



ARTÍCULO / ARTICLE

VARIACIÓN GENÉTICA DE DOS ÁREAS SEMILLERAS DE PINO ESTABLECIDAS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN

GENETIC VARIATION IN TWO PINE SEED NATURAL STANDS ESTABLISHED IN MICHOACÁN STATE

Patricia Delgado Valerio¹, Joaquín Núñez Medrano¹,
Ma. Carmen Rocha Granados³ y H. Jesús Muñoz Flores²

RESUMEN

En México se han establecido más de 200 áreas semilleras; sin embargo, muchas de ellas están abandonadas o sin manejo. El conocimiento genético de árboles productores de semillas es esencial en la obtención de planta de mejor calidad para las actividades de reforestación y conservación de los recursos. El objetivo central del presente trabajo fue evaluar los niveles de variación genética en dos áreas semilleras de *Pinus montezumae* y *Pinus pseudostrabus* establecidas en el estado de Michoacán, con base en el uso de cinco microsatélites nucleares. Los resultados indican que *P. pseudostrabus* contiene un mayor número de alelos ($A= 19$) que *P. montezumae* ($A= 18$). En el primero, el promedio de la heterocigosis observada fue superior a la esperada ($H_o= 0.290$, $H_e= 0.277$); por el contrario, en *P. montezumae* la heterocigosis promedio resultó más alta ($H_o= 0.246$, $H_e= 0.274$). Para ambas especies ninguno de los valores se desvió significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg. *P. pseudostrabus* presentó el tamaño efectivo más grande ($N_e= 805$) que *P. montezumae* ($N_e= 492$), con un nivel de endogamia no significativo ($F= -0.031$ en *P. pseudostrabus* y $F= 0.103$ en *P. montezumae*). Por tanto, se considera que no existe ningún efecto importante de consanguinidad entre los árboles de cada área semillera y que contienen individuos con el acervo genético representativo de los dos taxa. Finalmente, se plantea una propuesta para recolectar semillas de árboles específicos para cada taxon.

Palabras clave: Áreas semilleras, endogamia, heterocigosis, microsatélites nucleares, *Pinus*, variación genética.

ABSTRACT

More than 200 seed natural stands have been established in Mexico. However, nowadays many of them are abandoned or do not have a proper management. Genetic knowledge at the molecular level of seed trees is essential for the production of better plant quality, to ensure success in reforestation and conservation of genetic resources. The central objective of this study was to assess the levels of genetic variation in two seed stands of *Pinus montezumae* and *Pinus pseudostrabus* established in the state of Michoacán, screened with five nuclear microsatellite molecular markers. Results show that *P. pseudostrabus* contains a greater number of alleles ($A= 19$) than *P. montezumae* ($A= 18$). In *P. pseudostrabus*, the average observed heterozygosity was higher than the expected heterozygosity ($H_o= 0.290$, $H_e= 0.277$), whereas in *P. montezumae* the expected heterozygosity was higher ($H_o= 0.246$, $H_e= 0.274$). However, none of the values deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium. The effective size of *P. pseudostrabus* was higher ($N_e= 805$) than that of *P. montezumae* ($N_e= 492$), with a non-significant inbreeding level ($F= -0.031$ in *P. pseudostrabus*; $F= 0.103$ in *P. montezumae*). Therefore, it can be considered that there is no significant effect of consanguinity between the trees of each seed stand and those containing individuals with the gene pool representative of the two species. Finally, a proposal to obtain seeds of particular trees to each species is presented here.

Key words: Seed stand, inbreeding, heterozygosity, nuclear microsatellites, *Pinus*, genetic variation.

Fecha de recepción / date of receipt: 30 de octubre de 2012; Fecha de aceptación / date of acceptance: 13 de mayo de 2013.

¹ Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Correo-e: dvalerio@umich.mx

² Campo Experimental Uruapan. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. INIFAP.

INTRODUCCIÓN

En el estado de Michoacán los bosques de coníferas ocupan más de 1 355 739 millones de hectáreas (Conafor, 2005), las cuales se conforman por 26 especies que corresponden a seis de los nueve géneros de coníferas existentes en México: *Pinus*, *Abies*, *Juniperus*, *Podocarpus*, *Cupressus* y *Taxodium* (Madrigal-Sánchez, 1982; Farjon y Styles, 1997). El estado el género *Pinus* cuenta con 17 especies, tres variedades y dos formas (Madrigal-Sánchez, 1982). No obstante, en la actualidad *P. pseudostrobus* Lindl., *P. montezumae* Lamb., *P. pseudostrobus* Lindl. subsp. *protuberans* Martínez (Silba), *P. michoacana* f. *procera* Martínez; *P. ayacahuite* var. *veichtii* Shaw, *Pinus herrerae* Martínez están amenazadas de extinción local (Cofom, 2012; Delgado, 2002); mientras que *P. rzedowskii* Madrigal & M. Caball. y *P. martinezii* Larsen (Delgado *et al.*, 1999; CITES, 2002) lo están de manera total, debido a diferentes factores relacionados con la sobreexplotación de los bosques, el cambio de uso de suelo, los incendios forestales y el incremento de los asentamientos urbanos. En consecuencia, el desarrollo de programas para su manejo y conservación se torna prioritario.

En los criterios empleados para la conservación *in situ* de los recursos genéticos se incluye a las áreas productoras de semillas, las cuales se definen como rodales superiores que de forma obligatoria son aclareados y mejorados a través de la remoción de los árboles indeseables, y cuyo manejo está dirigido a una producción abundante y pronta de semillas (Snyder, 1972). Así, además de actuar como reservorios naturales de material genético nativo permiten un manejo y uso sustentable del recurso.

En México se han establecido más de 200, algunas de ellas tienen registro de Unidades Productoras de Germoplasma (Conafor, 2012). La mayoría corresponden a coníferas, en particular al género *Pinus* (Plancarte y Eguiluz, 1991; Clausen *et al.*, 1994; Flores, 2000; Aguilera, 2001). En dichas áreas están representadas las especies de mayor importancia económica, cuya distribución comprende las sierras Madre Occidental, Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal; sin embargo, por problemas de continuidad en los programas, actualmente están abandonadas (Mesén, 2003).

En el estado de Michoacán uno de los principales esfuerzos de manejo y recolección de semillas forestales lo ha realizado la Comisión Forestal del Estado (Cofom), mediante la implementación, desde la década de 1970, de programas orientados a la recolección de semillas de coníferas con fines de producción de planta para reforestación, en diferentes localidades o rodales semilleros para varios taxa de pinos (Guzmán *et al.*, 1979). No obstante, los criterios de recolección se han basado, en gran medida, en los árboles que presentan la mayor cantidad de conos, en características dasonómicas generales: edad, altura y diámetro copa, y no en normas de selección fundamentadas en aspectos genéticos o fisiológicos (Wang y Beardmore, 1997). Por lo tanto, no existe algún estudio que indique si los árboles de las áreas y rodales semilleros poseen la variabilidad

INTRODUCTION

Coniferous forests occupy more than 1 355 739 000 hectares in the state of Michoacán (Conafor, 2005), which are comprised of 26 species that belong to six of the nine existing genus of hardwoods in Mexico: *Pinus*, *Abies*, *Juniperus*, *Podocarpus*, *Cupressus* and *Taxodium* (Madrigal-Sánchez, 1982; Farjon and Styles, 1997). The status of the *Pinus* genus has 17 species, three varieties and two forms (Madrigal-Sánchez, 1982). However, currently *P. pseudostrobus* Lindl., *P. montezumae* Lamb., *P. pseudostrobus* Lindl. subsp. *protuberans* Martínez (Silba), *P. michoacana* f. *procera* Martínez; *P. ayacahuite* var. *veichtii* Shaw, *Pinus herrerae* Martínez are threatened with local extinction (Cofom, 2012; Delgado, 2002); while *P. rzedowskii* Madrigal & M. Caball. and *P. martinezii* Larsen (Delgado *et al.*, 1999, CITES, 2002) they are in wholly threatened, due to various factors related to the overexploitation of forests, land use change, forest fires and the increase of urban settlements. Consequently, the development of programs for management and conservation becomes a priority.

The criteria used for the *in situ* conservation of genetic resources includes seed production areas, which are defined as superior stands in which it is mandatory to have them cleared-cut and improved through the removal of undesirable trees, and whose management is directed to an abundant and early seed production (Snyder, 1972). Thus, in addition to acting as natural reservoirs of genetic native material, they allow management and sustainable use of the resource.

Mexico has established more than 200, some of them have registration as Seed Production Units (Conafor, 2012). Most of them are comprised by conifers, particularly by the *Pinus* genus (Plancarte and Eguiluz, 1991; Clausen *et al.*, 1994; Flores, 2000; Aguilera, 2001). In these areas are represented the most economically important species whose distribution includes the Sierras Madre Occidental, Oriental and Eje Neovolcánico Transversal (Transversal Neovolcanic Axis); however, by continuity problems, these programs have been abandoned (Mesén, 2003).

In the state of Michoacán, one of the major management efforts and forest seed collection has been made by the State Forestry Commission (Cofom) since the 1970's, through the implementation of programs aimed at collecting seeds of conifers for plant production for reforestation, in different localities or seed stands for various pine taxa (Guzmán *et al.*, 1979). However, collection criteria have been based largely on the trees with the greatest amount of cones, in general mensuration characteristics: age, height and crown diameter, and not in selection rules based upon genetic or physiological aspects (Wang and Beardmore, 1997). Therefore, there are no studies that indicate whether trees and seed plots areas possess the necessary genetic variability in order to avoid inbreeding or consanguinity processes in the seeds that eventually will be used in the production of plants for reforestation.

genética necesaria para no generar procesos de endogamia o consanguinidad en las semillas que, eventualmente, serán usadas en la producción de planta para reforestación.

En la presente investigación se utilizaron herramientas moleculares (microsatélites nucleares) y teóricas de la genética de poblaciones como criterios centrales para la evaluación de dos áreas semilleras de *P. montezumae* Lamb y *P. pseudostrobus* Lindl, localizadas en el estado de Michoacán. Se seleccionó a los microsatélites nucleares por ser altamente polimórficos, codominantes y compatibles con la teoría de la genética de poblaciones (Schaal *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2005). Además, las estimaciones de la variación genética que se han obtenido para seis pinos mexicanos: *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* (Delgado, 2002); *P. oocarpa* Schiede ex Schlecht., *P. tecunummani* Eguliz & Perry, *P. patula* Schiede & Deppe. (Dvorak *et al.*, 2009); *P. caribaea* var. *hondurensis* (Sénécl.) W.H.G. (Delgado *et al.*, 2011); con esos marcadores se han obtenido valores superiores a los determinados con isoenzimas, por lo que son recomendables para efectuar análisis de diversidad genética intrapoblacional. Aunque existen investigaciones que la han evaluado en huertos semilleros de diferentes coníferas en Estados Unidos de América y Europa, tales como *Pinus contorta* Dougl. var. *latifolia* Engelm. (Stoehr y Newton, 2002); *P. radiata* D. Don. (Devey *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2004); *Pinus pinaster* Ait. (Fernandes *et al.*, 2008) y *P. sylvestris* L. (Torimaru *et al.*, 2012), no existen registros formales de su empleo en áreas semilleras naturales. En este contexto el presente trabajo constituye el primer esfuerzo en el que se abordan dos de las especies de pino (*P. montezumae* y *P. pseudostrobus*) de mayor importancia económica en México, las cuales han sido muy explotadas para la comercialización de productos maderables y sus derivados, dentro y fuera del país (Eguliz, 1978; Niembro, 1986; Zamora *et al.*, 2007), y en el desarrollo de plantaciones (Stead, 1983; FAO, 2002), así como en el cultivo masivo de plantas con fines de reforestación (Pronare, 2000; Probosque, 2011).

El objetivo del análisis fue estimar los niveles de variación genética, de endogamia, y el tamaño efectivo de dos áreas semilleras de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* establecidas en el estado de Michoacán. Con los resultados se plantea una propuesta de recolecta de semillas para cada especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio

Las dos áreas semilleras estudiadas, establecidas en 2004, contienen árboles superiores seleccionados fenotípicamente (Muñoz *et al.*, 2008); la de *P. pseudostrobus* se ubica en la comunidad indígena de Santa Rosa, municipio Zinapécuaro (19°49'27" latitud norte y 100°3'49" longitud oeste, 900 msnm), y está conformada por un total de 244 árboles adultos (61 árboles ha⁻¹) de 55 años en promedio y 35 m de altura (Figura 1). El área semillera de *P. montezumae* está en Lázaro Cárdenas, municipio

In this study were used molecular tools (nuclear microsatellites) and theoretical population genetics as central criteria for the evaluation of two seed areas of *P. montezumae* Lamb and *P. pseudostrobus* Lindl, located in the state of Michoacán. Nuclear microsatellites were selected as they are highly polymorphic, codominant and compatible with the theory of population genetics (Schaal *et al.*, 1998, Petit *et al.*, 2005). In addition, estimates of genetic variation were obtained for six Mexican pines: *P. montezumae*, *P. pseudostrobus* (Delgado, 2002), *P. oocarpa* Schiede ex Schlecht., *P. tecunummani* Eguliz & Perry, *P. patula* Schiede & Deppe. (Dvorak *et al.*, 2009), *P. caribaea* var. *hondurensis* (Sénécl.) W.H.G. (Delgado *et al.*, 2011); with these markers higher values have been determined by isoenzymes, so, they can be recommended for analysis of genetic diversity within populations. Although there are studies that have evaluated different conifer seed orchards in the United States of America and Europe such as *Pinus contorta* Dougl. var. *latifolia* Engelm. (Stoehr and Newton, 2002), *P. radiata* D. Don. (Devey *et al.*, 2002, Bell *et al.*, 2004), *Pinus pinaster* Ait. (Fernandes *et al.*, 2008), *P. sylvestris* L. (Torimaru *et al.*, 2012), there are no formal records of their use in natural seed production areas. In this context, this paper is the first effort that addresses two pine species (*P. montezumae* and *P. pseudostrobus*) of major economic importance in Mexico, which have been heavily exploited for marketing of timber and its derivatives, inside and outside the country (Eguliz, 1978; Niembro, 1986; Zamora *et al.*, 2007), and in developing plantations (Stead, 1983; FAO, 2002) as well as mass cultivation of plants with for reforestation (Pronare, 2000; Probosque, 2011).

The objective of the analysis was to estimate the levels of genetic variation, inbreeding, and the effective size of two seed areas of *P. montezumae* and *P. pseudostrobus* established in the state of Michoacán. With the results, a proposal for collection of seeds for each species is made.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The two studied natural seed stands, established in 2004, contain phenotypically selected superior trees (Muñoz *et al.*, 2008); that of *P. pseudostrobus* is located in the indigenous community of Santa Rosa, Zinapécuaro municipality (19°49'27" north and 100°3'49" west, 900 masl), and consists of a total of 244 adult trees (61 trees ha⁻¹) of 55 years on average and 35 m high (Figure 1). The *P. montezumae* seed area is found in Lázaro Cardenas Zacapu municipality (19°45'26" north and 101°51'19" west 2 600 masl), and it has 60 adult trees (16 trees ha⁻¹) 53 years old on average and 34 m in height (Figure 1).

Collection of biological material

The biological material in each area was obtained from a random sample, in which individuals were sought at a distance of at least

Zacapu (19°45'26" latitud norte y 101°51'19" longitud oeste, 2 600 msnm), y reúne 60 árboles adultos (16 árboles ha⁻¹) de 53 años en promedio y 34 m de altura (Figura 1).

Recolecta de material biológico

12 m (Muñoz *et al.*, 2008). Tender twigs were collected from 37 *P. pseudostrabus* trees and 27 *P. montezumae* trees, which were stored in labeled plastic bags (date, number and registration of the key individual tree) and then stored at 4° C until processed for DNA extraction.

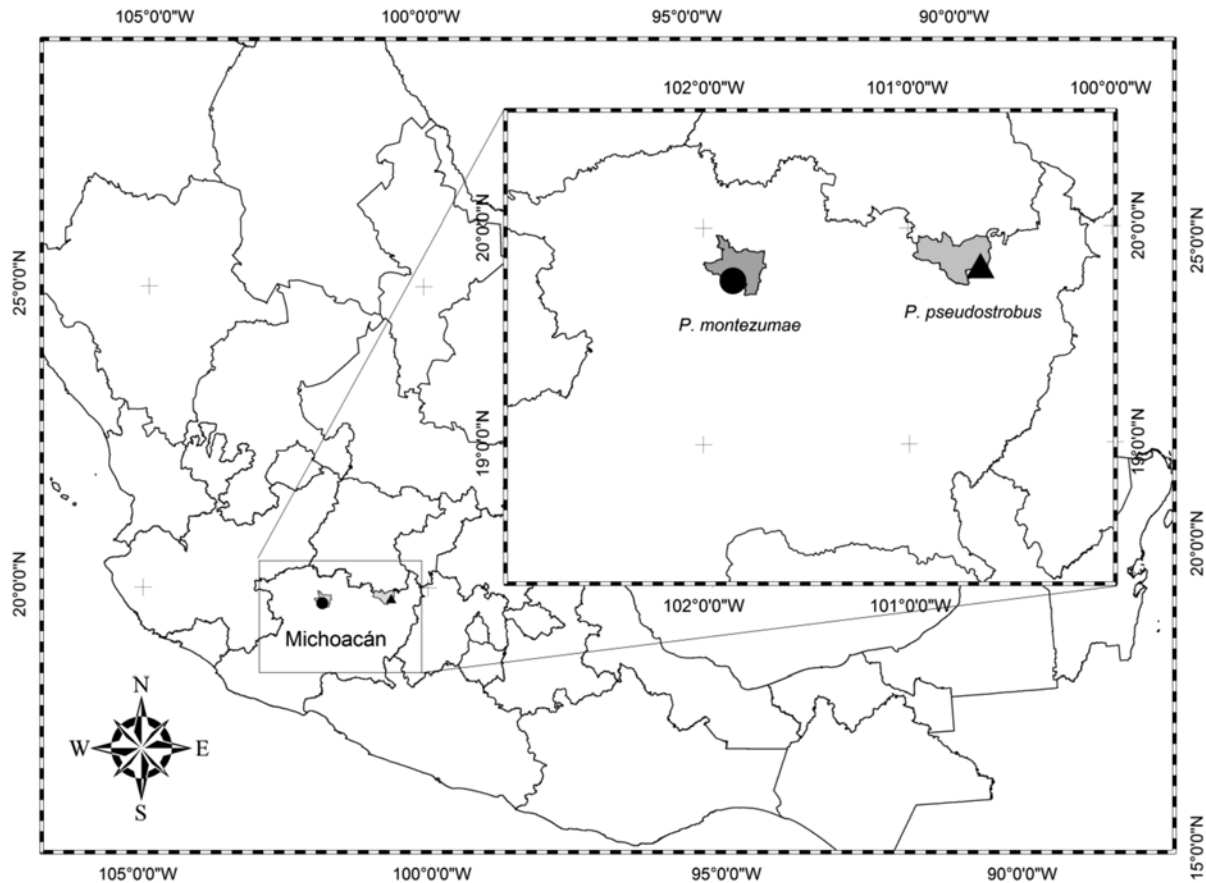


Figura 1. Ubicación geográfica de las áreas semilleras de *P. pseudostrabus* Lindl. y *P. montezumae* Lamb.

Figure 1. Geographic location of of *P. pseudostrabus* Lindl. and *P. montezumae* Lamb.

El material biológico en cada área se obtuvo a partir de un muestreo al azar, en el que se procuró que los individuos estuvieran a una distancia de 12 m como mínimo (Muñoz *et al.*, 2008). Se recolectaron ramillas tiernas de 37 árboles de *P. pseudostrabus* y 27 de *P. montezumae*, que se guardaron en bolsas de plástico etiquetadas (fecha, número de individuo y clave de registro del árbol) y después se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento para la obtención de ADN.

Extracción de ADN y obtención de fragmentos

Se extrajo ADN total a partir de acículas primarias con el método de CTAB-miniprep desarrollado para pinos (Delgado, 2002). Se probaron nueve microsatélites nucleares (nSSR) aislados

DNA extraction and production of fragments

Total DNA was extracted from primary needles with CTAB-miniprep method developed for pine (Delgado, 2002). Nine nuclear microsatellites were tested (nSSR) isolated in *P. taeda* L (Karhu *et al.*, 2000), of which five were polymorphic and reproducible (PiTX3025, PiTX3029, PiTX2123, PiTX3013 and PiTX2037). PCR reactions were performed using the methodology proposed by Elsik *et al.* (2000), which was modified MgCl concentration (4.0 mM). The fragments were separated on polyacrylamide gels 6% (7M Urea) and were run at 55 W for 1.5 to 3.5 h, depending on the size of the fragments. Polymorphisms were visualized with staining method proposed by silver nitrate Echt *et al.* (1996), while determination of the size of the fragments was carried out using a score of 10 bp (Invitrogen) as a reference.

en *P. taeda* L. (Karhu *et al.*, 2000), de los cuales cinco fueron polimórficos y reproducibles (PITX3025, PITX3029, PITX2123, PITX3013 y PITX2037). Las reacciones de PCR se efectuaron con la metodología propuesta por Elsik *et al.* (2000), en la que se modificó la concentración de MgCl (4.0 mμ). Los fragmentos se separaron en geles de poliacrilamida al 6% (7M de Urea) y se corrieron a 55 W durante 1.5 a 3.5 h, en función del tamaño de los fragmentos. Los polimorfismos se visualizaron con el método de tinción de nitrato de plata propuesto por Echt *et al.* (1996); mientras que la determinación del tamaño de los fragmentos se realizó mediante un marcador de 10 pares de bases (Invitrogen) como referencia.

Análisis molecular

A partir de las frecuencias alélicas se obtuvieron los estimadores de la variación genética: promedio de alelos por locus (A), heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e), con la siguiente fórmula (Nei, 1987):

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

Donde:

p_i = Frecuencia promedio del alelo p para todos los loci.

Para verificar si la heterocigosis observada estaba en equilibrio Hardy-Weinberg, se hizo un análisis no paramétrico (10 000 permutaciones) basado en la reconstrucción de tablas de contingencia $K \times K$ (Guo y Thomson, 1992). El contenido de la tabla lo conforman las frecuencias alélicas observadas y K representa el número de alelos.

El índice de endogamia o de fijación (F) se determinó de acuerdo con Wright (1965):

$$F = H_e - H_o / H_e$$

Donde:

H_o = Proporción de heterocigotos observados.

H_e = Proporción de heterocigotos esperados.

Su confiabilidad estadística se valoró con 1 000 permutaciones no paramétricas (Excoffier y Lischer, 2010).

El tamaño efectivo histórico (N_e) de las poblaciones se alcanzó con el parámetro $\theta = 4N_e u$, igual a cuatro veces el tamaño efectivo por la tasa de mutación (Otha y Kimura, 1973). El valor de θ se determinó a través del modelo de mutación de alelos infinitos (MAI) (Weir, 1996) y se asumió una tasa de mutación de 1×10^{-3} (Boys *et al.*, 2005). Todas las estimaciones se hicieron con los programas Arlequin ver. 3.5.3.1 (Excoffier y Lischer, 2010) y GENEPOP (Rousset, 2008).



Molecular analysis

From the allele frequencies were obtained estimators of genetic variation: average number of alleles per locus (A), observed heterozygosity (H_o) and expected (H_e), with the following formula (Nei, 1987):

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

Where:

p_i = P average allele frequency for all loci

To verify whether the observed heterozygosity was in Hardy-Weinberg equilibrium, became a non-parametric analysis (10 000 permutations) based on the reconstruction of contingency tables $K \times K$ (Guo and Thomson, 1992). The contents of the table is made observed allelic frequencies and K represents the number of alleles

The rate of inbreeding or fixing (F) was determined according to Wright (1965):

$$F = H_e - H_o / H_e$$

Where:

H_o = Observed proportion of heterozygous

H_e = Expected proportion of heterozygous

Its statistical reliability was assessed with 1 000 nonparametric permutations (Excoffier and Lischer, 2010).

The historical effective size (N_e) of the population was reached with the parameter $\theta = 4N_e u$ equal to four times the effective size of the mutation rate (Otha and Kimura, 1973). The value of θ is determined by the model of infinite alleles mutation (MAI) Weir, 1996) and assumed a mutation rate of 1×10^{-3} (Boys *et al.*, 2005). All estimates were made with the 3.5.3.1 Arlequin programs (Excoffier and Lischer, 2010) and GENEPOP (Rousset, 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

Genetic variation

Pinus pseudostrubus presented 19 alleles and *P. montezumae* 18, for a total of 23 alleles for both species with an average of 4.6 alleles per locus (Table 1 and Figure 2). The most common allele for the PITX3025 locus was 268 in both taxa, followed by 256 for *P. montezumae* and 260 in *P. pseudostrubus*. For the PITX3029 locus it was the allele 227 for the two species, the 235 and the 217 which only occurred in *P. montezumae*.

For the PITX3013 locus it was the 135 allele and for the PITX2037 it accounted for the 149 for the two pines. Five unique alleles in *P. pseudostrubus* and four in *P. montezumae* appeared in total. Although the number of alleles per locus in *P. pseudostrubus* was relatively higher than that of *P. montezumae*, their frequencies were

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variación genética

Pinus pseudostrobus presentó 19 alelos y *P. montezumae* 18, para un total de 23 alelos para las dos especies con un promedio de 4.6 alelos por locus (Cuadro 1 y Figura 2). El alelo con mayor frecuencia para el locus PtTX3025 fue el 268 en ambos taxa, seguido del 256 para *P. montezumae* y del 260 en *P. pseudostrobus*. Para el locus PtTX3029 fue el alelo 227 para las dos especies, el 235 y del 217 que solo se registró en *P. montezumae*.

lower. *P. pseudostrobus* had 10 alleles with frequencies below 0.05 and *P. montezumae*, eight.

These results are relatively similar to those reported by Delgado (2002) for the same taxa in other populations across their natural range, but with the use of three nSSR (five alleles in average for each taxon). They are also similar to those achieved in *P. caribaea* var. *Hondurensis* with four alleles (Delgado et al., 2011), *P. oocarpa*, *P. patula* and *P. tecunumanii* five alleles (Dvorak et al., 2009) and *P. radiata*, six alleles (Smith and Devey, 1994). Accordingly, it can be considered that both seed areas contain most alleles achieved so far the subgenus *Pinus*.

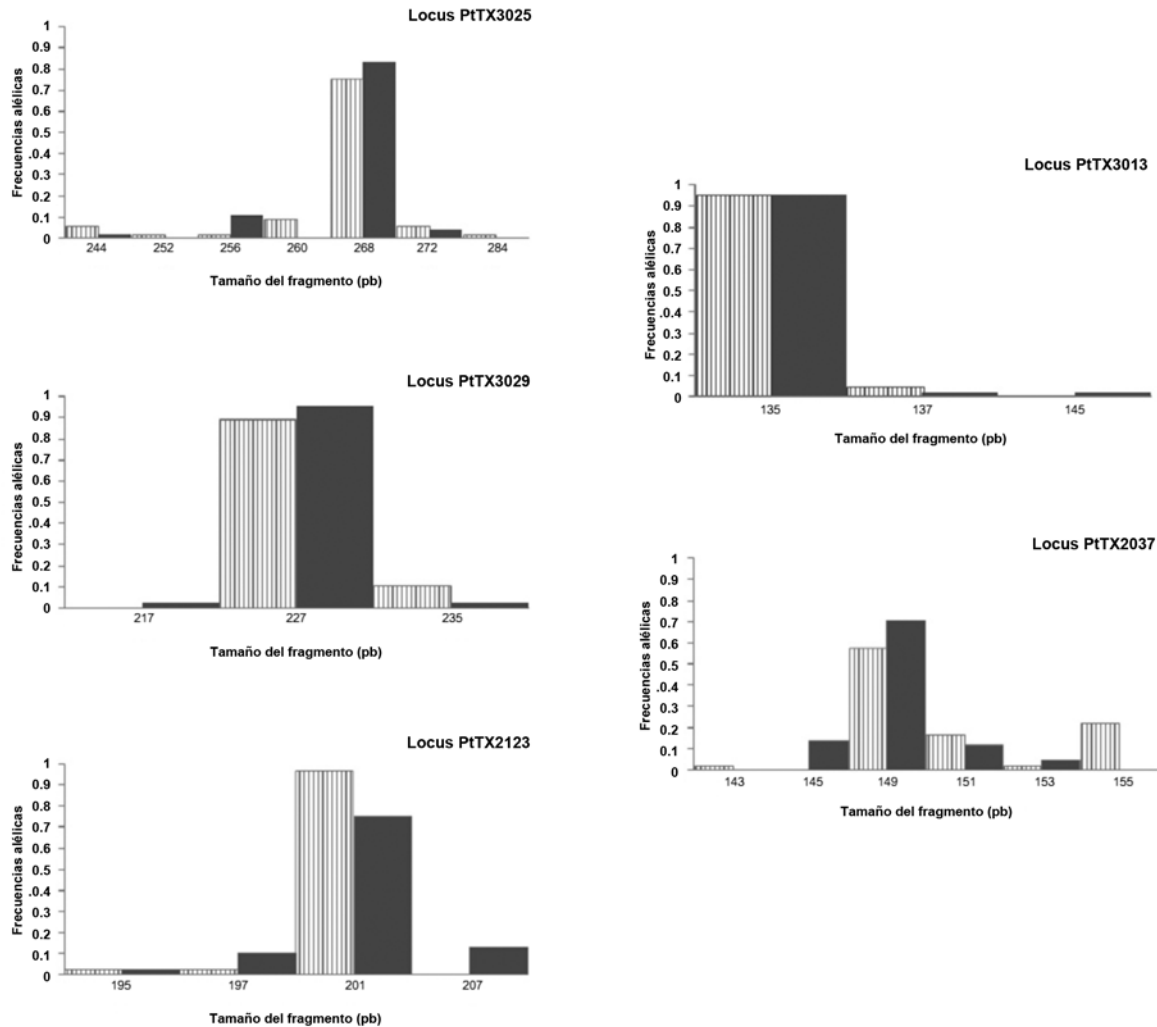
Cuadro 1. Frecuencias alélicas obtenidas para dos áreas semilleras de *P. pseudostrobus* Lindl. y *P. montezumae* Lamb. en Michoacán, México.
Table 1. Allele frequencies for two areas seed obtained from *P. pseudostrobus* Lindl. and *P. montezumae* Lamb. in Michoacán, México

Locus	Fragmentos	<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Pinus montezumae</i> Lamb.
PtTX3025	244	0.053	0.020
	252	0.017	0
	256	0.017	0.104
	260	0.089	0
	268	0.750	0.833
	272	0.053	0.042
	284	0.017	0
PtTX3029	217	0	0.022
	227	0.895	0.956
	235	0.104	0.022
	195	0.017	0.025
PtTX2123	197	0.017	0.100
	201	0.964	0.750
	207	0	0.125
PtTX3013	135	0.953	0.956
	137	0.046	0.022
	145	0	0.022
	143	0.018	0
PtTX2037	145	0	0.136
	149	0.574	0.704
	151	0.166	0.113
	153	0.018	0.045
	155	0.222	0

Para el locus PtTX3013 fue el alelo 135 y para el PtTX2037 correspondió el 149 para los dos pinos. En total se presentaron cinco alelos únicos en *P. pseudostrobus* y cuatro en *P. montezumae*. Aunque el número de alelos por locus en *P. pseudostrobus* fue relativamente mayor al de *P. montezumae*, sus frecuencias resultaron menores. *P. pseudostrobus* tuvo 10 alelos con frecuencias menores a 0.05 y *P. montezumae*, ocho.

The average heterozygosity was higher in *P. pseudostrobus* ($H_o = 0.290$) with respect to *P. montezumae* ($H_o = 0.246$), while the expected heterozygosity was similar ($I = 0.277$, $I = 0.274$, respectively). The PtTX2037 locus presented the highest value of heterozygosity in *P. pseudostrobus* and the PtTX2123 locus in *P. montezumae* (Tables 2 and 3). However, the differences between the two estimators (H_e and H_o) were not statistically significant ($p = 0.833$ in *P. pseudostrobus*, $p = 0.800$ in *P. montezumae*), so that the two seed areas are in the Hardy-Weinberg equilibrium. This suggests that the genotypes obtained in each of the areas are formed by random joints of





Barras con rayas color gris = *P. pseudostrobus*; barras en color negro = *P. montezumae*; Pb= tamaño de los alelos (fragmentos) en pares de bases.
 Gray striped bars = *P. pseudostrobus*; bars in black = *P. montezumae*; Pb = allele size (fragments) in base pairs

Figura 2. Distribución de las frecuencias alélicas obtenidas para las áreas semilleras de *P. pseudostrobus* Lindl. y *P. montezumae* Lamb.
 Figure 2. Distribution of allele frequencies obtained for seed areas of *P. pseudostrobus* Lindl. and *P. montezumae* Lamb.

Estos resultados son relativamente similares a los consignados por Delgado (2002) para los mismos taxa en otras poblaciones a través de su área de distribución natural, pero con el uso de tres nSSR (cinco alelos en promedio para cada taxon). Asimismo, son semejantes a los alcanzados en *P. caribaea* var. *hondurensis* con cuatro alelos (Delgado *et al.*, 2011); *P. oocarpa*, *P. patula* y *P. tecunumanii*, cinco alelos (Dvorak *et al.*, 2009) y *P. radiata* con seis alelos (Smith y Devey, 1994). En consecuencia, se puede considerar que ambas áreas semilleras contienen la mayoría de los alelos logrados hasta ahora para especies del subgénero *Pinus*.

gametes and that there is an evolutionary force that significantly activates within them: mutation, selection, genetic drift or migration (Wright, 1965; Hedrick, 1983).

Heterozygosity values in both species were lower than those reported for other pines that have been analyzed with the same markers (*P. radiata* $H_o=0.625$, Smith and Devey, 1994; *P. taeda* L, $H_o=0.559$, Williams *et al.*, 2000, and *P. caribaea* var. *hondurensis* $H_o = 0.422$ and $H_e = 0.465$, Delgado *et al.*, 2011), but similar to the results achieved by Delgado (2002) in natural populations of the same species ($H_o = 0.206$ and $H_e = 0.256$ in *P. pseudostrobus*, and $H_o = 0.219$ and $H_e = 0.273$ in *P. montezumae*) so that it can be considered that both seed areas contain good levels of genetic variation. *P. pseudostrobus* seed area includes more allelic variants representing the taxon and heterozygous genotypes than *P. montezumae*.



Cuadro 2. Estimadores de la variación genética obtenidos con cinco microsatélites polimórficos para el área semillera de *P. pseudostrabus* Lindl. en Zinapécuaro, Michoacán.Table 2. Estimators of the genetic variation obtained with five polymorphic microsatellite for the seed area of *P. pseudostrabus* Lindl. in Zinapécuaro, Michoacán.

Locus	A	H_o	H_e	F_{IS}	$\theta = 4N_e\mu$	N_e
PfTX3025	7	0.500	0.430			
PfTX3029	2	0.208	0.190			
PfTX2123	3	0.071	0.070			
PfTX3013	2	0.093	0.090			
PfTX2037	5	0.576	0.604			
Promedio	4.0	0.290	0.277	-0.031	32.224	805.50

A = Número de alelos; H_o = Heterocigosis observada; H_e = Heterocigosis esperada; F = Índice de fijación o endogamia; N_e = Tamaño efectivo.

A = number of alleles, H_o = observed heterozygosity, H_e = expected heterozygosity, F = fixation index or inbreeding, N_e = Effective size.

El promedio de la heterocigosis fue superior en *P. pseudostrabus* ($H_o=0.290$) con respecto a *P. montezumae* ($H_o=0.246$); en tanto que la heterocigosis esperada fue similar ($H_e=0.277$, $H_e=0.274$, respectivamente). El locus PfTX2037 presentó el valor más alto de heterocigosis en *P. pseudostrabus* y el locus PfTX2123 en *P. montezumae* (cuadros 2 y 3). Sin embargo, las diferencias entre los dos estimadores (H_e y H_o) no resultaron significativas estadísticamente ($p=0.833$ en *P. pseudostrabus*; $p=0.800$ en *P. montezumae*), por lo que las dos áreas semilleras están en equilibrio Hardy-Weinberg. Lo anterior sugiere que los genotipos obtenidos en cada una de las áreas están formados por uniones aleatorias de gametos, y que no existe fuerza evolutiva alguna que accione de manera significativa dentro de ellas: mutación, selección, deriva genética o migración (Wright, 1965; Hedrick 1983).

Effective size

The effective size was larger for the seed area of *P. pseudostrabus* ($N_e = 805.50$) than for that of *P. montezumae* ($N_e = 492.50$), which indicates that more individuals have historically contributed to the reproduction or transmission of genes from one generation to another in the first species than in *P. montezumae*. At present, no information about the estimate of N_e in other Mexican pine species has been performed with the same parameter ($\theta = 4N_e\mu$) and genetic marker and with the same mutation rate (1×10^{-3}).

Cuadro 3. Estimadores de la variación genética obtenidos con cinco microsatélites polimórficos para el área semillero de *P. montezumae* Lamb. en Zinapécuaro, Michoacán.Table 3. Estimators of the genetic variation obtained with five polymorphic microsatellite for the seed area of *P. montezumae* Lamb. in Zinapécuaro, Michoacán.

Locus	A	H_o	H_e	F_{IS}	$\theta = 4N_e\mu$	N_e
PfTX3025	4	0.333	0.298			
PfTX3029	3	0.085	0.085			
PfTX2123	4	0.500	0.422			
PfTX3013	2	0.086	0.086			
PfTX2037	4	0.227	0.481			
Promedio	3.4	0.246	0.274	0.103	19.70	492.50

A = Número de alelos; H_o y H_e = Heterocigosis observada y esperada; F = Índice de fijación o endogamia; N_e = Tamaño efectivo.

A = number of alleles; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; F = fixation index or inbreeding; N_e = Effective size.

Los valores de heterocigosis en las dos especies fueron inferiores a los señalados para otros pinos que se han analizado con los mismos marcadores (*P. radiata* $H_o=0.625$, Smith y Devey, 1994; *P. taeda* L., $H_o=0.559$, Williams *et al.*, 2000, y *P. caribaea* var. *hondurensis* $H_o=0.422$ y $H_e=0.465$, Delgado *et al.*, 2011), pero semejantes a los resultados logrados por Delgado (2002) en poblaciones naturales de las mismas especies ($H_o=0.206$ y $H_e=0.256$ en *P. pseudostrabus*, y $H_o=0.219$ y $H_e=0.273$ en *P. montezumae*); de tal forma, que se puede considerar que

There is only one record of an N_e estimate with the same approach in *P. resinosa* Ait, a taxon distributed in the United States of America, for which N_e values of 62 were obtained from 222 individuals (Boys *et al.*, 2005). These values are lower than those in this study; therefore, the estimated N_e was sufficient to prevent decreases in the genetic diversity by inbreeding processes or genetic drift (Hartl and Clark, 1997).

ambas áreas semilleras contienen buenos niveles de variación genética. La correspondiente a *P. pseudostrabus* se conforma por más variantes alélicas representativas del taxon y genotipos heterocigotos que la de *P. montezumae*.

Tamaño efectivo

El tamaño efectivo fue mayor para el área semillera de *P. pseudostrabus* ($N_e = 805.50$) que para la de *P. montezumae* ($N_e = 492.50$), lo cual indica que han contribuido históricamente más individuos a la reproducción o transmisión de genes de una generación a otra en la primera especie que en *P. montezumae*. En la actualidad, no existe información sobre el estimado de N_e en otras especies de pino mexicanas que se haya realizado con el mismo parámetro ($\theta = 4N_e u$) y marcador genético, así como con la misma tasa de mutación (1×10^{-3}).

Solo se ha registrado una estimación del N_e con la misma aproximación en *P. resinosa* Ait, taxon distribuido en Estados Unidos de América, para la que se obtuvieron valores de N_e de 62 a 222 individuos (Boys *et al.*, 2005). Dichos valores son inferiores a los derivados en este estudio; por lo tanto, el N_e estimado ha sido suficiente para impedir que la diversidad genética disminuya por procesos de endogamia o deriva genética (Hartl y Clark, 1997).

Sin embargo, estas estimaciones de N_e no son comparables con las que se aprecian en este trabajo, pues, además de extraerse de una región de ADN haploide (cloroplasto) y de obtenerse valores de heterocigosis esperada más altos (H_i de 0.6 para *P. cembroides* y de 0.95 en *P. maximartinezii*), el N_e se valoró con otra tasa de mutación (5.5×10^{-5} , Provan *et al.*, 1999), con otro modelo de mutación (SMM) y con mayor número de poblaciones e individuos más alto, lo cual, probablemente, generó tamaños efectivos más grandes.

Índice de fijación (F)

No se observó un valor significativo de endogamia; en *P. pseudostrabus* el estimador resultó ser negativo, aunque no fue significativo estadísticamente ($F = -0.031$, $P = 0.643$), y en *P. montezumae* fue relativamente alto pero no significativo ($F = 0.103$, $P = 0.087$). Este último valor de F se produjo debido a que las frecuencias genotípicas de uno de los loci (PITX3027) se desviaron del equilibrio Hardy-Weinberg ($p = 0.005$), mas no tuvieron un efecto significativo a nivel de la población. Al respecto, en el estudio de Delgado (2002) en cinco poblaciones de *P. montezumae* distribuidas en México y Guatemala se registró un valor de endogamia significativo ($F = 0.139$, $p = 0.000$), lo cual sugiere que la especie tiende a tener más individuos homocigotos que *P. pseudostrabus* y, por lo tanto, el valor de F que se estimó podría aumentar en muy pocas generaciones y alterar o desviar las frecuencias alélicas de manera significativa.

En general, los valores de F calculados son similares a los citados para algunos pinos analizadas con nSSR, en los que la

However, these N_e estimates are not comparable with those appreciated in this work, since, in addition to draw from an haploid DNA region (chloroplast) and to obtain high expected heterozygosity values (H_i 0.6 for *P. cembroides* and 0.95 in *P. maximartinezii*), the N_e was assessed with another mutation rate (5.5×10^{-5} Provan *et al.*, 1999), with another mutation model (SMM) and with a higher number of populations and individuals which probably resulted in larger effective sizes.

Fixation index (F)

There was no significant value of inbreeding; in *P. pseudostrabus*, the estimator proved negative, although non- statistically significant ($F = -0.031$, $P = 0.643$), and in *P. montezumae* it was relatively high but non-significant too ($F = 0.103$, $P = 0.087$). The latter F value is produced because the genotype frequencies of one of the loci (PITX3027) deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.005$), but had no significant effect at the population level. In this regard, in the study by Delgado (2002) in five populations of *P. montezumae* distributed in Mexico and Guatemala a significant inbreeding value ($F = 0.139$, $p = 0.000$) was recorded, suggesting that the species tends to have more homozygous individuals than *P. pseudostrabus* and therefore, the value of F that was estimated could increase in a few generations and significantly alter or deflect the allele frequencies.

In general, the calculated F values are similar to those mentioned for some pines analyzed by nSSR, in which inbreeding is the evolutionary force that shapes genetic variation (*P. pseudostrabus*, $F = 0.038$, Delgado 2002; *P. densata* Mast., $F = 0.021$, Wang *et al.*, 2001). Unfortunately, all these studies were performed with natural populations without any forest management and there are no formal records of other seed areas evaluated at the molecular level that allow a finer comparison. In spite of it, it can be considered that the individuals selected for their desirable phenotypic characteristics (height, diameter and crown cover of trees) for the formation of the two seed areas were correct, which is slightly reflected at the molecular level by the low inbreeding values and the presence of a large number of allelic variants in the two populations. Thus, both seed areas contain individuals with a genetic quality enough to ensure the production of plant for the successful reforestation in nearby places.

Management Proposal

Based on the information that came from this study, the following management scheme is suggested for obtaining individual tree seed. For *P. pseudostrabus* seed area it is proposed to collect from randomly sampled trees, since the selection of individuals effected for forming the seed area indicates that it is in Hardy-Weinberg equilibrium at the molecular level. Random sampling will allow to keep the value of F and hat the genetic balance of the population is not altered. For the strategy is a little different, although, at present the population does not deviate from Hardy Weinberg equilibrium, if seeds are only collected from trees selected at

endogamia no es la fuerza evolutiva que moldea la variación genética (*P. pseudostrabus*, $F=0.038$, Delgado 2002; *P. densata* Mast., $F=0.021$, Wang *et al.*, 2001). Desafortunadamente, todos esos trabajos se realizaron con poblaciones naturales sin ningún tipo de manejo forestal y no existen registros formales sobre otras áreas semilleras evaluadas a nivel molecular que permitan hacer una comparación más fina. Pese a ello, se puede considerar que los individuos seleccionados por sus características fenotípicas deseables (altura, diámetro y cobertura de copa de los árboles) para la formación de las dos áreas semilleras fueron las adecuadas, lo que ligeramente se refleja a nivel molecular por los valores bajos de endogamia, y por la presencia de un número alto de variantes alélicas en las dos poblaciones. Por lo tanto, ambas áreas semilleras contienen individuos con una calidad genética suficiente para garantizar la producción de planta para la reforestación exitosa en las zonas cercanas.

Propuesta de Manejo


Con base en la información generada se sugiere el siguiente esquema de manejo para la obtención de semillas de árboles particulares. Para el área semillera de *P. pseudostrabus* se propone la recolecta en los árboles muestreados al azar, dado que la selección de los individuos efectuada para la conformación del área semillera indica, a nivel molecular, que está en equilibrio Hardy Weinberg. El muestreo al azar permitirá que el valor de F se mantenga y no se altere el equilibrio genético de la población. Para *P. montezumae* la estrategia es un poco diferente, pues como en esta área se estimó un valor de endogamia importante ($F=0.103$), y, aunque, en la actualidad la población no se desvía del equilibrio Hardy Weinberg, si sólo se recolectaran semillas de árboles elegidos al azar, en el futuro podría existir una mayor probabilidad de que se recolectaran simientes en condición homociga y se originara la pérdida de alelos y niveles significativos de endogamia en las áreas de reforestación. En consecuencia, para este caso se propone llevar a cabo la recolecta del germoplasma tanto de los árboles con mayor número de alelos y de heterocigos para los cinco loci analizados (individuos 06, 13, 17, 20, 57, 23, 46, 29, 39, 58, 18 y 42), así como de individuos seleccionados al azar. Ambas estrategias permitirán, a corto plazo, que más cantidad de plantas logren establecerse y sobrevivir en las zonas de plantación, y producir, a mediano y largo plazo, semillas que genéticamente contengan proporciones alélicas y genotípicas similares, a fin de mantener el equilibrio genético a través de las generaciones.

CONCLUSIONES

El uso de los marcadores moleculares nSSR permitió reconocer que los niveles de variación genética contenida en las dos áreas semilleras están dentro del intervalo señalado para pinos con equilibrio Hardy-Weinberg, y que no presentan niveles de endogamia o consanguinidad significativos. Se recomienda comparar la diversidad hallada en estas áreas con las zonas que se pretende reforestar,

random, in the future there could be more likely that seeds in homozygous condition were collected and there will be a loss of alleles as well as significant levels of inbreeding in reforestation areas. Accordingly, in this case it is proposed to carry out the collection of germ plasm from both kinds of trees, with greater number of alleles and heterozygous for the five loci analyzed (individuals 06, 13, 17, 20, 57, 23, 46, 29, 39, 58, 18 and 42) as well as randomly selected individuals. Both strategies will allow, in the short term, that a greater number of plants become established and survive in the plantation areas, and produce, at the medium and long term, seeds containing genetically allelic and genotypic similar proportions, in order to keep the genetic balance through generations.


CONCLUSIONS

The use of nSSR molecular markers allowed to recognize that the levels of genetic variation in both seed production areas are within the range reported for pines with Hardy-Weinberg equilibrium, and present no inbreeding or consanguinity significant levels. It is recommended to compare the diversity found in these areas to the areas intended to be reforested, in order not to decrease the genetic variation. It is also suggested to undertake studies in other seed areas of the species here described with nuclear and chloroplast markers to know the movement of their genes (seeds and pollen) and propose with certainty the geographical boundaries of reforestation. 

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their acknowledgement to the owners of Gerahuaro and Zacapu seed areas for their support in the field work. To Dr. Ignacio Vidales, to facilitate the development of the laboratory work in the Campo Experimental de Uruapan, Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, INIFAP, and to the two reviewers for their valuable comments that enriched the manuscript. This work was supported by the Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Proy-226 and by the Comisión Nacional Forestal, Proy-176167.

End of the English version

a fin de no disminuir la variación genética existente. Asimismo, se sugiere emprender estudios en otras áreas semilleras de las especies estudiadas con marcadores nucleares y de cloroplasto para conocer el movimiento de sus genes (semillas y polen) y proponer con certeza los límites geográficos de reforestación. 

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a los dueños de las áreas semilleras de Gerahuaro y Zacapu, por el apoyo en el trabajo de campo. Al Dr. Ignacio Vidales, por facilitar el desarrollo del trabajo de laboratorio en el Campo Experimental de Uruapan, Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, INIFAP, y a dos revisores por sus invaluable comentarios que enriquecieron el manuscrito. Este trabajo fue financiado por la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Proy-226 y por la Comisión Nacional Forestal, Proy-176167.



REFERENCIAS

- Aguilera, R. M. 2001. Unidades productoras de germoplasma forestal: Resumen de fuentes que se han identificado en el país. Gaceta de la Red Mexicana de Germoplasma Forestal: SEMARNAP. México, D.F. México, pp. 90-100.
- Bell, J., M. Powell, M. Devey and G. Moran. 2004. DNA Profiling, Pedigree Lineage Analysis and Monitoring in the Australian Breeding Program of Radiata Pine. *Silvae Genetica*. 53: 130-134.
- Boys, J., M. Cherry and S. Dayanandan. 2005. Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of red pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *American Journal of Botany*. 92:833-841.
- Clausen, K. E., L. C. Flores y J. Vargas H. 1994. Avances del Programa de Mejoramiento Genético Forestal en Chihuahua. Nota Técnica No. 8. Centro de Genética Forestal, A.C. Chapingo, Edo. de Mex México. 13 p.
- Comisión Forestal del Estado de Michoacán (Cofom). 2012. Programa de Desarrollo Forestal Sustentable del Estado de Michoacán 2030. Tomo I. Gobierno del estado de Michoacán. <http://www.cofom.michoacan.gob.mx> (7 de mayo, 2013).
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). 2002. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Appendix II. <http://www.cites.org/resources/species.html>. (10 de septiembre 2012).
- Comisión Nacional Forestal (Conafor). 2005. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: Programa Nacional de reforestación. http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/pronare (6 de marzo de 2012).
- Comisión Nacional Forestal (Conafor). 2012. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: Unidades Productoras de Germoplasma Forestal. Fichas Técnicas. <http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php/temas-forestales/germoplasma-forestal/upgf> (14 de marzo de 2012).
- Delgado, P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser and E. Alvarez-Buylla. 1999. High levels of variation and structure genetic in very rare pine specie (*Pinus rzedowskii*), endemic of Michoacán, México. *American Journal of Botany*, 86: 669-676.
- Delgado, P. 2002. Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales de *Pinus montezumae* Lamb. y *P. pseudostrabus* Lindl. (Pinaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. México. 110 p.
- Delgado, P., D. Piñero, L. Jardón, V. Rebolledo and F. Chi-May. 2011. Genetic variation and demographic contraction of the remnant populations of Mexican Caribbean pine (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*: Pinaceae). *Annals of Forest Science*. 68: 121-128.
- Devey, M., J. Bell, T. Uren and G. Moran. 2002. A set of microsatellite markers for fingerprinting and breeding applications in *Pinus radiata*. *Genome* 45:984-989.
- Dvorak, W. S., K. M. Potter, V. D. Hipkins and G. R. Hodge. 2009. Genetic diversity and gene exchange in *Pinus oocarpa*, a Mesoamerican pine with resistance to the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *International Journal of Plant Science*. 170:609-626.
- Echt, C. S., P. May-Marquardt, M. Hseih and R. Zahorchak. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*. 39:1102-1108.
- Elsik, C. G., V. T. Minihan, S. E. Hall, A. M. Scarpa and C. G. Williams. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*. 43:550-555.
- Eguluz P., T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el genero *Pinus* en Mexico. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Edo. de Mex México. 623 p.
- Excoffier, L. and H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under linux and Window. *Molecular Ecology Resources*. 10:564-567.
- Farjon, A. T. and B. Styles 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropical, Monograph 75. New York Botanical Garden. New York, NY, USA. 246 p.
- Fernandes, L., M. Rocheta, J. Cordeiro, S. Pereira, S. Gerber, M. Oliveira and M. Ribeiro M. 2008. Genetic variation, mating patterns and gene flow in a *Pinus pinaster* Aiton clonal seed orchard. *Annals of Forest Science*. 65: 706-706.
- Flores L., C. 2000. Análisis y perspectivas del mejoramiento genético de los bosques del estado de Chihuahua. Gaceta de la Red Mexicana de Germoplasma Forestal. SEMARNAP. México, D.F. México, pp 81-88.
- Guzmán, M., A., M. O. Barrera y R. Moncayo F. 1979. Manejo de semillas de pino en la Comisión Forestal del Estado de Michoacán. Técnica Reforestación. No. 19. 49 p.
- Guo, S. and E. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48:361-372.
- Hedrick, P. W. 1983. Genetics of populations. Science Books International. Boston, MA USA. 278 p.
- Hartl, D. L. and A. G. Clark. 1997. Principles of population genetics. 2da edition. Sinauer Associates. Sunderland, UK. 682 p.
- Karhu, A., J.-H. Dietrich and O. Savolainen. 2000. Rapid expansion of microsatellite sequences in pines. *Molecular Biology and Evolution* 17:259-265.
- Madrigal-Sánchez, X. 1982. Claves para la identificación de las Coníferas silvestres del estado de Michoacán. Boletín Divulgativo No. 58. INF-SARH. México, D.F. México. 100 p.
- Mesén, F. 2003. Estado de los Recursos Genéticos Forestales en América Central, Cuba y México, y Plan de Acción Regional para su Conservación y Uso Sostenible. Documentos de Trabajo: Recursos Genéticos Forestales. FGR/525 Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales, FAO. Roma, Italia. 85 p. <http://www.fao.org/docepr/ag046s/ag045s00.html>. (3 de febrero 2011).

- Muñoz, F., J. R. Toledo B., T. Sáenz R., F. J. Villaseñor, J. García S. y J. García M. 2008. Establecimiento y manejo de dos áreas semilleras de coníferas nativas en el estado de Michoacán. *Rev. Mex. Cien. For.* 33: 79-102.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Press. New York, NY, USA. 512 p.
- Niembró, A. 1986. *Árboles y Arbustos Útiles de México*. Limusa. México, D.F. México. 206 p.
- Ohta, T. and M. Kimura. 1973: A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetics Research* 22: 201-204.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 2002. *Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2000*. Informe principal. Estudio Monte FAO 140. Roma, Italia. pp. 1-81.
- Petit, J. R., J. Duménil, S. Fineschl, A. Hampe, D. Salvini and G. G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*. 14:689-701.
- Plancarte, B., A. y T. Eguiluz P. 1991. *Avances de investigación en 1990*. Centro de Genética Forestal A.C. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de Mex. México. 9 p.
- Protectora de bosques del Estado de México (Probosque). 2011. Secretaría del Medio Ambiente. *Viveros Forestales*. <http://www.wedomex.gob.mx/portal/page/portal/probosque/viverosforestales/> (9 de enero de 2012).
- Programa Nacional de Reforestación (Pronare). 2000. *Evaluación de la reforestación 1999*. SEMARNAT. México, D.F. México. s/p.
- Provan, J., N. Soranzo, N. J. Wilson, D. B. Goldstein and W. Powell. 1999. A low mutation rates for chloroplast microsatellites. *Genetics*. 153:943-947.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher and W. Smith A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*. 7:465-474.
- Smith, D. N. and M. E. Devey 1994. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome*. 37:977-983.
- Snyder, F. B. 1972. *Glossary for forest tree improvement works*. USDA Forest Service. Southern Forest Experiment Station. New Orleans, LA USA. 22 p.
- Stead, J. W. 1983. A study of variation and taxonomy of the *Pinus pseudostrabus* complex. *Commonw. Forestry Review*. 62:26-36.
- Stoehr, M. U. and N. H. Newton 2002. Evaluation of mating dynamics in a lodgepole pine seed orchard using chloroplast DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research*. 32:469-476.
- Torimaru, T., U. Wennström, D. Lindgren and X-R. Wang. 2012. Effects of male fecundity, interindividual distance and anisotropic pollen dispersal on mating success in a Scots pine (*Pinus sylvestris*) seed orchard. *Heredity*. 108:312-321.
- Wang, B. S. P. y T. Beardmore. 1997. Almacenamiento y manejo de germoplasma. In: Vargas, J., J., B. Bermejo y F. Ledig T. (eds.). *Manejo de Recursos Genéticos Forestales*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. De Méx. México. pp. 107-140.
- Wang, X-R., A. E. Szmíd and O. Savolainen. 2001. Genetic composition and diploid hybrid speciation of high mountains pine, *Pinus densata* native to the Tibetan plateau. *Genetics*. 159:337-346.
- Weir, B. S. 1996. *Genetic data analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland. Sunderland, MA USA. 445 p.
- Williams, C. G., C. G. Elsik and D. B. Richard. 2000. Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. in Zimbabwe. *Heredity*. 84:261-268.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19:395-420.
- Zamora-Campos, E. M., O. G. Vázquez-Cuecuecha, A. Pérez A., R. Cano F., A. Aparicio R. y P. Fernández E. 2007. Variación natural de la densidad de la madera en *Pinus montezumae* Lamb., en tres altitudes del Parque Nacional La Malinche Tlaxcala, México. *Foresta Veracruzana*. 9 (2):33-37.

