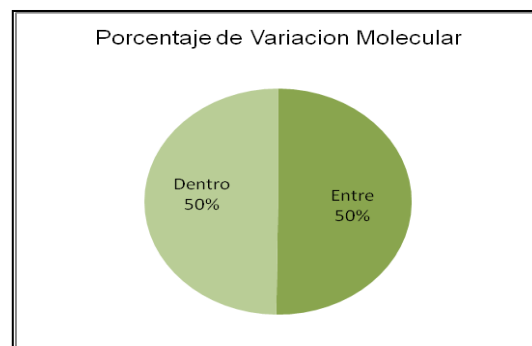


Figura 11. Porcentaje de Variación Molecular en *P. maximartinezii* dentro y entre población; análisis estadístico AMOVA.

6.2.2 *P. maximartinezii* y *P. pinceana*

Los niveles de variación genética en *P. pinceana* fueron (Cuadro 6). La Zarca ($H_E= 0.291$; %P=83.33); La Yesera ($H_E= 0.153$; %P=50.00). En *P. maximartinezii*; Localidad Durango ($H_E= 0.257$; %P= 76.67); Localidad Zacatecas ($H_E= 0.218$; %P= 56.67). Los mayores niveles de variación y el mayor número de loci polimórficos se obtuvo en *P. pinceana*, localidad La Zarca ($H_E= 0.291$; %P=83.33). Este valor es relativamente alto en comparación con el promedio de polimorfismo registrado en varias especies de *Pinus* (65.6%) (Ledig *et al.*, 1999); H_E promedio en *Pinus*, 0.251 con isoenzimas y $H_E=0.296$ con microsatélites; para *Abies* $H_E= 0.0975$ y para *Picea* $H_E= 0.110$ (Piñero, D., *et al.* 2008).

Cuadro 6. Cuadro de comparación de medias y desviación estándar en alelos de *P. maximartinezii* y *P. pinceana*.

Población		N	Na	Ne	I	He	UHe	%P
Durango	Media	15.000	1.700	1.418	0.389	0.257	0.266	76.67
	σ	0.000	0.109	0.058	0.047	0.033	0.034	
Zacatecas	Media	15.000	1.333	1.386	0.321	0.218	0.226	56.67
	σ	0.000	0.154	0.074	0.056	0.039	0.041	
La Zarca	Media	15.000	1.667	1.476	0.439	0.291	0.301	83.33
	σ	0.000	0.138	0.056	0.042	0.030	0.031	
La Yesera	Media	15.000	1.000	1.237	0.239	0.153	0.158	
	σ	0.000	0.186	0.053	0.047	0.031	0.032	50.00

Na= Número de alelos diferentes, Ne = número de alelos efectivos, I = índice de Shannon, He = heterocigosidad esperada, UHe = heterocigosidad imparcial esperada; %P= loci polimórficos.

6.3 Distancia Genética

6.3.1 *Pinus maximartinezii*

El grado de distancia genética calculada mediante distancia genética de Nei entre las dos poblaciones de *P. maximartinezii* fue de 0.367. El valor es bajo; en la literatura esto se traduce en que “la existencia de distancias genéticas pequeñas puede deberse a que la separación de las poblaciones es reciente” (Trejo 2006), y con base en la hipótesis de que la población de *P. maximartinezii* de Zacatecas pudiera haber surgido hace pocas generaciones (menos de 1000 años) a partir de una semilla (Ledig *et al.*, 1999). Con estos resultados, se deja abierta la posibilidad de que la población de Durango sea anterior a la de Zacatecas. Ambos rodales se localizan en una misma región hidrológica (Lerma-Santiago), de tal manera que cabe la posibilidad de una dispersión por aves hace pocos cientos de años. (González-Elizondo *et al.*, 2011). La población de Durango mostro un porcentaje de polimorfismo de 86.36%, y la de Zacatecas 50.00%. El valor promedio de loci polimórficos para *P. maximartinezii* es de 68.18%. Este valor es relativamente mayor de lo registrado en poblaciones de pino 65.6% (Ledig *et al.*, 1999), basado en 91 estudios que incluyeron 42 especies de pinos y 62.5% en Abetos en 22 estudios con nueve especies (Ledig *et al.*, 1997).

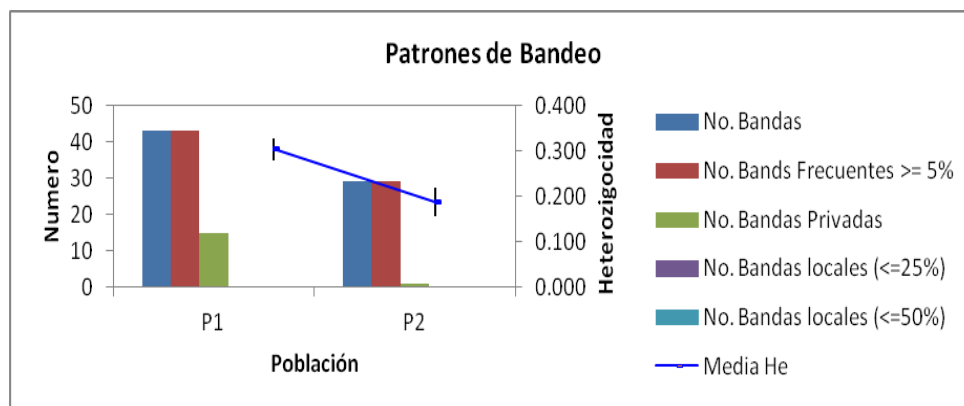


Figura 12. Muestra los patrones totales de bandeo en *Pinus maximartinezii*. (1) Durango;(2) Zacatecas.

(Figura 12) muestra que el mayor número de bandas se presenta en la población de Durango, 49 bandas contra 29 de la localidad de Zacatecas. El mayor número de alelos privados o polimorfismo privado también se registraron para la localidad de Durango, los alelos privados se dan en las frecuencias > 1% y menor 99% en una sola población o región. La Heterocigosidad también es mayor en la población de Durango con un valor de 0.300 contra 0.100 para Zacatecas.

6.3.2 *P. maximartinezii* y *P. pinceana*

El segundo análisis se realizó únicamente con tres primers (OPA-07, OPG-05 y OPG-09). En este análisis se eliminó el primer OPA-08, debido a su baja amplificación en las muestras de *P. pinceana*. Los valores encontrados de distancias genéticas en *maximartinezii* y *P. pinceana* se muestran en el cuadro 7.

Estos valores indican que la mayor distancia genética se presenta entre las dos poblaciones de *P. maximartinezii*. También se observa que la distancia entre la población de *P. maximartinezii* (Zacatecas) y la población de *pinceana* del cañón de la Yesera, S.L.P, el sitio geográficamente más cercano a la población de *P. maximartinezii* de Zacatecas, es la que presenta mayor distancia genética. Lo anterior confirma lo encontrado y registrado por Ledig *et al.*, 2001. Su interpretación fue que, a pesar de que la población de *P. pinceana* de la Yesera es la más cercana geográficamente a la de *P. maximartinezii* (Zacatecas), ambas especies están en diferentes cordilleras, separadas por la Meseta Central árida de México, mientras que la menor distancia genética es con *P. pinceana* del Cañón de La Laja, ya que esa zona está conectada con el sur de la Sierra Madre Occidental por una ruta de migración más directa “ya que las provincias morfotectónicas de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental están en contacto en el extremo norte de la Sierra Madre Oriental (Ferrusquía-Villafranca, 1993)”.

Cuadro 7. Distancia Genética de Nei en cuatro poblaciones: *P. maximartinezii* y *P. pinceana* (1) La Muralla Durango, (2) Cerro de Piñones, Zac., (3) La Zarca Dgo., (4) La Yesera S.L.P.

	(1)	(2)	(3)	(4)
	0.000			(1)
	0.358	0.000		(2)
	0.225	0.290	0.000	(3)
	0.329	0.347	0.188	0.000 (4)

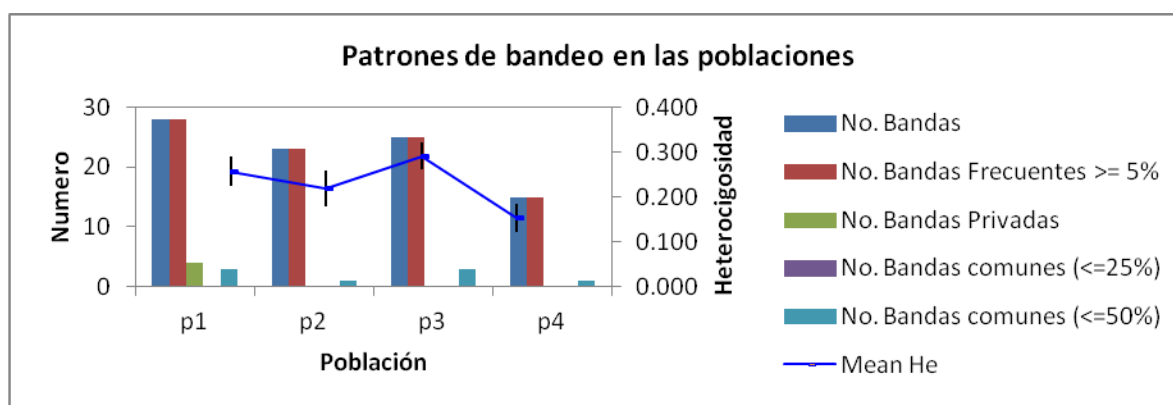


Figura 13. Muestra los patrones totales de bandeo en dos especies: *Pinus maximartinezii* (p1) Durango;(p2) Zacatecas; *Pinus pinceana* (p3) La Zarca; (p4) La Yesera.

Los patrones de bandeo de la población de *P. maximartinezii* Durango y *Pinus pinceana* localidad La Zarca son similares; en las dos poblaciones se presentan bandas comunes y los valores más altos de heterocigosidad. *P. maximartinezii* localidad Durango es la única que presenta bandas privadas. Los resultados similares en alelos comunes puede confirmar lo registrado en estudios moleculares con *P. pinceana*, donde las dos especies se encuentran cercanamente emparentadas (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995). Cabe mencionar que estas dos localidades se encuentran cercanas geográficamente.

VII CONCLUSIONES

La variación genética dentro y entre las poblaciones de *P. maximartinezii* es alta, en comparación en otras coníferas, sobresaliendo la localidad de Durango.

El grado de diferenciación genética encontrada en *P. maximartinezii* fue baja, pero mayor a los valores registrados para otras especies de coníferas. La poca distancia genética entre las dos poblaciones puede traducirse en una separación de las dos poblaciones hace pocas generaciones.

El grado de diferenciación sugiere que a pesar de que las dos poblaciones de *P. maximartinezii* tienen una distribución restringida y aislada, el flujo de genes entre las poblaciones que tiene en la actualidad no conducen a la pérdida dramática de variación genética y a la diferenciación de la población.

Los resultados moleculares obtenidos en este trabajo con respecto a *P. maximartinezii*, indican que todos los alelos encontrados en la población de Durango se encuentran en la localidad de Zacateca. Con base a estos resultados obtenidos se generan dos posibles hipótesis.

1.- En algún momento estas dos poblaciones estuvieron de alguna forma conectadas y a causas de la fragmentación estas dos poblaciones se separaron recientemente

2.- Las dos poblaciones de *P. maximartinezii* actualmente están separadas y la marcada reducción de alelos en loci polimórficos que se presenta en la población de Zacatecas pudo haber sido reducida a un cuello de botella extremo y la población actual de zacatecas proviene de una sola semilla donde resurgió rápidamente.

VIII RECOMENDACIONES

Se requiere ampliar la información hasta ahora obtenida con este trabajo, esto significa analizar el mayor número de alelos con los demás primers que han sido seleccionados.

Se recomienda ampliar el estudio con mayor número de localidades de *Pinus pinceana*; esto nos ayudara a obtener una representación más amplia de la situación genética de esta especie en su área de distribución natural.

Desarrollar estrategias de Conservación *in situ* en las dos poblaciones de *P. maximartinezii*; tratándose de una especie en peligro de extinción y de distribución restringida a la Sierra Madre Occidental es de gran importancia conservar sus recursos genéticos.

Las plantaciones son una alternativa de conservación *ex situ*, muy importante, especialmente cuando se trata de especies que tienen una distribución natural muy restringida o en los casos donde el hábitat de la especie se encuentra seriamente amenazado.

.

.

IX LITERATURA CITADA

- Ahuja, MR. 2001. Recent advances in molecular genetics of forest trees. *Euphytica* 121: 173-195.
- Anónimo. 2010a. International Union for Conservation of Nature (IUCN) red list of threatened species: version 2010.4. Consultado el 10 de diciembre de 2010. (En línea). <http://www.iucnredlist.org>.
- Anónimo. 2010b. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, segunda sección, México, D.F. pp. 1-77.
- Bucci, G.; Binelli, G. and Menozzi, P. 1995. Identification of a New Set of Molecular Markers in Norway spruce as Revealed by Random Amplification Techniques. In: Baradat Ph., Adams W.T., Muller-Starck, G. (eds.), *Population Genetics and Gene Conservation*, SPB Academic Publishing, The Hague the Netherlands. pp. 121-127.
- Caballeros, M y R. Ávila 1989. Importancia actual y potencial de los piñoneros en México. In: Flores, J.D., L.J. Flores, M.E. García y R.H Lira (comp.). *Memorias del II Simposio Nacional sobre pinos piñoneros*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias. Saltillo, Coahuila. pp. 18-22.
- Cronquis, A. 1977. *Introducción a la botánica*. Edit. C.E.C.S.A. Segunda edición. Mexico. pp. 742-784.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.

- Eguiluz P., T. 1977. Los pinos del mundo. Publicación Especial 1, Depto. de Bosques., E.N.A, Chapingo. México. p. 74.
- Eguiluz P., T. 1978. Ensayo de la integración del conocimiento sobre el género *Pinus* en México. Tesis de Licenciatura. Depto. De Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, México. pp. 71-76.
- Eguiluz P., T. 1982. Clima y distribución del genero *Pinus* en México. Rev. Ciencia Forestal. I.N.I.F., S.A.R.H. México Origen 38 (7): 31-43.
- Eguiluz P., T. 1987. Estado actual del conocimiento de los piñonares. En: I Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros. Facultad de Silvicultura., U.A.N.L. Reporte Científico 2:1-18. Linares, Nuevo León. México.
- FAO, 2001. Forest Genetic Resources Bulletin. Versión 029. (En línea). <http://www.fao.org/docrep/004/y2316s/y2316s00.htm>.
- Favela L., Susana. Population Variation In the Endemic *Pinus culminicola* detected by RAPD; Polibotánica. (En línea).
- Favela Lara, S., C.G. Velasco Macías y G. J Alanís Flores, 2009. *Pinus pinceana* (*pinaceae*) Nuevo registro para el estado de Nuevo León, México Journal of the botanical Research Institute on Texas. 3 (2):771-774.
- Ferreira, M., and D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, D. F.
- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: island populations. Conservation Biology 12: 665-675.
- García M., E. 1985. Estado actual del conocimiento de los piñoneros. En: I Simposio Nacional sobre Piñoneros. Facultad de Silvicultura., U.A.N.L. Reporte Científico 2: 1-18. Linares, Nuevo León. México.

García M., EE. 1985. Estado actual del conocimiento de los piñonares En: I Simposio Nacional sobre los pinos Piñoneros. Facultad de Silvicultura., U.A.N.L., reporte Científico 2: 1-18 Linares, Nuevo León. México.

García, E. 1987. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen (adaptado a las condiciones de la Republica Mexicana). 4ª. Ed. Instituto de geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 217 p.

Gernandt, D. S., A. Liston y D. Piñero. 2003. Phylogenetics of *Pinus* subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* inferred from cpDNA sequences. Syst. Bot. 28:657-673.

González, M., M.S. González, L. Ruacho y Molina. 2011. *Pinus maximartinezii* Rzed. (*pinaceae*), primer registro para Durango, segunda localidad para la especie. Acta Botánica Mexicana 96: 33-48.

Goor, A.Y. and Barney, C.W. 1976. Forest Tree Plantina in ARID Zones, Second Edition. The Ronald Press Company, New York. 504 pp.

Hartl, D. L. y A. G. Clark, 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, M.A.

Hedrick, P. W, 2000. Genetics of Populations. USA, Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusets.

<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=62114250005>>

Iglesias, L. y García, J. 1999. Principales avances en el estudio de la diversidad genética en árboles mediante el uso de marcadores moleculares. Forestal Veracruzana 1 (2): 51-56.

Lanner, M.R.1981. The Pinyon Pine. A natural and cultural history. Univ. of Nevada Press, Reno, Nevada. U.S.A. p.108.

- Ledig, F.T., M.T. Conkle, B. Bermejo, T. Eguluz, P. Hodgskiss, D. R. Johnson, y W.S Dvorak.1999. Evidence for an extreme bottleneck in rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53 (1):91-99.
- Little E. L. 1987. Los pinos piñoneros de los Estados Unidos: Su pasado y su futuro. En: II Symposium Nacional sobre Pinos Piñoneros. División de Ciencias Forestales Universidad Autónoma Chapingo, México. pp. 56-59.
- Little Jr., E. and B. Crichfield.1969. Subdivision for the genus *Pinus*. U.S.D.A. Forest Service. Misc. Pub.1144 Wash., D.C., U.S.A. 51 pp.
- López Mata, L., I.G. Galván Escobedo. 2011. Extracción de semillas de *Pinus maximartinezii* y sus consecuencias poblacionales. *CONABIO. Biodiversitas*, 98:1.
- Lu., M.Z.; Wang, X. R. and Szmidt, A. E. 1997.Molecular properties of RAPDs in *Pinus sylvestris* L and their implications for genetic analysis. *For. Gen.* 4:227-234.
- Neale, D.B. and Sederoff, R.R. 1991. Genome mapping in pines takes shape. *Probe.* 1: 1-3.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. USA.
- Nybom, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Otero., A. A., M. De la Cruz y K. Oyama, 1999. El uso de los RAPD's como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 85-117.
- Palacios Vázquez, A. L. 2008. Cultivo in vitro de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. Tesis ingeniero en Restauración Forestal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 54 pp.

- Parker, P. G., A. Snow, G. Booton, M. Schung y P. Fuerst, 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79(2):361-382.
- Passini P., F.1985. Structure et regeneration the formations ligneuses a *Pinus maximartinezii* Rzed. Mexique bull. Soc. Bot. Fr, 32, lettres bot. (4-5) 327-339.
- Pavel and Vasile *BMC Bioinformatics* 2012.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* In press.
- Pérez de la Rosa, J., S. A. Harris y A. Farjon. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theor Appl. Genet.* 91: 1101-1106.
- Perry J., P. 1990. The pines of México and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. U.S.A. 163 pp.
- Picó, F. X.; Quintana A., P. F. Mayo 2005. Análisis de factores demográficos y genéticos para la conservación de poblaciones de plantas en un hábitat fragmentado. *Ecosistemas.* 14 (2): 1697-2473, pp. 109-115.
- Piñero, D., et al. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad.* Conabio, México, pp. 437-494.
- Price R., A.; A. Liston y S.H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematic of pines, en D.M. Richardson (ed.), *Ecology and biogeography of Pinus.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 48-98.
- Robert, M. F. 1977. Notas sobre el estudio ecológico fitogeográfico de los bosques de *Pinus* Central de Zucc, en México. *Ciencia Forestal,* 2 (10): 48-58.

- Rzedowski R., J. 1964. Una nueva especie de pino piñonero del Estado de Zacatecas (México). *Ciencia* XXIII (2):17-21.
- Rzedowski R., J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México. 432 pp.
- Saccheri, I., M. Kuussaari, M. Kankare, P. Vikman, W. Fortelius And I. Hanski 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H. A. Erlich, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sánchez V., A. 1986. *Conservación biológica en México (Perspectivas)*. División de Ciencias Forestales. U.A.CH. Chapingo, México.136 pp.
- Sánchez V., A. 1986. *Conservación biológica en México (Perspectivas)*. División de Ciencias Forestales. U.A.CH. Chapingo, México. 136 pp.
- Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion *Nature Reviews Genetics* 5: 63-69.
- Soltis D., E. and P. S. Soltis, 1989. *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland,Or.
- Toledo J., V. 1988. La biodiversidad biológica de México. *Rev. Ciencia y desarrollo*. CONACYT. México. 23 (42): 17-30.
- Trejo H., Laura 2006. *Genética de poblaciones de Agave striata*. Tesis obtener el grado de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas-UNAM, México.
- Universidad Autónoma de Nuevo León.1985. Memoria: Primer Simposio Nacional sobre Pinos piñoneros; Linares Nuevo León, México.

- Villareal Q., J. A., J.A. Mares Arreola., E.H. Cornejo Oviedo y M.A Capo Arteaga. 2009. Estudio florístico de los piñonares de *Pinus pinceana*. Acta botánica mexicana. N° 89:87.
- Westemeier, R. L., J. D. Brawn, S. A. Simpson, T.L. Esker, R.W. Jansen, J.W. Walk, E. L. Kershner, J.L. Bouzat, And K.N. Paige. 1998. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. Science 282: 1695-1698.
- Williams, J. G. K.; A. R., Kubelik, k. J., Livak, J.A. Rafalski, S.V., Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6231-6235.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-354.
- Wu, J.; Krutovskii, K.V. and Strauss, S.H. 1999. Nuclear DNA diversity, population differentiation and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. Genome. 41: 893-908.
- Young, A. G. y Clarke, G. M. 2000. Genetics, demography and viability of fragmented populations. Pres, Cambridge, UK. Cambridge University. 421 pp.
- Zavarin, E. y K. Snajberk. 1987. Monoterpene differentiation in relation to the morphology of *Pinus culminicola*, *Pinus nelsonii*, *Pinus pinceana* and *Pinus maximartinezii*. Bioch. Syst. Ecol. 15: 307-312.
- Zhang, Z. Y. y D. Z. Li. 2004. Molecular phylogeny of section *Parrya* of *Pinus* (*Pinaceae*) based on chloroplast mark gene sequence data. Acta Botanica 46(2): 171-179.