

VARIACIÓN ISOENZIMÁTICA DE *Pinus pseudostrobus* LINDL. A LO LARGO DE UN GRADIENTE ALTITUDINAL EN MICHOACÁN, MÉXICO

Pinus pseudostrobus LINDL. ISOENZYMATIC VARIATION ALONG AN ALTITUDINAL GRADIENT IN MICHOACÁN, MEXICO

Héctor Viveros-Viveros¹, Blanca Ll. Tapia-Oivares², Cuauhtémoc Sáenz-Romero^{2,3*}

¹Instituto de Investigaciones Forestales, Universidad Veracruzana. Parque Ecológico "El Haya", Colonia Benito Juárez. 91070. Xalapa, Veracruz. ²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH). Km 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro. 58880. Tarímbaro Michoacán, México. ³INRA, UMR 1202 BIOGECO, F-33610 Cestas, France & Univ. Bordeaux, UMR 1202 BIOGECO, F-33615 Pessac, France. (csaenzromero@gmail.com).

RESUMEN

Pinus pseudostrobus Lindl. es la especie de pino de mayor importancia económica en el estado de Michoacán. Para su conservación y manejo sustentable se debe conocer tanto la variación de caracteres cuantitativos con valor adaptativo como la diversidad genética mediante marcadores neutrales a la selección. En el presente estudio se investigó la variación genética isoenzimática entre poblaciones de *P. pseudostrobus* a lo largo de un gradiente altitudinal (de 2200 a 2910 m de altitud) en el estado de Michoacán, México. En enero del 2001 se recolectaron semillas de ocho localidades, separadas entre sí por 100 m de altitud; en cada población se seleccionaron al azar 9 a 11 árboles. En 12 de los 14 loci examinados se encontró polimorfismo. La heterocigosidad esperada promedio (H_e) fue 0.10. En todos los loci se encontró equilibrio de Hardy-Weinberg. La diferenciación genética entre poblaciones fue significativa ($F_{ST} = 0.017$), aunque fue baja. La distancia genética promedio fue baja (0.078) y el flujo génico promedio fue alto ($N_m = 14.5$). Se encontró un débil patrón de variación genética asociado con la altitud de origen de las poblaciones, en el cual las poblaciones de menor altitud presentaron mayor número efectivo de alelos que las poblaciones de mayor altitud. Para conservar la diversidad genética se sugiere establecer tres Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (UCRGF), una por cada uno de los siguientes intervalos altitudinales, con el tamaño mínimo de población efectiva viable (N_e) siguiente: entre 2100 y 2400 m con 3422 individuos en edad reproductiva, entre 2400 y 2700 m con 1586 individuos, y entre 2700 y 3000 m con 2321 individuos.

ABSTRACT

Pinus pseudostrobus Lindl. is the pine species of major economic importance in the state of Michoacán. For its conservation and sustainable management both the variation of quantitative traits with adaptive value as well as the genetic diversity through markers neutral to selection should be known. In the present study the genetic isoenzymatic variation among populations of *P. pseudostrobus* along an altitudinal gradient (2200-2910 m of altitude) in the state of Michoacan, Mexico was investigated. In January 2001, seeds from eight locations, separated by 100 m altitude were collected; in each population from 9 to 11 trees were randomly selected. Polymorphism was found in 12 of the 14 loci examined. The expected average heterozygosity (H_e) was 0.10. In all loci Hardy-Weinberg equilibrium was found. Genetic differentiation among populations was significant ($F_{ST} = 0.017$), although it was low. Average genetic distance (0.078) was low, and average gene flow was high ($N_m = 14.5$). It was found a weak pattern of genetic variation associated with altitude of origin of populations, in which lower altitude populations presented a greater effective number of alleles than higher altitude populations. To preserve genetic diversity it is suggested to establish three Forest Genetic Resource Conservation Units (FGRCU), one for each of the following altitudinal ranges, with the minimum size of a viable effective population (N_e) as follows: between 2100 and 2400 m with 3422 individuals in reproductive age, between 2400 and 2700 m with 1586 individuals, and 2700 and 3000 m with 2321 individuals.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2014. Aprobado: agosto, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 48: 713-723. 2014.

Key words: *Pinus pseudostrobus*, altitudinal genetic variation, forest genetic resource conservation, gene flow, isoenzymes.

Palabras clave: *Pinus pseudostrubus*, variación genética altitudinal, conservación de recursos genéticos forestales, flujo génico, isoenzimas.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de especies con distribución a lo largo de gradientes altitudinales tienden a diferenciarse genéticamente en caracteres cuantitativos, como el patrón de elongación de la yema, el crecimiento en altura y diámetro, la resistencia a sequía y heladas, en respuesta a diferentes intensidades de selección impuestas por el ambiente (Sáenz-Romero *et al.*, 2012). Pero en la mayoría de los casos se debe conocer la diversidad genética revelada con marcadores moleculares (neutrales o casi neutrales a la selección), para identificar el estado que presentan las poblaciones en relación a la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones (Lynch *et al.*, 1999), así como las evidencias de eventos previos (cuellos de botella, deriva génica y endogamia), y en caso necesario, establecer programas de conservación (Nelson, 2005). Según Ohsawa e Ide (2008), la variabilidad genética de caracteres neutrales en poblaciones de especies forestales presenta patrones muy diversos en relación con los gradientes altitudinales.

Los objetivos de este estudio fueron: 1) cuantificar la diversidad genética en poblaciones de *Pinus pseudostrubus* distribuidas en un gradiente altitudinal en el estado de Michoacán; 2) determinar la asociación entre los parámetros de diversidad genética y la ubicación de las poblaciones; y 3) estimar el tamaño de población genéticamente viable necesario para establecer Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (UCRGF).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

La semilla de polinización libre de *P. pseudostrubus* se recolectó en ocho poblaciones en un gradiente altitudinal, a lo largo de un solo transecto, desde 2200 (Paraje Joya del Durazno, 19° 27.8' N, 102° 08.9' O) a 2910 msnm (Cerro de Pario, 19° 28.4' N, 102° 11.0' O), en los bosques de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. Cada población se ubicó aproximadamente a 100 m de diferencia altitudinal, con una distancia geográfica promedio entre sitios contiguos de

INTRODUCTION

Populations of species with distribution along altitudinal gradients tend to genetically differentiate into quantitative traits, such as the elongation pattern of bud, growth in height and diameter, resistance to drought and frost, in response to different intensities of selection imposed by environment (Sáenz-Romero *et al.*, 2012). But in most cases, the genetic diversity revealed by molecular markers (neutral or nearly neutral selection) should be known, to identify the state that populations have in relation to genetic diversity among and within populations (Lynch *et al.*, 1999), as well as evidence of previous events (bottlenecks, genetic drift and endogamy), and if necessary, establish conservation programs (Nelson, 2005). According to Ohsawa and Ide (2008), the genetic variability of neutral characters in populations of forest species has very different patterns in relation to altitudinal gradients.

The objectives of this study were 1) to quantify the genetic diversity in populations of *Pinus pseudostrubus* distributed along an altitudinal gradient in the state of Michoacan; 2) to determine the association between genetic diversity parameters and location of the populations; and 3) estimate the size of a genetically viable population necessary to establish Forest Genetic Resources Conservation Units (FGRCU).

MATERIALS AND METHODS

Genetic material

The open-pollinated *P. pseudostrubus* seed was collected in eight populations along an altitudinal gradient in a single transect, from 2200 (Paraje Joya del Durazno, 19° 27.8' N, 102° 08.9' W) at 2910 masl (Cerro de Pario, 19° 28.4' N, 102° 11.0' W), in the forests of the indigenous community of Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, Mexico. Each population was located to approximately 100 m of altitudinal difference, with an average geographical distance between adjacent sites of 0.6 km. The population was a group of individuals in a relatively homogeneous stand condition; this category might be considered by some researchers as a sub-population. In each population 9 to 11 trees were randomly selected, separated by at least from 30 to 50 m to reduce the possibility of relationship. Ideally, it would be better to include more than 20 individuals, but the number of individuals included by population is within the range of sample

0.6 km. La población fue un grupo de individuos en una condición de rodal relativamente homogénea; esta categoría se podría considerar por algunos investigadores como subpoblación. En cada población se seleccionaron al azar de 9 a 11 árboles, separados al menos entre 30 y 50 m para disminuir la posibilidad de parentesco. Lo ideal sería incluir más de 20 individuos, pero el número de individuos incluidos por población está dentro del rango de tamaño de muestra por población utilizado en otros estudios con marcadores moleculares en árboles forestales: en *Pinus sylvestris* 10 a 22 individuos por población (Waldmann *et al.* 2005), en *Pinus oocarpa* 8 a 13 (Sáenz-Romero y Tapia-Olivares 2003), en *Cedrela odorata* 5 a 22 (Navarro *et al.* 2005), y en un estudio de encinos europeos 4.7 individuos (Petit *et al.*, 2002a; 2002b).

Electroforesis de isoenzimas

El análisis fue electroforesis de isoenzimas en geles de almidón y se evaluaron 14 loci; en ocho loci (*ACP*, *G6P*, *MDH-1*, *MDH-2*, *PGI-1*, *PGI-2*, *6PG-1* y *6PG-2*) se usó la metodología de Yamada y Guries (1989), y en seis (*GOT-1*, *GOT-2*, *LAP-1*, *LAP-2*, *PGM* y *SKD*) la de Soltis *et al.* (1983). La interpretación de los patrones de bandeo se realizó usando como referencia la migración de muestras de *Pinus resinosa* Aiton, una especie monomórfica (Fowler y Morris, 1977). Las muestras de *P. pseudostrabus* consistieron en seis megagametofitos por cada individuo; con ese tamaño de muestra, la probabilidad de error de una identificación de heterocigotos como homocigotos es 0.03 (Conkle, 1981).

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas, la heterocigosidad observada y esperada, los alelos raros (alelos con frecuencia <0.05), los alelos privados, la proporción de loci polimórficos (criterio frecuencia del alelo más común ≤ 0.99) y las diferencias significativas entre la heterocigosidad observada y esperada, se estimaron usando Tools For Population Genetic Analysis (TFPGA) (Miller, 1997). El número promedio de alelos por locus, y el número efectivo de alelos se obtuvieron mediante el programa POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Se estimó la endogamia total (F_{IT}), la proporción de la diversidad genética total entre poblaciones (F_{ST}) y la endogamia dentro de poblaciones (F_{IS}). Los intervalos de confianza al 90 % para los estadísticos de F de Wright se calcularon por la técnica de muestreo con reemplazo (bootstrapping) sobre los loci con 10 000 repeticiones (Miller, 1997). Con el intervalo de confianza para F_{ST} se determinó la existencia de diferenciación genética significativa entre poblaciones. El flujo génico se estimó como el número de migrantes por generación (N_m), mediante la fórmula siguiente (Slatkin, 1987):

size by population used in other studies with molecular markers in forest trees: in *Pinus sylvestris* 10-22 individuals per population (Waldmann *et al.* 2005), in *Pinus oocarpa* 8-13 (Sáenz-Romero and Tapia Olivares 2003), *Cedrela odorata* 5-22 (Navarro *et al.* 2005), and in a study of European oaks 4.7 individuals (Petit *et al.*, 2002a; 2002b).

Isoenzyme electrophoresis

Isoenzyme electrophoresis analysis was done in starch gels and 14 loci were assessed; in eight loci (*ACP*, *G6P*, *MDH-1*, *MDH-2*, *PGI-1*, *PGI-2*, *6PG-1* and *6PG-2*) the methodology of Yamada and Guries (1989) was used, and in six (*GOT-1*, *GOT-2*, *LAP-1*, *LAP-2*, *PGM* and *SKD*) the Soltis *et al.* (1983) method. Interpretation of banding patterns was carried out using as reference the migration of samples of *Pinus resinosa* Aiton, a monomorphic species (Fowler and Morris, 1977). The *P. pseudostrabus* samples consisted of six mega-gametophytes per individual; with this sample size, the probability of error in an identification of heterozygotes as homozygotes is 0.03 (Conkle, 1981).

Statistical analysis

Allele frequencies, observed and expected heterozygosity, rare alleles (alleles with frequency <0.05) private alleles, the proportion of polymorphic loci (criterion frequency of the most common allele ≤ 0.99) and significant differences between the observed and expected heterozygosity were estimated using Tools For Population Genetic Analysis (TFPGA) (Miller, 1997). The average number of alleles per locus, and the actual number of alleles were obtained using the program POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.* 1999). Total endogamy (F_{IT}), proportion of total genetic diversity among populations (F_{ST}) and endogamy within populations (F_{IS}) were estimated. Confidence intervals of 90 % for the Wright's F-statistics were calculated using the (bootstrapping) re-sampling technique with replacement on the loci with 10 000 replications (Miller, 1997). With the confidence interval for F_{ST} the existence of significant genetic differentiation among populations was determined. Gene flow was estimated as the number of migrants per generation (N_m), using the following formula (Slatkin, 1987):

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

To know the pattern of genetic differentiation among populations, genetic distances were estimated between pairs of localities using the modified Rogers distance (Miller, 1997). The frequency of alleles between pairs of populations was compared with the Fisher's combined probability test (Miller, 1997). The

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

Para conocer el patrón de diferenciación genética entre poblaciones se estimaron las distancias genéticas entre pares de localidades mediante la distancia modificada de Rogers (Miller, 1997). La frecuencia de alelos entre pares de poblaciones se comparó con la prueba de probabilidad combinada de Fisher (Miller, 1997). El tamaño efectivo de población genéticamente viable se calculó desde el valor estimado de heterocigosidad esperada, usando una fórmula de regresión obtenida al ajustar un modelo de regresión lineal entre valores de tamaño efectivo de población viable (N_e) y valores de heterocigosidad esperada (H_e) que se desea mantener, considerando una tasa de mutación de 1×10^{-5} , a partir de datos de Millar y Libby (1991) para especies de coníferas, con base en una ecuación de Crow y Kimura (1972) y la fórmula fue:

$$N_e = -984.58 + (36723 H_e) \quad (2)$$

El grado de asociación de los parámetros de diversidad genética respecto a la elevación (metros sobre el nivel del mar) de las localidades se evaluó usando los procedimientos CORR y REG (SAS Institute, 1988). La correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas se estimó mediante la prueba de Mantel (Miller, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Frecuencias génicas

En 14 loci muestreados se registraron 33 alelos, de los cuales 14 fueron comunes a todas las poblaciones y dos fueron privados (alelos menos frecuentes de los loci PGI-1; alelo dos) para la población de 2700 msnm y de PGI-2 (alelo tres; para la de 2400 msnm). No se encontraron alelos raros (alelos con frecuencia <0.05). La cantidad de alelos raros y privados encontrados en *P. pseudostrobus* fueron menos que los encontrados en poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. ubicadas también a lo largo de un transecto altitudinal (cinco alelos privados y 20 raros) (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). Lo anterior probablemente se debe a que en las poblaciones de *P. pseudostrobus* existe mayor intercambio génico que en las de *P. hartwegii* (flujo génico de 14.5 *vs.* 2.0). El mayor número de alelos por locus fue de tres y se presentó en siete de los 14 loci evaluados: ACP, GOT-2, MDH-1, PGM, PGI-2, SKD y 6PG-1.

effective size of genetically viable population was calculated from the estimated value of expected heterozygosity, using a regression formula obtained by fitting a linear regression model among values of actual viable population size (N_e) and the desired expected heterozygosity (H_e) values which are desired to keep, considering a mutation rate 1×10^{-5} , from data of Millar and Libby (1991) for conifer species, based on an equation of Crow and Kimura (1972) and the formula was:

$$N_e = -984.58 + (36723 H_e) \quad (2)$$

The degree of association of the parameters of genetic diversity with respect to the elevation (meters above sea level) of the locations was evaluated using the CORR and REG procedures (SAS Institute, 1988). The correlation between genetic and geographic distances was estimated using the Mantel test (Miller, 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Gene frequencies

In 14 sampled loci 33 alleles were recorded, of which 14 were common to all populations and two were private (less frequent alleles of the PGI-1 loci; allele two) for the population of 2700 masl and PGI-2 (allele three, for 2400 masl). No rare alleles (alleles with frequency <0.05) were found. The amount of rare and private alleles found in *P. pseudostrobus* was less than that found in populations of *Pinus hartwegii* Lindl. located also along an altitudinal transect (five private and 20 rare alleles) (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). This is probably due to the fact that in *P. pseudostrobus* populations there is more genetic exchange than in those of *P. hartwegii* (gene flow 14.5 *vs.* 2.0). The highest number of alleles per locus was three and appeared in seven of the 14 loci tested: ACP, GOT-2, MDH-1, PGM, PGI-2, SKD and 6PG-1.

Genetic diversity within populations

The number of alleles per locus at the level of all populations was similar to that reported in *Pinus oocarpa* Lindl. (2.4) (Sáenz-Romero and Tapia-Olivares, 2003) and very close to that reported in *P. hartwegii* (2.5) (Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

The joint analysis of all *P. pseudostrobus* populations showed that 12 loci were polymorphic

Diversidad genética dentro de poblaciones

El número de alelos por locus a nivel de todas las poblaciones fue similar al reportado en *Pinus oocarpa* Lindl. (2.4) (Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2003) y muy cercano al reportado en *P. hartwegii* (2.5) (Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

El análisis conjunto de todas las poblaciones de *P. pseudostrabus* mostró que 12 loci fueron polimórficos (85.7 %) y dos loci fueron monomórficos (*LAP-2*, y *6PG-2*); de usarse el criterio ≤ 0.99 , también *PGI-1* sería monomórfico y los loci polimórficos serían 78.6 %, pero el promedio de loci polimórficos fue 51.8 % (Cuadro 1). Estos valores son similares a los reportados para *Pinus pungens* Lamb.: 76.2 % de loci polimórficos en análisis conjunto y 58.3 % promediando 19 poblaciones (Gibson y Hamrick, 1991); y para *Pinus echinata* Mill.: 90.7 % de loci polimórficos en análisis conjunto y 52.8 % promediando 18 poblaciones (Edwards y Hamrick, 1995).

La heterocigosidad esperada fue ligeramente mayor en las poblaciones de menor altitud (de 2200 y 2490 m), excepto en la población de 2400 m, que las demás poblaciones (Cuadro 1). La heterocigosidad esperada promedio fue similar a la heterocigosidad esperada para el análisis conjunto de todas las poblaciones (0.10) y similar a la encontrada en *P. oocarpa* (Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2003); pero menor a la de otras especies de pinos con distribución en

(85.7 %) and two loci were monomorphic (*LAP-2* and *6PG-2*); if the criteria ≤ 0.99 is used also *PGI-1* would be monomorphic and polymorphic loci would be 78.6 %, but the average of polymorphic loci was 51.8 % (Table 1). These values are similar to those reported for *Pinus pungens* Lamb.: 76.2 % of polymorphic loci in conjoint analysis and 58.3 % averaging 19 populations (Gibson and Hamrick, 1991); and for *Pinus echinata* Mill. and.: 90.7 % of loci of polymorphic loci in conjoint analysis and 52.8 % averaging 18 populations (Hamrick and Edwards, 1995).

The expected heterozygosity was slightly higher in lower altitude populations (2200 and 2490 m), except in the population of 2400 m, than other populations (Table 1). The average heterozygosity expected was similar to that expected heterozygosity for the joint analysis of all populations (0.10) and similar to that found in *P. oocarpa* (Sáenz-Romero and Tapia-Olivares, 2003); but less to that of other species of pine with distribution in altitudinal gradients: 0.12 in *P. hartwegii* (Viveros-Viveros *et al.*, 2010) and 0.295 to 0.299 in *Pinus sylvestris* L. (Puglisi *et al.* 1999). The average observed heterozygosity was similar to the average expected heterozygosity (0.10). These values are within the range reported for pine species (Ledig, 2000). Hardy-Weinberg equilibrium test showed no significant difference between observed and expected heterozygosity for the 14 loci

Cuadro 1. Parámetros de diversidad genética en ocho poblaciones de *Pinus pseudostrabus* Lindl. muestreadas en un gradiente altitudinal en Michoacán, México.

Table 1. Genetic diversity parameters in eight *Pinus pseudostrabus* Lindl. populations sampled along an altitudinal gradient in Michoacán, Mexico.

Población (msnm)	N [†]	A [‡]	A _e [§]	H _o [‡]	H _e [‡]	P (%) ^{††}	I ^{¶¶}
2200	11	1.71	1.16	0.12	0.12	57.1	0.21
2290	10	1.64	1.16	0.14	0.12	57.1	0.21
2400	10	1.64	1.09	0.09	0.08	57.1	0.15
2490	11	1.79	1.15	0.13	0.12	64.3	0.22
2600	10	1.43	1.08	0.07	0.07	42.9	0.12
2700	9	1.43	1.09	0.08	0.07	35.7	0.13
2820	10	1.64	1.11	0.10	0.09	50.0	0.17
2910	9	1.50	1.02	0.10	0.09	50.0	0.15
Promedio		1.60	1.11	0.10	0.10	51.8	0.17
Todas las poblaciones	80	2.36	1.12	0.10	0.10	78.6	0.21

[†]Tamaño de muestra promedio por locus. [‡]Número promedio de alelos por locus. [§]Número efectivo de alelos. [‡]Heterocigosidad observada. [‡]Heterocigosidad esperada. ^{††}Porcentaje de loci polimórficos, criterio ≤ 0.99 . ^{¶¶}Índice de información de Shannon [‡]Average sample size per locus. [‡]Average number of alleles per locus. [§]Effective number of alleles. [‡]Observed heterozygosity. [‡]Expected heterozygosity. ^{††}Percentage of polymorphic loci, criterion ≤ 0.99 . ^{¶¶}Shannon's information index.

gradientes altitudinales: 0.12 en *P. hartwegii* (Viveros-Viveros *et al.*, 2010) y de 0.295 a 0.299 en *Pinus sylvestris* L. (Puglisi *et al.*, 1999). La heterocigosidad observada promedio fue similar a la heterocigosidad esperada promedio (0.10). Estos valores están dentro del rango reportado para especies de pino (Ledig, 2000). La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg no mostró diferencias significativas entre la heterocigosidad observada y la esperada para los 14 loci en el análisis conjunto y en el de cada una de las ocho poblaciones. Lo anterior sugiere que todos los loci estudiados están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el estudio de la diversidad genética de especies entre poblaciones se usó el índice Shannon, y éste varió de 0.12 (población de 2600 msnm) a 0.22 (población de 2490 msnm), con un promedio de 0.17 para las ocho poblaciones; para el análisis conjunto de las poblaciones fue 0.21 (Cuadro 1). El valor promedio fue menor al encontrado en *Pinus brutia* Ten. (0.34) (Kandemir *et al.*, 2004), y para el conjunto de poblaciones fue menor al reportado en otras especies arbóreas, por ejemplo, 0.50 en *Pinus albicualis* Engelm. (Mahalovich e Hipkins, 2011).

Estructura de la diversidad genética

El valor medio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) no fue significativamente diferente de cero (el intervalo de confianza incluye al cero, Cuadro 2). La no significancia de F_{IS} sugiere que los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg. En forma contraria, el valor estimado promedio de F_{IT} , fue significativamente diferente de cero (Cuadro 2). El valor de F_{IT} indica que a nivel global (análisis conjunto de todas las poblaciones) hay indicios de exogamia o bien un ligero exceso de heterocigotos (Schmidting *et al.*, 1999), probablemente debido a la combinación de un intenso flujo génico entre poblaciones y selección natural de embriones heterocigóticos.

La diferenciación genética entre poblaciones fue significativamente diferente de cero (Cuadro 2). El valor de F_{ST} indica que solo una pequeña proporción (1.7 % en promedio) del total de la variación isoenzimática se atribuyó a diferencias entre poblaciones, mientras que 98.3 % se puede atribuir a diferencias dentro de poblaciones. Valores de F_{ST} menores a 0.050 representan niveles bajos de diferenciación genética (Yeh, 2000). El valor de F_{ST} fue mayor al de *P. oocarpa* en un gradiente

in the joint analysis and in that of each of the eight populations. This suggests that all loci studied are in Hardy-Weinberg equilibrium.

In the study of the genetic diversity of species at population level the Shannon index was used, and this ranged from 0.12 (population at 2600 masl) to 0.22 (population at 2490 masl), with an average of 0.17 for the eight populations; for joint analysis of populations was 0.21 (Table 1). The average value was lower than that found in *Pinus brutia* Ten. (0.34) (Kandemir *et al.*, 2004), and for all populations was lower than that reported in other tree species such as 0.50 *Pinus albicualis* Engelm. (Mahalovich and Hipkins, 2011).

Structure of genetic diversity

The mean value of the coefficient of endogamy (F_{IS}) was not significantly different from zero (the confidence interval includes zero, Table 2). The non-significance of F_{IS} suggests that the loci are in Hardy-Weinberg equilibrium. In contrary, the estimated average F_{IT} value was significantly different from zero (Table 2). The F_{IT} value indicates that globally (joint analysis of all populations) there is evidence of exogamy or a slight excess of heterozygotes (Schmidting *et al.* 1999), probably due to the combination of an intense gene flow between populations and natural selection of heterozygotic embryos.

Genetic differentiation among populations was significantly different from zero (Table 2). Value of F_{ST} indicates that only a small proportion (1.7 % average) of total isoenzymatic variation was attributed to differences between populations, while 98.3 % can be attributed to differences within populations. F_{ST} values less than 0.050 represent low levels of genetic differentiation (Yeh, 2000). The F_{ST} value was higher than that in *P. oocarpa* along an altitudinal gradient ($F_{ST}=0.001$) (Sáenz-Romero and Tapia-Olivares, 2003), but in *P. hartwegii* the value of genetic differentiation between populations was higher ($F_{ST}=0.111$) (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). This indicates that the high gene flow that *P. pseudostrobus* presented regarding *P. hartwegii* decreases differentiation among populations.

The values of the number of migrants per generation (Table 2) have an average of 14.5,

Cuadro 2. Estadísticos F de Wright calculados para 12 loci polimórficos en *Pinus pseudostrabus* en Michoacán, México.
Table 2. Wright's F-Statistics calculated for 12 polymorphic loci in *Pinus pseudostrabus* in Michoacán, Mexico.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}	N_m
<i>ACP</i>	-0.031	0.024	-0.056	10.17
<i>G6P</i>	-0.041	0.018	-0.060	13.64
<i>GOT-1</i>	-0.042	0.019	-0.062	12.91
<i>GOT-2</i>	-0.036	0.020	-0.057	12.25
<i>LAP-1</i>	-0.042	0.018	-0.061	13.64
<i>MDH-1</i>	-0.041	0.019	-0.060	12.91
<i>MDH-2</i>	-0.041	0.017	-0.059	14.46
<i>PGM</i>	-0.061	0.012	-0.074	20.58
<i>PGI-1</i>	-0.042	0.018	-0.060	13.64
<i>PGI-2</i>	-0.042	0.009	-0.051	27.53
<i>SKD</i>	-0.039	0.020	-0.059	12.25
<i>6PG-1</i>	-0.037	0.017	-0.056	14.46
Promedio	-0.042	0.017	-0.060	14.46
Límite superior [†]	0.004	0.040	-0.025	
Límite inferior [†]	-0.070	0.001	-0.084	

[†]90 % de intervalo de confianza con 10 000 repeticiones ❖ [†]90 % confidence interval with 10 000 replications.

altitudinal ($F_{ST} = 0.001$) (Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2003), pero en *P. hartwegii* el valor de diferenciación genética entre poblaciones fue mayor ($F_{ST} = 0.111$) (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). Lo anterior indica que el flujo génico elevado que presentó *P. pseudostrabus* con respecto a *P. hartwegii*, disminuye la diferenciación entre poblaciones.

Los valores del número de migrantes por generación (Cuadro 2) tienen un promedio de 14.5, lo cual fue mayor al reportado en *P. hartwegii* (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). Pero según Ledig *et al.* (1997), los valores de N_m en coníferas pueden variar de 1.8 a 27.5, aunque en la mayoría de los casos los valores van de 4.6 a 17.2 (Ledig, 2000), rango en el que se ubica *P. pseudostrabus*.

Distancias genéticas

La distancia genética (modificación de la distancia de Roger) promedio fue 0.078, un valor que indica poca diferenciación genética (Bakshi y Konnert, 2011) y coincide con los valores bajos de F_{ST} . Sin embargo, las distancias fueron muy variables, desde 0.055 (entre las poblaciones de 2400 y 2600 m), hasta 0.117 (entre las poblaciones de 2200 y 2290 m), una diferenciación importante según Konnert (1995). La distancia genética promedio fue mayor a

which was higher than that reported in *P. hartwegii* (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). But according to Ledig *et al.* (1997), N_m values in conifers can vary from 1.8 to 27.5, although in most cases the values ranges from 4.6 to 17.2 (Ledig, 2000), a range in which *P. pseudostrabus* is located.

Genetic distances

The average genetic distance (modification of Roger's distance) was 0.078, a value indicating low genetic differentiation (Bakshi and Konnert, 2011) and coincides with the low values of F_{ST} . However, the distances were highly variable, from 0.055 (between populations of 2400 and 2600 m) to 0.117 (between populations 2200 and 2290 m), an important differentiation according to Konnert (1995). The average genetic distance was greater than that found in *P. oocarpa* along an altitudinal gradient (0.0054; Sáenz-Romero and Tapia-Olivares, 2003), but lower than that found in *P. hartwegii* (0.108; Viveros-Viveros *et al.*, 2010). The Mantel test indicates there was no significant association between altitudinal and genetic distances ($r = -0.044$; $p = -0.5910$) of populations. Therefore, there was no effect of genetic isolation by distance between populations.

la encontrada en *P. oocarpa* en un gradiente altitudinal (0.0054; Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2003), pero menor al encontrado en *P. hartwegii* (0.108; Viveros-Viveros *et al.*, 2010). La prueba de Mantel indica que no hubo asociación significativa entre las distancias altitudinales y las genéticas ($r = -0.044$; $p = 0.5910$) de las poblaciones. Por lo tanto, no hubo un efecto de aislamiento genético por la distancia entre ellas.

Asociación entre variación genética y altitud de la población

La mayoría de los parámetros de diversidad genética no mostraron una correlación con la altitud. Sin embargo, sí hubo asociación negativa significativa entre el número efectivo de alelos y la altitud de origen de las poblaciones; es decir, las poblaciones de menor altitud presentaron mayor número efectivo de alelos que las poblaciones de mayor altitud (Figura 1). Este patrón altitudinal coincide con el 19 % de los casos analizados por Ohsawa e Ide (2008). Este patrón puede originarse por una de las siguientes razones o por combinación de las mismas: 1) la especie comenzó a ampliar su distribución altitudinal a partir de las poblaciones de menor elevación, por lo cual tienen más antigüedad que las de mayor elevación, lo cual permite ampliar su diversidad genética (Austerlitz *et al.*, 2001); 2) la selección natural favorece

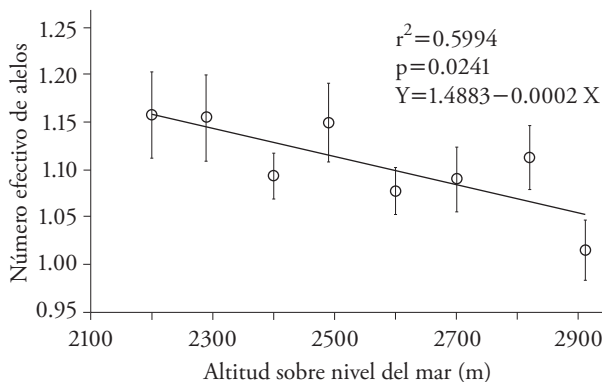


Figura 1. Asociación entre el número efectivo de alelos promedio con la altitud de origen de ocho poblaciones de *Pinus pseudostrobus* en Michoacán, México. La barra vertical representa la desviación estándar.

Figure 1. Association between the average effective number of alleles with the altitude of origin of eight *Pinus pseudostrobus* populations in Michoacán, Mexico. The vertical bar represents the standard deviation.

Association between genetic variation and population altitude

Most of the genetic diversity parameters did not show a correlation with altitude. However, there was significant negative association between the effective number of alleles and the altitude of origin of populations; that is, lower altitude populations had higher effective number of alleles than higher altitude populations (Figure 1). This altitudinal pattern coincides with 19 % of the cases analyzed by Ohsawa and Ide (2008). This pattern can be caused by one of the following reasons or by a combination of them: 1) the species began expanding its altitudinal distribution of populations from lower elevations, so they are older than those of higher elevation, which allows to extend its genetic diversity (Austerlitz *et al.*, 2001); 2) natural selection favors presence of a larger number of alleles as a mechanism of adaptation to unfavorable (less humid environments) or very specific environments (Kawecki, 2000); 3) higher elevation populations originate from a reduced number of individuals caused by a bottleneck during the altitudinal expansion of the species, so that the genetic diversity of the same ones was reduced (Newton *et al.*, 1999).

Implications for conservation of the species

To implement the use of the altitudinal zoning proposed (based on the variation of quantitative traits) by Sáenz-Romero *et al.* (2012) for this species and in the region of Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, it would be useful to help preserve the current pattern of distribution of genetic variability among and within populations for neutral or nearly neutral characters to the selection, by establishing three FGRCU one for each altitudinal zone and each with a genetically viable population size estimated from the formula (2), taking advantage that one has F_{ST} estimates (Table 2). This leads to suggest a FGRCU between 2100 and 2400 m with an effective population size (N_e) of 3422 individuals, other unit between 2400 and 2700 m with an N_e of 1586 individuals, and other between 2700 and 3000 m with an N_e of 2321 trees.

la presencia de un número mayor de alelos como un mecanismo de adaptación a ambientes más desfavorables (ambientes menos húmedos) o muy particulares (Kawecki, 2000); 3) las poblaciones de elevación mayor se originaron de un número reducido de individuos ocasionado por un cuello de botella durante la expansión altitudinal de la especie, con lo cual se redujo la diversidad genética de la mismas (Newton *et al.*, 1999).

Implicaciones para la conservación de las poblaciones

Para implementar el uso de la zonificación altitudinal propuesta (con base a la variación de caracteres cuantitativos) por Sáenz-Romero *et al.* (2012) para esta especie y en la región de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, sería útil contribuir a conservar el patrón actual de distribución de la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones para caracteres neutrales o casi neutrales a la selección, mediante el establecimiento de tres UCRGF, una por cada zona altitudinal y cada una con un tamaño de población genéticamente viable estimado con la fórmula (2), aprovechando que se cuenta con estimaciones de F_{ST} (Cuadro 2). Esto lleva a sugerir una UCRGF entre 2100 y 2400 m con un tamaño efectivo de población (N_e) de 3422 individuos, otra entre 2400 y 2700 m con un N_e de 1586 individuos, y otra entre 2700 y 3000 m con un N_e de 2321 árboles.

CONCLUSIONES

Pinus pseudostrabus mostró una ligera pero significativa diferenciación genética entre poblaciones. Hubo un débil patrón de variación genética asociado con la altitud de origen de las poblaciones, en el que las poblaciones de menor altitud presentaron mayor número efectivo de alelos que las poblaciones de mayor altitud; pero otros parámetros de diversidad genética (como heterozigosidad) no presentaron una asociación significativa con la altitud. Para usar una zonificación altitudinal para recolección y movimiento de semillas, se propone establecer tres UCRGF: una entre 2100 y 2400 m, otra entre 2400 y 2700 m, y una tercera entre 2700 y 3000 m, con un tamaño mínimo de población de 3422, 1586 y 2321.

CONCLUSIONS

Pinus pseudostrabus showed a slight but significant genetic differentiation between populations. There was a weak pattern of genetic variation associated with altitude of population origin, in which lower altitude populations had higher effective number of alleles than the higher altitude populations; but other parameters of genetic diversity (as heterozygosity) did not show a significant association with altitude. To use an altitudinal zoning for the collection and movement of seeds, it is proposed to establish three FGRCU: one between 2100 and 2400 m, another between 2400 and 2700 m, and a third between 2700 and 3000 m, with a minimum population size of 3422, 1586 and 2321.

—End of the English version—



AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento del Fondo Sectorial CONA-CyT-CONAFOR (proyecto 2002- C01-4655) para la colecta de semillas, y de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (5.1) y la beca CONACyT por año sabático a CSR (232838). Se agradece a Reyes Aguilar, Manuel Echeverría, Rafael Echeverría, Luis Toral, Felipe Aguilar y otras personas de la Dirección Técnica Forestal de la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, y a Ernesto Moreno, Daniel Saldivar, Víctor Quiñónez y otras personas de la Comisión Forestal de Michoacán, por su ayuda en la colecta de semillas. Tres revisores anónimos ayudaron a mejorar significativamente el manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Austerlitz, F., B. Jung-Muller, B. Godelle, and P.-H. Gouyon. 1997. Evolution of coalescence times, genetic diversity and structure during colonization. *Theor. Popul. Biol.* 51: 148-64.
- Bakshi, M., and M. Konner. 2011. Genetic diversity and differentiation through isozymes in natural populations of *Pinus walllichiana* A.B. Jacks (blue pine) in India. *Ann. For. Res.* 54: 23-37.
- Conkle, M. T. 1981. Isozyme variation and linkage in six conifer species. *In: Proc. Symp. Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects.* USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep., PSW-48. pp: 11-17.
- Crow, J. F., and M. Kimura. 1972. The effective number of a population with overlapping generations: a correction and further discussion. *Amer. J. Hum. Genet.* 24: 1-10.

- Edwards, M. A., and J. L. Hamrick. 1995. Genetic variation in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. (Pinaceae). *For. Genet.* 2: 21-28.
- Fowler, D. P., and R. W. Morris. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. *Can. J. For. Res.* 7: 343-347.
- Gibson, J. P., and J. L. Hamrick. 1991. Genetic structure in *Pinus pungens* (table mountain pine) populations. *Can. J. For. Res.* 21: 653-642.
- Kandemir, G. E., I. Kandemir, and Z. Kaya. 2004. Genetic variation in Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) seeds stand as determined by RADP markers. *Silvae Genet.* 53(4-5): 169-175.
- Kawecki, T. J. 2000. Adaptation to marginal habitats: contrasting influence of the dispersal rate on the fate of alleles with small and large effects. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 1315-1320.
- Konnert, M. 1995. Investigations on the genetic variation of beech (*Fagus sylvatica* L.) in Bavaria. *Silvae Genet.* 44: 5-6.
- Ledig, F. T. 2000. Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson, D. M. (ed). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp: 251-280.
- Ledig, F. T., V. Jacob-Cervantes, P. D. Hodgskiss, and T. Eguiluz-Piedra. 1997. Recent evolution and divergence among populations of a rare Mexican endemic, Chihuahua spruce, following Holocene climatic warming. *Evolution* 51: 1815-1827.
- Lynch, M., M. Pfrender, K. Spitze, N. Lehman, J. Hicks, and D. Allen. 1999. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution* 53: 100-110.
- Mahalovich, M. F., and V. D. Hipkins. 2011. Molecular genetic variation in whitebark pine (*Pinus albicaulis* Engelm.) in the Inland West. In: Keane, R. E., D. F. Tomback, M. P. Murray, and C. M. Smith (eds). *The Future of High-Elevation, Five-Needle White Pines in Western North America*. Proc. High Five Symposium. Missoula, MT. Proceedings RMRS-P-63. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 376 p.
- Millar, C. I., and W. J. Libby. 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species. In: Falk, D. A., and K. E. Holsinger (eds). *Genetic and Conservation of Rare Plants*. Biology and Genetics. Oxford University Press. New York. pp: 149-170.
- Miller, M. P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses [TFPGA] 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author <http://herb.bio.nau.edu/~miller> (Consulta: diciembre 2008).
- Navarro, C., S. Cavers, A. Pappinen, P. Tigerstedt, A. Lowe, J. Lowe, and J. Merilla. 2005. Contrasting quantitative traits and neutral genetic markers for genetic resource assessment of Mesoamerican *Cedrela odorata*. *Silvae Genet.* 54: 281-292.
- Nelson, C.D. 2005. Marcadores de ADN, diversidad genética y conservación de especies forestales. In: G. Vera C., J. J. Vargas H. y J. Dorantes L. (eds). *Uso y Conservación de Recursos Genéticos Forestales*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México y Comisión Nacional Forestal. Zapopan, Jalisco, México. pp: 29-48.
- Newton, A. C., T. R. Allnutt, A. C. M. Gillies, A. J. Lowe, and R. A. Ennos. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends Ecol. Evol.* 14: 140-145.
- Ohsawa, T., and Y. Ide. 2008. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients in mountains. *Global Ecol. Biogeogr.* 17: 153-162.
- Petit, R. J., S. Brewer, S. Bordács, K. Burg, R. Cheddadi, E. Coart, J. Cottrell, U. M. Csaikl, B. C. van Dam, J. D. Deans, S. Fineschi, R. Finkeldey, I. Glaz, P. G. Goicoechea, J. S. Jensen, A. O. König, A. J. Lowe, S. F. Madsen, G. Mátyás, R.C. Munro, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, S. M. G. de Vries, B. Ziegenhagen, J-L. de Beaulieu, and A. Kremer. 2002a. Identification of refugia and postglacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *For. Ecol. Manage.* 156: 49-74.
- Petit, R. J., U. M. Csaikl, S. Bordács, K. Burg, E. Coart, J. Cottrell, B. C. van Dam, J. D. Deans, S. Dumolin-Lapègue, S. Fineschi, R. Finkelday, A. Gillies, I. Glaz, P. G. Goicoechea, J. S. Jensen, A. O. König, A.J. Lowe, S. F. Madsen, G. Mátyà, R. C. Munro, M.-H. Pemonge, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, D. Turchini, S. M. G. de Vries, B. Ziegenhagen, and A. Kremer. 2002b. Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *For. Ecol. Manage.* 156: 5-26.
- Puglisi, S., R. Lovreglio, and M. Attolico. 1999. Subpopulation differentiation along elevational transect within two Italian populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Forest Genetics* 6: 247-256.
- Sáenz-Romero, C., and B. L. Tapia-Olivares. 2003. *Pinus oocarpa* isoenzymatic variation along an altitudinal gradient in Michoacán, México. *Silvae Genet.* 52: 237-240.
- Sáenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, J. C. Soto-Correa, S. Aguilar-Aguilar, V. Zamarripa-Morales, and J. López-Upton. 2012. Altitudinal genetic variation among *Pinus pseudostrobus* populations from Michoacán, Mexico. Two locations shadehouse test results. *Rev. Fitotec. Mex.* 35: 111-120.
- SAS Institute. 1988. SAS/STAT Users's; release 6.03. SAS Institute. Cary, N.C. 1028 p.
- Schmidting, R. C., E. Carroll, and T. LaFarge. 1999. Allozyme diversity of selected and natural loblolly pine populations. *Silvae Genet.* 48: 35-45.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Soltis, D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow, and G. J. Gastromy. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, and staining schedules. *Am. Ferns J.* 73: 9-27.
- Viveros-Viveros, H., B. L. Tapia-Olivares, C. Sáenz-Romero, J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, A. Santacruz-Varela, y G. Ramírez Valverde. 2010. Variación isoenzimática de *Pinus hartwegii* Lindl. en un gradiente altitudinal en Michoacán México. *Agrociencia* 44: 723-733.
- Waldmann, P., M. R. García-Gil, and M.J. Sillanpaa. 2005. Comparing Bayesian estimates of genetic differentiation of molecular markers and quantitative traits: applications to *Pinus sylvestris*. *Heredity* 94: 623-629.
- Yamada, M., and R. P. Guries. 1989. Manual for starch gel electrophoresis: new chocolate lovers edition. Staff Paper Series No. 39. Department of Forestry, College of Natural

- Resource, University of Wisconsin-Madison. Madison, WI. 29 p.
- Yeh, F.C. 2000. Population genetics. *In*: Young A., D. Boshier, and T. Boyle (eds). Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. CSIRO Publishing & CABI Publishing. Collingwood, Australia. pp: 21-37.
- Yeh, F.C., R.-C. Yang, and T. Boyle. 1999. POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. Univ. of Alberta & Centre for International Forestry Research. Edmonton, Canada. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/> (Consulta: diciembre 2008).