



Diversidad genética y conservación de pinos nativos de la cuenca del río Cupatitzio, en Michoacán

Genetic diversity and conservation of native pines in the Cupatitzio river basin, in Michoacán

Etelbina Ramírez Enríquez¹, Patricia Delgado Valerio^{1*}, J. Jesús García Magaña¹ y Agustín Molina Sánchez¹

Abstract

The conservation of terrestrial habitats associated with hydrographic basin has as an intrinsic component the conservation of the genetic resources of the species that form the vegetation cover of these systems. The objective of the present study was to evaluate the levels of variation and genetic structure of pine populations found in the Cupatitzio river basin, in Michoacán, using four nuclear microsatellite markers. The study includes eight populations of four pine species found in the upper, middle and lower zones of the basin. The results show that the SL3 populations of *P. pseudostrobus* and RB6 of *P. douglasiana* contain the highest values of genetic variation ($H_E= 0.674$ y $H_E= 0.615$, respectively). The populations have significant levels of inbreeding (F_{IS} between 0.057-0.544) and a moderate genetic differentiation (F_{ST} between 0.094-0.152), that is moderately associated to the geographical distribution of the populations ($R= 0.443$) and is clustered according to species. The upper zone of the Reserve, in Quinceo and in Tzararacua, had the lowest levels of genetic variation and the highest levels of inbreeding, so restoration activities in these localities is advisable. Likewise, *in situ* conservation activities in San Lorenzo and the lower part of the Reserve are suggested, since both populations have the largest effective size and are representative of the gene pool of the pine forests in the Cupatitzio basin.

Key words: Genetics, conservation, hydrographic basin, microsatellite markers, *Pinus*, restoration.

Resumen

La conservación de los hábitats terrestres asociados a cuencas hidrográficas tiene como componente intrínseco la conservación de los recursos genéticos de las especies que conforman la cubierta vegetal de estos sistemas. El objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles de variación y estructura genética de las poblaciones de pino distribuidas en la cuenca del río Cupatitzio, en Michoacán, con el uso de cuatro microsatélites de núcleo. El estudio incluye ocho poblaciones de cuatro especies de pino distribuidas en las zonas altas, media y baja de la cuenca. Los resultados indican que las poblaciones SL3 de *P. pseudostrobus* y RB6 de *P. douglasiana* contienen los valores más altos de variación genética ($H_E = 0.674$ y $H_E= 0.615$, respectivamente). Las poblaciones presentan importantes niveles de endogamia (F_{IS} entre 0.057-0.544) y una diferenciación genética significativa (F_{ST} entre 0.094-0.152), la cual se asocia de manera moderada con la distribución geográfica de las poblaciones ($r= 0.443$) y se agrupa de acuerdo con las especies. La parte alta de la Reserva, en Quinceo y la Tzararacua, presenta los niveles más bajos de variación genética y los mayores niveles de endogamia, por lo que se recomienda hacer actividades de restauración en estas localidades. Así mismo, se sugieren actividades de conservación *in situ* en San Lorenzo y la parte baja de la Reserva, ya que ambas poblaciones presentan los tamaños efectivos más grandes y son representativas del acervo genético de los bosques de pino en la cuenca del Cupatitzio.

Palabras clave: Genética, conservación, cuenca hidrográfica, marcadores microsatélites, *Pinus*, restauración.

Fecha de recepción/Reception date: 23 de agosto de 2018

Fecha de aceptación/Acceptance date: 01 de febrero de 2019

¹Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.

Introducción

La cuenca del río Cupatitzio forma parte de la Meseta Purépecha, ubicada dentro del Eje Neovolcánico Transversal en el estado de Michoacán (Bravo *et al.*, 2009). Se considera una de las áreas de mayor interés silvícola de la parte centro-norte del estado, con una influencia hidrológica y climática única tanto para la región central, como para la Depresión del Balsas (Conanp, 2006). Es una de las zonas de mayor importancia para la recarga de los mantos acuíferos que dan origen a un número superior de 35 manantiales y a los volúmenes del río Cupatitzio (González, 2010; Conagua, 2015). Así mismo, provee diversos servicios ecosistémicos, como la generación de energía eléctrica, de agua potable y de riego para cultivos frutícolas y de hortalizas (Conanp, 2006; Conagua, 2015).

A pesar de la importancia que tiene la cuenca para la región, las especies de plantas que conforman la cubierta vegetal de la zona de recarga hídrica no han sido descritas completamente (Bello y Madrigal, 1996), ni existen estudios básicos sobre la ecología y la genética de poblaciones o de comunidades, y, por lo tanto, no se han desarrollado propuestas confiables para la restauración y conservación de este sistema hidrológico. El estado de conservación de sus bosques no es bueno, pues los frecuentes incendios y el cambio de uso de suelo, principalmente para huertos de aguacate y zonas urbanas, influyen indudablemente en la pérdida de la vegetación nativa, particularmente de especies del género *Pinus* que son características de los bosques de coníferas del lugar (Bravo *et al.*, 2009).

Los marcadores moleculares son una de las herramientas que se usan para evaluar la diversidad genética de las especies, información que es útil para establecer criterios de manejo y conservación (Brown *et al.*, 1989; Frankham, 2010). Los microsatélites de núcleo (SSRn), son marcadores eficaces para este fin, son codominantes y altamente polimórficos, por lo que se puede obtener información genética detallada de las poblaciones e individuos (por ejemplo, los niveles de heterocigosis y endogamia, las tasas de entrecruzamiento y migración, análisis de paternidad, la certificación de cruas controladas, análisis de pedigrí, entre otros) (Rajora *et al.*,

2000; Rajora y Mosseler, 2001; Delgado y Piñero, 2008; Ellstrand, 2014). Sin embargo, en la actualidad existen pocos trabajos publicados formalmente que usen SSRn en pinos mexicanos (Dvorak *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2011, 2013; Alfonso *et al.*, 2014; Villalobos *et al.*, 2014), y no se ha consignado ningún estudio enfocado a cuencas hidrográficas que use estas herramientas moleculares para el rescate de especies vegetales. El conocimiento de la diversidad genética de las especies que conforman los bosques forestales es esencial para su conservación efectiva y sostenible, lo cual impacta directamente en el mantenimiento integral de los sistemas hídricos asociados (FAO, 2009; Potter *et al.*, 2017).

En este orden de ideas, en el presente estudio se planteó como hipótesis que las especies de pino distribuidas en la cuenca del río Cupatitzio contienen bajos niveles de variación genética con una estructura genética marcada entre las poblaciones. Los objetivos fueron: i) estimar los niveles de variación y estructura genética, el índice de endogamia y los tamaños efectivos de las poblaciones de cuatro especies del género *Pinus* distribuidas en la cuenca del río Cupatitzio; y ii) analizar las relaciones genéticas de las poblaciones y su asociación con la distribución geográfica.

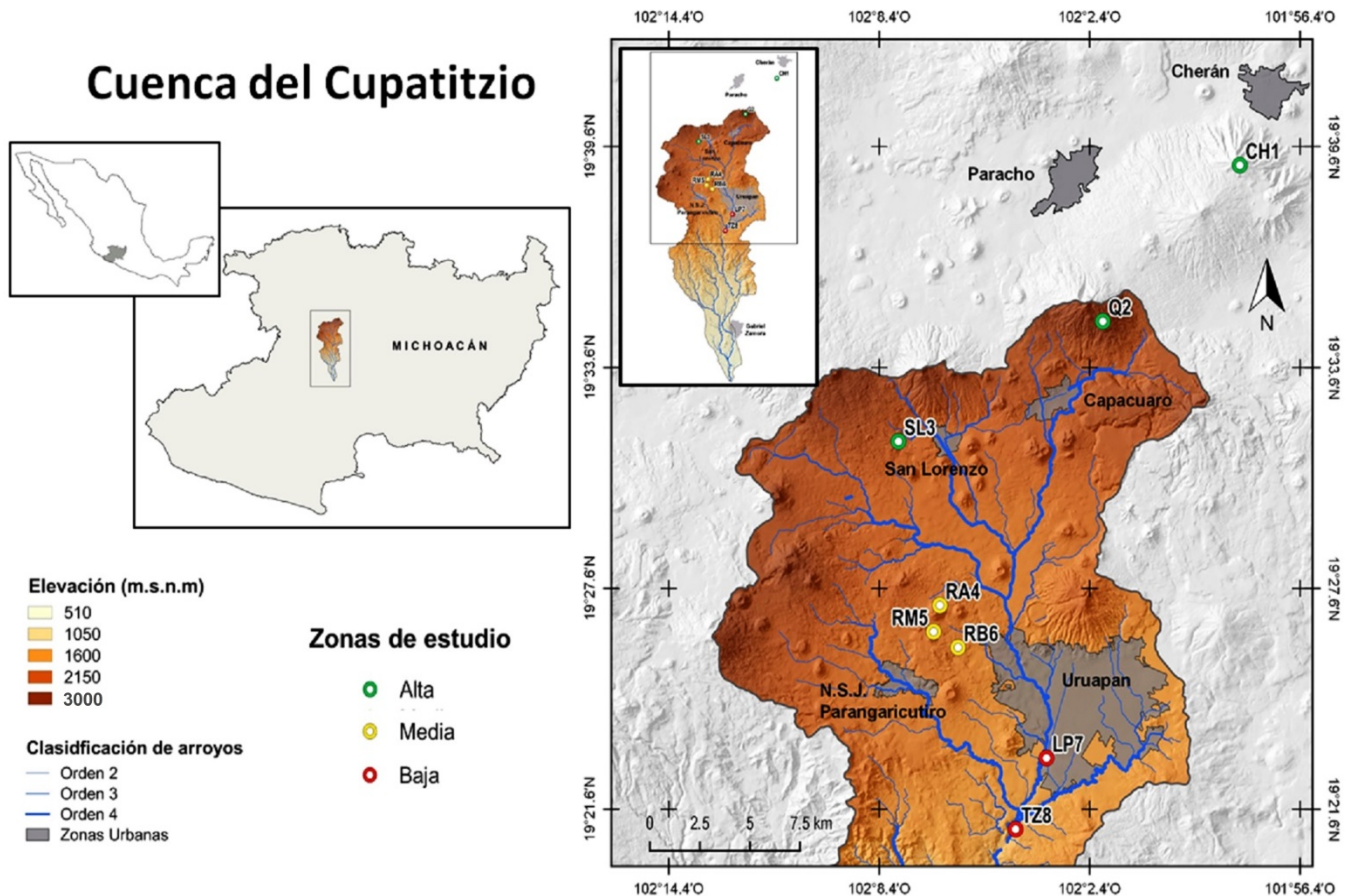
Con base en los resultados se proponen núcleos de mayor diversidad genética, así como puntos estratégicos para la restauración y conservación de la cubierta vegetal de pinos en la cuenca.



Materiales y Métodos

Área de estudio

La cuenca del río Cupatitzio forma parte de la región hidrológica del río Balsas (RH18), dentro de la sub-región hidrológica Tepalcatepec-Infiernillo (I) (INEGI, 1985; DOF, 2011). Se localiza en la parte centro occidente de Michoacán; la integran los municipios Uruapan, Nuevo Parangaricutiro, Gabriel Zamora, Francisco Javier Múgica y Parácuaro (DOF, 2011). Se ubica entre los 18°49'58" y 19°36'11" N y 101°59'30" y 102°13'16" O, con una superficie aproximada de 2 659.03 km² (Conagua, 2009) (Figura 1).



ID de las poblaciones como en el Cuadro 1.

Figura 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Pinus* colectadas en la cuenca del río Cupatitzio en Michoacán.

La vegetación predominante es el bosque de coníferas con tres tipos: bosque de pino, bosque de pino-encino y bosque mesófilo de montaña (Bello y Madrigal, 1996). Los suelos son de tipo Andosol en la parte alta de la cuenca, Luvisol y Acrisol en la parte media y Regosol y Vertisol en la parte baja (Inegi, 1985). El clima corresponde al clima templado, tipo semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano (A)C(m)(w) (Inegi, 2010).

El área de estudio se dividió en tres zonas geográficas debido a las diferentes especies de pino: la parte alta o zona de recarga de la cuenca, con tres poblaciones; Cherán (CH1), representada por *Pinus montezumae* Lamb.; Quinceo (Q2) y San Lorenzo (SL3), representadas por *Pinus pseudostrobus* Lindl. La parte media, que incluye a la Reserva del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, con tres poblaciones: reserva alta (RA4), reserva media (RM5) y reserva baja (RB6), representadas por *Pinus douglasiana* Martínez. La tercera zona, la parte baja de la cuenca, incluye los sitios de La Pinera (LP7) y Tzaráracua (TZ8), representados por *Pinus oocarpa* Schiede, con un total de ocho poblaciones muestreadas (Cuadro 1 y Figura 1). Cabe mencionar que la localidad de Cherán no está contemplada dentro de la cuenca del Cupatitzio; sin embargo forma parte de la zona alta de recarga de los mantos acuíferos, por lo que se consideró importante incluirla en el estudio.



Cuadro 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de las poblaciones en estudio del género *Pinus*.

Zona/Especie	Sitio	ID	Ubicación geográfica		Altitud (msnm)
Norte					
<i>P. montezumae</i>	Cherán	CH1	19°39'5.53" N	101°58'7.17" O	2 956
<i>P. pseudostrobus</i>	Quinceo	Q2	19°35'53.9" N	102°02'11.7" O	2 810
<i>P. pseudostrobus</i>	San Lorenzo	SL3	19°31'35.4" N	102°07'51.3" O	2 246
Centro					
<i>P. douglasiana</i>	Reserva alta	RA4	19°26'24.7" N	102°06'58.1" O	2 066
<i>P. douglasiana</i>	Reserva media	RM5	19°26'25.3" N	102°06'51.2" O	2 035
<i>P. douglasiana</i>	Reserva baja	RB6	19°25'59.7" N	102°06'9.30" O	1 834
Sur					
<i>P. oocarpa</i>	La Pinera	LP7	19°22'59.46" N	102°3'37.9" O	1 656
<i>P. oocarpa</i>	Tzaráracua	TZ8	19°21'03.4" N	102°04'30.8" O	1 481

Para cada especie se recolectó material foliar de cinco a 19 árboles por población, con base en la densidad del arbolado, con un total de 102 muestras, que se guardaron en bolsas de plástico y almacenaron en ultra-congelador a -80° C, hasta su uso.

Datos moleculares

La extracción de ADN se hizo con el método CTAB *mini-prep* para pinos (Delgado *et al.*, 2013). Se ensayaron cinco microsatélites de núcleo (SSRn) aislados de *Pinus taeda* L. (Karhu, 2001), de los cuales se seleccionaron cuatro que fueron polimórficos y reproducibles (PtTX3013, PtTX3025, PtTX2146, PtTX2123). La amplificación de los microsatélites fue acorde con Elsik *et al.* (2000), con modificaciones en la concentración de cloruro de magnesio (4mM) (Delgado *et al.*, 2013). Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (7 % 8M de Urea; Buffer TBE al 0.5 %), corridos en cámaras de

secuenciación manuales a 60 Volts, durante 2-3 h a partir del tamaño de los fragmentos (Karhu, 2001). Para observarlos, los geles fueron revelados con nitrato de plata (Delgado *et al.*, 2013), y su tamaño se determinó por medio de un marcador de 10 pb (*Invitrogen*TM), como referencia.

Análisis de datos

Los estimadores de la variación genética que se obtuvieron fueron las siguientes: porcentaje de *loci* polimórficos (% *P*), número total de alelos (*A*), promedio de alelos por *locus* (*N_A*), heterocigosis observada (*H_o*) y esperada (*H_E*) (Nei, 1987) con la fórmula:

$$H_E = 2N / (2N - 1) (1 - \sum p_i^2)$$

El índice de fijación o de endogamia (*F_{IS}*) que se obtuvo como:

$$F = H_E - H_o / H_E \text{ (Wright, 1965)}$$

La desviación del equilibrio *Hardy-Weinberg*, se estimó con el método no paramétrico de cadenas de Marco y Monte Carlo (MCMC) con 100 000 permutaciones (Guo y Thomson, 1992). Los análisis fueron obtenidos con el programa *Arlequin* v. 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Se hicieron pruebas exactas de desequilibrio de ligamiento para cada par de *loci* para las poblaciones de cada especie y una global con el método exacto de *Fisher*, obtenido con el programa *GENEPOP* v. 4.4 (Rousset, 2008). Para los cuatro SSRn utilizados se determinó la frecuencia de alelos nulos con el programa *FreeNa* (Chapuis y Estoup, 2007).

El tamaño efectivo (*N_e*), o sea, el número de individuos que contribuyen a la reproducción (Hartl y Clark, 1997), se estimó de manera indirecta de acuerdo con la fórmula:

$$\theta = 1/(1 - H_E)^2 - 1$$

modificada para microsatélites (Excoffier y Lischer, 2010). Dado que el parámetro $\theta = 4N_e\mu$ (Kimura, 1968), y al asumir una tasa de mutación (μ) de 10^{-3} por generación, el N_e se estimó como $\theta/4 \times 10^{-3}$ (Boys *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2011; 2013; Rebolledo *et al.*, 2018).

La estructura genética se determinó con un análisis de varianza molecular (AMOVA), entre y dentro de las poblaciones de cada especie, con el uso de los modelos de mutación de alelos infinitos (IAM) (Weir, 1996) y de paso a paso (SMM) (Slatkin, 1995). La significancia estadística se obtuvo con 1 000 permutaciones no paramétricas (Excoffier y Lischer, 2010). El parámetro M , que es la tasa de migración ($M = Nm$) entre pares de poblaciones, se obtuvo con la fórmula $M = (1/F_{ST} - 1)/4$ (Slatkin, 1993). Todas las estimaciones se hicieron con el programa Arlequín ver. 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

Para analizar las relaciones genéticas de las poblaciones se construyó un dendrograma de *Neighbor-joining*, con base en las distancias genéticas estandarizadas (Da) (Nei *et al.*, 1983). La robustez de la topología se evaluó con valor de *bootstrap* de 10 000 (Takezaki y Nei, 1996), con el uso del programa *Poptree2* (Takezaki *et al.*, 2010). La asociación entre la estructura geográfica y genética de las poblaciones se obtuvo mediante un análisis de agrupamiento Bayesiano con el programa *BAPS* (Corander *et al.*, 2008). Este método usa información de la distribución espacial de las poblaciones para definir la estructura genética más probable. Se asumieron de 1-8 grupos (K), con 10 réplicas por K con 10 000 iteraciones, precedidas de 10 000 iteraciones iniciales.

Finalmente, se hizo un análisis de aislamiento por distancia entre pares de poblaciones y su distribución geográfica, mediante una prueba de Mantel con 1 000 permutaciones (IBD) (Bohonank, 2002). Para el análisis se usaron los valores pareados del estadístico F_{ST} (Slatkin, 1995) y las distancias geográficas absolutas en kilómetros, obtenidas a través de

la transformación de Mercator con el programa Quantum GIS Geographic Information System (v. 2.16 Nødebo) (QGIS Development Team, 2016).

Resultados y Discusión

Diversidad y estructura genética

Se registró un total de 37 alelos en un intervalo de 13 (PtTX2146) a siete (PtTX3013) por *locus*. *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* presentaron el mayor número de alelos (18 y 17 respectivamente), seguidos por *P. douglasiana* (14) y *P. oocarpa* (13). El número total de alelos entre las poblaciones de cada especie fue diferente: las de LS3 de *P. pseudostrobus* con 23 y RB6 de *P. douglasiana* con 19 tuvieron el mayor número; Q2 y RA4 de las mismas especies, el número menor, con 11 y nueve alelos respectivamente (Figura 2, Cuadro 2). Se detectaron de uno a cuatro alelos únicos (presentes en una sola población), con frecuencias entre 0.033-0.150. La población RB6 de *P. douglasiana* tuvo tres alelos únicos, CH1 de *P. montezumae*, Q2 y SL3 de *P. pseudostrobus* y TZ8 de *P. oocarpa* presentaron dos alelos, mientras que el resto de las poblaciones no se identificó a ninguno.

Al comparar los resultados obtenidos con los de otros estudios realizados con SSRn (Delgado *et al.*, 2011, 2013; Karhu *et al.*, 2006), el número de alelos fue superior al de los de una población de *P. pseudostrobus* (19) y de *P. montezumae* (18) distribuidas en Michoacán (Delgado *et al.*, 2013), las dos únicas poblaciones de *P. caribae* var. *hondurensis* (Sénécl.) W. H. Barret & Golfari para México (17) (Delgado *et al.*, 2011) y cinco poblaciones de *P. radiata* D. Don en California, Estados Unidos de América y Baja California, México (8) (Karhu *et al.*, 2006). *P. oocarpa* fue la única especie con un valor promedio menor a los registrados, con excepción del estudio de *P. radiata* (Karhu *et al.*, 2006). Estas cifras indican que a pesar de que las poblaciones de la cuenca del Cupatitzio están fragmentadas, aún conservan variantes alélicas, por lo que se podría considerar que la deriva génica no ha actuado de manera importante en la fijación o pérdida de esta forma de diversidad en las poblaciones.

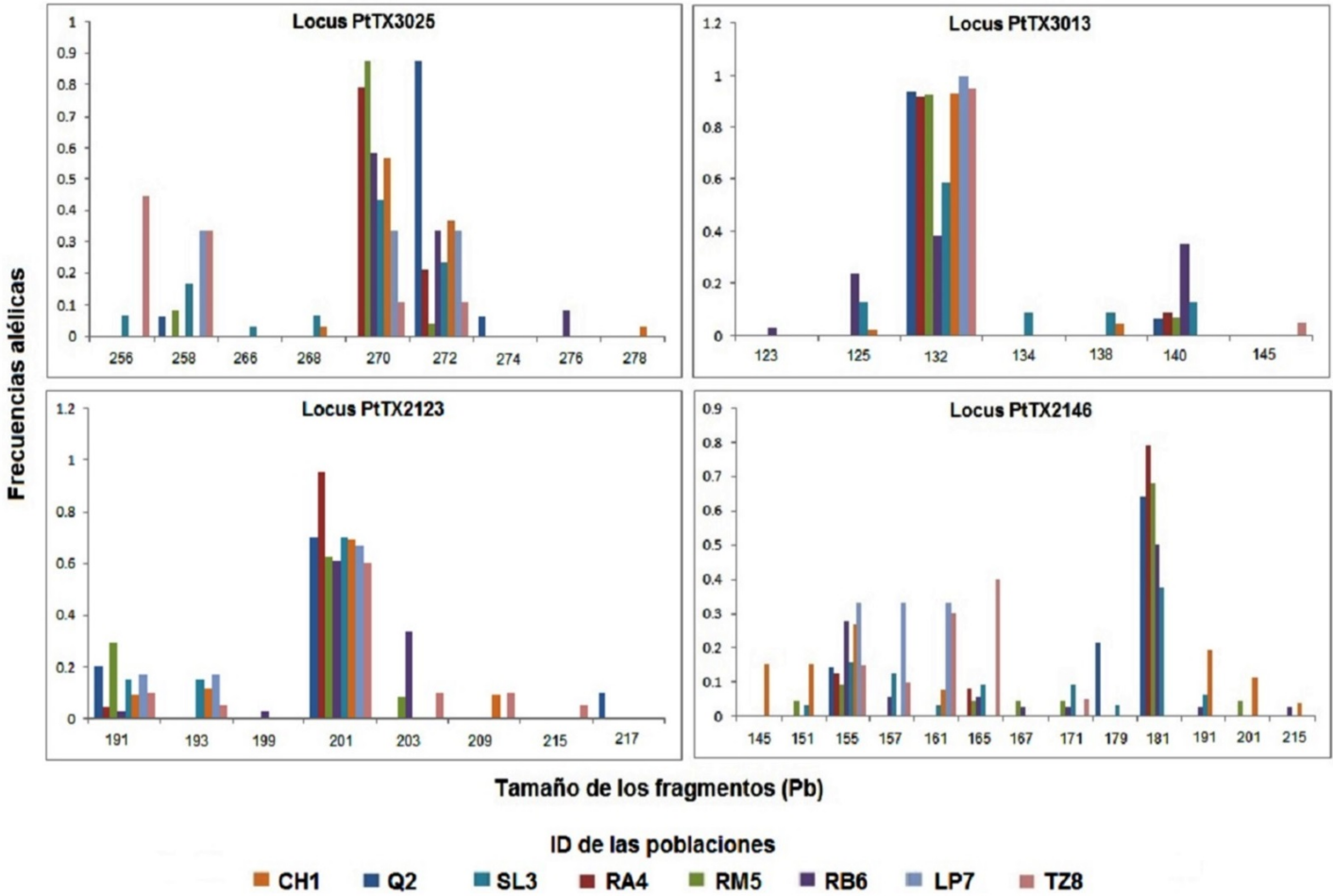


Figura 2. Frecuencias alélicas para los cuatro *loci* analizados en las poblaciones del género *Pinus* de la cuenca del río Cupatitzio, Michoacán, México.

La H_o en promedio fue menor a la H_E para las cuatro especies analizadas. Los promedios de H_o en *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana* fueron los más altos ($H_o=0.378$ y 0.368 , respectivamente), mientras que los valores más bajos se calcularon para *P. montezumae* ($H_o= 0.338$) y *P. oocarpa* ($H_o= 0.275$). En contraste los valores de H_E difirieron entre especies; *P. pseudostrobus* presentó el valor más alto, seguido de *P. montezumae*, *P. oocarpa* y *P. douglasiana* (Cuadro 2). Lo anterior muestra que los valores se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg, y fueron significativos para las cuatro especies ($p<0.05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estimados de la variación genética de ocho poblaciones del género *Pinus*, distribuidas en la cuenca del río Cupatitzio, Michoacán, México.

Zona/especie	Sitio	N	A	N_a	H_o	H_E	F_{IS}	N_e
Alta								
<i>P. montezumae</i>	CH1	18	18	4.5 (2.060)	0.338 (0.143)	0.512** (0.294)	0.339*	835
<i>P. pseudostrobus</i>	Q2	10	11	3.0 (0.500)	0.300 (0.180)	0.359 (0.216)	0.164	360
<i>P. pseudostrobus</i>	SL3	16	23	5.7 (2.082)	0.449 (0.214)	0.674* (0.127)	0.333**	2104
Promedio				4.4 (1.546)	0.362 (0.179)	0.515* (0.227)		1099
	RA4	10	9	2.5 (0.250)	0.189 (0.156)	0.240* (0.136)	0.218*	183
Media								
	RM5	14	15	4.0 (2.217)	0.337 (0.314)	0.364 (0.229)	0.074	369
<i>P. douglasiana</i>	RB6	19	19	5.0 (2.217)	0.580 (0.302)	0.615* (0.094)	0.057	1439
Promedio				3.833 (1.561)	0.368 (0.257)	0.406* (0.153)		664
Baja								
	LP7	5	9	3.0 (0.000)	0.300 (0.246)	0.466** (0.111)	0.393**	627
<i>P. oocarpa</i>	TZ8	10	17	4.5 (1.708)	0.250 (0.254)	0.516** (0.308)	0.544**	818
Promedio				3.75 (1.708)	0.275 (0.250)	0.491** (0.316)		722
Promedio general			15.1	4.02 (1.605)	0.341 (0.228)	0.469** (0.232)	0.286*	

N = Número de individuos; A = Número total de alelos; N_a = Promedio de alelos por locus; H_o = Heterocigosis observada; H_E = Heterocigosis esperada; F_{IS} = Índice de endogamia; N_e = Tamaño efectivo. En paréntesis se indica la desviación estándar. ** $P < 0.000$, * $P < 0.05$.

A nivel de poblaciones, el promedio de la H_o también fue menor a la H_E . Los valores más altos se presentaron en las poblaciones SL3 ($H_o= 0.449$; $H_E= 0.674$) de *P. pseudostrobus* y RB6 ($H_o= a 0.580$; $H_E= 0.615$) de *P. douglasiana*, mientras que los más bajos se obtuvieron para la población de RA4 ($H_o= 0.189$; $H_E= 0.240$) de *P. douglasiana* y P7 de *P. oocarpa* con una H_o mucho menor (0.250) que la H_E (0.516) (Cuadro 2). La mayoría de los valores se desvían significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg ($p<0.05$), lo que sugiere diferentes intensidades de endogamia.

En general, los resultados reflejan una heterogeneidad en la cantidad de variación genética dentro de las diferentes poblaciones y zonas. No obstante, los valores se encuentran dentro de los reportado para otras especies de pino, como *P. oocarpa* ($H_E= 0.642$) (Dvorak *et al.*, 2009), *P. patula* Schiede. ex. Schl. & Cham y *P. tecunumanii* Eguiluz et Perry ($H_E= 0.567$ y 0.646 respectivamente) (Dvorak *et al.*, 2009), *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* ($H_E= 0.277$ y 0.274 respectivamente)(Delgado *et al.*, 2013), *P. mugo* Turra ($H_E= 0.440$) (Zukowska y Wachowiak, 2017), *P. sylvestris* L. ($H_E= 0.772$) (Bilgen y Kaya, 2017) y *P. caribaea* var. *hondurensis* ($H_E= 0.575$) (Rebolledo *et al.*, 2018), lo que indica una diversidad genética intermedia y suficiente para el mantenimiento y posible adaptación de las especies a cambios ambientales.

Endogamia y tamaño efectivo

El promedio del índice de endogamia (F_{IS}) fue alto y significativo ($F_{IS}= 0.286$), por lo que se desvía del equilibrio *Hardy-Weinberg* (Cuadro 2). Las poblaciones que presentaron los mayores niveles fueron LP7 ($F_{IS}= 0.393^{**}$, $P= 0.000$) y TZ8 ($F_{IS}= 0.544^{**}$, $P= 0.000$), ambas de *P. oocarpa*. Estos resultados sugieren que las poblaciones de la cuenca del Cupatitzio no se encuentran en equilibrio genético, debido probablemente al efecto de la reproducción entre parientes cercanos. Los valores son relativamente mayores a los obtenidos con el uso de SSRn en otras especies de pino (*P. patula*, $F_{IS}= 0.148$, *P. tecunumanii*, $F_{IS}= 0.109$) (Dvorak *et al.*, 2009); *P. caribaea* var. *hondurensis*, $F_{IS}= 0.163$ (Delgado *et al.*, 2011). Esto muestra

que a pesar de que las poblaciones contienen importantes niveles de variación genética (como mayor número de alelos o niveles altos de H_E), existen procesos como la endogamia que hacen que las frecuencias de los genotipos y de los alelos se desvíen del equilibrio genético (Hartl y Clark, 1997; Holsinger, 2000).

Los valores altos de endogamia, y por lo tanto, el déficit de heterocigos observados en las poblaciones, se pueden deber a la presencia de alelos nulos (alelos no expresados) que dan lugar a valores erróneos que desvían a las poblaciones de la panmixia (Shinde *et al.*, 2003). En el análisis para la detección de alelos nulos, únicamente el *locus* PtTX3025 en la población TZ8 de *P. oocarpa* mostró una frecuencia superior a 0.200 (0.295). No obstante, para esta especie, también se detectaron valores de endogamia significativos ($F_{IS} = 0.150$, $P < 0.05$) con el uso de SSRn (incluyendo el *locus* PtTX3025) para 51 poblaciones distribuidas en México, Guatemala, Honduras y Nicaragua (Dvorak *et al.*, 2009). La población TZ8 registró un coeficiente de endogamia significativo ($F_{IS} = 0.204$, $P < 0.05$), por lo que es pertinente considerar que la desviación de la panmixia de este *locus* está determinada por el efecto de la endogamia y no por la frecuencia de alelos nulos. Así mismo, no se reconocieron evidencias de desequilibrio de ligamiento para ninguno de los pares de *loci* analizados en cada especie o con la prueba global ($P > 0.05$), lo que indica que los utilizados se segregan de manera independiente, y por lo tanto, no sobreestiman los valores de F_{IS} obtenidos.

El tamaño efectivo (N_e), nuevamente fue mayor en *P. pseudostrobus*, seguido de *P. montezumae*, *P. oocarpa* y *P. douglasiana*. Sin embargo, los valores a nivel de las poblaciones de cada especie fueron contrastantes; la población SL3 de *P. pseudostrobus* presentó el mayor N_e (2 104), mientras que la población Q2, presentó uno de los valores más bajos ($N_e = 360$). En *P. douglasiana* la población RB6 tuvo un valor alto ($N_e = 1 439$), y en la población RA4 se obtuvo el menor valor ($N_e = 183$). En las dos poblaciones de *P. oocarpa*, con los niveles de endogamia más altos, los estimados de N_e fueron intermedios (Cuadro 2). Por ello se podría considerar que los estimados de N_e resultantes, son suficientes para lograr mantener la variabilidad genética de las especies en la cuenca del Cupatitzio.

Actualmente existen pocos estudios que han estimado el N_e con el uso de SSRn en pinos, como es el caso de *Pinus resinosa* Ait, distribuida en Estados Unidos de América, con poblaciones fragmentadas (N_e entre 62-222) (Boys *et al.*, 2005), de *P. caribaea* var. *hondurensis* (N_e entre 402-868) (Delgado *et al.*, 2011), con solo dos poblaciones fragmentadas y restringidas al sureste de México, así como de algunas poblaciones de esta variedad y de *P. caribaea* var. *caribaea* Morelet, y *P. caribaea* var. *bahamensis* (Griseb.) W. H. Barret, distribuidas en la cuenca del Caribe (N_e entre 161-537) (Rebolledo *et al.*, 2018).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el estudio, se observa que la mayoría de los valores son relativamente superiores. Por ello es muy probable que la fragmentación de algunas de las poblaciones como RB6 ($N_e= 1\ 439$) sea muy reciente y que los efectos de la deriva genética y/o de la endogamia aún no se vean reflejados en la disminución de su variabilidad genética, y por ende en los estimados de sus tamaños efectivos.

Estructura genética y flujo genético

La estimación de la diferenciación genética entre las poblaciones de *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana* fue más alta y significativa con el estadístico F_{ST} (0.152 y 0.131, respectivamente) que con R_{ST} , aunque para *P. pseudostrobus* ambos índices fueron significativos ($P<0.05$) (Cuadro 3). Es probable que para dichas especies la migración haga una mayor contribución a la diferenciación genética de las poblaciones en comparación con la mutación, la cual no sigue un modelo estricto (Crow y Aoki, 1984; Balloux y Goudet, 2002). Para *P. oocarpa* el estadístico F_{ST} fue inferior (0.094) a R_{ST} (0.295), si bien ambos fueron significativos ($P<0.01$). En este caso, el efecto de la mutación no es despreciable con respecto a la migración y podría ser la causa más probable de la diferenciación observada (Balloux y Goudet, 2002) (Hardy *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Análisis de AMOVA obtenido con los modelos de mutación de alelos infinitos (IAM; arriba de la diagonal) y paso a paso (SMM; debajo de la diagonal) para las poblaciones de *Pinus pseudostrobus* Lindl., *Pinus douglasiana* Martínez y *Pinus oocarpa* Schiede estudiadas en la Cuenca del río Cupatitzio.

Recurso de variación	df	Componentes de variación	Porcentaje de variación	Promedio de <i>Fst/Rst</i> sobre los <i>loci</i>	Valor de <i>P</i>
<i>P. pseudostrobus</i>					
Entre poblaciones	1	5.677/56.592	15.241/12.091	0.152***/0.121*	0.000/0.015
Dentro de poblaciones	50	46.526/411.456	84.759/87.901		
Total	51	1.267/20964.1			
<i>P. douglasiana</i>					
Entre poblaciones	2	0.138/3.655	13.061/1.948	0.131***/0.019	0.000/0.194
Dentro de poblaciones	87	0.872/184.913	86.939/97.105		
Total	89	1.004/198.433			
<i>P. oocarpa</i>					
Entre poblaciones	1	0.1096/37.074	9.408/29.591	0.094*/0.295***	0.015/0.000
Dentro de poblaciones	28	1.055/88.214	90.592/70.409		
Total	29	1.1649/125.288			

La significancia estadística fue obtenida con 1 000 permutaciones no paramétricas (Excoffier and Lischer, 2010). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

En la actualidad no existe un consenso sobre la exactitud de las estimaciones con ambos modelos de mutación, pero se ha probado, experimental y empíricamente, que depende en gran medida de los tamaños de las poblaciones, del tamaño de muestra y del número de *loci* analizados (Gaggiotti *et al.*, 1999; Balloux y Goudet, 2002), con una mayor sensibilidad del estadístico R_{ST} a los tamaños de muestra

pequeños o al uso de pocos *loci* (< 8), debido a que sus estimaciones presentan una varianza más alta que con F_{ST} (Golstein *et al.*, 1995; Slatkin 1995; Balloux y Goudet, 2002; Hardy *et al.*, 2003). Para este último estadístico, el número de poblaciones no tiene que ser infinito, ni necesariamente muy grande para que la estructura genética, y, por ende, los estimados de Nm , sean más acertados (Niegel, 2002).

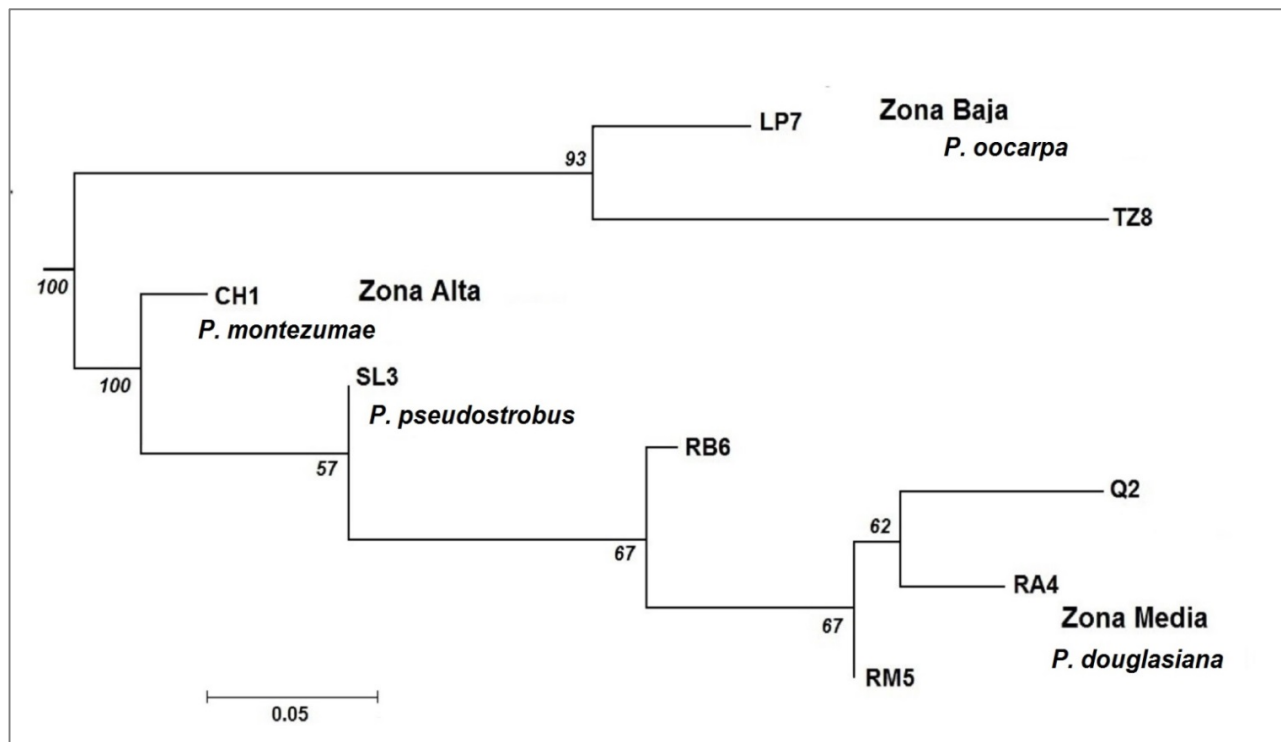
Para la estimación de la estructura genética de especies de pinos mexicanos mediante el uso de SSRn en particular, se ha utilizado el estadístico F_{ST} , con el que resultaron valores entre 0.059 en *P. patula* y 0.131 en *P. oocarpa* (Dvorak *et al.*, 2009; Alfonso *et al.*, 2014); en el presente estudio se obtuvieron valores superiores, excepto para *P. oocarpa*. Así, el Nm estimado para esta última especie es relativamente más alto ($Nm= 2.41$) comparado con *P. pseudostrobus* y *P. douglasiana* ($Nm= 1.40$ y $Nm= 1.66$ respetivamente).

En trabajos para especies de pinos mexicanos, los valores de Nm calculados con SSRn varían entre 1.81 en *P. patula* y 13.2 en *P. caribaea* var. *hondurensis* (Dvorak *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2011). No obstante, está documentado que unidades mayores a 1.0 de Nm son suficientes para homogeneizar las frecuencias alélicas entre las poblaciones de algunas especies de plantas e impedir la diferenciación genética (Hartl y Clark, 1997).

Las coníferas, en general, tienen mecanismos de dispersión por viento, tanto de polen como de semillas, por lo que el estimado del flujo genético generalmente es superior a 1.5 unidades (Hamrick *et al.*, 1995). Aunque también tienen capacidad para autofecundarse al ser la mayoría de las especies monoicas y auto-compatibles (Williams, 2008). Por lo tanto, se puede considerar que, a pesar de que algunas de las poblaciones muestran niveles importantes de endogamia, tienen la posibilidad de intercambiar variantes alélicas (por los valores de Nm obtenidos), lo que impide una separación genética marcada, además de que contienen alelos que se comparten entre las poblaciones de cada zona, como alelos diferenciales entre las poblaciones de las especies de interés.

Relaciones genéticas y aislamiento por distancia

El análisis de Neighbor-Joining formó dos grupos: el primero representado por las poblaciones distribuidas en la zona baja de la subcuenca (P7 y TZ8), de *P. oocarpa*; y el segundo, ubicado en la parte más basal del dendrograma, conformado por la población de *P. montezumae* (CH1) y una de las dos poblaciones de *P. pseudostrobus* (SL3) de la zona alta de la subcuenca. Las poblaciones más derivadas o recientes están integradas por las poblaciones de la zona media, representadas por *P. douglasiana* y una población de *P. pseudostrobus* (Q2) (Figura 3).



En la base de las ramas se indican los porcentajes de robustez de la topología obtenida con 1 000 réplicas de re-muestreo.

Figura 3. Dendrograma de Neighbor-Joining, basado en las distancias genéticas (D_a) de Nei *et al.* (1983) entre las poblaciones del género *Pinus* de la cuenca del río Cupatitzio.

Este resultado es muy similar al obtenido con el análisis de agrupamiento Bayesiano BAPS, el cual formó cuatro grupos (K4), con la máxima probabilidad marginal ($\text{LogML} = -960.15$, $P = 1.000$) (Figura 4). El primer grupo representado por la población CH6 de *P. montezumae*; el segundo por la población Q2 de *P. pseudostrobus*; un tercer grupo formado por la población SL3 de *P. pseudostrobus* y las tres poblaciones de *P. douglasiana*; y el cuarto grupo formado por *P. oocarpa*. Solo difirieron en el segundo grupo formado por la población Q2, que en el dendrograma corresponde a la población más derivada.

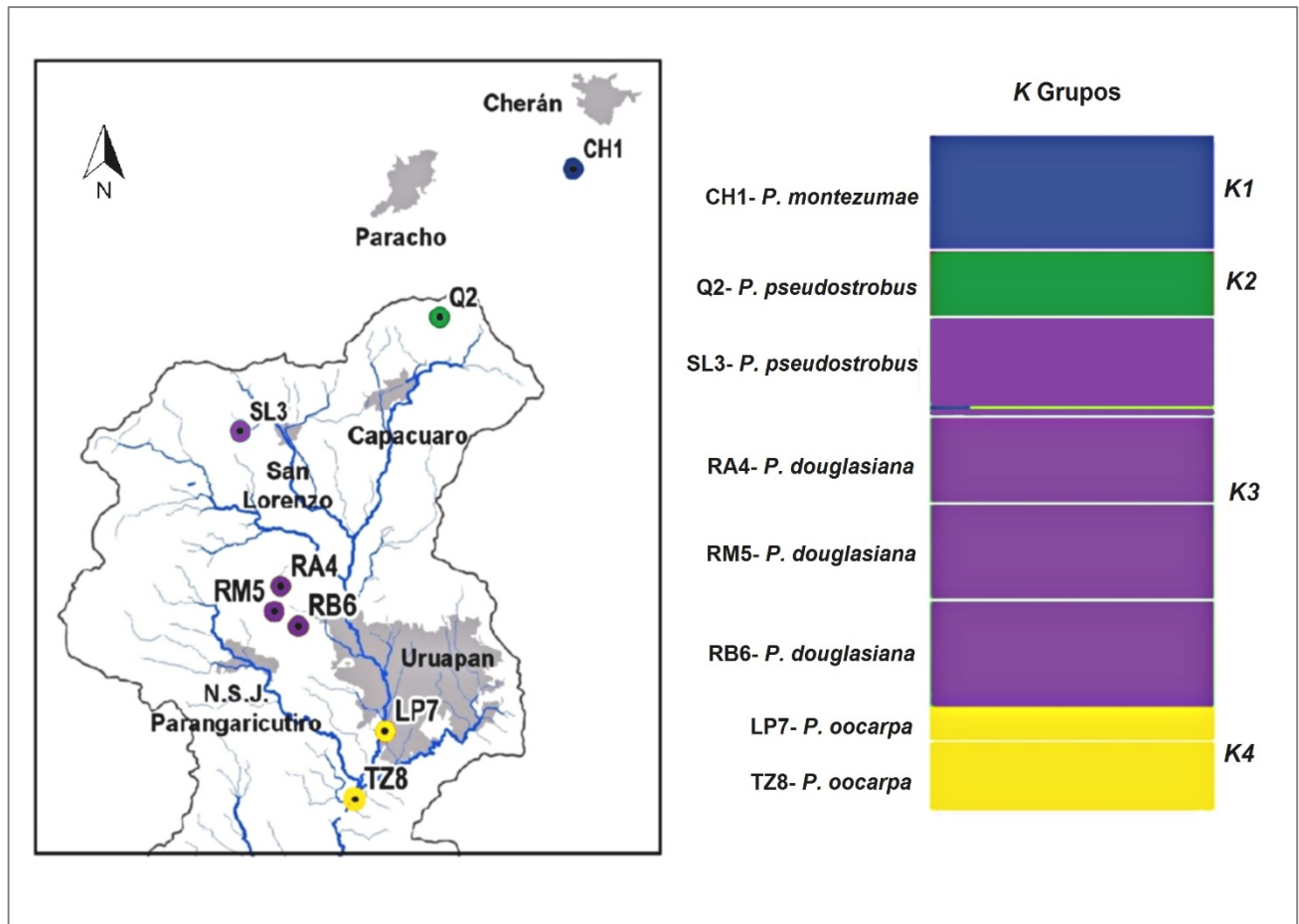


Figura 4. Agrupamiento Bayesiano BAPS, obtenido para las poblaciones del género *Pinus* distribuidas en la cuenca del río Cupatitzio. En barras de color se representan los 4K grupos seleccionados con la partición más óptima de los datos ($P = 1.000$).

Ambos tipos de análisis muestran una tendencia de agrupar a las poblaciones con su distribución geográfica, las cuales están representadas por *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* en la parte alta de la cuenca, por *P. douglasiana* en la parte media y *P. oocarpa* en la parte baja.

Esta asociación se verificó parcialmente con el análisis de aislamiento por distancia (IBD), con una correlación moderada pero significativa ($r^2 = 0.443$, $P < 0.026$), en la que 44.3 % de las diferencias genéticas observadas son atribuibles a la distancia geográfica entre las poblaciones.

Se ha demostrado que el IBD es más evidente en algunas especies de pino que tienen una distribución fragmentada, los cuales se han obtenido en varias especies analizadas con microsatélites de cloroplasto (SSRcp) (Delgado y Piñero, 2008; Moreno y Piñero, 2009; Jardón *et al.*, 2011).

Solo se han consignado tres trabajos con el uso de SSRn en pinos, que muestran una asociación baja pero significativa: *Pinus pinaster* Ait en la cuenca del mediterráneo en Europa ($r = 0.360$) (Mariette *et al.*, 2001); *P. resinosa* que se ubica en el Noreste de EUA ($r = 0.381$) (Boys *et al.*, 2005); y en el complejo de pinos caribeños para la cuenca del Caribe ($r = 0.263$) (Rebolledo *et al.*, 2018). Estos resultados son similares al obtenido en el presente estudio, por lo que una gran parte (≈ 60 %) de la distribución de la variación genética podría estar vinculada a otros factores, como la fragmentación espacial de las poblaciones, demarcada tanto por la geomorfología natural de la cuenca, como por al cambio de uso de suelo, de forestal a huertos de aguacate y de urbanización (Bravo *et al.*, 2009). Dicha relación también está influenciada por las diferencias genéticas intrínsecas de los cuatro *taxa* estudiados, lo que se observa en los análisis de agrupamiento Bayesiano y en el dendrograma obtenido.

Recomendaciones para la conservación

Primero, se sugiere hacer actividades de conservación *in situ* de las poblaciones SL3 de *P. pseudostrobus* y RB6 de *P. douglasiana*, distribuidas en las zonas alta y media de la cuenca respectivamente, ya que fueron las poblaciones que presentaron los niveles mayores de H_E y de variantes alélicas, las cuales podrían contener el acervo genético representativo de ambas especies. La población RB6 de *P. douglasiana* se encuentra dentro del área de Reserva del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, lo que ha ayudado a su conservación, mientras que la población SL3 de *P. pseudostrobus*, que se distribuye en la comunidad de San Lorenzo, requiere de acciones mediatas para delimitarla de manera formal, la cual podría ser declarada por las autoridades competentes como una Unidad de Manejo Forestal (UMAFOR; Conafor, 2009), de tal manera que ambas poblaciones funcionen como reservorios de biodiversidad y como puentes de conectividad con otras poblaciones o fragmentos (Aavick *et al.*, 2014).

Así mismo, se recomienda la colecta de semillas de estas dos poblaciones ya que contienen la mayor variabilidad genética. Este tipo de semillas se debe aprovechar para la producción de planta a gran escala con fines de restauración o de reforestación; particularmente para el caso de la Meseta Purépecha, donde están inmersas las poblaciones mencionadas.

Por otra parte, las poblaciones RA4 (zona media) de *P. douglasiana*, TZ8 (zona baja) de *P. oocarpa* y de Q2 (zona alta) de *P. pseudostrobus*, presentaron los niveles de variación genética menor, y para dos de ellas se obtuvieron los niveles mayores de endogamia (RA4 y TZ8). Demográficamente, para la población de *P. douglasiana* de la parte alta de la Reserva RA4, se observó poca regeneración y el menor número de árboles adultos (<15), probablemente como consecuencia de los incendios frecuentes que han ocurrido en la zona. La población TZ8 de *P. oocarpa*, también está representada por pocos árboles adultos (<30), con nula regeneración; en este caso, se debe principalmente a los asentamientos urbanos, al estar el sitio inmerso dentro de la región sur-oriente de la ciudad de Uruapan. Es necesario realizar actividades de

restauración y repoblación con base en la introducción de planta obtenida de árboles de *P. pseudostrobus*, *P. douglasiana* y *P. oocarpa* nativos de la región, para aumentar su tamaño censal y disminuir el efecto de la endogamia a mediano plazo.

En general, se deben implementar estrategias de conservación y restauración enfocadas al incremento del tamaño de las poblaciones, para que la diversidad genética se mantenga y con ello, la representación biológica, evolutiva y ecológica de las especies de pino de los bosques templados de la cuenca del río Cupatitzio.

Conclusiones

Las cuatro especies de pino estudiadas contienen niveles intermedios de variación genética; las poblaciones SL3 de *P. pseudostrobus* y RB6 de *P. douglasiana* presentan los mayores valores. Sin embargo, la mayoría de las poblaciones se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg, por lo que muestran niveles importantes de endogamia. Los tamaños efectivos y los estimados del flujo genético son intermedios, pero suficientes para impedir una diferenciación genética marcada entre las poblaciones, la cual fue moderada pero significativa. Los análisis de agrupamiento Bayesiano y de las distancias genéticas, agrupan a las poblaciones acorde con su distribución geográfica e identidad taxonómica. Es necesario que dentro de los planes de conservación y restauración se consideren poblaciones de las cuatro especies, con la priorización mínimamente de las poblaciones que contienen los mayores niveles de variación genética, para que asegure su permanencia en estos bosques de pino, que son esencial para el buen funcionamiento del sistema hidrológico de la cuenca del río Cupatitzio.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Fondos Mixtos Conacyt-Estado de Michoacán por el financiamiento otorgado al proyecto FOMIX-115897 de P. Delgado. A las comunidades de San Lorenzo, Cherán y Quinceo por permitirnos trabajar en sus bosques y apoyar

en el trabajo de campo. Se agradece a los revisores que con sus comentarios mejoraron sustancialmente el manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución por autor

Etelbina Ramírez Enríquez y Patricia Delgado Valerio: trabajo de laboratorio y análisis estadísticos; Patricia Delgado Valerio: responsable del proyecto integral. Todos los autores participaron en el trabajo de campo, elaboraron el manuscrito y aplicaron correcciones.

Referencias

Aavik, T., R. Holderegger and J. Bolliger. 2014. The structural and functional connectivity of the grassland plant *Lychnis flos-cuculi*. *Heredity* 112(5): 471-478.

Alfonso C., C., J. Campos C., G. Sánchez G., A. Monsalvo R. y R. Clark T. 2014. Manejo forestal y diversidad genética de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham, en Sierra de Juárez, Oaxaca. *Madera y Bosques* 20(2): 11-22. doi: 10.21829/myb.2014.202160.

Balloux, F. and J. Goudet. 2002. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology* 11(4): 771-783.

Bello G., M. A. y X. Madrigal S. 1996. Estudio florístico del Campo Experimental Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán. INIFAP-Campo experimental Uruapan. Folleto Científico Núm. 2. Uruapan, Mich., México. 47 p.

Bilgen, B. B. and N. Kaya. 2017. Genetic diversity among *Pinus sylvestris* L. populations and its implications for genetic conservation: comparison of nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Fresenius Environmental Bulletin* 26: 6873-6881.

Bohonak, A. J. 2002. IBD (Isolation by Distance): a program for analysis of isolation by distance. *Journal of Heredity* 93(2): 153–154.

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(5): 833-841.

Bravo, M., J. Sánchez, J. A. Vidales, J. T. Sáenz, J. G. Chávez, S. Madrigal, H. J. Muñoz, L. M. Tápia, G. Orozco, J. J. Alcántar, I. Vidales y E. Venegas. 2009. Impactos ambientales y socioeconómicos del cambio de uso del suelo forestal a huertos de aguacate en Michoacán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Campo Experimental Uruapan. Publicación especial Número 2. México, D. F. México. 76 p.

Brown, A. H. D., O. Frankel H., D. Marshall R. and J. Williams T. 1989. The use of plants genetic resources. Cambridge University Press. New York, NY USA. 382 p.

Comisión Nacional del Agua (Conagua). 2009. Programa hídrico visión 2030 del Estado de Michoacán de Ocampo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D. F, México. 176 p.

Comisión Nacional del Agua (Conagua). 2015. Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero de Uruapan (1914), estado de Michoacán. Subdirección General Técnica. Gerencia de Aguas Subterráneas. Diario Oficial de la Federación. Comisión Nacional del Agua. México, D. F., México. pp. 1- 27

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (Conanp). 2006. Programa de conservación y manejo del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio. Morelia, Mich., México. 173 p.

Comisión Nacional Forestal (Conafor). 2009. Guía para elaborar el estudio Regional Forestal de la Unidad de Manejo Forestal. Diario Oficial de la Federación. Comisión Nacional Forestal. Zapopan, Jal., México. 88 p.

Corander, J., J. Sirén and E. Arjas. 2008. Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics* 23(1): 111–129.

Crow, J. F. and K. Aoki. 1984. Group selection for a polygenic behavioural trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81(19):6073-6077.

Chapuis, M. P. and A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621-631. doi: 10.1093/molbev/msl191.

Delgado, P. y D. Piñero. 2008. Marcadores moleculares, variación genética y filogeografía en árboles forestales. *In: Sánchez V., L. R. (ed.). Ecología, Manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México. Editorial MundiPrensa México, S. A. de C. V. México, D. F., México. pp. 1-19.*

Delgado, P., D. Piñero, L. Jardón B. and F. Chi M. 2011. Genetic variation and demographic contraction of the remnant populations of Mexican Caribbean pine (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*: Pinaceae). *Annals of Forest Science* 68(1): 121-128.

Delgado, P., J. Núñez, M. A. Rocha G. y F. H. Muñoz J. 2013. Variación genética de dos áreas semilleras de pino establecidas en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 4(8): 104-115.doi.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2011. Acuerdo por el que se dan a conocer los estudios técnicos de aguas nacionales superficiales de la Región Hidrológica número 18 Balsas. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5175730&fecha=26/0 (28 de julio de 2018).

- Dvorak, W. S., K. Potter M., V. Hipkins D. and G. Hodge R. 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(5):609–626.
- Ellstrand, N. C. 2014. Gene flow, the most important evolutionary force in plants? *American Journal of Botany* 101(5):737-753.
- Elsik, G. C., T. Minihan V, E. Hall S, M. Scarpa A. and G. Williams C. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43(3): 550-555.
- Excoffier, L. and H. Lischer E. 2010. Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 564-567.
- Frankham, R. 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* 143(9): 1919-1927.
- Gaggiotti, O. E., O. Lange, K. Rassmann and C. Gliddon. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* 7(9):1513-1520.
- González P., C. 2010. Los manantiales del Cupatitzio, Uruapan. Apuntes sobre hidrología. Editorial Morevallado, S. R. L. de C. V. Morelia, Mich., México. 51 p.
- Guo, W., S. and A. E. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48(2): 361-372.
- Hamrick, J. L., M. J. Godt W. and S. L. Sherman B. 1995. Gene flow among plant populations: evidence from genetic markers. *In*: Hoch, P. C. and A. G. Stephenson (eds.). *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics*. Monographs in Systematic Botany. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, MO USA. pp. 215-232.

Hardy, O. J., N. Charbonnel, H. Fréville and M. Heuertz. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163(4):1467–1482.

Hartl, D. L. and A. G. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates. Sunderland, UK. 682 p.

Holsinger, K. E. 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(13): 7037–7042.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (Inegi). 1985. *Síntesis geográfica del estado de Michoacán*. Dirección General de Cartografía. Secretaría de Programación y Presupuesto. México, D. F., México. 316 p.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (Inegi). 2010. *Compendio de Información Geográfica Municipal*.

<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/topografia/compendio.aspx>
(7 de noviembre de 2018).

Jardón, L., P. Delgado, A. Vázquez L., G. Geada and D. Piñero. 2011. Phylogeography of Australes (Loudon) pine Subsection distributed on the Caribbean Basin. *Annals of Botany* 107(2): 229-241.

Karhu, A. 2001. *Evolution and applications of pine microsatellites*. Oulu University Press. Oulu, Finland. 51 p.

Karhu, A., C. Vogl, G. F. Moran, J. C. Bell and O. Savolainen. 2006. Analysis of microsatellite variation in *Pinus radiata* reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks. *Journal of Evolution and Biology* 19(1): 167-175.

Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217 (5129): 624-626.

Mariette, S., D. Chagné, C. Lézier, P. Pastuszka, A. Raffin, C. Plomion and A. Kremer. 2001. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 86(4): 469-479.

- Moreno L., A. and D. Piñero. 2009. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography* 36(1): 121-131.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Press. New York, NY. USA. 512 p.
- Nei, M. F., F. Tajima and Y. Tatenno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequencies data. *Journal of Molecular Evolution* 19(2): 153-170.
- Neigel, J. E. 2002. Is F_{ST} obsolete? *Conservation Genetics* 3(2):167-173.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2009. *Los bosques y el agua. Estudio FAO Montes. No 155*. Roma, Italia. 86 p.
- Potter, K. M., R. Jetton M, A. Bower, F. Douglas, J. Man G, V. Hipkins D. and M. Westwood. 2017. Banking on the future: progress, challenges and opportunities for the genetic conservation of forest trees. *New Forest* 48(2): 153-180.
- QGIS Development Team. 2016. Quantum GIS Geographic Information System (v. 2.16 Nødebo). Open Source Geospatial Foundation Project. <http://www.qgis.osgeo.org> (14 de enero de 2017).
- Rajora, O. P., M. H. Rahman, G. P. Buchert and B. P. Dancik. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* 9(3): 339-348.
- Rajora, O. P. and A. Mosseler. 2001. Molecular markers in conservation, restoration and sustainable management of forest genetic resources. *In*: Muller S., G. and R. Schubert (eds.). *Genetic response of forest system to changing environmental conditions. Forest Science Book Series, vol 70*. Springer Dordrecht. Dordrecht, Holland. pp. 187-202.

- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106.
- Rebolledo, V., L. Jardón, I. Ramírez, A. Vázquez-Lobo, D. Piñero and P. Delgado. 2018. Genetic variation and dispersal patterns in three varieties of *Pinus caribaea* Morelet (Pinaceae) in the Caribbean Basin. *Plant Ecology and Evolution* 151 (1) 61-76.
- Shinde, D., Y. L. Lai, F. Z. Sun and N. Arnheim. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acid Research* 31(3): 974–980.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and not-equilibrium populations. *Evolution* 47(1): 264-279.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics* 139(1):457-462.
- Takesaki, N. and M. Nei. 1996. Genetic distances y reconstruction of phylogenetics tree from microsatellite DNA. *Genetics* 144(1): 389-399.
- Takezaki N., M. Nei. and K. Tamura. 2010. POPTREE2: software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Molecular Biology and Evolution* 27(4): 747- 752.
- Villalobos A., A. R., J. A. Pérez de la R., A. Arias and O. P. Rajora. 2014. Cross-species transferability of eastern white pine (*Pinus strobus*) nuclear microsatellite markers to five Mexican white pines. *Genetics and Molecular Research* 13(3): 7571-7576.
- Weir, B. S. 1996. Genetic data analysis II. Sinauer Associates, Sunderland. Sunderland, MA USA. 445 p.
- Williams, C. G. 2008. Selfed embryo death in *Pinus taeda*: a phenotypic profile. *New Phytologist* 178(1):210-222.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F- statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19(3): 395-420.

Zukowska, W. B. and W. Wachowiak. 2017. Nuclear microsatellite markers reveal the low genetic structure of *Pinus mugo* Turra (dwarf mountain pine) populations in Europe. *Plant Systematics and Evolution* 303(5):641–651.