



Variación genética de *Pinus pinceana* Gordon evidencia de conectividad en poblaciones fragmentadas

Verónica Aguirre-Limón¹

Glafiro Alanís-Flores^{1*}

José Ignacio González-Rojas¹

Adriana Flores-Suárez¹

Susana Favela-Lara¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León

*Autor por correspondencia, email: galanis_44@yahoo.com.mx

Resumen:

Pinus pinceana es una especie de pino mexicano que pertenece a la subsección Cembroides. Se presenta, de manera fragmentada, en zonas montañosas y áridas de la Sierra Madre Oriental (SMO). Actualmente, está incluida en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 con el estatus de Protección Especial. Con el fin de evaluar la diversidad genética entre sus poblaciones, la cantidad de flujo genético, así como la distancia genética de 180 muestras obtenidas de las localidades más norteñas, estas se analizaron con la técnica de amplificación

aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). La diversidad genética en las poblaciones fue alta, con un porcentaje de polimorfismo de 94.7 %, y un grado de diversidad medido con el índice de Shannon de 48 %. El total de la variación, encontrada entre las poblaciones fue de 14.8 % ($P=0.001$). La mayor parte de la variación se determinó dentro de las poblaciones (85.18 %), la cual fue alta, con una diferenciación baja ($G_{st} = 0.15$). Esto sugiere que aun y cuando la especie presenta distribución restringida y fragmentada a través de la SMO, el flujo genético interpoblacional ha sido suficiente para decir que *P. pinceana* no está en un *vortex* de extinción genética. La distancia genética muestra la formación de dos grupos: uno con las poblaciones pertenecientes al estado de Coahuila y otro con las de Nuevo León y Zacatecas, lo cual indica un mayor flujo genético entre ellas, con respecto a las de Coahuila y, probablemente, la influencia de alguna barrera fisiográfica en la Sierra Madre Oriental.

Palabras clave: Distancia genética, extinción genética, flujo genético, *Pinus pinceana* Gordon, RAPDs, Sierra Madre Oriental, variación genética.

Fecha de recepción/Reception date: 25 de febrero de 2017

Fecha de aceptación/Acceptance date: 22 de junio de 2017.



Introducción

Pinus pinceana Gordon, es una especie endémica de México, la cual proporciona una excelente oportunidad para estudiar los efectos de la fragmentación y los patrones genéticos de variación entre sus poblaciones. Se distribuye sobre una distancia superior a 750 km de norte a sur (Favela y Thomas, 2013); su extensión es por encima de 20 000 km², pero debido a su distribución discontinua y dispersa, el área que ocupa es probablemente menor a 2 000 km². Se presentan en tres áreas principales: el norte (Coahuila, Zacatecas, Nuevo León), centro (San Luis Potosí) y el sur (Hidalgo y Querétaro); separadas por montañas y grandes extensiones de zonas áridas. *P. pinceana* no solo se presenta de forma dispersa en las comunidades, si no que de forma fragmentada y aislada por barreras geográficas, lo que se supone dificulta el intercambio genético o conectividad entre sus poblaciones, especialmente, en la parte Norte (Coahuila) en donde se acentúa su aislamiento por grandes extensiones de zonas áridas y se detiene su distribución presentándose las poblaciones más septentrionales.

El aislamiento genético favorece la diferenciación de las poblaciones por efectos de deriva genética, como lo demuestran estudios de diversidad genética de la especie mediante isoenzimas (Ledig *et al.*, 2001; Molina-Freaner *et al.*, 2001) y con microsatélites de ADN de cloroplasto. La disimilitud ambiental entre regiones sugiere la posibilidad de que la selección natural haya ocasionado diferencias entre las poblaciones con características de importancia adaptativa a factores específicos de estrés ambiental (Ledig *et al.*, 2001).

Los bosques de *Pinus pinceana* están incluidos en el listado de hábitats naturales en peligro que exigen medidas específicas de conservación, clasificada como "LRnt" en la lista roja de la IUCN *Red List*, que significa en bajo riesgo (IUCN, 2001); además tiene categoría de sujeta a protección en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010), en parte porque sus poblaciones se distribuyen en forma fragmentada, en pequeños rodales y quizá por la falta de estudios sobre su

variabilidad genética. Aunado a lo anterior, diversos autores documentan que es vulnerable, dado que en algunas áreas visitadas se presenta poca regeneración natural (Perry, 1991; Villarreal *et al.*, 2009). Asimismo, es importante en la economía de los habitantes de las comunidades cercanas, pues obtienen ingresos por la venta de la semilla comestible (piñón blanco) y la utilizan como fuente de leña y combustible.

Pinus pinceana se ha sido estudiado, previamente, con técnicas moleculares como isoenzimas (Ledig *et al.*, 2001; Ramírez-Herrera 2007). Por lo tanto, en el presente trabajo se utilizan los marcadores de RAPD, para evaluar la variación de sus poblaciones norteñas, incluyendo las más septentrionales y exclusivamente las que ocurren en la Sierra Madre Oriental, además se considera, por primera vez, una población recientemente registrada en el estado de Nuevo León. Analizar solo la parte norte de la distribución de las especies dará la oportunidad de conocer, si existe una estructura poblacional, así como evaluar las poblaciones más septentrionales y las más aisladas.

Los marcadores nucleares RAPD se han usado para analizar la variación genética de especies y poblaciones del género *Pinus* (Newton *et al.*, 2002; Kurt *et al.*, 2011; Cipriano *et al.*, 2013; Kovacevic *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013); así como para reconstruir la relación filogenética de algunas taxa (Favela, 2004; Castro-Félix, 2008). La técnica de RAPD no requiere previo conocimiento del genoma por utilizar, tienen, además, la ventaja de ser marcadores *multilocus* arbitrarios que generan un gran número de marcadores polimórficos por la amplificación o no amplificación de secuencia de ADN dispersos por todo el genoma (Williams *et al.*, 1990; Vos *et al.*, 1995), de los cuales se obtiene información más precisa de la que se infiere basada en un solo gen (Koopman, 2005). No obstante, los resultados de RAPD pueden ser engañosos, por la presencia de contaminantes (hongos), lo cual es crucial para medir la reproducibilidad de los datos.

Otros posibles inconvenientes son la no homología de los fragmentos comigrantes y su naturaleza dominante (ausencia/presencia de bandas). Sin embargo, una

exhaustiva búsqueda de literatura demuestra la congruencia general de los datos obtenidos con RAPD con los de microsatélites, a través de una amplia gama de grupos taxonómicos (Nerendrula y Nkongolo, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Cichorz *et al.*, 2014; Tomar *et al.*, 2014), esto indica que son aceptables en análisis de variabilidad genética de poblaciones.

Los objetivos del presente estudio fueron: a) documentar cómo la diversidad, diferenciación y distancia genética de RAPD se distribuye en las poblaciones norteñas de *Pinus pinceana*, incluyendo una población recientemente descubierta en el estado de Nuevo León, b) comparar los datos sobre diversidad genética, previamente, registrados para otras poblaciones de *P. pinceana* y con otros marcadores moleculares, a fin de analizar el comportamiento de los resultados de la población de Nuevo León; y c) inferir si existe conectividad entre las poblaciones.

Materiales y Métodos

Material biológico

Se analizaron seis poblaciones que representan la distribución de *P. pinceana* en el norte de México (Cuadro 1), específicamente, aquellas que se ubican en los estados de Zacatecas, Coahuila y la recientemente registrada para el estado de Nuevo León (Figura 1) (Favela *et al.*, 2009). En cada localidad se seleccionaron al azar 30 individuos espaciados entre ellos 10 m, de los cuales se tomaron, manualmente, 10 g de hojas maduras, que se almacenaron en bolsas de plástico con 10 g de sílica gel.

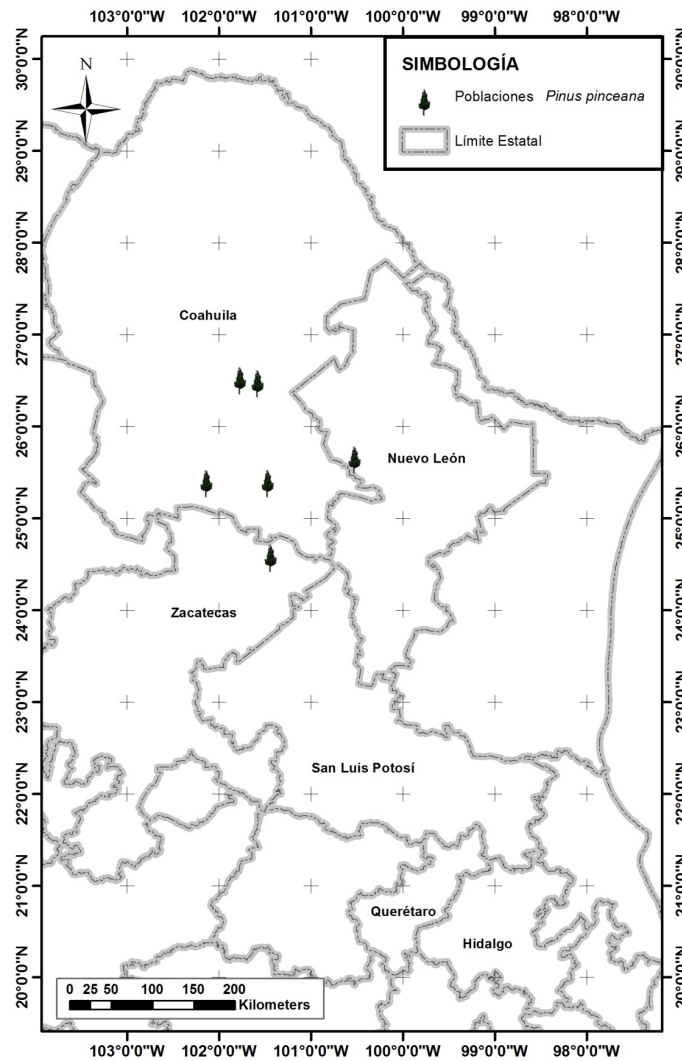


Figura 1. Distribución geográfica de las poblaciones muestreadas de *Pinus pinceana* Gordon en la Sierra Madre Oriental.



Cuadro 1. Lista de poblaciones de *Pinus pinceana* Gordon muestreadas en la Sierra Madre Oriental.

	Localidad	Coordenadas		Altitud (m)
		N	O	
1	La Noria, Cuatro Ciénegas, Coahuila	25°23'08"	101°10'03"	2 050
2	La Palmosa, Cuatro Ciénegas, Coahuila	25°17'29"	101°10'03"	2 340
3	La Casita, Parras, Coahuila	25°15'08"	101°34'08"	2 200
4	El Jaralito, Gral. Cepeda, Coahuila	25°21'42"	101°27'76"	2 500
5	Cañón del Moroso, Santa Catarina, Nuevo León	25°37'46"	100°31'34"	1 500
6	Las Lajas, Concepción del Oro, Zacatecas	24°33'35"	101°26'25"	2 400

Extracción de ADN

El ADN se extrajo de 1 g. de hojas secas de los 30 individuos recolectados en cada una de las poblaciones, siguiendo el método de Doyle y Doyle (1990), con adición de acetato de amonio para remover los excesos de carbohidratos (Hollingsworth *et al.*, 1999).

Análisis de RAPD

Para seleccionar los oligos por utilizar en todas las muestras se probaron 15 decanonucleótidos de secuencia arbitraria de las series OPA, OPB, OPC, OPG y OPP de operón para RAPD (*Operon RAPD kits technologies*, Alameda), para ello se usaron 16 individuos escogidos de los 180 existentes, para finalmente seleccionar seis que mostraron patrones de bandeos claros y reproducibles para llevar a cabo los análisis correspondientes.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 μ L, cuya mezcla consistió de los siguientes reactivos: 20 ng de ADN genómico en buffer 1X (*Invitrogen* 10X) con 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 nM dNTP's, 0.50 M de primer, 2 % formamida, y 1 Unidad *Taq* polimerasa (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA). Se incluyó un tubo control sin ADN genómico, con todos los componentes de la reacción, para de esta forma descartar la contaminación.

Condiciones de PCR

La amplificación del ADN se hizo con un termociclador programable (*Thermo Electron Px2 Thermal Cycler PCR PCYL220 Issue 1, HBPX2110*). Las condiciones de reacción para RAPD que se utilizaron fueron: 94 °C (2 min) para la separación inicial de las cadenas de ADN, posteriormente, se agregaron 2 ciclos *touchdown* en la que la temperatura de alineamiento de la reacción decreció 2 °C cada ciclo; enseguida 41 ciclos de 93 °C (30 seg), 35 °C (1 min), 72 °C (2 min) y 72 °C (5 min) para la extensión final.

Detección y procesamiento de productos de PCR con RAPD

Las amplificaciones se realizaron de forma replicada para cada primer y población, con el protocolo estandarizado. Las muestras de ADN de población se colocaron intercaladas en los geles de agarosa. Los productos amplificados fueron separados en electroforesis de gel de agarosa al 1.8 % en buffer TBE 1x, con una diferencia de potencial constante de 135 voltios, durante 2 horas 30 minutos. Se tiñeron los geles posteriormente, por 15 minutos en buffer SB 1X con bromuro de etidio, y por último, los patrones de bandeo se visualizaron bajo luz UV, donde se fotografiaron en un transiluminador (*MultiDoc-It™ Imaging System, UVP®*, USA).

Análisis de datos

Con el patrón de bandas obtenido por la separación durante la electroforesis de los diferentes fragmentos amplificados, se construyó una matriz presencia-ausencia, registrándose visualmente como bandas presentes (1), que serían todos los homocigotos dominantes (AA) y heterocigotos (Aa); las bandas ausentes como (0), correspondientes a homocigotos recesivos (aa). Se desarrollaron matrices binarias para cada primer y población, después se utilizaron para estimar la variabilidad genética y estructura de las poblaciones de *P. pinceana*.

La matriz binaria se analizó con el programa *POPGENE* v32 (Yeh *et al.*, 1997) para medir la variabilidad genética. Los valores de variación genética para cada población fueron: el índice de diversidad de Shannon (I) (Lewontin, 1972) y el porcentaje de loci polimórfico (P). El análisis estadístico de diversidad genética de Nei (1973) se usó para calcular la diferenciación genética entre poblaciones (G_{st}).

A partir de la matriz binaria se calculó la distancia genética (Jaccard), para después someterla a un análisis de Coordenadas Principales (PCO) en el programa *PAST* ver.3 (Hammer *et al.* 2001), el cual produce una representación visual de la relación genética dentro y entre las poblaciones. Además, se construyó un dendrograma utilizando el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages*) basado en la distancia genética de pares. El análisis de *bootstrap* se hizo con 1 000 repeticiones, ambos análisis fueron realizados utilizando el programa *FAMD* (*Fingerprint Analysis with Missing Data*) v1.25 (Schlüter y Harris, 2006).

En el caso de la estructura de la población, se llevó a cabo el análisis de varianza molecular (AMOVA), esto para evaluar la variación entre y dentro de las poblaciones mediante el programa *Arlequín* (Schneider *et al.*, 2000). Los niveles de significancia para AMOVA son computados por permutaciones no paramétricas del set de datos con 1 000 permutaciones. El programa *Arlequin* genera un estadísticos- ϕ (Excoffier

et al., 1992), el cual es análogo a F_{st} de Wrigth (Wrigth, 1951). Este método ha sido usado con datos de RAPD (Favela, 2004, 2010).

Resultados

Amplificación con marcadores RAPD

De los 15 primers ensayados, seis produjeron patrones reproducibles de bandas de fácil resolución, los cuales se utilizaron con 180 individuos muestreados. Los seis primers generaron un total de 76 bandas con tamaños que variaron de 1 500 a 250 pb. Se obtuvo un rango de bandas de 10 – 16 por primer.

Análisis de datos

Diversidad genética. El análisis de diversidad genética de las poblaciones empleando *POPGENE* reveló que la población de Cuatrociénegas, Coahuila presenta mayor diversidad genética, como se muestra en el Cuadro 2, con altos valores de I ($I=0.44$ y $I=0.43$). El valor más bajo correspondió a la población de Las Lajas, Zacatecas ($I=0.37$).

El promedio de loci polimórficos (P) de las poblaciones varió de 77.32 – 84.21 %, la población de La Noria Cuatrociénegas, Coahuila fue la de mayor polimorfismo, y la menos polimórfica la de Las Lajas, Zacatecas (Cuadro 2).

Es importante mencionar que las poblaciones que mantienen los valores de diversidad más altos son las de La Noria y La Palmosa, en Cuatrociénegas, Coahuila, ambas se encuentran en la franja más norteña o septentrional del intervalo de distribución de *P. pinceana*.

Cuadro 2. Estimadores de diversidad genética para cada una de las seis poblaciones de *Pinus pinceana* Gordon, en México a partir de RAPD.

Población	N	Índice de Shannon (I)	Porcentaje de loci polimórfico (P)
La Noria	30	0.44	84.21
La Palmosa	30	0.43	77.63
La Casita	30	0.39	78.95
El Jaralito	30	0.41	78.95
Cañón del Moroso	30	0.41	81.58
Las Lajas	30	0.37	76.32
Total	180	0.48	94.74

N = Número de individuos utilizados en el análisis de cada población.

Diferenciación genética

El coeficiente total de diferenciación genética (G_{st}) entre las poblaciones fue de 0.15. Este valor describe cómo la variación es repartida entre las poblaciones estudiadas y se mide entre 0 a 1, en el que más cercano a 0 implica que las poblaciones comparten más genes y cuanto más se acerque a 1, más alejadas están y comparten menos material genético.



Estructura genética de las poblaciones de *P. pinceana*

El AMOVA indica que ≈ 85.18 % de la variación total se registra dentro de las poblaciones ($P < 0.001$). Y significativamente, 14.82 % de la variación restante se localiza entre las seis poblaciones de *P. pinceana* ($P < 0.001$) (Cuadro 3). Se observó un valor de F_{ST} (0.1482), equivalente al valor de G_{ST} (0.15) citado anteriormente.

Cuadro 3. AMOVA basado en el análisis de marcadores RAPD a partir de seis poblaciones de *Pinus pinceana* Gordon.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación (%)	P
Entre poblaciones	5	319.470	1.89	14.82	$p < 0.001$
Dentro de poblaciones	162	1 763.25	10.88	85.18	$p < 0.001$
Total	167	2 082.72	12.77		
$F_{ST} = 0.1481$					

^a = Niveles de significancia basado en 1 000 interacciones.

Distancia genética

La distancia de Jaccard se usó para realizar un análisis de coordenadas principales, el cual es una representación gráfica de la relación genética entre las seis poblaciones de *P. pinceana* analizadas. Los primeros dos componentes principales de la distancia de RAPD describen 4.64 y 4.24 % de la variación, respectivamente. Las muestras de los individuos de cada población se representaron como una

dispersión continua, con las poblaciones de La Noria, La Palmosa, La Casita y el Jaralito del estado de Coahuila. Las poblaciones provenientes del Cañón del Moroso, Nuevo León y Las Lajas de Zacatecas se distinguen claramente separadas del resto de las poblaciones en un grupo diferente (Figura 2).

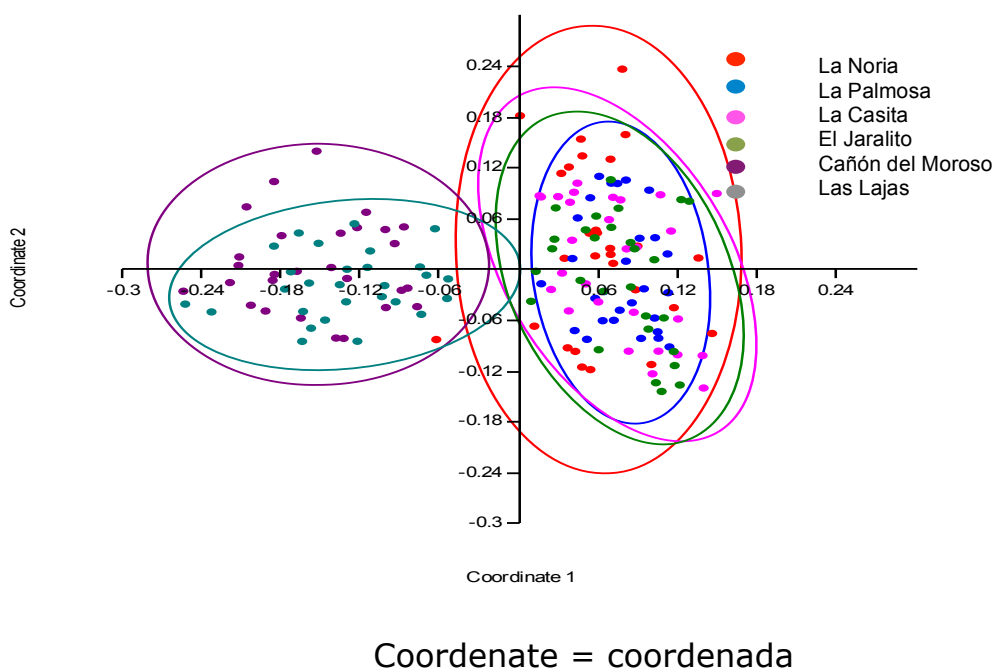
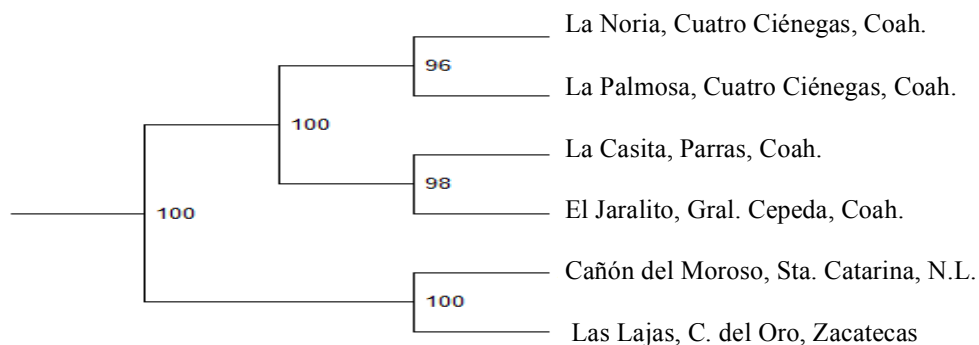


Figura 2. Gráfico de coordenadas principales de la distancia genética para seis poblaciones de *Pinus pinceana* Gordon (coeficiente de similitud de Jaccard).

El dendrograma que se muestra en la Figura 3, que se obtuvo de la matriz de pares de distancia genética mediante el método de agrupamiento de pares no ponderado con la media aritmética reveló que las poblaciones de Coahuila están más cercanas, forman dos clados: el de las poblaciones de Cuatrociénegas (La Noria y La Palmosa) y otro por las poblaciones de Parras y General Cepeda (La Casita y el Jaralito). Igualmente, las poblaciones de Nuevo León (Cañón el Moroso) y la de Zacatecas (Las Lajas) constituyen un clado aparte, las cuales son cercanas genéticamente. Los valores de *bootstrap* para cada población fueron altamente significativas y varían entre 96 y 100.



Los valores de *bootstrap* se muestran en la bifurcación de cada grupo.

Figura 3. Dendrograma de los grupos de las seis poblaciones de *Pinus pinceana* Gordon, a partir del análisis de agrupamiento de pares no ponderado con la media aritmética basado en la distancia de Jaccard de los marcadores de RAPD.

Discusión

En el presente estudio, los marcadores RAPD usados mostraron ser una técnica rápida y eficiente para el estudio de la genética de poblaciones de *P. pinceana*, por su alto polimorfismo visualizado en geles de agarosa. A partir de ellos se logró medir la variación genética a través de sus componentes: diversidad, diferenciación y distancia genética.

Diversidad genética entre poblaciones de *Pinus pinceana*

Estimada mediante el índice de Shannon ($I=0.48$) sigue un patrón en el que las poblaciones más norteñas tienen los valores mayores de diversidad: La Noria y La Palmosa (0.44 y 0.43), le siguen El Jaralito y Sta. Catarina (0.41), La Casita y Las Lajas (0.39 y 0.37), lo cual permite inferir que la fragmentación pudo iniciar la

divergencia entre las poblaciones, lo que generó alguna de ellas nuevos y únicos alelos, como resultado del aislamiento.

Sin embargo, al comparar el índice de Shannon obtenido para todas las poblaciones estudiadas (0.48) no difieren en promedio con otras especies de pinos (0.45) y de otras coníferas y latifoliadas (0.53) (*Araucaria*, *Fitzroya* y *Cedrela*) (Gillies *et al.*, 1997; Allunt *et al.*, 1999; Bekessy *et al.*, 2002).

El porcentaje de loci polimórfico es otro indicador importante para determinar el nivel de variación genética de un área, pues una especie con un valor alto muestra una elevada capacidad de adaptación al medio ambiente y por el contrario una con una capacidad débil de adaptación pudiera ser eliminada por selección natural (Zhang *et al.*, 2013); para *P. pinceana* fue relativamente alto (79.80 %) en contraste con otras especies de pinos piñoneros como *P. culminicola* Andresen & Beaman (57.3 %), (Favela, 2010), *P. cembroides* var. *bicolor* Little y *P. johannis* M.-F. Robert con 69.9 y 78.1 %, respectivamente (Favela, 2004). Esto indica que cada población contiene una fracción considerable de la diversidad genética de la especie, con valores superiores que lo documentado para especies endémicas (Hamrick *et al.*, 1992; Hamrick y Godt, 1996).

En general la variación genética, en términos de los diferentes índices de diversidad, muestra un patrón geográfico, pues se observan los valores más altos en las poblaciones de Coahuila; de ellas, las más norteñas, La Noria y La Palmosa de Cuatrociénegas, presentan el valor más alto seguida por las de La Casita y El Jaralito, lo que las separa de las de Nuevo León y Zacatecas, probablemente, debido a que existen barreras geográficas que han favorecido su aislamiento, y a que el flujo de información entre poblaciones está determinado por la distancia geográfica. Sin embargo, no dejan de compartir alelos, quizás porque todas fueron una en su origen y con el tiempo esta población original se fragmentó, hecho que favoreció el inicio de la divergencia de las poblaciones, que a su vez generó, en algunas, nuevos y únicos alelos, pues logra concluir la estructura genética para la especie como una estructura fragmentada en tres

parches dado que en su estudio incluye seis poblaciones, cada una las cuales marcan la fragmentación separándolas, en dos por cada parche, del norte, centro y sur de la distribución geográfica.

Diferenciación genética entre poblaciones de *Pinus pinceana*

Para estimar la proporción de la variación genética dentro y entre las poblaciones se emplea el estadístico (F_{st}), especialmente, útil para datos dominantes como RAPD (Excoffier, 2001), el cual varía en un intervalo de 0-1, si los valores se acercan a 0, indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones, no ha habido diferenciación; y el máximo posible es de 1, cuando cada población está fija en alelos diferentes (Piñero *et al.*, 2008). El valor en las poblaciones estudiadas (0.15) fue comparable con el F_{st} (0.152) registrado por Ledig *et al.* (2001), pero más bajo que los estimados por Molina-Freaner (2001) (0.24) y Ramírez-Herrera (2007) (0.16) para *Pinus pinceana*, mediante Isoenzimas; y para otras taxa de *Pinus* que se localizan en poblaciones aisladas y dispersas (Hamrick, 2004).

Este valor indica que 15 % de la diversidad genética de la especie corresponde a la existente entre poblaciones, y es muy cercano al estimado para otro pino piñonero, *P. rzedowskii* Madrigal & M.Caball. (17 %) (Delgado *et al.*, 1999), taxón endémico de México que también se distribuye en poblaciones fragmentadas y aisladas. Es importante mencionar que un F_{st} superior a 0.10 es considerado como un indicador de una fuerte diferenciación genética interpoblacional, lo cual es poco común en especies alógamas, como es el caso del género *Pinus* (Hamrick *et al.*, 1992; Ledig, 1998). Solo en algunas coníferas, con una distribución natural restringida o una fuerte fragmentación de sus poblaciones, se han documentado con valores similares de diferenciación genética entre poblaciones (Ledig, 1998).

La mayor parte de la variación en las poblaciones de *Pinus pinceana* se registró dentro de ellas (85.18 %). Este resultado es similar al consignado para otros pinos

(Ledig, 1998; Favela, 2010) y especies de plantas leñosas (Hamrick *et al.*, 1992). Además, son comparables con datos obtenidos a partir de RAPD, en los que la mayoría de las especies examinadas muestran altos niveles de variación genética intrapoblacional (Xue *et al.*, 2006; Favela, 2010). Mientras que el grado de variación genética entre poblaciones fue de 14.82 %. Los altos niveles de diversidad y diferenciación entre poblaciones parece ser común en taxa de coníferas mexicanas. (Ledig *et al.*, 2001; Fazekas y Yeh, 2006; Favela, 2010).

Distancias genéticas y geográficas entre poblaciones de *Pinus pinceana*

En el gráfico (Figura 2) correspondiente al coeficiente de similitud de Jaccard y sometido al análisis de PC, evidencia una separación de las poblaciones de Nuevo León y Zacatecas de las de Coahuila, lo cual indica que son las más alejadas genéticamente. Dado lo anterior, es posible inferir que existe un mayor flujo genético entre las poblaciones de Coahuila (La Noria, La Palmosa, La casita en Parras y El Jaralito), con respecto a las de Nuevo León (Cañón del Moroso) y Zacatecas (Las Lajas). Estudios previos (Ramírez-Herrera, 2007) muestran, también, separación con las poblaciones de Sierra de Parras y Las Norias, respectivamente.

Hollingsworth y Ennos (2004), argumentan que el agrupamiento de individuos de diferentes poblaciones en el mismo clado en un árbol se interpreta como evidencia del flujo genético entre poblaciones. En el árbol obtenido mediante el método UPGMA se observa eso mismo, ya que se forman dos cladogramas, en el primero se agrupan las poblaciones de Coahuila, dentro del cual se presentan dos subclados uno con las poblaciones de Cuatro Ciénegas; localidades de La Noria y La Palmosa, y otro con las de Parras y Gral. Cepeda; en un solo grupo las localidades de Cañón del Moroso, Sta. Catarina, Nuevo León y las Lajas, Zacatecas. Esto permite inferir

que entre las poblaciones de Nuevo León y Zacatecas existe un mayor flujo genético, con respecto a las poblaciones de Coahuila. Lo anterior es un dato importante, pues en estudios anteriores (Ledig, 2001; Ramírez-Herrera, 2007) las poblaciones de Zacatecas se separaban en los grupos de poblaciones nortañas, junto con las de Coahuila.

La variación entre las poblaciones puede deberse a las diferencias ecológicas en cada uno de los dos grupos. El primero corresponde a regiones con menor cantidad de lluvia (350 a 400mm), comparado con las del segundo grupo (400 a 500mm) y, en general, a las regiones climáticas y orográficas que se definen por la Sierra Madre Oriental.

Diversos estudios sobre *P. pinceana* registran datos similares, en los que separan las poblaciones nortañas (Coahuila) de las del centro y sur de México; y, ahora, con los resultados obtenidos de la población recientemente descrita de Nuevo León (Favela *et al.*, 2009) es evidente como se separa con la de Zacatecas.

En las investigaciones de Ledig *et al.* (2001), se logra distinguir la formación de dos clados que separan claramente, las poblaciones del norte de las del sur, y en subclados las poblaciones de Las Lajas y de Parras, Coahuila, también incluidas en este estudio. De igual forma Ramírez-Herrera (2007) presenta un gráfico en donde se forman dos clados: uno que separa a las poblaciones del norte y otro con las del centro y sur; en las del norte se observan dos subclados que separan en uno de ellos a la población de Las Norias, población considerada en este estudio; en el otro subclado se integran las de Zacatecas. Finalmente, Villarreal *et al.* (2009) concluyen que existen dos grupos de piñonares de *P. pinceana*, con base en sus diferencias florísticas y de distribución: los de la región norte (Coahuila, Zacatecas y San Luis Potosí) y los de la región sur (Querétaro e Hidalgo).



Conclusiones

La variación genética en las poblaciones de *Pinus pinceana* es alta y tiene concordancia con estudios previos.

El grado de diferenciación genética entre las poblaciones de *P. pinceana* es baja, pero consistente con valores registrados para otras especies de coníferas. La diferenciación presente sugiere que aun y cuando las poblaciones de *P. pinceana* son restringidas, aisladas y fragmentadas, el flujo genético entre las poblaciones, por lo menos en la actualidad, no ha conducido a la pérdida dramática de la variación genética y la diferenciación de las poblaciones.

Las medidas de distancia genética entre las poblaciones de *Pinus pinceana* muestran que las poblaciones de Coahuila tienen un mayor flujo genético entre ellas y que están más alejadas genéticamente de las de Nuevo León y Zacatecas. Esto sugiere la existencia de dos fragmentos (poblaciones de Coahuila y poblaciones de Nuevo León y Zacatecas) y la influencia de alguna barrera fisiográfica en esa parte de la Sierra Madre Oriental.

En general, se concluye que, no obstante que la técnica de RAPD ha sido controversial, es confiable, dado que los resultados y valores obtenidos no se alejan a los previamente registrados con otros marcadores moleculares. Por lo tanto, si bien *Pinus pinceana* ha sido categorizada como una especie vulnerable y con poblaciones fragmentadas, las analizadas hasta el momento conservan su conectividad genética.

Futuros estudios que incluyan factores bióticos y abióticos que pudieran estar involucrados en patrones de especiación, particularmente, parámetros orográficos y geológicos darán la pauta para entender la influencia de las barreras geográficas sobre la especie. Sería interesante, también, estudiar las interacciones bióticas que pudieran influir en la diversificación de la especie.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por todas las facilidades otorgadas en el desarrollo de la investigación. El estudio aquí descrito fue financiado por el proyecto PROMEP/103.5/09/562.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución por autor

Verónica Aguirre Limón: trabajo de campo, laboratorio y elaboración del manuscrito; Glafiro Alanís Flores: corrección del manuscrito; José Ignacio González Rojas: revisión de resultados y apoyo en análisis estadísticos; Adriana Flores Suárez: revisión y discusión de resultados del laboratorio y revisión del manuscrito; Susana Favela Lara: responsable del proyecto original, revisión de resultados de campo, laboratorio, análisis moleculares y revisión del manuscrito.



Referencias

- Allunt, T. R., A. C. Newton, A. Lara, A. Premoli, J. J. Armesto, R. Vergara and M. Gardner. 1999. Genetic Variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Molecular Ecology* 8: 975-987.
- Bekessy, S. A., T. R. Allnut, A. C. Premoli, A. Lara, R. A. Ennos, M. A. Burgman, M. Cortes and A.C. Newton. 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity* 88:243-249.
- Castro-Félix, P., J. A. Pérez D., A. G. Vargas, M. S. Velázquez, A. Santerre, T. López-Dellamary y A. R. Villalobos-Arámbula. 2008. Genetic relationships among Mexican White pines (*Pinus*, Pinaceae) based on RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 36(7):523-530.
- Cichorz, S., M. Goska and A. Litwiniec. 2014. Miscanthus: genetic diversity and genotype identification using ISSR and RAPD markers. *Molecular Biotechnology* 56(10): 911-924.
- Cipriano J., A. Carvalho, C. Fernandes, M. J. Gaspar, J. Pires, J. Bento, L. Roxo, J. Louzada and J. Lima-Brito. 2013. Evaluation of genetic diversity of Portuguese *Pinus sylvestris* L. populations based on molecular data and inferences about the future use of this germplasm. *Journal of Genetics* 92(2): e41-8.
- Delgado, P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser and E. R. Álvarez- Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86: 669-676.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Excoffier, L. 2001. Analysis of population subdivision. *In*: Baldwin, D. J., C. Cannings and M. Bishop (eds.), *Handbook of statistical genetics*. John Wiley. Nueva York, NY USA. pp. 271-308.

Excoffier, L., P. Smouse and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Favela L., S. 2004. Taxonomy and genetic variation of pinyon pines (*Pinus* subsection *Cembroides*) in the northeast of Mexico. Doctoral dissertation. University of Edinburgh, Scotland. 226 p.

Favela L., S., C. G. Velazco M. y G. J. Alanís F. 2009. *Pinus pinceana* (Pinaceae), nuevo registro para el estado de Nuevo León, México. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 3(2): 771-774.

Favela L., S. 2010. Population variation in the endemic *Pinus culminicola* detected by RAPD. *Polibotánica* 30: 55-67.

Favela, S. and P. Thomas. 2013. *Pinus pinceana*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. www.iucnredlist.org (3 de agosto de 2017).

Fazekas, A. J. and F. C. Yeh. 2006. Postglacial colonization and population genetic relationships in the *Pinus contorta* complex. *Canadian Journal of Botany* 84(2): 223-234.

Gillies, A. C. M., J. P. Cornelius, A. C. Newton, C. Navarro, M. Hernández and J. Wilson. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology* 6(12): 1133-1145.

Hammer, Ø., D. A. T. Harper and P. D. Ryan. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1-9.

Hamrick, J. L. 2004. Responses of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management* 197: 323-335.

Hamrick, J. L., M. J. W. Godt and S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. *New Forests* 6(1-4): 95-124.

Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemics plant species. *In*: Avise, J.C. and J. L. Hamrick (eds.). Conservation Genetics: Case Histories from Nature. Chapman & Hall. New York, NY USA. pp. 281-304.

Hollingsworth, P. M. and R. A. Ennos. 2004. Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity* 92: 490-498.

Hollingsworth, M. L., J. P. Bailey, P. M. Hollingsworth and C. Ferris. 1999. Chloroplast DNA variation and hybridization between invasive populations of Japanese knotweed and giant knotweed (*Fallopia*, Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 129: 139-154.

International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). 2001. *IUCN Red List Categories and Criteria*: version 3.1. Gland, Switzerland and Cambridge, UK, IUCN Species Survival Commission IUCN. www.iucnredlist.org. (3 de agosto de 20179).

Koopman, W. J. M. 2005. Phylogenetic signal in AFLP datasets. *Systematic Biology* 54: 197-217.

Kovacevic, D., N. Biljana, M. Snezana, B. Srdan, D. Tanja, R. Nemanja and D. Petar. 2013. Genetic relationship among some *Pinus*, *Picea* and *Abies* species revealed by RAPD markers. *Genetika* 45 (2): 493-502.

Kurt, Y., B. B Bilgen, N. Kaya and K. Isil. 2011. Genetic comparison of *Pinus brutia* Ten. populations from different elevations by RAPD markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39(2):299-304.

Ledig, F. T., M. A. Capo-Ortega, P. D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. Thompson and B. Bermejo-Velázquez. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88: 1977-1987.

Ledig, F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. *In*: Richardson, D.M. (ed.). Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp. 251-280.

- Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolution Biology* 6: 381-398.
- Molina-Freaner, F., P. Delgado, D. Piñero, N. Pérez-Nasser, and E.R. Álvarez-Buylla. 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany* 79(2): 131-138.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 321-3323.
- Nerendrula, R. and K. Nkongolo. 2012. Genetic Variation in *Picea mariana* x *P. rubens* hybrid Populations Assessed with ISSR and RAPD Markers. *American Journal of Plant Sciences* 3: 731-737.
- Newton, A. C., T. R. Allnut, W. S. Dvorak, R.F. Del Castillo and R. A. Ennos. 2002. Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity* 89: 191-198.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2010. Norma Oficial Mexicana 2010. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión y exclusión o cambio – lista de especies en riesgo. Semarnat. 30 de diciembre de 2010. México, D.F., México. 75 p.
- Perry, J. P. Jr. 1991. *The pines of México and Central America*. Timber press. Portland, OR USA. 231 p.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha O. y R. Salas L. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *In: Soberón, J., G. Halffter y J. Llorente-Bousquets (comps.)*. Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio. México, D.F., México. pp. 415-435.
- Ramírez Herrera, Carlos. 2007. Quantitative trait variation and allozyme diversity of *Pinus pinceana*. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Forestry.

Department of Forestry and Environmental Management. University of New Brunswick. Fredericton, New Brunswick, Canada. 396 p.

Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN, version 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva. Geneva, Switzerland. n/p.

Schlüter, P. M. and S. A Harris. 2006. Analysis multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6(2): 569-572.

Tomar, R. S., M. V. Parakhia and V. M. Rathod. 2014. A comparative analysis of ISSR and RAPD marker for studying genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* genotypes. *Research Journal of Biotechnology* 9 (10): 89-95.

Villarreal, J. A., O. Mares, E. Corejo y M. A. Capó. 2009. Estudio florístico de los piñonares de *Pinus pinceana* Gordon. *Acta Botánica Mexicana* 89:87-124.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman and M. Kuiper. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Research* 23(21): 4407-4414.

Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22):6531-6535.

Xue, X., Y. Wang, H. Korpelainen and C. Li. 2006. Genetic diversity of *Picea asperata* populations based on RAPD´s. *Plant Biology* 9:101-108.

Yeh, F. C., R. C. Yang, T. Boyle, Z. H. Ye and J. X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetics analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center. University of Alberta. Edmonton, Alberta, Canada. n/p.

Zhang, L., H. G. Zhang and X. F. Li. 2013. Analysis of genetic diversity in *Larix gmelinii* (Pinaceae) with RAPD and ISSR markers. *Genetic and Molecular Research* 12 (1): 196-207.