

## ESTRUCTURA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE *Pinus greggii* Engelm.

### STRUCTURE OF GENETIC DIVERSITY IN NATURAL POPULATIONS OF *Pinus greggii* Engelm.

Conrado Parraguirre Lezama<sup>1,2\*</sup>, J. Jesús Vargas Hernández<sup>2</sup>, Porfirio Ramírez Vallejo<sup>2</sup>,  
Hilda Susana Azpíroz Rivero<sup>1</sup> y Jesús Jasso Mata<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Estado de México. <sup>2</sup> Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Apartado Postal # 10, Chapingo, Estado de México. Correo electrónico: cparraguirre@yahoo.com.mx

\*Autor responsable

#### RESUMEN

Se estudió la estructura de la diversidad genética en 15 loci isoenzimáticos de 19 poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. con la finalidad de determinar el grado de variabilidad genética de la especie y el nivel de diferenciación genética existente entre sus poblaciones. Los resultados mostraron que existe una amplia diversidad genética en la especie (93 % de loci polimórficos, 3.5 alelos por locus), pero esa diversidad es relativamente baja a nivel de poblaciones (31.9 % de loci polimórficos y 1.6 alelos por locus), con una proporción elevada de alelos raros (47 %) y alelos "privados" (23 %) en ellas. Aunque se encontró una alta diferenciación genética entre las poblaciones ( $F_{st} = 0.379$ ), esta diferenciación no estuvo asociada a las regiones geográficas (2 %), a diferencia del patrón geográfico reportado para las características morfológicas y de crecimiento de los árboles. Las distancias genéticas promedio entre pares de poblaciones fueron similares en las dos regiones geográficas; sin embargo, sólo en la región norte se encontró una correlación positiva y significativa ( $r = 0.48$ ) entre las distancias genéticas y geográficas de las poblaciones.

**Palabras clave:** Pinos, isoenzimas, polimorfismo, diferenciación genética, alelos raros

#### SUMMARY

The structure of genetic diversity was studied on 15 allozyme loci in 19 natural populations of *Pinus greggii* Engelm. in order to determine the level of genetic variability within this species and the degree of genetic differentiation among its populations. A broad genetic diversity was found at the species level (93 % polymorphic loci and a mean of 3.5 alleles per locus). At the population level, however, genetic diversity was relatively low (31.9 % polymorphic loci and 1.6 alleles per locus on average) with a high proportion of rare (47 %) and private (23 %) alleles. A high degree of genetic differentiation was found among populations ( $F_{st}=0.379$ ) but it was not associated to their geographic distribution (only 2 % of the total genetic diversity was attributed to differentiation between geographic regions), unlike the geographic pattern reported for morphological and growth traits of trees. Average genetic distances between pairs of populations were similar in both geographic regions, however, only in the northern region a positive and significant correlation ( $r = 0.48$ ) was found between genetic and geographic distances of populations.

**Index words:** Pines, isozymes, polymorphism, genetic differentiation, rare alleles

#### INTRODUCCIÓN

*Pinus greggii* Engelm. es una especie endémica en México de gran importancia ecológica y económica. Esta especie ha mostrado una adecuada capacidad de supervivencia y desarrollo en condiciones de humedad limitada (Vargas y Muñoz, 1988), por lo que tiene gran potencial para ser empleada en programas extensivos de forestación o restauración en condiciones poco favorables. Además, es una alternativa con respecto a otras especies de *Pinus* para el establecimiento de plantaciones comerciales a gran escala (Dvorak y Donahue, 1992), porque ha superado en crecimiento a *P. patula* en algunas regiones de Sudáfrica (Kletzka *et al.*, 1996). La distribución natural de *Pinus greggii* Engelm. está restringida a dos regiones geográficas en la parte centro-este y noreste de México. Estas regiones están separadas por unos 300 km y presentan condiciones ambientales distintas. En la región "norte" (Coahuila y Nuevo León) *P. greggii* se ubica a una altitud de 2100 a 2600 m, con una precipitación media anual de 650 mm en suelos neutros o ligeramente alcalinos. En la región "sur" (San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Veracruz y Puebla), se encuentra en elevaciones de 1100 a 2400 m, con una precipitación media anual de 800 a 1600 mm en suelos ácidos predominantemente (Donahue y López-Upton, 1999).

El aislamiento geográfico entre ambas regiones, que limita o impide el flujo genético entre ellas y las diferencias edáficas y climáticas entre las regiones, plantean la posibilidad de que las poblaciones de *P. greggii* se hayan diferenciado genéticamente en cada región. De hecho, estudios de variación morfológica realizados en esta especie (López *et al.*, 1993 y 2000; Donahue y López-Upton,

1996) sugieren la presencia de dos ecotipos. Donahue y López-Upton (1999) describen a estos ecotipos como variedades distintas, la variedad *greggii* para la región “norte” y la variedad *australis* para la región “sur”. Estudios en ambiente común (invernadero, vivero y campo) establecidos de manera independiente confirman las diferencias en características morfológicas entre las poblaciones de las dos regiones (López *et al.*, 1993; Donahue y López-Upton, 1996) e incluso muestran grandes diferencias entre ellas en la tasa y patrón de crecimiento estacional del brote (Salazar *et al.*, 1999) y en otras características adaptativas (López-Ayala *et al.*, 1999; López *et al.*, 2000). Esos resultados sugieren la existencia de una fuerte variación y diferenciación genética en *P. greggii*. Sin embargo, hasta ahora este patrón geográfico de variación no ha sido confirmado mediante el uso de marcadores moleculares. Aunque Ramírez *et al.* (1997) detectaron bajos niveles de polimorfismo en *loci* isoenzimáticos de la mayoría de las poblaciones estudiadas, el limitado número de poblaciones y el reducido tamaño de muestra utilizado en varias de ellas impidió obtener una idea clara de la diferenciación genética existente entre las poblaciones.

Los marcadores isoenzimáticos han sido muy utilizados para evaluar la diversidad genética intraespecífica y establecer posibles patrones geográficos de diferenciación genética (Berg y Hamrick, 1997). En algunas especies de pinos los resultados con isoenzimas muestran patrones de diversidad genética similares a los observados con características morfológicas y adaptativas (Matheson *et al.*, 1989; Mitton *et al.*, 1998). Sin embargo, en otros casos el patrón de diversidad genética detectado mediante isoenzimas no corresponde al observado en otras características morfológicas, fitoquímicas o de crecimiento (Schmidting y Hipkins, 1998; Schmidting *et al.*, 1999). La distancia geográfica entre poblaciones influye considerablemente en la estructura de la diversidad genética, debido a que el intercambio o flujo génico entre poblaciones se reduce al aumentar la distancia entre ellas, lo que conduce a su diferenciación. Estudios efectuados en diferentes especies forestales muestran que generalmente existe una relación directa entre las distancias geográficas y las distancias genéticas de las poblaciones (Parker y Hamrick, 1996; Parker *et al.*, 1997; Ledig, 2000). La identificación de una relación definida entre estas dos variables es importante, ya que permite establecer la importancia relativa de las diferentes fuerzas evolutivas en la estructura de la diversidad genética intraespecífica.

Con base en lo anterior, en este trabajo se evaluó el nivel de diversidad genética de *Pinus greggii* Engelm. a lo largo de su área de distribución natural, con base en marcadores isoenzimáticos, utilizando un mayor número de poblaciones y un tamaño de muestra más grande, que el

empleado por Ramírez *et al.* (1997). Los objetivos específicos del estudio fueron: a) caracterizar la estructura de la diversidad genética en esta especie y el grado de diferenciación genética entre regiones geográficas, y b) determinar si la distancia genética entre poblaciones está asociada con la distancia geográfica entre ellas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico y procedimiento electroforético

Se utilizó una muestra inicial de 475 individuos provenientes de 19 poblaciones naturales (25 árboles por población) de *Pinus greggii* (Cuadro 1). Durante el periodo de abril a diciembre de 1997 se recolectó una muestra de conos de cada uno de estos individuos, asegurando una separación mínima de 50 m entre ellos, para evitar en lo posible incluir individuos emparentados.

Cuadro 1. Localización geográfica, altitud y precipitación promedio anual de las poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. incluidas en el estudio.

| Región N° | Localidad                  | Ubicación geográfica |              |             |                    |
|-----------|----------------------------|----------------------|--------------|-------------|--------------------|
|           |                            | Latitud (N)          | Longitud (O) | Altitud (m) | Precipitación (mm) |
| Sur       | 1 Zacualpan, Ver.          | 20°26'               | 98°20'       | 1600        | 1900               |
| Sur       | 2 Molango, Hgo.            | 20°45'               | 98°43'       | 1600        | 1700               |
| Sur       | 3 Pemuxtitla, Hgo.         | 20°49'               | 98°46'       | 1370        | 1642               |
| Sur       | 4 Xochicoatlán, Hgo.       | 20°47'               | 98°42'       | 1840        | 1750               |
| Sur       | 5 Cieneguilla, Hgo.        | 20°45'               | 99°02'       | 1860        | 800                |
| Sur       | 6 El Piñón, Hgo.           | 20°56'               | 99°12'       | 1830        | 1050               |
| Sur       | 7 Laguna Seca, Hgo.        | 21°04'               | 99°10'       | 1720        | 820                |
| Sur       | 8 Valle Verde, Qro.        | 21°29'               | 99°13'       | 1490        | 1400               |
| Sur       | 9 El Madroño, Qro.         | 21°17'               | 99°10'       | 1840        | 1200               |
| Sur       | 10 San Joaquín, Qro.       | 20°56'               | 99°34'       | 2350        | 1100               |
| Norte     | 11 Jamé, Coah.             | 25°21'               | 100°36'      | 2552        | 600                |
| Norte     | 12 Los Lirios, Coah.       | 25°23'               | 100°31'      | 2420        | 600                |
| Norte     | 13 Puerto San Juan, Coah.  | 25°26'               | 100°33'      | 2613        | 600                |
| Norte     | 14 Santa Anita, Coah.      | 25°27'               | 100°34'      | 2560        | 650                |
| Norte     | 15 El Penitente, Coah.     | 25°22'               | 100°54'      | 2405        | 500                |
| Norte     | 16 Agua Fría, Coah.- N. L. | 25°26'               | 100°28'      | 2400        | 633                |
| Norte     | 17 Puerto El Conejo, Coah. | 25°29'               | 100°35'      | 2520        | 650                |
| Norte     | 18 Las Placetas, N. L.     | 24°55'               | 100°12'      | 2450        | 750                |
| Norte     | 19 La Taponá, N. L.        | 24°44'               | 100°06'      | 2130        | 650                |

Dado que *P. greggii* es una especie de conos serotinos, la muestra recolectada incluyó conos de varios ciclos reproductivos. Los conos se mantuvieron separados por árbol dentro de cada población y las semillas fueron extraídas en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Edo. de México. Las semillas fueron germinadas en cajas de Petri con papel filtro húmedo, a una temperatura de 26° C hasta que su radícula alcanzó 5 mm. Debido a que las semillas de las poblaciones no germinaron uniformemente y en la misma cantidad, las muestras que finalmente fueron sometidas a electroforesis variaron

de 14 a 25 árboles por población, con un promedio de 19 árboles.

El análisis de isoenzimas se llevó a cabo utilizando electroforesis horizontal en geles de almidón del tejido del megagametofito de las semillas. Para establecer el genotipo de cada uno de los árboles madre se utilizó una muestra de seis semillas por individuo. Al momento de extraer las enzimas se separó la testa y el embrión de las semillas, dejando únicamente el megagametofito. Este tejido fue macerado en un tubo eppendorff con una punta de plástico adaptada a un taladro eléctrico y se agregó a cada tubo 70  $\mu\text{L}$  del amortiguador de extracción (Stuber *et al.*, 1988). Los extractos obtenidos fueron almacenados en un congelador a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de realizar los corrimientos electroforéticos. Los extractos fueron sometidos a electroforesis conforme a la metodología descrita por Stuber *et al.* (1988). Se evaluaron los seis sistemas enzimáticos que en un estudio previo (Ramírez *et al.*, 1997) mostraron una buena resolución en esta especie. Estos sistemas incluyen el de fosfatasa ácida (ACP, E.C.3.1.3.2), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD, E.C.1.1.1.44), fosfoglucona isomerasa (PGI, E.C.5.3.1.9), isocitrato deshidrogenasa (IDH, E.C.1.1.1.42), glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT, E.C.2.6.1.1) y malato deshidrogenasa (MDH, E.C.1.1.1.37). Los sistemas ACP, 6PGD, PGI, IDH y MDH se corrieron empleando el amortiguador "D" preparado con 10.088 g  $\text{L}^{-1}$  (0.065M) de L-histidina y 1.5 g  $\text{L}^{-1}$  (0.007M) de ácido cítrico, con pH de 6.5, mientras que para el sistema GOT se empleó el amortiguador "C" preparado con 11.875 g  $\text{L}^{-1}$  (0.19M) de ácido bórico y 1.60 g  $\text{L}^{-1}$  (0.04M) de hidróxido de litio con pH de 8.3 (Stuber *et al.*, 1988).

En estos seis sistemas enzimáticos se evaluó un total de 15 *loci* putativos; la identificación de los genotipos electroforéticos (esto es, alelos presentes en cada *locus*), se efectuó considerando la migración relativa de las enzimas a partir del punto de origen dentro de los geles. Para facilitar la interpretación de los *loci* y sus alelos correspondientes se incluyeron como referencia en cada gel muestras de *Pinus resinosa*, una especie que es prácticamente invariable en estos *loci*. En los casos donde se identificaron varias zonas de actividad para una misma enzima, los *loci* se identificaron con numerales sucesivos junto con la clave de la enzima. La designación de cada alelo se efectuó de manera similar, considerando como alelo 1 al de mayor frecuencia en toda la muestra y posteriormente a los de menor frecuencia, sucesivamente.

#### Estimación de parámetros de diversidad genética

Para cada población se calcularon las frecuencias génicas, el número de alelos por *locus* y el porcentaje de *loci*

polimórficos (frecuencia del alelo más común menor o igual a 0.95), de acuerdo con los procedimientos descritos por Brown y Weir (1983). También se estimó la heterociguidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) para cada población, de acuerdo con la fórmula descrita por Nei (1978), corregida para poblaciones pequeñas. La estructura de la diversidad genética se evaluó con los estadísticos "F" (Wright, 1965), que incluye los valores de  $F_{it}$ ,  $F_{is}$  y  $F_{st}$ .  $F_{it}$  representa el índice de fijación o endogamia de los individuos con respecto a la población total,  $F_{is}$  representa el índice de fijación o endogamia de los individuos dentro de cada una de las poblaciones, y  $F_{st}$  representa el índice de fijación o endogamia de los individuos que ocurre entre las poblaciones. En este sentido  $F_{st}$  es una medida de la diferenciación entre las poblaciones. Para calcular estos índices se utilizó el procedimiento descrito por Swofford y Selander (1989) con el programa BIOSYS-1. Con la finalidad de evaluar la importancia del aislamiento entre poblaciones y su efecto sobre la diferenciación de las mismas, se estimó el flujo génico de acuerdo con el procedimiento de Slatkin y Barton (1989), el cual proporciona una estimación indirecta del número de migrantes por generación ( $N_m$ ) mediante la siguiente expresión:

$$N_m = (1 - F_{st}) / 4F_{st} \quad (1)$$

Con el propósito de analizar con mayor detalle la estructura de la diversidad genética y su partición en los diferentes niveles jerárquicos de la especie, se calcularon los componentes de diversidad genética de acuerdo con el modelo de Nei (1973) para el análisis de poblaciones subdivididas. Los cálculos se efectuaron con el procedimiento descrito por Chakraborty (1980), de acuerdo con el siguiente modelo:

$$H_t = H_p + D_{p(r)} + D_r \quad (2)$$

donde:  $H_t$  es la diversidad genética total;  $H_p$  es la diversidad genética dentro de poblaciones;  $D_{p(r)}$  es la variación entre poblaciones dentro de regiones geográficas, y  $D_r$  es la variación entre regiones geográficas. Con la información anterior se calculó la proporción de la diversidad genética existente entre ( $G_r$ ) y dentro de regiones geográficas ( $G_{p(r)}$ ), como lo indica Nei (1973). Los valores de  $G_r$  y  $G_{p(r)}$  permiten conocer los componentes que tienen mayor importancia en la estructura genética de la especie.

Las distancias genéticas entre pares de poblaciones se estimaron con el procedimiento descrito por Nei (1978). Con base en la matriz de distancias genéticas se efectuó el agrupamiento de las poblaciones empleando el método de agrupamiento con promedios no ponderados (UPGM). Para determinar la posible relación entre las distancias genéticas y geográficas de las poblaciones, se estimó la

correlación entre ellas. La distancia geográfica entre dos poblaciones se calculó con base en las coordenadas geográficas (latitud y longitud) de cada una de ellas.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Diversidad genética**

En los seis sistemas isoenzimáticos se encontró un total de 15 *loci*, de los cuales 14 fueron polimórficos en por lo menos una población. En los 14 *loci* polimórficos se registró un total de 50 alelos, con un promedio de 3.5 y una variación de 2 a 7 alelos por *locus*. Esto implica que a nivel global más de 90 % de los *loci* fueron polimórficos y que a nivel de especie existe una amplia diversidad genética. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos para la gran mayoría de coníferas (Hamrick *et al.*, 1992) y del género *Pinus* en particular (Ledig, 1998). A pesar de la gran riqueza de alelos encontrados a nivel global, una proporción elevada de éstos (47 %) fueron alelos raros (esto es, alelos con frecuencia menor a 0.05), y 12 de ellos fueron alelos “privados” (es decir, alelos presentes en una sola población).

A nivel de poblaciones la diversidad genética fue mucho más baja que a nivel global, pero relativamente similar de una población a otra. Por ejemplo, el número de alelos por *locus* varió de 1.3 a 2.1 entre las poblaciones, con un valor promedio de 1.6, y el porcentaje de *loci* polimórficos varió de 13.3 a 53.3 entre ellas, con un promedio de 31.9 (Cuadro 2). Esto indica que cada población contiene sólo una pequeña fracción de la diversidad genética de la especie, con valores más bajos que los reportados para otras especies de coníferas (Hamrick *et al.*, 1992, Ledig, 1998), incluyendo algunas especies endémicas de *Pinus* como *P. ayacahuite* (Hernández, 1990), *P. rzedowskii* (Delgado *et al.*, 1999) o *P. koraiensis* (Potenko y Velikov, 1998), con excepción de *P. clausa*, que presenta poblaciones pequeñas y aisladas (Parker y Hamrick, 1996).

Lo anterior significa que la diversidad genética de *P. greggii* a nivel poblacional es relativamente pobre. Es decir, aunque existen muchos alelos en la especie, éstos no están presentes en todas las poblaciones, como se manifiesta por la elevada proporción de alelos raros y “privados”. Lo anterior puede estar asociado a un proceso de erosión genética que ha ocasionado la pérdida de alelos en algunas poblaciones o a un proceso de diferenciación genética importante, como resultado de diversos factores evolutivos, lo cual implica una expansión de la diversidad genética a nivel de especie.

La heterocigocidad observada (Ho) y esperada (He) también fue similar entre poblaciones y entre regiones

geográficas, con valores promedio de 0.087 y 0.123 para Ho y He respectivamente, y valores extremos de 0.038 y 0.137 para Ho y de 0.053 y 0.209 para He (Cuadro 2). Estos valores son menores a los que se han publicado para otras especies de coníferas (Hamrick *et al.*, 1992), así como para la mayoría de especies de *Pinus* (Ledig, 1998; Schmidting *et al.*, 1999), incluyendo a varias especies endémicas y con distribución natural restringida (Hernández, 1990; Delgado *et al.*, 1999). Sin embargo, los valores de heterocigocidad de *P. greggii* son mayores a los de *P. resinosa* y *P. toreyana*, especies consideradas como genéticamente depauperadas (Ledig, 1998).

Cuadro 2. Valores de diversidad genética en 19 poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. con base en 15 *loci* isoenzimáticos.

| Localidad             | TPA <sup>†</sup><br>por<br><i>locus</i> | NPA<br>por<br><i>locus</i> | PLM <sup>†</sup> | Heterocigocidad<br>promedio |   |
|-----------------------|---|----------------------------|------------------|-----------------------------|---|
|                       |   |                            |                  | Observada                   | Esperada <sup>‡</sup> $\chi^2$ <sup>§</sup> |
| Zacualpan             | 20.0                                    | 1.5                        | 33.3             | 0.090                       | 0.120 ns                                    |
| Molango               | 19.7                                    | 1.4                        | 26.7             | 0.064                       | 0.112 *                                     |
| Pemuxtita             | 24.9                                    | 1.9                        | 26.7             | 0.074                       | 0.129 **                                    |
| Xochicoatlán          | 19.9                                    | 1.5                        | 20.0             | 0.127                       | 0.104 ns                                    |
| Cieneguilla           | 23.9                                    | 1.6                        | 26.7             | 0.057                       | 0.092 *                                     |
| El Piñón              | 18.4                                    | 1.5                        | 33.3             | 0.084                       | 0.097 ns                                    |
| Laguna Seca           | 16.5                                    | 1.5                        | 40.0             | 0.100                       | 0.146 ns                                    |
| Valle Verde           | 15.0                                    | 1.5                        | 26.7             | 0.044                       | 0.096 ns                                    |
| El Madroño            | 17.7                                    | 1.3                        | 26.7             | 0.133                       | 0.123 ns                                    |
| San Joaquín           | 17.7                                    | 1.7                        | 40.0             | 0.101                       | 0.127 ns                                    |
| Promedio región sur   | 19.37                                   | 1.5                        | 30.01            | 0.087                       | 0.115                                       |
| Jamé                  | 20.0                                    | 1.5                        | 46.7             | 0.083                       | 0.154 **                                    |
| Los Lirios            | 23.5                                    | 1.5                        | 20.0             | 0.038                       | 0.068 *                                     |
| Puerto San Juan       | 21.2                                    | 2.1                        | 46.7             | 0.131                       | 0.209 **                                    |
| Santa Anita           | 14.1                                    | 1.4                        | 33.3             | 0.061                       | 0.117 *                                     |
| El Penitente          | 18.3                                    | 1.9                        | 40.0             | 0.093                       | 0.157 *                                     |
| Agua Fría             | 16.7                                    | 1.5                        | 13.3             | 0.053                       | 0.053 ns                                    |
| Puerto El Conejo      | 20.8                                    | 1.7                        | 40.0             | 0.103                       | 0.162 **                                    |
| Las Placetas          | 20.3                                    | 1.7                        | 13.3             | 0.089                       | 0.089 ns                                    |
| La Tapona             | 18.0                                    | 1.8                        | 53.3             | 0.137                       | 0.191 ns                                    |
| Promedio región norte | 19.21                                   | 1.7                        | 34.07            | 0.087                       | 0.133                                       |
| Promedio general      | 19.29                                   | 1.6                        | 31.93            | 0.087                       | 0.123                                       |

<sup>†</sup> TPA = Tamaño promedio de muestra; NPA = Número promedio de alelos; PLM = Porcentaje de *loci* polimórficos

<sup>‡</sup> Un *locus* es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excede de 0.95.

<sup>§</sup> Estimación insesgada, según Nei (1978). <sup>§</sup> Prueba de  $\chi^2$  para las diferencias entre heterocigocidad observada y esperada: ns =diferencias no significativas; \* = diferencias significativas (P ≤ 0.05); \*\* = diferencias altamente significativas (P ≤ 0.01).

De manera consistente, la heterocigocidad observada fue menor que la esperada en la mayoría de las poblaciones, aunque la prueba de  $\chi^2$  mostró que las diferencias fueron significativas sólo en nueve de ellas, tres en la región sur y seis en la región norte. Así, en general, existe una deficiencia de individuos heterocigóticos en las poblaciones, posiblemente como resultado de la deriva genética y del apareamiento no aleatorio entre los individuos de la población. Las poblaciones que presentaron diferencias

altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ), son aquéllas de menor tamaño ( $< 90$  ha), lo cual apoya la hipótesis de que existen efectos de endogamia asociados con el apareamiento de individuos emparentados entre sí.

### Estructura de la diversidad genética

Con excepción de tres *loci* (ACP-2, MDH-3 y GOT-3) que presentaron un valor negativo de  $F_{is}$ , el resto de los *loci* mostraron valores positivos, con un promedio de 0.271 (Cuadro 3), lo cual confirma el déficit de individuos heterocigóticos en las poblaciones descrito anteriormente. Un patrón similar se observó para  $F_{it}$ , aunque en este caso el valor promedio (0.547) fue mucho más elevado (Cuadro 3). Esto refleja que también a nivel global (es decir, a nivel del conjunto total de poblaciones estudiadas) existe una deficiencia de individuos heterocigóticos. Es poco común que se presente una deficiencia de individuos heterocigóticos en especies de polinización cruzada como los pinos. Una consecuencia de la deriva genética es precisamente la reducción de la frecuencia de individuos heterocigóticos a nivel global, aun cuando las poblaciones individuales se encuentren en equilibrio. Dado que las poblaciones de *P. greggii* se encuentran fragmentadas y aisladas entre sí, es posible que la deriva genética tenga un papel importante en la estructura genética de la especie. Los valores promedio de  $F_{is}$  y  $F_{it}$  son elevados en comparación con los publicados para otras especies del género *Pinus* (Potenko y Velikov, 1998; Schimdtling *et al.*, 1999), lo cual implica que en *P. greggii* la deficiencia de individuos heterocigóticos es relativamente elevada.

Con excepción de dos *loci* (MDH-4 y GOT-3), los valores de  $F_{st}$  fueron iguales o mayores a 0.10 en los otros 12 *loci* polimórficos evaluados, con un valor promedio de 0.379. Este valor indica que 37.9 % de la diversidad genética detectada en la especie se encuentra entre poblaciones (Cuadro 3). Este valor de  $F_{st}$  en *P. greggii* también es mayor que en otras especies del género *Pinus* estudiadas hasta la fecha (Potenko y Velikov, 1998; Schimdtling *et al.*, 1999), pero es muy cercano al valor estimado en *P. rzedowskii* (Delgado *et al.*, 1999), otra especie endémica de México que también se encuentra en poblaciones fragmentadas y aisladas. En general, un valor de  $F_{st}$  mayor a 0.10 se considera como un indicador de una fuerte diferenciación genética entre poblaciones, situación que es poco común en especies alógamas y de polinización anémofila como el caso del género *Pinus* (Hamrick *et al.*, 1992; Ledig, 1998). Sólo en algunas especies de coníferas con una distribución natural restringida o una fuerte fragmentación de sus poblaciones como *P. cembra* o *P. muricata* (Ledig, 1998), se han encontrado valores similares de diferenciación genética entre poblaciones.

Cuadro 3. Estadísticos "F" (Wright, 1965) y flujo génico ( $Nm$ ) con base en 14 *loci* polimórficos analizados en 19 poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm.

| Locus    | $F_{is}$ | $F_{it}$ | $F_{st}$ | $Nm^{\dagger}$ |
|----------|----------|----------|----------|----------------|
| IDH-1    | 0.294    | 0.438    | 0.204    | 0.975          |
| 6PGD-1   | 0.162    | 0.277    | 0.137    | 1.575          |
| 6PGD-2   | 0.087    | 0.366    | 0.306    | 0.567          |
| PGI-1    | 0.000    | 1.000    | 1.000    | 0.000          |
| PGI-2    | 0.034    | 0.492    | 0.474    | 0.277          |
| ACP-2    | -0.161   | -0.007   | 0.133    | 1.630          |
| MDH-1    | 0.243    | 0.494    | 0.331    | 0.505          |
| MDH-2    | 0.506    | 0.603    | 0.197    | 1.019          |
| MDH-3    | -0.022   | 0.978    | 0.978    | 0.006          |
| MDH-4    | 0.198    | 0.256    | 0.072    | 3.222          |
| GOT-1    | 0.074    | 0.259    | 0.200    | 1.000          |
| GOT-2    | 0.170    | 0.251    | 0.098    | 2.301          |
| GOT-3    | -0.091   | -0.006   | 0.078    | 2.955          |
| GOT-4    | 0.874    | 0.930    | 0.445    | 0.312          |
| Promedio | 0.271    | 0.547    | 0.379    | 1.167          |

<sup>†</sup> Número de migrantes por generación, según Slatkin y Barton (1989).

El número estimado de migrantes por generación ( $Nm$ ) fue de 1.17, valor relativamente bajo si se compara con los valores estimados en otras especies de coníferas (Ledig, 1998), en donde el número de migrantes por generación es generalmente mayor de 10. El reducido número de migrantes en *P. greggii* implica que existe muy poco intercambio genético entre poblaciones, lo que conduce a una diferenciación de éstas. De acuerdo con la teoría (Wright, 1965) se requiere un mínimo de cuatro migrantes por generación para mantener un balance que evite los efectos de diferenciación genética asociados con la deriva genética. El reducido flujo génico y la baja diversidad genética de la mayoría de las poblaciones de *P. greggii*, pueden estar asociados con el hecho de que las poblaciones de esta especie son pequeñas y se encuentran aisladas entre sí. Esta situación se ve favorecida por la fragmentación de algunas de ellas debida a la eliminación de individuos de la especie en algunas zonas por causas naturales o antropogénicas.

Al extender el modelo de partición de la diversidad genética para considerar el nivel de diferenciación entre regiones geográficas y entre poblaciones dentro de las regiones, se encontró que el mayor porcentaje de diferenciación genética se encuentra dentro de regiones (29 %) y sólo 2 % de ésta corresponde a las regiones geográficas (Cuadro 4). Es decir, aunque existe una elevada diferenciación genética entre las poblaciones de *P. greggii* (Cuadro 3), las regiones geográficas no contribuyen en gran medida a esta diferenciación. Algunos *loci*, como PGI-1 y MDH-3, presentan valores muy elevados de diferenciación entre poblaciones dentro de regiones (>93 %), mientras que otros (MDH-4, GOT-2 y GOT-3) tienen valores pequeños (<9 %) (Cuadro 4), lo que sugiere que los primeros son los que más contribuyen a la diferenciación de las poblaciones. Estos *loci* generalmente presentan un alelo fijo o muy

cercano a la fijación en unas poblaciones, mientras que otro alelo diferente es el más común en otras poblaciones.

El reducido nivel de diferenciación genética detectado entre regiones geográficas no es consistente con los resultados en características morfológicas y adaptativas de *P. greggii*. En esos estudios se ha encontrado una clara diferenciación entre regiones geográficas (Donahue y López-Upton 1996; Salazar *et al.*, 1999; López-Ayala *et al.*, 1999; López *et al.*, 2000). En otras especies de coníferas (*Picea mariana*, *Pinus palustris*, *P. strobus* y *P. taeda*) tampoco se han encontrado patrones consistentes en estructura de diversidad genética al comparar los resultados de *loci* isoenzimáticos con aquellos asociados a características morfológicas o adaptativas (Schmidting y Hipkins, 1998; Schmidting *et al.*, 1999). Una posible explicación es el hecho de que los *loci* isoenzimáticos se consideran neutrales a la selección, mientras que las otras características responden a la fuerza de selección natural, lo que ocasiona patrones distintos de diversidad genética entre ellos. La única posibilidad de que ambos tipos de caracteres muestren patrones similares de estructura genética es cuando los *loci* isoenzimáticos se encuentran ligados a los otros o cuando ambos responden de manera similar a las mismas fuerzas selectivas.

Cuadro 4. Partición de la diversidad genética en diferentes loci muestreados en poblaciones naturales de *Pinus greggii*, de acuerdo con el modelo de poblaciones subdivididas (Nei, 1973)

| Locus          | H <sub>t</sub> | H <sub>p</sub> | D <sub>p(r)</sub> | D <sub>r</sub> | G <sub>p(r)</sub> | G <sub>r</sub> |
|----------------|----------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| IDH-1          | 0.1437         | 0.1144         | 0.0256            | 0.0037         | 0.1783            | 0.0258         |
| 6PGD-1         | 0.0465         | 0.0402         | 0.0063            | 0.0001         | 0.1353            | 0.0012         |
| 6PGD-2         | 0.5284         | 0.3669         | 0.1507            | 0.0108         | 0.2852            | 0.0204         |
| PGI-1          | 0.0997         | 0.0000         | 0.0936            | 0.0062         | 0.9383            | 0.0617         |
| PGI-2          | 0.3938         | 0.2073         | 0.1687            | 0.0178         | 0.4285            | 0.0451         |
| ACP-2          | 0.0145         | 0.0126         | 0.0018            | 0.0001         | 0.1245            | 0.0082         |
| MDH-1          | 0.5529         | 0.3700         | 0.1599            | 0.0230         | 0.2892            | 0.0415         |
| MDH-2          | 0.0257         | 0.0206         | 0.0047            | 0.0004         | 0.1818            | 0.0146         |
| MDH-3          | 0.1018         | 0.0023         | 0.0948            | 0.0047         | 0.9311            | 0.0466         |
| MDH-4          | 0.0261         | 0.0242         | 0.0018            | 0.0001         | 0.0683            | 0.0039         |
| GOT-1          | 0.3068         | 0.2454         | 0.0547            | 0.0067         | 0.1784            | 0.0218         |
| GOT-2          | 0.0749         | 0.0676         | 0.0065            | 0.0008         | 0.0872            | 0.0110         |
| GOT-3          | 0.0139         | 0.0128         | 0.0010            | 0.0001         | 0.0730            | 0.0052         |
| GOT-4          | 0.5723         | 0.3174         | 0.2394            | 0.0155         | 0.4184            | 0.0270         |
| Promedio       | 0.1934         | 0.1201         | 0.0673            | 0.0060         | 0.2878            | 0.0223         |
| Error estándar | 0.0560         | 0.0368         | 0.0206            | 0.0020         | 0.0747            | 0.0048         |

Nota: El promedio es sobre 15 loci, incluyendo el locus ACP-1 que fue monomórfico. H<sub>t</sub> = Diversidad genética total; H<sub>p</sub> = Diversidad genética dentro de poblaciones; D<sub>p(r)</sub> = Variación entre poblaciones dentro de regiones; D<sub>r</sub> = Variación entre regiones; G<sub>p(r)</sub> = Proporción de la diversidad genética entre poblaciones dentro de regiones; y G<sub>r</sub> = Proporción de la diversidad genética entre regiones.

### Distancias genéticas

La distancia genética promedio entre poblaciones fue de 0.091 pero varió desde 0.002 hasta 0.376. Sin embargo, no se observó una separación distintiva a nivel de re-

giones, ya que la distancia genética promedio entre poblaciones de las dos regiones (0.093) fue similar a la distancia genética promedio dentro de regiones, 0.091 en la región sur y 0.085 en la región norte (Cuadro 5), lo cual confirma los resultados descritos en párrafos anteriores. Dado que la distancia genética promedio entre poblaciones de una misma región fue similar en las dos regiones geográficas, en ambas existe un grado similar de diferenciación genética. Debido a lo anterior, el agrupamiento de las poblaciones no muestra un patrón geográfico definido (Figura 1). Es decir, dentro de un mismo grupo existen poblaciones tanto del norte como del sur. Estos resultados difieren de lo que se ha encontrado en *Pseudotsuga menziesii* (Li y Adams, 1988) en donde el agrupamiento de las poblaciones coincide con la regionalización geográfica de la especie. Sin embargo, en otras especies del género *Pinus* tampoco se ha encontrado un patrón geográfico definido en el agrupamiento de las poblaciones con base en las distancias genéticas existentes entre ellas (Goncharenko *et al.*, 1993a; 1993b; 1994).

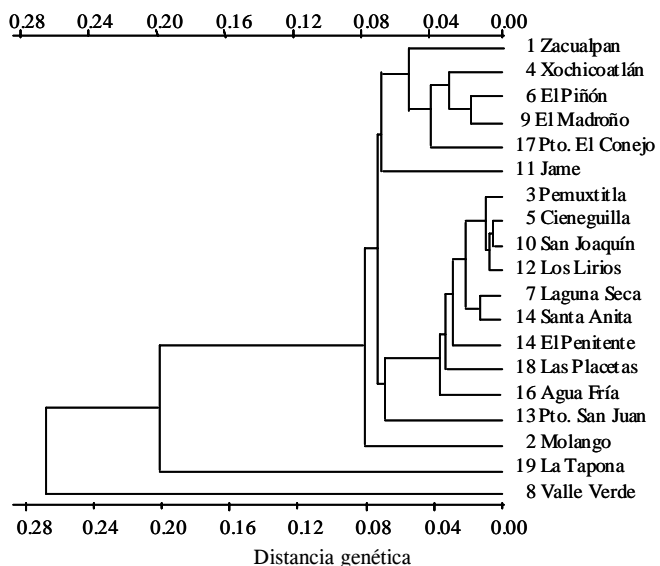


Figura 1. Agrupamiento de las 19 poblaciones de *Pinus greggii* con base en las distancias genéticas (Nei, 1978) entre ellas.

Las poblaciones de “Valle Verde” en la región sur y “La Tapona” en la región norte, presentaron distancias genéticas relativamente elevadas (2 a 4 veces mayores que el promedio) que el resto de las poblaciones (Cuadro 5), lo cual muestra que estas dos poblaciones se diferencian notablemente del resto en cuanto a las frecuencias alélicas en los loci evaluados (Figura 1). Al excluir estas dos poblaciones del análisis disminuyen en gran medida las distancias genéticas promedio entre las poblaciones dentro de regiones y entre regiones, pero no se modifica el esquema de agrupamiento de las poblaciones. Es difícil explicar la separación de estas dos poblaciones con respecto al resto de la especie, ya que se trata de poblaciones relativamente

Cuadro 5. Matriz de distancias genéticas entre pares de poblaciones (arriba de la diagonal) y valores promedio dentro y entre regiones geográficas (debajo de la diagonal) en *Pinus greggii* Engelm.

| Pob.                  | S U R |     |        |        |       |       |       |       |       |       | NORTE |       |        |        |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-----|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                       | 1     | 2   | 3      | 4      | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13     | 14     | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    |       |
| S<br>U<br>R           | 1     | --- | 0.082  | 0.045  | 0.063 | 0.043 | 0.027 | 0.024 | 0.260 | 0.047 | 0.044 | 0.060 | 0.065  | 0.051  | 0.040 | 0.037 | 0.064 | 0.056 | 0.095 | 0.184 |
|                       | 2     |     | ---    | 0.049  | 0.039 | 0.071 | 0.085 | 0.050 | 0.251 | 0.074 | 0.054 | 0.142 | 0.062  | 0.076  | 0.058 | 0.093 | 0.137 | 0.073 | 0.090 | 0.277 |
|                       | 3     |     |        | ---    | 0.072 | 0.005 | 0.073 | 0.010 | 0.240 | 0.086 | 0.006 | 0.084 | 0.009  | 0.043  | 0.020 | 0.029 | 0.037 | 0.052 | 0.033 | 0.205 |
|                       | 4     |     |        |        | ---   | 0.088 | 0.024 | 0.046 | 0.287 | 0.028 | 0.078 | 0.088 | 0.098  | 0.094  | 0.047 | 0.076 | 0.143 | 0.043 | 0.125 | 0.223 |
|                       | 5     |     |        |        |       | ---   | 0.073 | 0.010 | 0.250 | 0.086 | 0.002 | 0.078 | 0.005  | 0.054  | 0.013 | 0.019 | 0.023 | 0.049 | 0.024 | 0.185 |
|                       | 6     |     | 0.0    | 91     |       |       | ---   | 0.029 | 0.295 | 0.011 | 0.075 | 0.041 | 0.100  | 0.087  | 0.039 | 0.046 | 0.092 | 0.042 | 0.121 | 0.175 |
|                       | 7     |     | (0.002 | 0.295) |       |       |       | ---   | 0.266 | 0.040 | 0.012 | 0.047 | 0.023  | 0.058  | 0.007 | 0.018 | 0.032 | 0.038 | 0.043 | 0.174 |
|                       | 8     |     |        |        |       |       |       |       | ---   | 0.260 | 0.236 | 0.376 | 0.225  | 0.189  | 0.239 | 0.268 | 0.322 | 0.210 | 0.238 | 0.348 |
|                       | 9     |     |        |        |       |       |       |       |       | ---   | 0.084 | 0.062 | 0.103  | 0.088  | 0.034 | 0.051 | 0.108 | 0.027 | 0.100 | 0.172 |
|                       | 10    |     |        |        |       |       |       |       |       |       | ---   | 0.091 | 0.004  | 0.047  | 0.014 | 0.029 | 0.038 | 0.046 | 0.027 | 0.199 |
| N<br>O<br>R<br>T<br>E | 11    |     |        |        |       |       |       |       |       |       | ---   | 0.113 | 0.124  | 0.062  | 0.047 | 0.072 | 0.083 | 0.122 | 0.182 |       |
|                       | 12    |     |        |        |       |       |       |       |       |       |       | ---   | 0.057  | 0.019  | 0.038 | 0.047 | 0.053 | 0.019 | 0.223 |       |
|                       | 13    |     |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       | ---    | 0.058  | 0.066 | 0.100 | 0.047 | 0.078 | 0.218 |       |
|                       | 14    |     |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |        | ---    | 0.014 | 0.038 | 0.015 | 0.020 | 0.167 |       |
|                       | 15    |     |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        | ---   | 0.027 | 0.027 | 0.036 | 0.163 |       |
|                       | 16    |     | 0.0    | 93     |       |       |       |       |       |       |       |       | 0.0    | 85     |       | ---   | 0.094 | 0.038 | 0.166 |       |
|                       | 17    |     | (0.004 | 0.376) |       |       |       |       |       |       |       |       | (0.014 | 0.223) |       |       | ---   | 0.052 | 0.185 |       |
|                       | 18    |     |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |       |       |       | ---   | 0.205 |       |
|                       | 19    |     |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |       |       |       |       | ---   |       |

extensas (con una superficie mayor a 100 ha). Sin embargo, es conveniente señalar que en ambas poblaciones se presentaron problemas de germinación de las semillas, un elevado porcentaje de semillas vanas y algunas plantas albinas. Lo anterior podría estar relacionado con la baja densidad de árboles presente en ambas poblaciones (Ramírez *et al.*, 2001 datos no publicados), o con la inclusión de árboles aislados en la muestra, aunque es necesario realizar estudios adicionales al respecto.

A pesar de que el agrupamiento de las poblaciones no siguió un patrón geográfico definido a nivel de regiones, la distancia genética entre poblaciones tuvo una correlación positiva ( $r = 0.30$ ) y significativa ( $P \leq 0.05$ ), aunque relativamente baja, con la distancia geográfica entre ellas (Figura 2). En la región norte la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica ( $r = 0.48$ ) fue mayor que en la región sur ( $r = 0.21$ ), lo cual implica que en la primera la separación geográfica tiene un papel más importante en la diferenciación de las poblaciones que en la segunda. Al mismo tiempo, señala que la diferenciación genética de las poblaciones en cada región podría estar asociada a diferentes fuerzas evolutivas.

Los valores estimados de diversidad genética, estructura de la diversidad y flujo génico, apoyan las conclusiones obtenidas anteriormente para esta especie (Ramírez *et al.*, 1997), en el sentido de que existe una fuerte influencia de la deriva genética y la endogamia debido al aislamiento y fragmentación de las poblaciones naturales en las dos regiones geográficas. En la región norte, la migración o selección también parecen estar involucradas, ya que la similitud en las frecuencias alélicas de las poblaciones aumenta conforme se reduce la distancia geográfica entre ellas.

Las poblaciones de la región sur han presentado los mejores crecimientos en ensayos de campo, especialmente las de “El Madroño”, “San Joaquín”, “Laguna Seca” y “El Piñón” (Salazar *et al.*, 1999; López-Ayala *et al.*, 1999; López *et al.*, 2000). Estas poblaciones presentaron frecuencias alélicas en equilibrio de Hardy-Weinberg (Cuadro 2) y menor número de alelos raros (menos de 3) que el resto de las poblaciones. Schmidling *et al.* (1999) encontraron que en *Pinus taeda* un aumento en el número de alelos raros estuvo relacionado con una disminución en el crecimiento de los árboles descendientes de dichas poblaciones. Estos autores señalan que esto se debe a que los alelos raros tienen efectos deletéreos que se manifiestan en una disminución de la tasa de crecimiento.

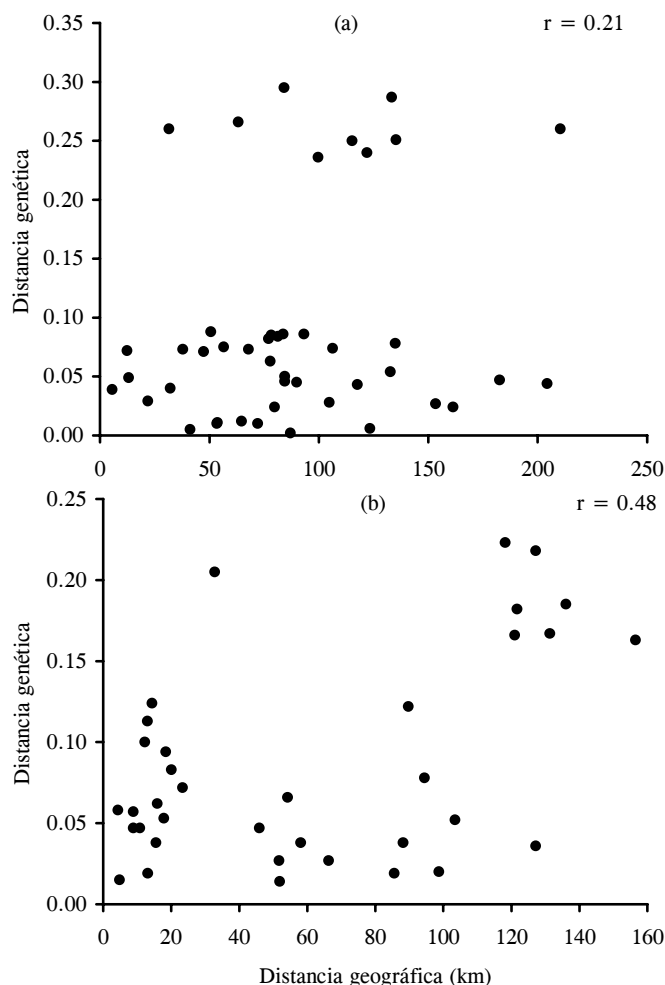


Figura 2. Relación entre distancias genéticas y distancias geográficas para las poblaciones de la región sur (a) y de la región norte (b) de *P. greggii* Engelm. y su coeficiente de correlación (*r*).

**CONCLUSIONES**

Los resultados de este trabajo muestran que a nivel de especie existe una amplia diversidad genética en *P. greggii*, así como un alto grado de diferenciación genética entre las poblaciones, con una elevada proporción de alelos raros y “privados” en ellas, por lo que cada población representa sólo una pequeña muestra de la diversidad genética total. Ante esta situación y dado que la mayoría de las poblaciones de esta especie enfrentan problemas de fragmentación y aislamiento, es necesario implementar una estrategia que permita conservar la diversidad genética de la especie. Esta estrategia debe considerar incluir el mayor número posible de poblaciones ya que la diversidad genética se encuentra distribuida en todas ellas y no es posible conservar sólo un grupo de ellas sin correr el riesgo de perder parte de esa riqueza genética.

**AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al M. C. Carlos Ramírez Herrera, quien realizó la recolección de las muestras y colaboró en la realización de los trabajos de laboratorio, así como el C. Juan Carlos Zaragoza Ramírez. Al Dr. Javier López Upton, quien realizó valiosas observaciones para la interpretación de los resultados. A la International Foundation for Science Grand D/2318-1 y al Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza proyecto B1-073, por aportar los recursos económicos para la realización del trabajo.

**BIBLIOGRAFÍA**

Berg E E, J L Hamrick (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can. J. For. Res.* 27:415-424.

Brown A H D, B S Weir (1983) Measuring genetic variability in plant population. *In: Tanksley, S D, T J Orton (eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part “A”.* Ed. Elsevier. Amsterdam, Holland. pp: 219-239.

Chakraborty R (1980) Gene-Diversity analysis in nested subdivided populations. *Genetics* 96:721-726.

Delgado P, D Piñeiro, A. Chaos, N Perez-Nasser, E Alvarez-Buylla (1999) High population differentiation and genetic variation in endangered Mexican pine *Pinus rzendowskii* (Pinaceae). *Amer. J. Bot.* 86(5):669-676.

Donahue J K, J López-Upton (1996) Geographic variation in leaf, cone and seed morphology of *Pinus greggii* in native forests. *Forest Ecol. Manage.* 82:145-157.

-----, J López-Upton (1999) A new variety of *Pinus greggii* (Pinaceae) in Mexico. *SIDA* 18(4):1083-1093.

Dvorak W S, J K Donahue (1992) CAMCORE Cooperative Research Review 1980-1992. Department of Forestry, College of Forest Resources, North Carolina State University. Raleigh, N.C., USA. 93 p.

Goncharenko G G, V E Padutov, A E Silin (1993a) Allozyme variation in natural population of Eurasian Pines. I: Population structure, genetic variation and differentiation in *Pinus pumila* (Pall.) Regel from Chukotsk and Sakhalin. *Silvae Genetica* 42(4-5):237-246.

-----, -----, ----- (1993b) Allozyme variation in natural population of Eurasian Pines. II. Genetic variation, diversity, differentiation and gene flow in *Pinus sibirica* Du Tour in some lowland and mountain populations. *Silvae Genetica* 42(4-5):246-253.

-----, A E Silin, V E Padutov (1994) Allozyme variation in natural population of Eurasian Pines. III: Population structure, diversity, differentiation and gene flow in central and insolated populations of *Pinus silvestris* L. in eastern Europe and Siberia. *Silvae Genetica* 43(2-3):119-132.

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

Hernández G J J (1990) Variación genética isoenzimática en *Pinus aya cahuite* y sus dos variedades de México y Centroamérica. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México. 103 p.

Kletzka J E, N P Denison, W S Dvorak (1996) *Pinus greggii* a promising new species for South Africa. *In: Dieters M J, A C Matheson, D G Nikles, C E Hardwood, S M Walker (eds). Tree Improvement for Sustainable Tropical Forestry. Proceed QFRI-IUFRO Conf., Caloundra, Queensland, Australia. 27 Oc. -1 Nov. 1996.* pp: 42-45.



- Ledig F T (1998)** Genetic variation in *Pinus*. In: D M Richardson (ed.), Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge. pp: 251-280.
- (2000) Founder effects and the genetic structure of coulter pine. *J. Hered.* 91(4):307-315.
- Li P, W T Adams (1988)** Range-wide of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. For. Res.* 19:149-161.
- López-Ayala J L, J J Vargas-Hernández, C Ramírez-Herrera, J López-Upton (1999)** Variación intraespecífica en el patrón de crecimiento del brote terminal en *Pinus greggii* Engelm. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 5(2):133-140.
- López U J, J Jasso M, J J Vargas H, J C Ayala S (1993)** Variación de características morfológicas en conos y semillas de *Pinus greggii*. *Agrociencia Serie Recursos Naturales Renovables* 3(1):81-95.
- , **A J Mendoza H, J Jasso M, J J Vargas H, A Gómez G (2000)** Variación morfológica de plántulas e influencia del pH del agua de riego en doce poblaciones de *Pinus greggii* Engelm. *Madera y Bosques* 6(2):81-94.
- Matheson A C, J C Bell, R D Barnes (1989)** Breeding system and genetic structure in some Central America pine populations. *Silvae Genetica* 38:107-113.
- Mitton J B, M C Grand, A M Yoshino (1998)** Variation in allozyme and stomatal size in pinyon (*Pinus edulis*, Pinaceae), associated with soil moisture. *Am. J. Bot.* 89(9):1262-1265.
- Nei M (1973)** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70(12):3321-3323.
- (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Parker K C, Hamrick J L (1996)** Genetic variation in sand pine (*Pinus clausa*). *Can. J. For. Res.* 26:244-254.
- , **J L Hamrick, A J Parker, E A Stacy (1997)** Allozyme diversity in *Pinus virginiana* (Pinaceae): Intraspecific and interspecific comparisons. *Am. J. Bot.* 84(10):1372-1382.
- Potenko V V, A V Velikov (1998)** Genetic diversity and differentiation of natural populations of *Pinus koraiensis* (Sieb. et Zucc.) in Russia. *Silvae Genetica* 47(4):202-208.
- Ramírez H C, J J Vargas H, J Jasso M, G Carrillo C, H Guillén A (1997)** Variación isoenzimática en diez poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Agrociencia* 31(2):223-230.
- Salazar G J G, J J Vargas H, J Jasso M, J D Molina G, C Ramírez H, J López U (1999)** Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. *Madera y Bosques* 5(2):19-34.
- Schmidtling R C, V Hipkins (1998)** Genetic diversity in longleaf pine (*Pinus palustris*): influence of historical and prehistorical events. *Can. J. For. Res.* 28:1135-1145.
- , **E Carrol, T LaFarge (1999)** Allozyme diversity of selected and natural loblolly pine populations. *Silvae Genetica* 48(1):35-45.
- Slatkin M, N H Barton (1989)** A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43(3):1349-1368.
- Stuber C W, J F Wendel, M M Goodman, J S C Smith (1988)** Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L). North Carolina Agricultural Research Service. North Carolina State University, Raleigh, N.C., U.S.A. Technical Bulletin No. 286. 87 p.
- Swofford D L, R B Selander (1989)** BIOSYS-1: a computer program for analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics, release 1.7. Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill. U.S.A. 65 p.
- Vargas H J. J, A Muñoz O (1988)** Resistencia a sequía: II. Crecimiento y supervivencia en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. *Agrociencia* 72:197-208.
- Wright S (1965)** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.