

**POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE
PLANTAS**

**Variación y estructura genética del complejo
de *Pinus caribaea* Morelet (Pinaceae)**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en ciencias
presenta:**

Virginia Rebolledo Camacho

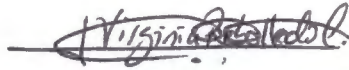
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

**Mérida Yucatán, México
2010**



Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



Virginia Rebolledo Camacho.

Reconocimientos

Este trabajo se realizó en la Unidad de Recursos Naturales bajo la dirección de la Dra. Patricia Delgado Valerio, actualmente investigadora de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y la Dra. Ivón Ramírez Morillo, de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

La colecta del material vegetal se realizó con el financiamiento del proyecto CONACYT-44373, 2004 y la ayuda de los técnicos Francisco Chi y Paulino Simá de la Unidad de Recursos Naturales, CICY.

La cuantificación de ADN se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Dr. Jorge Santamaría, Unidad de Biotecnología, CICY.

La amplificación de microsátélites se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares de la Unidad de Biotecnología, responsable Dr. Felipe Sánchez Teyer y en el Laboratorio de Marcadores Moleculares de Recursos Naturales, responsable Dr. Jaime Martínez.

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto CONACYT-44373, 2004 y por las becas de doctorado otorgadas por el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT-203325) y PROMEP a Virginia Rebolledo Camacho.



Dedicatoria

A mi familia, razón de ser y motivo de conseguir siempre una meta más.

A mis sobrinos, fuerza motivadora y alegría para seguir adelante.

Agradecimientos

Mi sincero agradecimiento para la Dra. Patricia Delgado Valerio, quien me confió la realización de este trabajo de investigación, por la dirección de esta tesis, por su guía y asesoría. Además, por compartir sus conocimientos y experiencias sobre el fascinante mundo de los pinos y mostrarme su importancia desde el punto de vista evolutivo, aprendiendo siempre un poco más de ellos.

Agradezco igualmente a la Dra. Ivón Ramírez Morillo, sin cuyo apoyo este trabajo no hubiese llegado a buen término. Por su asesoría para comprender mejor la genética de poblaciones.

Al Comité Tutorial, integrado por las Dras. Patricia Delgado, Ivón Ramírez y Nancy Santana, cuya contribución a lo largo del desarrollo de este estudio ayudó a su delimitación y finalización. Además, a los doctores David Gernandt, Jaime Martínez, Felipe Sánchez y a la Dra. Daisy Pérez quienes participaron conjuntamente con el Comité Tutorial como jurado evaluador del Examen Predoctoral.

De igual manera a los miembros del jurado evaluador de tesis, los doctores David Gernandt, Jaime Martínez, Germán Carnevali y a las doctoras Patricia Delgado, Ivón Ramírez, Nancy Santana y Lourdes Iglesias, agradezco su tiempo y dedicación para la revisión de esta tesis, por sus valiosas aportaciones y recomendaciones que ayudaron en la mejora del documento.

Agradezco al CONACYT, por el financiamiento al Proyecto 44373 (2004), por la beca de estudios (203325) y el apoyo obtenido por el Programa Integral de Fortalecimiento al Posgrado (PIFOP) para el desarrollo del trabajo de tesis de doctores en ciencia 2006. Así mismo, al Programa de Mejoramiento del Profesorado (SEP-PROMEP) por la beca otorgada.

A las autoridades de la Universidad Veracruzana, a la Mtra. Leticia Rodríguez Audirac, directora de Desarrollo Académico y representante ante PROMEP, a la Lic. Olga Sobrino y Lic. Patricia Luna por su gran apoyo para la obtención y seguimiento de la beca PROMEP. Al Instituto de Genética Forestal, ahora Instituto de Investigaciones Forestales por todo el apoyo institucional para realizar mis estudios de doctorado. Al Dr. Juan Alba y Dra. Lilia Mendizábal, así como todos los demás amigos del instituto con quienes comparto este logro profesional.

Al personal de los departamentos de Posgrado, Biblioteca y Cómputo del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., por las facilidades brindadas y su atento apoyo logístico.

A los señores miembros de la comunidad del Ejido Pioneros del Río, Campeche y del Ejido Caobas, Quintana Roo, por la disponibilidad y ayuda en la colecta del material vegetal.

Agradezco profundamente a los técnicos Francisco Chi May, Paulino Simá y a los amigos Ricardo Balam, Lev Jardon, Darío Escudero y Nayhelli Soltero por su ayuda y entusiasmo en las pesados días de colecta del material vegetal, gracias por tener siempre la sonrisa y el buen ánimo en todo momento.

Mil gracias al técnico Gregorio Amilcar Castillo por todo su apoyo en la realización del trabajo de laboratorio, por su dedicación y esas palabras de aliento durante las largas horas de espera para tener un buen resultado, por su entusiasmo y continuo ánimo.

Agradezco al técnico Julián Coello, por compartir su experiencia de laboratorio y por su perseverancia para la resolución de cualquier problema. De igual manera, mi agradecimiento para los técnicos Adriana Quiróz y Miguel A. Keb por su ayuda en el laboratorio.

A Celene Espadas, Francisco Chi, Lizandro Peraza y William Cetzal Ix, muchas gracias por su ayuda en la realización de los mapas empleados tanto en esta tesis como en el artículo científico.

A todos los amigos de la Unidad de Recursos Naturales, particularmente del cubículo de estudiantes –Selene, Eliana, Gerardo, René, Isaac, Jazmín, Carla, Nayhelli y Arturo- con quienes durante estos años compartimos largas horas, por su ánimo y enriquecedoras charlas.

Especial agradecimiento para Dafne, Jericó, Cinthya, Carlos L. y Daniela, Carlos C. y Rosalía, Gerardo y Jeany, Susana y Max, por toda su ayuda, presencia y sobre todo por compartir todos esos momentos de alegría y tensión, por aceptar conformar mi segunda familia y compartir su crecimiento con tres nuevos sobrinos.

A mis amigos Mónica y Mauro, Beatriz, Carmen, Virginia J. y Marcos, Arcadio y Francisco, por su compañía todos estos años y compartir esta nueva meta, gracias por el apoyo incondicional aún en la distancia.

Índice

	Pág.
CONTENIDO	
Declaración de propiedad	i
Reconocimientos	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vii
Índice	ix
Lista de cuadros	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de abreviaturas	xv
Resumen	xvii
Abstract	xix
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	5
1.1. SISTEMA DE ESTUDIO	5
El complejo <i>Pinus caribaea</i> Morelet	5
Características morfológicas generales de <i>Pinus caribaea</i>	6
Biología de la especie	8
Distribución geográfica	10
Importancia económica	10
1.2. VARIACIÓN GENÉTICA	11
1.3. ESTRUCTURA GENÉTICA	12
Flujo genético	14
1.4. MARCADORES MOLECULARES	15
Marcadores genéticos en especies forestales	17
Estudios de variación y estructura genética en <i>Pinus caribaea</i>	18
1.5. JUSTIFICACIÓN	20
1.6. HIPÓTESIS	21
1.7. OBJETIVOS	21
Capítulo 2. Materiales y Métodos	23
2.1. ÁREA DE ESTUDIO Y COLECTA DE MATERIAL	23
2.2. EXTRACCIÓN DE ADN	25
2.3. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	25
2.4. ANÁLISIS DE DATOS	27
Variación genética	27
Estructura genética	28
Flujo genético y aislamiento por distancia	29
Relaciones genéticas	29

Capítulo 3. Resultados	31
3.1. VARIACIÓN GENÉTICA	32
3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA	34
3.3. FLUJO GENÉTICO Y AISLAMIENTO POR DISTANCIA	37
3.4. RELACIONES GENÉTICAS	39
Capítulo 4. Discusión	41
4.1. DIVERSIDAD GENÉTICA	41
4.2. PATRONES DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	46
4.3. FLUJO GENÉTICO Y AISLAMIENTO POR DISTANCA	48
4.4. RELACIONES GENÉTICAS Y RUTAS DE DISPERSIÓN	49
4.5. RECOMENDACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	53
Capítulo 5. Conclusiones	57
5.1. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO.....	57
REFERENCIAS	59
ANEXO	69

Lista de Cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Microsatélites caracterizados en el género <i>Pinus</i> L.	17
Cuadro 2. Estudios de variabilidad y estructura genética con isoenzimas para el complejo de <i>Pinus caribaea</i>	19
Cuadro 3. Poblaciones estudiadas del complejo de <i>Pinus caribaea</i>	24
Cuadro 4. Características de los siete loci de microsatélites nucleares amplificados en <i>Pinus caribaea</i>	26
Cuadro 5. Condiciones para la secuenciación de los diferentes loci amplificados en el complejo de <i>Pinus caribaea</i>	27
Cuadro 6. Variación genética obtenido con seis loci de microsatélites nucleares para las poblaciones del complejo de <i>Pinus caribaea</i>	33
Cuadro 7. Estructura genética de acuerdo a tres modelos de análisis para el complejo de <i>Pinus caribaea</i> Morelet	34
Cuadro 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para el complejo de <i>Pinus caribaea</i>	35
Cuadro 9. Análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) para el complejo de <i>Pinus caribaea</i>	37
Cuadro 10. Flujo genético entre pares de poblaciones del complejo de <i>Pinus caribaea</i>	38
Cuadro 11. Variación y estructura genética en diferentes especies de <i>Pinus</i> basada en loci de microsatélites nucleares	44

Lista de Cuadros

4	Cuadro 1. Variables características en el género Pinus
17	Cuadro 2. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
19	Cuadro 3. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
20	Cuadro 4. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
21	Cuadro 5. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
22	Cuadro 6. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
23	Cuadro 7. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
24	Cuadro 8. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
25	Cuadro 9. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
26	Cuadro 10. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
27	Cuadro 11. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
28	Cuadro 12. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
29	Cuadro 13. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
30	Cuadro 14. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
31	Cuadro 15. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
32	Cuadro 16. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
33	Cuadro 17. Características de las especies de Pinus en el género Pinus
34	Cuadro 18. Características de las especies de Pinus en el género Pinus

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Características anatómicas y morfológicas distintivas de las variedades del complejo de <i>Pinus caribaea</i>	7
Figura 2. Caracteres morfológicos de <i>Pinus caribaea</i>	9
Figura 3. Distribución natural del complejo <i>Pinus caribaea</i>	11
Figura 4. Distribución de las poblaciones estudiadas del complejo del <i>Pinus caribaea</i> en la cuenca del Caribe	23
Figura 5. Tamaños de alelos por locus obtenidos en geles de poliacrilamida 5% con seis microsatélites nucleares en poblaciones de <i>Pinus caribaea</i>	31
Figura 6. Análisis bayesiano de varianza molecular para el complejo de <i>Pinus caribaea</i>	36
Figura 7. Correlación entre distancia geográfica y flujo genético del complejo de <i>Pinus caribaea</i>	39
Figura 8. Filograma mostrando las relaciones genéticas entre poblaciones del complejo de <i>Pinus caribaea</i>	40

Lista de Figuras

112	Figura 1. Almacén de productos y mercancías distribuidas de las actividades del complejo de Pinar del Río.
9	Figura 2. Construcción tecnológica de Pinar del Río.
14	Figura 3. Distribución interna del complejo Pinar del Río.
31	Figura 4. Distribución de las subzonas establecidas del complejo de Pinar del Río en la zona de Caba.
31	Figura 5. Mapa de la zona por zonas establecidas en Pinar del Río, con sus respectivos límites y coordenadas de Pinar del Río.
38	Figura 6. Vista aérea de varias manzanas de Pinar del Río.
39	Figura 7. Comparación entre técnicas geográficas y sus límites del complejo de Pinar del Río.
40	Figura 8. Fotografía aérea de las zonas geográficas de Pinar del Río.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
TBE	Buffer: Tris/Borate/EDTA.
F _{IS}	Diferenciación genética dentro de poblaciones.
R _{ST}	Diferenciación genética entre poblaciones asumiendo el modelo de mutación de un paso.
G _{ST}	Diferenciación genética entre poblaciones respecto a varios loci.
F _{ST}	Diferenciación genética entre poblaciones asumiendo el modelo de mutación de alelos infinitos.
F _{IT}	Diferenciación genética total.
H	Diversidad genética promedio.
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato.
N _m	Flujo genético.
H _e	Heterocigosidad esperada.
H _o	Heterocigosidad observada.
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
µl	Microlitro (10 ⁻⁶ L).
µM	Micromolar (10 ⁻⁶ M).
mM	Millimolar (10 ⁻³ M).
MA	Millones de años.
IAM	Modelo de mutación de alelos infinitos.
SMM	Modelo de mutación de un paso.
ng	Nanogramos (10 ⁻⁶ g).
A _e	Número efectivo de alelos.
A	Número promedio de alelos.
n	Número total de alelos.
pb	Pares de bases.
RAPD	Polimorfismo de ADN amplificado al azar. Técnica que amplifica tramos anónimos de ADN empleando la PCR con cebadores arbitrarios.
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. Técnica basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción por PCR, después de la digestión del ADN.
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. La variación entre los individuos se detecta por las diferencias en los tamaños de los fragmentos de ADN después de la digestión con un enzima de restricción.
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido. Polimorfismos que resultan de la sustitución de una sola base entre secuencias homólogas.
pH	Potencial de hidrógeno.

P	Proporción de loci polimórficos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa. Método para amplificar una secuencia de ADN en grandes cantidades mediante una polimerasa estable al calor y con cebadores apropiados, los cuales dirigen la amplificación de la región del ADN que interesa.
SCAR	Región amplificada caracterizada por una secuencia. Es un locus identificado a partir de un solo fragmento de RAPD que ha sido secuenciado. Se pueden diseñar cebadores específicos para el locus y usarse para la amplificación específica del fragmento mediante PCR.
SSR	Repeticiones de secuencia simple o microsatélite. Técnica basada en la amplificación selectiva de secuencias simples repetidas de ADN, formadas de una a seis pares de bases por medio de PCR.
ISSR	Secuencia entre repeticiones simples. La técnica se basa en la amplificación, mediante la PCR, de secuencias ubicadas entre microsatélites.
N_e	Tamaño efectivo de la población.
P_i	Tasa de polimorfismo.
T_m	Temperatura de fusión: Punto medio del intervalo de temperaturas al cual el ADN se desnaturaliza.
Taq DNA polimerasa	Enzima que la bacteria <i>Thermus aquaticus</i> emplea para la replicación del ADN.

Resumen

Seis marcadores microsatélite nucleares polimórficos, fueron usados para determinar los niveles de diversidad y estructura genética en 16 poblaciones naturales del complejo *Pinus caribaea* Morelet a lo largo de su área de distribución natural en México y Centroamérica (var. *hondurensis*), Cuba (var. *caribaea*) y las Islas Bahamas (var. *bahamensis*). Los resultados indican que *Pinus caribaea* muestra niveles de diversidad genética ($n=36$ alelos totales, $A=3.4$, $A_e=3.5$, $H_o=0.49$, $H_e=0.63$) promedios o menores que el promedio con relación a otras especies de pinos. La mayor parte de las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y un bajo grado de endogamia fue encontrado en las variedades ($F_{IS}=0.100$). Se identificó a las variedades como la principal agrupación de diferenciación genética ($R_{ST}=0.091$) dentro del complejo. Un análisis Bayesiano de estructura genética poblacional (BAPS) y un análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA), determinaron una diferenciación genética entre variedades, la cual parece estar asociada a su distribución geográfica. Aunque no se encontró un patrón de aislamiento por distancia significativo, se observó un flujo genético relativamente alto entre poblaciones de *P. caribaea* ($Nm=2.5$) y un valor promedio mayor para la variedad *hondurensis* ($Nm=7$). Los tamaños efectivos de las poblaciones se han mantenido elevados a través del tiempo ($N_e=818$ individuos) lo que ha evitado la erosión de la diversidad genética por deriva, pero las variedades han sido suficientemente aisladas como para diferenciarse. Estos resultados corroboran la hipótesis de Dvorak *et al.* (2005) quienes postulan como posible origen de *Pinus caribaea* a Centroamérica, ya que las poblaciones que contienen la mayor variación genética se ubican en Honduras y Nicaragua. Proponemos que la dispersión de *Pinus caribaea* ocurrió aproximadamente hace 8-12 MA desde la Península de Yucatán hacia las islas del Caribe (Cuba y Bahamas).

Abstract

Six nuclear polymorphic microsatellite markers were used to determine diversity levels and genetic structure in 16 natural populations of the *Pinus caribaea* Morelet complex distributed throughout its natural range in México and Central America (*P. caribaea* var. *hondurensis*), Cuba (*P. caribaea* var. *caribaea*) and the Bahamas (*P. caribaea* var. *bahamensis*). Results indicate that *Pinus caribaea* has intermediate to lower levels of genetic diversity ($n=36$ total alleles, $A=3.4$, $A_e=3.5$, $H_o=0.49$, $H_e=0.63$) compared to other pine species. Most of the populations are in Hardy-Weinberg equilibrium with low levels of inbreeding within varieties ($F_{IS}=0.100$). Varieties were identified as the main grouping for genetic differentiation ($R_{ST}=0.091$) in the species complex. A Bayesian analysis of the genetic structure at population level (BAPS) and an analysis of Spatial Molecular Variance (SAMOVA), revealed a genetic differentiation among varieties, which seems to be associated with the geographical distribution. Although a significant pattern of isolation by distance was not found, we observed a relatively high gene flow among populations of *P. caribaea* ($N_m=2.5$), with highest values for *P. caribaea* var. *hondurensis* ($N_m=7$). Effective population sizes ($N_e=818$) have been maintained long enough to avoid erosion of genetic diversity due to the effect of genetic drift; however varieties have been sufficiently isolated to become differentiated. These results support Dvorak *et al.*'s hypothesis (2005) suggesting Central America as the possible place of origin of *Pinus caribaea*, since populations with the highest genetic diversity are currently found in Honduras and Nicaragua. We propose that the dispersal of *Pinus caribaea* occurred approximately 8-12 MYA from the Yucatan Peninsula to the islands of the Caribbean (Cuba and Bahamas).

Introducción

La conservación de la diversidad biológica forestal es fundamental para sostener los valores productivos de los bosques, para preservar el estado sanitario y la vitalidad de los ecosistemas forestales, y de este modo, mantener sus funciones protectoras y ambientales (Palmberg-Lerche, 2001). El adecuado manejo de las poblaciones naturales de árboles se muestra como una alternativa para dotar de bienes y servicios a la sociedad. Dicho manejo depende tanto del conocimiento preciso de la biología de las poblaciones, para basar ahí las decisiones silvícolas que garanticen un aprovechamiento forestal sostenible (Arteaga y Pérez, 2001), así como de la correcta valoración de los niveles y estructura de la variación genética. En particular, el conocimiento de la distribución espacial y temporal de la estructura genética de las poblaciones en una especie, ofrece una perspectiva histórica de los cambios evolutivos que caracterizan a una especie y nos permite predecir cómo las poblaciones responderán a futuros eventos de origen natural o artificial (Wallace, 2002).

Dentro de los recursos genéticos forestales, las coníferas son de gran importancia ya que constituyen un amplio grupo formado por ocho familias, 70 géneros y 630 especies alrededor del mundo (Farjon, 2005), y además poseen gran utilidad en la industria maderera, medicinal, artesanal y de otros derivados. El género *Pinus* L. es uno de los grupos más amplios y diversos dentro de las coníferas con poco más de 100 especies reconocidas (Gernandt *et al.*, 2005; Farjon, 2005). Este género ha sido particularmente exitoso en cuanto a su adaptación a ambientes muy diversos, como resultado de esto, es posible encontrar especies de pinos creciendo naturalmente en el Hemisferio Norte o siendo introducidas en el Hemisferio Sur (Farjon, 2005). En algunas regiones las especies de pinos se encuentran conformando grandes extensiones de bosque como especie dominante y en algunas otras son codominantes generalmente con otras coníferas, o algunas veces con angiospermas. La diversidad genética que poseen las especies que conforman al género *Pinus*, le ha permitido sobrevivir desde tiempos remotos manteniéndose hasta la actualidad (Farjon, 2005).

Dentro del género *Pinus* se encuentra el complejo de *Pinus caribaea* Morelet, el cual está conformado por tres variedades: *P. caribaea* var. *caribaea* Morelet, *P. caribaea* var. *bahamensis* (Griseb.) W.H.G. Barrett & Golfari y *P. caribaea* var. *hondurensis* (Sénécl.) W. H. G. Barrett & Golfari. La especie tiene un origen tropical y se distribuye en una extensa área geográfica tanto en islas del Caribe, como en México y Centroamérica (Vidakovic, 1991), y es la especie de pino en América con la distribución más sureña. Este taxón es reconocido por su amplia

adaptabilidad, crece desde el nivel del mar hasta cerca de los 1000 m (Poynton, 1977), en tierras bajas susceptibles de inundaciones temporales o en suelos arcillo-arenosos extremadamente pobres, donde la alta precipitación pluvial del trópico rápidamente se drena y los incendios de maleza o pastos son muy frecuentes en la temporada de sequía (Farjon, 2005), con pH ligeramente ácidos (4.5-6.5) a moderadamente alcalinos (7.5-8.5) (Francis, 1992). Aunado a lo anterior, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* posee gran importancia económica para la región de América Central, ya que durante los últimos 70 años ha sido usada extensivamente como una especie para plantaciones comerciales, tanto dentro como fuera de su área de distribución natural (Vidakovic, 1991; Zheng y Ennos, 1999). Se estima que un millón de hectáreas de esta variedad se han plantado en China, Indonesia y Australia (Hodge *et al.*, 2001).

La distribución geográfica de islas-continente que presenta *P. caribaea*, así como sus adaptaciones a zonas tropicales, hacen de este grupo de variedades un sistema de estudio de gran relevancia ecológica y evolutiva. Sin embargo, se ha estimado un 4% de pérdida anual de áreas forestales en Mesoamérica (Myers, 1989) aunque este dato actualmente pudiera ser mayor por la demanda y afectación al recurso forestal. Por lo tanto, los bosques en esta área han visto disminuida la extensión de sus aéreas naturales tanto por la afectación de huracanes o incendios, así como por el cambio de uso del suelo, plagas o enfermedades y aprovechamiento ilegal (Hernández, 1997). Aunque, *P. caribaea* esta considerada dentro de la lista roja de la UICN (2010) como una especie en bajo riesgo de extinción, *P. caribaea* var. *hondurensis* está reportada como amenazada para México por la NOM-59. La disminución en el tamaño de las poblaciones de *P. caribaea* en Mesoamérica así como la condición de poblaciones aisladas en las islas del Caribe, podría haber afectado su variabilidad genética, por lo que resulta de interés conocer el nivel y distribución de la variación genética que actualmente presenta esta especie. Por tanto, en este trabajo se obtuvo la información relacionada con los niveles de variación y distribución de la variación genética para las tres variedades, con base en el uso de marcadores microsatélites nucleares y herramientas teóricas de la genética de poblaciones. Este conocimiento permitirá, por un lado, esclarecer las relaciones genéticas entre las tres variedades y saber si representan tres linajes evolutivos independientes, y por otro lado, reconocer que tanto de la diferenciación entre variedades se debe a procesos genéticos y/o geográficos. Así mismo, esta información será de gran utilidad para el planteamiento de estrategias de manejo y conservación de los recursos genéticos de este grupo de pinos tropicales.

Este trabajo esta enmarcado dentro de un proyecto más amplio titulado "Genética de poblaciones y divergencia evolutiva del complejo *Pinus caribaea* Morelet: una aproximación molecular y biogeográfica" (Delgado *et al.*; Proyecto CONACYT 44373, 2004), el cual aportará información relevante sobre el origen y diversidad de estos linajes evolutivos, así como en la determinación de los procesos genéticos y demográficos que han influido en la dinámica evolutiva de las poblaciones naturales que lo conforman.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. SISTEMA DE ESTUDIO

El complejo *Pinus caribaea* Morelet

El género *Pinus* L. es el género más grande dentro de las coníferas –con cerca de 110 especies- y con la distribución más amplia en el Hemisferio Norte (Farjon, 2005). Éste género se divide en dos grandes grupos, el subgénero *Pinus* –también llamado Diploxilón o pinos duros, caracterizado por tener dos haces fibrovasculares en las acículas– y el subgénero *Strobis* –Haploxilón o pinos blandos con un solo haz vascular- (Little y Critchfield, 1969; Farjon, 2005). Particularmente, dentro del subgénero *Pinus* existen las secciones *Pinus* y *Trifoliae* Duhamel, en ésta última se encuentran tres subsecciones: *Contortae* Little and Critchfield, *Ponderosae* Loudon y *Australes* Loudon. *Pinus caribaea* Morelet se ubica dentro de esta última subsección (Dvorak *et al.*, 2000b; Farjon, 2005; Gernandt *et al.*, 2005).

En referencia a la taxonomía de *P. caribaea*, ésta tiene una historia un tanto complicada en lo que respecta a la circunscripción de especies, variedades y en particular, a las distribuciones geográficas de las mismas. Farjon y Styles (1997) en el tratamiento del género *Pinus* para la Flora Neotrópica, reconocen varios nombres aplicables a las poblaciones comprendidas en este estudio y es el que se sigue en este trabajo.

Farjon y Styles (1997) reconocen tres variedades para *Pinus caribaea*, las diferencias tanto anatómicas como morfológicas se presentan en la figura 1. *Pinus caribaea* var. *caribaea* es el nombre que se le asigna a aquellas poblaciones localizadas en el extremo occidental de la Isla de Cuba, en particular en la Provincia de Pinar del Río y en la Isla de la Juventud (Isla de Los Pinos), a altitudes entre 1-700 msnm, más frecuentemente por debajo de 400 msnm, en bosques abiertos, con sotobosque con arbustos y gramíneas, en suelos pedregosos, bien drenados y ácidos. El nombre de *Pinus caribaea* var. *caribaea* es el nombre que aplicaremos a nuestras poblaciones de Mil Cumbres y Viñales (Cuba).

Pinus caribaea var. *bahamensis* (Grisebach) W. H. Barret & Golfari se describió originalmente como *Pinus bahamensis* por Grisebach en 1960. Después, fue descrita como una variedad de *Pinus caribaea* por Barret & Golfari en 1962 y así aceptada por Farjon y Styles (1997); este es el nombre que se le aplica particularmente en nuestro estudio a las poblaciones de New Providence y de Andros (ambas de las Bahamas). Miembros de esta variedad crecen en suelos arenosos, formando bosques abiertos acompañados en el sotobosque por *Sabal palmetto* (Walter)

Lodd. ex Schult. & Schult. f. (Arecaceae) y arbustos, algunas veces formando bosques secundarios, a altitudes desde 1-10 msnm.

La tercera variedad es *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Sénéclauze) W. H. Barret & Golfari, descrita originalmente como *Pinus hondurensis* por Sénéclauze en 1868 y reconocida como variedad de *Pinus caribaea* en 1962 por Barret & Golfari. Esta entidad es la que presenta la distribución geográfica más amplia de la especie, desde el SE de México (Quintana Roo), Belice, Norte de Guatemala, Honduras (incluyendo la Isla de La Bahía) y Nicaragua. Las poblaciones casi en su totalidad están en el arco Atlántico de México y Mesoamérica, en bosques cercanos a manglares hasta sabanas. Crecen en suelos bien drenados, arenosos o de grava, ácidos, en bosques puros o también acompañados de miembros de *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl. y *P. tecunumanii* Eguluz y J. P. Perry o en bosques de pino-encino, con sotobosque de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Dennstaedtiaceae) o *Sabal palmetto* (Walter) Lodd. ex Schult. & Schult. (Arecaceae) cerca de la costa, a altitudes de 1-700 m. Todas las poblaciones de Mesoamérica incluidas en este estudio serán identificadas como *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

Características morfológicas generales de *Pinus caribaea*

Árboles adultos que alcanzan alturas de 20-30 m, excepcionalmente 45 m, cuyo diámetro del tronco varía de los 25 a 75 cm y hasta 1.35 m, el tronco es generalmente recto y bien formado (Figura 2a). Las ramas inferiores son grandes y horizontales mientras que las ramas superiores son ascendentes, lo cual proporciona a la copa una forma piramidal. Su corteza es delgada y de color café-rojizo, con profundas fisuras verticales y horizontales (Figura 2b) (Van Wyk, 2002).

Las acículas se presentan regularmente en fascículos de 3 (algunas veces 2, 4, ó 5), con una longitud que varía entre 15 a 25 cm, y el grosor de 1.0 a 1.6 mm, con 2 a 5 canales resiníferos internos y 2 haces vasculares. Sus márgenes están finamente aserrados y las hileras de estomas están presentes en todas las superficies (Figura 2d) (Van Wyk, 2002; Farjon y Styles, 1997).

Las semillas son pequeñas, ovoide-angosto-triangulares, color café, de 5-6 mm de largo y aproximadamente de 3-4 mm de ancho, el ala de la semilla de 20 mm de largo aproximadamente y de 5-7 mm de ancho. Aunque el ala es articulada, cubre parcialmente un lado de la semilla (Van Wyk, 2002; Farjon y Styles, 1997).

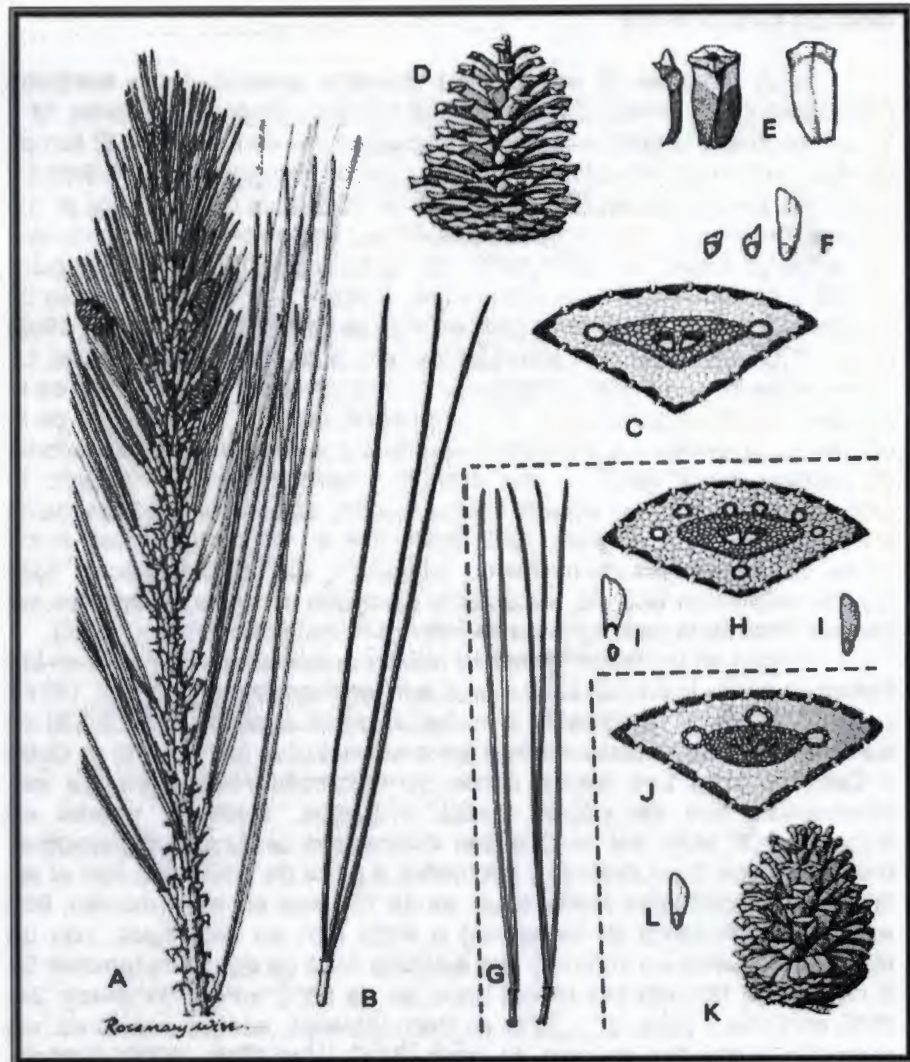


Figura 1. Características anatómicas y morfológicas distintivas de las variedades del complejo de *Pinus caribaea*. A-F, *Pinus caribaea* var. *caribaea*. G-I, *P. caribaea* var. *bahamensis*. J-L, *P. caribaea* var. *hondurensis*. A. Rama con fascículos aciculares y conos inmaduros. B, G. Fascículos aciculares. C, H, J. Sección transversal de hojas. D, K. Conos ovulíferos. E. Tres vistas de la escama del cono. F. Semillas con alas adnadas. I, L. Semillas con alas adnadas y articuladas (Farjon y Styles, 1997).

Biología de la especie

Pinus caribaea es una especie monoica, presenta tanto estróbilos masculinos como femeninos en el mismo individuo. Requiere de entre 18 a 21 meses desde la polinización hasta la maduración de los conos. El tiempo de maduración máxima ocurre en mayo o junio en Nicaragua, julio en Belice y Honduras, junio y julio en Cuba, y agosto en las Bahamas. Los conos en los árboles comienzan a liberar su semillas de dos a tres semanas después que los conos se tornan de color pardo. Se ha reportado un número de entre 52,000 a 81,000 semillas por kilo (Francis, 1992). La primera producción de semilla se presenta desde los 4 años en algunas plantaciones (Francis, 1992) hasta 10 (Okoro, 1984) o 15 años (Jardon com. pers.) en arbolado natural. La germinación de la semilla comienza en promedio 12-15 días después de la siembra y alcanza porcentajes de germinación variados dependiendo de la calidad de la semilla. La producción de plántula puede ser en contenedores de plástico, bolsa negra o raíz desnuda. También se ha reportado la propagación vegetativa mediante injertos, acodos aéreos y micropropagación por cultivo de tejidos (Francis, 1992; Stasolla et al., 2002). Las raíces de los pinos se encuentran normalmente asociadas con ectomicorrizas. Esta asociación permite al árbol aumentar la absorción de agua y nutrientes así como ofrecer cierta protección contra patógenos de la raíz (Francis, 1992).

Crecen en un rango altitudinal que va desde el nivel del mar en las Bahamas hasta los 1000-1200 msnm en Centroamérica (Poynton, 1977). Los suelos van de ligeramente a moderadamente alcalinos (pH 7.5-8.5) en las Bahamas, hasta intensamente a ligeramente ácidos (pH 4.5-6.5) en Cuba y Centroamérica. Los suelos donde se desarrolla *Pinus caribaea* var. *hondurensis* son de origen aluvial, arenosos, ácidos y pobres en nutrientes (al nivel del mar) o son suelos con textura arcillo-arenosa, profundos, con buen drenaje y originados a partir de granitos (Lugo et al., 2006) La precipitación media anual es de 750 mm en las Bahamas, 600 mm (Valle Choluteca de Honduras) a 4000 mm en Nicaragua, con un régimen de lluvias en verano y una estación seca de aproximadamente 0-6 meses. La temperatura media anual es de 25°C en las Bahamas, 24-25°C en Cuba y entre 20° y 27°C en Centroamérica, aunque incluso se han reportado promedios anuales de hasta 34°C (Van Wyk, 2002; Francis, 1992).

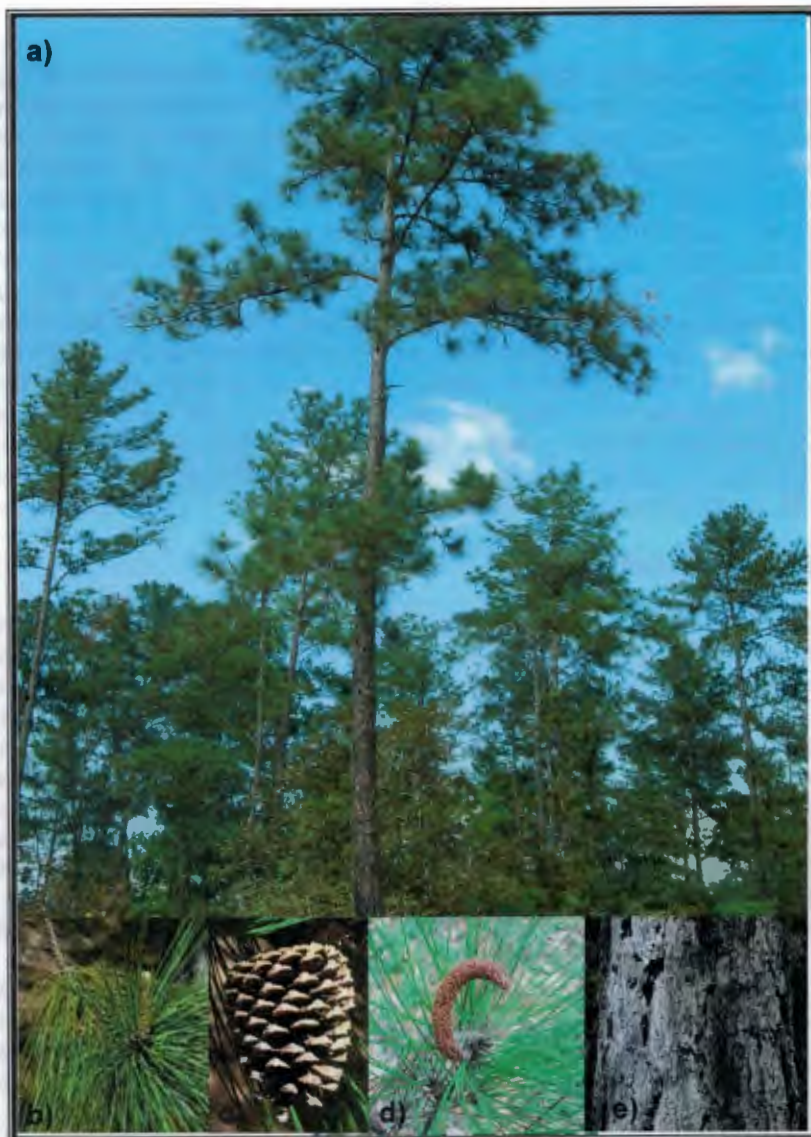


Figura 2. Caracteres morfológicos de *Pinus caribaea*. (a) árboles adultos creciendo en Belice, (b) yema y acículas, (c) cono femenino, (d) cono masculino (e) corteza. Fotos b, c y e tomadas de Gimnosperm Database (www.conifers.org/pi/pin/caribaea.htm); y foto d, tomada de www.cybertruffle.org.uk/vinales/pics/pinus_estrobilo_masculino.htm

Distribución geográfica

Pinus caribaea tiene una amplia distribución natural en la zona del Caribe (Figura 3) y las variedades que la conforman se distribuyen en áreas geográficas particulares cuyo aislamiento probablemente ha influido en la diferenciación morfológica de las mismas. *Pinus caribaea* var. *caribaea* está confinada a las montañas del oeste de la isla de Cuba y en la isla de la Juventud, esta última situada lo suficientemente distante de la isla principal como para tener una población genéticamente distinta (Birks y Barnes, 1990; Francis, 1992). *Pinus caribaea* var. *bahamensis* es nativa de algunas islas de las Bahamas y del grupo Caicos (Grand Bahama, Great Abaco, Andros, New Providence y en tres pequeñas islas del grupo Caicos) (Francis, 1992). *Pinus caribaea* var. *hondurensis* se puede encontrar en la zona que se extiende desde el sureste de la Península de Yucatán y el este de Centroamérica hasta Nicaragua (Farjon y Styles, 1997; Francis, 1992; Dvorak *et al.*, 2005). En general, todas las variedades se distribuyen entre las latitudes 12° N y 27° N, longitudinalmente entre los 75° W y 90° W.

Importancia económica

Pinus caribaea es una especie tropical muy importante, se usa como ornamental y como árbol de sombra, en parte debido a su rápido crecimiento (0.75–1.5 m por año hasta los 15-20 años) y su adaptabilidad a diversos tipos de suelo. Es particularmente eficaz para la protección de cuencas y vertientes perturbadas (Francis, 1992). La especie también se planta para restaurar sitios erosionados y agotados de nutrientes, por al menos los últimos 70 años se ha usado extensivamente en plantaciones tanto dentro como fuera de su rango natural de distribución, en áreas tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Zheng y Ennos, 1999). Los árboles de esta especie son aprovechados para la obtención de resina, oleoresina, terpentina, látex y productos medicinales; su madera se utiliza en forma de vigas, madera de contrachapado, tableros de partículas, paneles, contenedores, cajas, estacas, garrochas, para pisos, muebles, juguetes, cubiertas de barcos, tablas para exportación, paletas, espátulas, pinceles, brochas, palos de escoba, en construcción de casas, postes, leña, antorchas, carbón y sus astillas son adecuadas para lo obtención de pulpa para papel (Van Wyk, 2002).



Figura 3. Distribución natural del complejo *Pinus caribaea*. Adaptado de Francis, 1992.

1.2. VARIACIÓN GENÉTICA

La finalidad de la genética de poblaciones es el estudio de los genes en las poblaciones que conforman a las especies y es importante por su aplicación en el conocimiento de la microevolución de las especies, procesos de especiación y en el aporte de la teoría y evidencia de análisis en la reconstrucción filogenética. El reto es la descripción de los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones en términos de las fuerzas evolutivas: selección natural, deriva génica, mutación, migración y sistemas reproductivos (Eguiarte, 1990). Por un lado la mutación, la selección natural y la deriva génica son las fuerzas que favorecen la diferenciación genética de una población y por el otro, la migración tiende a igualarlas. Estas fuerzas que tienden a determinar la diferenciación genética entre poblaciones juegan un papel importante en la diversidad y

estructura genética entre y dentro de las poblaciones (Slatkin, 1980; Futuyama, 2000; Nason, 2002).

El estudio de la variación genética de una especie se puede hacer desde tres perspectivas: a nivel de individuos, a nivel de una población en particular y comparando poblaciones. La diversidad genética a nivel de individuo es definida por la frecuencia relativa de los alelos, el grado de heterocigosis o la proporción de loci que poseen alelos distintos respecto al total de loci examinados. En cuanto a poblaciones, la variación genética es definida tanto por el tipo de alelos presentes como sus frecuencias relativas y se expresa al nivel de una población dada, y entre poblaciones distintas, conforma la estructura genética de una población (Nason, 2002).

La diversidad genética entre poblaciones de una misma especie se refiere a las diferencias que muestran en su acervo genético, las poblaciones que la conforman, diferencias que obedecen a factores biológicos o geográficos detectables a lo largo del área de distribución natural de la especie, o a características ecológicas o de historia de vida, tales como mecanismos de polinización, dispersión de semillas y fecundidad (Pérez, 1990).

La diversidad genética puede cuantificarse midiendo la variación intrapoblacional desde dos puntos de vista. El primero toma en cuenta el número de variantes, esto implica conocer la tasa de polimorfismo (P_j), la proporción de loci polimórficos (P), la abundancia de variantes alélicas o número de alelos (n) y el número promedio de alelos por locus (A). El segundo, con base en la frecuencia de las variantes, conlleva a obtener el número efectivo de alelos (A_e) y la heterocigosidad esperada (H_e ; diversidad genética de Nei). La heterocigosidad esperada promedio de todos los loci (H) evaluados en una población es una estimación del grado de variabilidad genética de la población y varía de 0 a 1 (De Vincent *et al.*, 2004). La diversidad genética también se puede medir entre poblaciones calculando el aporte de una población a la variación genética total, esto a través del análisis de varianza molecular o AMOVA el cual se basa en un modelo jerárquico o anidado.

1.3 ESTRUCTURA GENÉTICA

Las poblaciones vegetales no son agregados de fenotipos arreglados aleatoriamente sino que están estructurados en espacio y tiempo. Esta estructura puede manifestarse entre poblaciones distintas geográficamente, dentro de un grupo local de plantas o aún en la progenie de individuos (Slatkin, 1994). Una población se considera estructurada si (1) hay deriva genética en algunas de sus subpoblaciones, (2) si la migración no se da uniformemente en toda la población, o (3) si el

apareamiento no ocurre al azar en toda la población. La estructura de una población afecta el grado de variación genética y los patrones de su distribución (De Vincent *et al.*, 2004).

En los años 30's, Wright se interesó en estudiar la estructura genética de las poblaciones y fué quien se percató de la tremenda diversidad de estructuras demográficas que puede tener una especie, e intentó siempre que fuera posible reducir esa complejidad en algo más simple que bastara para predecir los rasgos más importantes de la estructura genética (Slatkin, 1994). La teoría de Wright planteó así los conceptos de coeficiente de endogamia y tamaño efectivo de la población resumidos en un solo valor. El análisis de Wright acerca de las poblaciones geográficamente subdivididas tenía el mismo objetivo, mostrar que en muchos casos el efecto de una dispersión restringida puede ser descrita por un sólo valor. Más tarde, consideró el problema del aislamiento por distancia (Wright, 1943), modeló una situación en la cual la dispersión de las especies que ocupaban una gran área geográfica estaba restringida. Concluyó que lo que él había definido como tamaño del vecindario —el número de individuos en un área de la cual fueron muestreados los padres de cada individuo— era equivalente al tamaño efectivo poblacional de una sola población y era suficiente para predecir el grado de variación en las frecuencias alélicas entre las localidades. Sin embargo, los trabajos de Kimura y Weiss (1964), mostraron que el análisis de Wright (1943) era incompleto. Estos autores mostraron que para alelos neutros en un locus, la varianza en las frecuencias alélicas entre localidades depende, tanto del tamaño del vecindario como de la tasa de mutación en ese locus.

Los índices de fijación (F) desarrollados por Wright (1951), son usados para describir la estructura genética de las poblaciones, éstos determinan la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, se pueden calcular en tres diferentes niveles. El primero es F_{IS} , mide el grado de endogamia dentro de individuos relativo al resto de su subpoblación, éste refleja la probabilidad de que dos alelos dentro del mismo individuo sean idénticos por descendencia. Toma valores entre -1 y 1 indicando un exceso de heterócigos u homócigos, respectivamente. El segundo es F_{ST} , también conocido como índice de fijación, proporciona un estimado de la diferenciación genética entre subpoblaciones. Toma valores entre 0 y 1 indicando que todas las subpoblaciones son iguales o diferentes, respectivamente. Índices análogos a F_{ST} han surgido después del planteado por Wright. Uno de ellos es G_{ST} desarrollado por Nei (1973), el cual equivale a F_{ST} cuando hay solamente dos alelos en un locus y en el caso de alelos múltiples G_{ST} equivale al promedio ponderado de F_{ST} para todos los alelos (Culley *et al.*, 2002). Otro índice es θ , propuesto por Weir y Cockerham (1984), preferido por tomar en cuenta el efecto de

tamaños de muestra desiguales y el número de poblaciones muestreadas. Y el más reciente es R_{ST} , desarrollado por Slatkin (1995) específicamente para el análisis de datos obtenidos con microsatélites, éste difiere de los anteriores porque asume un modelo de mutación de un paso (SMM, Kimura y Ohta, 1978) que puede ser más realista en comparación con el modelo de alelos infinitos (IAM, Kimura y Crow, 1964) en el cual se basa F_{ST} . Finalmente el tercer índice es el F_{IT} , el cual es un coeficiente general de entrecruzamiento o endogamia, midiendo la heterocigosis de un individuo relativo al total de la población y toma valores de -1 a 1 (Freeland, 2005).

El modelo de mutación de un paso o paso a paso (SMM) que se asume en microsatélites sostiene que cuando los microsatélites mutan, ellos sólo ganan o pierden una repetición. Esto implica que los dos alelos que se diferencian por una repetición están más estrechamente relacionados (tienen un ancestro común más reciente) de los alelos que se diferencian por muchas repeticiones. En otras palabras, el tamaño de alelo importa cuando se hacen las pruebas estadísticas de subestructuración en la población. Un problema que se presenta es la homoplasia (cuando tenemos dos alelos idénticos en tamaño -mismo estado-, pero no idénticos por descendencia). En cambio, en el modelo de alelos infinitos cada mutación puede crear un nuevo alelo al azar. Un alelo de 15 repeticiones podría estar tan estrechamente relacionado con un alelo de 10 repeticiones como a uno de 11 repeticiones. Todo lo que importa es que son alelos diferentes. En otras palabras, el tamaño no es importante (Freeland, 2005; Williams et al., 2000).

Flujo genético

El flujo genético (Nm) es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta que punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo genético entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo cada población evoluciona en forma casi independiente. Cuánto flujo genético se requiere para impedir la evolución independiente en poblaciones locales diferentes, depende de que otras fuerzas se encuentren actuando. El resultado de Wright para el modelo de islas nos habla del equilibrio alcanzado entre el flujo genético y la deriva genética. Si Nm es mayor que 1, el flujo genético sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local. Si Nm es menor que 1, la deriva actúa en forma casi independiente en cada población. La selección que favorece al mismo alelo en diferentes poblaciones en general impedirá la diferenciación sin importar la cantidad de flujo genético. Estos resultados teóricos nos dicen que el flujo podría

impedir la diferenciación en algunos loci -aquellos que son neutros o que están bajo una selección débil- pero no en los loci que se encuentran bajo una selección fuerte. Además, el tiempo necesario para alcanzar los estados de equilibrio de cada locus depende tanto del grado de flujo genético como de la fuerza de la selección. Los loci fuertemente seleccionados alcanzarán sus frecuencias de equilibrio mucho más rápidamente que los loci neutros o débilmente seleccionados (Slatkin, 1994).

Hay dos métodos para estimar los niveles de flujo genético en poblaciones naturales (Slatkin y Barton, 1989). Los métodos directos son aquellos que dependen de observaciones o experimentos que miden el grado de dispersión. Por ejemplo, estudios de marcado, liberación y recaptura pueden proveer de estimaciones de la distancia promedio entre el punto de liberación y el punto de recaptura. En contraste con los métodos directos, los métodos 'indirectos' no dependen de estudios en individuos que se dispersan. En vez de ello, conducen a estimaciones del nivel promedio de flujo genético a partir de un modelo matemático de la interacción del flujo y otras fuerzas para predecir cuánto flujo genético debe haber estado ocurriendo para que los patrones observados estén presentes en los datos. El método indirecto más comúnmente utilizado para estimar el flujo genético entre pares de poblaciones se basa en el estadístico F_{ST} de Wright, el cual se calcula como $Nm=(1-F_{ST})/4(F_{ST})$ (Wright, 1969).

Los métodos indirectos para estimar los niveles y patrones de flujo genético utilizando el estadístico F_{ST} de Wright realmente proporcionan estimaciones confiables del valor promedio de Nm y pueden indicar el grado de aislamiento por distancia (Slatkin, 1994).

1.4 MARCADORES MOLECULARES

Un marcador genético puede definirse como un carácter cuantificable que puede detectar variación ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN. Una diferencia ya sea fenotípica o genotípica puede actuar como marcador genético si identifica en un individuo características del genotipo, del fenotipo o de ambos, y si además, puede hacerse seguimiento a su herencia a través de varias generaciones (De Vicente *et al.*, 2004). Los marcadores genéticos se dividen en tres tipos: 1) morfológicos, constituyen una medida directa del fenotipo, son de fácil disponibilidad, no requiere equipo sofisticado pero son ampliamente influenciados por el ambiente y su número es limitado; 2) bioquímicos (proteicos), son un complemento de los anteriores y se basan en la propiedades de migración de las proteínas que pueden separarse por

electroforesis y detectarse mediante ensayos bioquímicos específicos, pero también presentan influencia ambiental y son de número limitado; y 3) moleculares, definido como los polimorfismos detectados en la secuencia del ADN del núcleo, mitocondria o cloroplasto, constituyen una medida objetiva de la variación, no están sujetos a la influencia del ambiente, pueden realizarse en cualquier etapa del desarrollo de la planta y son en número ilimitado porque abarcan todo el genoma (De Vicente *et al.*, 2004). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997).

Los marcadores moleculares pueden ser detectados por hibridación, dentro de los cuales tenemos a los llamados RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y a los Minisatélites o número variable de repeticiones en tándem; o pueden estar basados en la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) empleando cebadores que difieren en longitud y secuencia, lo que lleva a tener marcadores con secuencias arbitrarias dentro de los que tenemos a los RAPD's (Polimorfismo del ADN amplificado al azar), con secuencias semiarbitrarias en donde se encuentra los AFLP's y los Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR, siglas en inglés) (Yáñez, 2002; Cornide-Hernández, 2002). Recientemente han surgido marcadores como las secuencias entre repeticiones simples (ISSR), las regiones amplificadas caracterizadas por una secuencia (SCAR), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), y es posible determinar la secuencia de bases del ADN en una región genómica de interés (núcleo, cloroplasto, mitocondria o ribosoma) para diferentes individuos (Rentaría-Alcántara, 2007).

De todos los marcadores moleculares anteriores, los microsatélites están siendo ampliamente usados porque son altamente polimórficos, segregan de manera mendeliana, son codominantes, específicos y uniformemente distribuidos en el genoma, son selectivamente neutros, la técnica es reproducible y confiable, los loci son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros (Yáñez, 2002, De Vicente *et al.*, 2004; Vendramin *et al.*, 1996). Los microsatélites son secuencias simples repetidas de ADN formadas de una a seis pares de bases, se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del mismo y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Zane *et al.*, 2002; Karhu, 2001). Los SSR's fueron los primeros usados para obtener mapas genéticos y ahora son regularmente usados en estudios poblacionales y ecológicos, ya que son excelentes para estudiar flujo genético, tamaño efectivo de poblaciones, dispersión y migración, parentesco y relaciones, así como niveles de endogamia (Karhu, 2001).

Marcadores genéticos en especies forestales

Las isoenzimas fueron de los primeros marcadores más ampliamente usados en estudios de variación genética de especies forestales (Furnier, 2004), ahora los microsatélites son de los marcadores más empleados en este tipo de estudios. Los primeros microsatélites desarrollados en árboles forestales fueron con *Pinus radiata* D. Don (Smith y Devey, 1994), desde entonces se han desarrollado para genomas nucleares de diversas especies de pinos (Butcher *et al.*, 1999) (ver Cuadro 1). Los microsatélites nucleares son ideales para el estudio tanto de sistemas de apareamiento y análisis de paternidad, como también para el mapeo genético, mejoramiento vegetal, identificación de variedades e incluso individuos y para la conservación de especies. En los últimos diez años, pocos han sido los estudios que se han realizado con microsatélites nucleares en especies de pinos, estos son: Rajora *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000; Mariette *et al.*, 2001(a) (b); Shepherd *et al.*, 2002; Al-Rabah'Ah, 2003; Boys *et al.*, 2005; Kumar y Richardson, 2005; Karhu *et al.*, 2006; Furlan *et al.*, 2007 y Dvorak *et al.*, 2009. El principal objetivo de dichos estudios ha sido evaluar inicialmente la transferencia de microsatélites entre especies de pinos por lo menos dentro del mismo subgénero (*Strobis* o *Pinus*) ya que desarrollarlos específicamente para cada especie es costoso y laborioso, una vez identificados aquellos que son polimórficos para cada especie, entonces se han aplicado para evaluar el nivel de variación y estructura genética en especies tanto de amplia como de restringida distribución natural, así como inferir la historia evolutiva de las mismas.

Microsatélites procedentes del genoma de cloroplasto se han aislado también en varias especies de *Pinus* (Powell *et al.*, 1995; Cato y Richardson 1996; Vendramin *et al.*, 1996). El genoma de cloroplasto se hereda por vía paterna en la mayoría de las gimnospermas, lo que ofrece oportunidades para estudios comparativos del flujo de genes por medio del polen vs semilla y pruebas de paternidad (Kent y Richardson, 1997).

Cuadro 1: Microsatélites caracterizados en el género *Pinus* L. Tomado de Butcher *et al.* (1999).

Especie	No. loci	Fuente
<i>Pinus radiata</i> D. Don	24	Smith y Devey 1994; Devey <i>et al.</i> , 1999; Echt <i>et al.</i> , 1999
<i>Pinus sylvestris</i> L.	2	Kostia <i>et al.</i> , 1995; Soranzo <i>et al.</i> , 1998
<i>Pinus strobus</i> L.	23	Echt <i>et al.</i> , 1996; 1999
<i>Pinus contorta</i> Douglas ex Loudon	5	Hicks <i>et al.</i> , 1998

La principal aplicación de los microsatélites en árboles forestales incluye estudios de diversidad genética de poblaciones naturales y mejoradas, particularmente en especies con bajos niveles de variación detectada con isoenzimas, flujo de genes, dispersión de polen o semilla y diferentes sistemas de cruzamiento. Como estos parámetros son importantes para la conservación de los recursos genéticos forestales, los microsatélites se están utilizando para vigilar los efectos genéticos de los sistemas de ordenación forestal y de la fragmentación del bosque (Butcher *et al.*, 1999). En los programas de domesticación, éstos marcadores pueden emplearse para la identificación del germoplasma y para ayudar a la construcción de mapas de ligamiento genético, con el objetivo final de lograr una selección asistida por marcadores.

Además de proporcionar datos sobre la genética de poblaciones de árboles forestales, los microsatélites han abierto posibilidades para el uso de métodos analíticos que permiten obtener deducciones más detalladas sobre la historia evolutiva de los procesos de las especies y poblaciones. La eficacia de estos métodos aumentará con el número y variabilidad de loci, haciendo posible la estimación de las tasas de dispersión entre poblaciones, la identificación de dispersores individuales y la reconstrucción de los linajes genéticos de las poblaciones naturales (Waser y Strobeck, 1998).

Sin embargo, los microsatélites presentan ciertas limitaciones o problemáticas, uno es la reducción o completa pérdida de amplificación de algunos alelos debido a la sustitución de bases (inserciones y/o deleciones) dentro del sitio del iniciador. Otra limitación es aquella asociada al proceso de amplificación en sí, la Taq polimerasa puede generar ciertos deslices durante la PCR añadiendo nucleótidos al producto de PCR que algunas veces pueden crear problemas de lectura. Otra situación a considerar es la homoplasia, ya que es posible que dos fragmentos amplificados del mismo tamaño no deriven de la misma secuencia ancestral (Karhu, 2001).

Estudios de variación y estructura genética en *Pinus caribaea*

En *Pinus caribaea* solo se han realizado unos pocos estudios para conocer la variación y estructura genética en poblaciones naturales, o en poblaciones con algún grado de manejo o en plantaciones mejoradas (Matheson *et al.*, 1989; Zheng y Ennos, 1999; Dvorak *et al.*, 2005). Estos estudios han sido realizados usando principalmente marcadores moleculares isoenzimáticos (Cuadro 2). Así por ejemplo, al evaluarse algunas poblaciones de *Pinus caribaea* var. *caribaea* y *Pinus caribaea* var. *bahamensis*, se determinó que las poblaciones naturales presentaron altos niveles de diversidad genética y baja endogamia en comparación

con las plantaciones que mostraron menos diversidad y mayor endogamia (Zheng y Ennos, 1999). Además, observaron que ambas variedades representan unidades evolutivas distintas. Las isoenzimas se usaron también para estimar las relaciones entre poblaciones de *P. caribaea* var. *hondurensis* y la variedad *bahamensis*, así como sus tasas de entrecruzamiento. Los resultados mostraron niveles de variación semejantes a otras especies de pinos y la tasa de entrecruzamiento fue ligeramente superior para la variedad *hondurensis* ($t=0.905$) en comparación con la variedad *bahamensis* ($t=0.89$), además las distancias genéticas corroboraron la diferenciación entre ambas variedades (Matheson *et al.*, 1989). Finalmente, Dvorak *et al.* (2005) plantearon el posible origen natural o artificial (plantación realizada por los Mayas) de la población de El Pinal en Guatemala. El análisis isoenzimático reveló que esta población tuvo un origen ancestral y una amplia distribución en Centroamérica, además proponen un modelo climático indicando que la población de El Pinal pudo pertenecer a una amplia zona de distribución en Mesoamérica.

Cuadro 2. Estudios de variabilidad y estructura genética con isoenzimas para el complejo de *Pinus caribaea*. Zheng y Ennos (1999)¹, Matheson *et al.* (1989)² y Dvorak *et al.* (2005)³.

Variedad	A	H _o	H _e	F _{IS}	F _{ST}
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>caribaea</i> ¹	2.1-2.3		0.25-0.297	0.107-0.173	0.020 *
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>bahamensis</i> ^{1,2}	1.9-2.5 2.1-2.4	0.21-0.23	0.22-0.26 0.25-0.26	0.014-0.218	0.078 * 0.013
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> ^{2,3}	2.2-2.3 2.3-5.6	0.23-0.24 0.20-0.25	0.27-0.29 0.21-0.25	0.011	0.011 0.023 *

A=número promedio de alelos por locus. H_o=heterocigosis observada. H_e=heterocigosis esperada. F_{IS}=coeficiente de endogamia. F_{ST}=diferenciación genética entre poblaciones. $p<0.05^*$

En otro estudio se usaron marcadores AFLP's y microsatélites para obtener los mapas genéticos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* y *P. caribaea* var. *hondurensis*, lo que permite la comparación con otras especies de pinos y futuros análisis de caracteres cuantitativos (Shepherd *et al.*, 2003).

El único estudio realizado con marcadores microsatélites nucleares se reporta para *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Furlan *et al.*, 2007), en donde se comparan tres tipos de poblaciones: una población que ha sido la base para mejoramiento genético de la especie, otra de árboles élite y la última, una población de híbridos F₁. Los autores encontraron una baja diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST}=0.0213) al igual que su diversidad genética (H_o=0.247 y H_e=0.248), así mismo pudieron

determinar 10 potenciales cruzas entre árboles élite con el fin de lograr un mayor vigor híbrido entre progenies.

1.5. JUSTIFICACION

La información sobre los niveles y patrones de variación genética es importante para la conservación y el manejo de los recursos genéticos. Se ha reconocido que la diversidad genética es la materia prima del mejoramiento genético y la evolución de las especies (Furnier, 2004; Krutovskii y Neale, 2001). Por un lado, la variación genética en las plantas ha permitido aumentar los rendimientos en los cultivos, incrementar la resistencia a plagas y enfermedades o crecer en nuevas condiciones climáticas (Eguiarte y González, 2007). En otras palabras, si no hay reservas de variación, no se pueden mejorar los organismos y la selección artificial no puede actuar. Además, la variación genética permite que accione la selección natural, sin ella las poblaciones no se pueden adaptar a las nuevas y diferentes condiciones ambientales que ocurren a lo largo del tiempo, y tampoco cambiarían ni aparecerían nuevas especies, por lo que no habría evolución (Eguiarte y González, 2007; Krutovskii y Neale, 2001). Es por esto que entre las diferentes razones por las que debemos conocer y conservar los recursos naturales (ecológicas, económicas, éticas), las razones genéticas ocupan un lugar preponderante. Desde el punto de vista genético, los genomas de las especies son reservorios de información genética sobre todo tipo de adaptaciones, procesos bioquímicos, morfologías, patrones de desarrollo, ciclos de vida y adaptaciones ecológicas complejas (Eguiarte y González, 2007). Existen porciones del genoma que no se expresan o no representan adaptaciones en el momento actual, no obstante, pueden funcionar como marcadores genéticos para reconstruir la historia evolutiva de las especies o ser la base de la adaptación del organismo a condiciones futuras, materia prima de la evolución futura de diversos linajes. En síntesis la conservación de la variación genética mantiene la posibilidad de evolución (Eguiarte y González, 2007).

La importancia que representa el estudio de la variación y la estructura genética en poblaciones naturales del género *Pinus*, para conocer y entender la historia evolutiva y la diversificación de las especies, ha sido plasmada en diversos estudios (Ledig, 1998; Delgado et al., 2002). En este caso, el complejo de *Pinus caribaea* posee las características para hacer este tipo de estudios, cuyos resultados serán de utilidad al aportar información que complemente la delimitación taxonómica de la especie y sus variedades, conocer el grado de diversidad genética de la especie, así como poder establecer el

planteamiento de estrategias de manejo y conservación de los recursos genéticos de este grupo de pinos tropicales.

1.6. HIPÓTESIS

El complejo *Pinus caribaea* representado por tres variedades, muestra una marcada diferenciación genética debido principalmente a la distribución geográfica de continente-islas presente en sus poblaciones. Esto se ve reflejado en las relaciones genéticas; donde la similitud genética es mayor entre poblaciones de la misma variedad y menor entre variedades, representando tres linajes evolutivos en proceso de especiación.

1.7. OBJETIVOS

General:

Evaluar los niveles y posibles causas de la variabilidad y estructura genética entre poblaciones naturales del complejo de *Pinus caribaea* Morelet (*P. caribaea* var. *caribaea*, *P. caribaea* var. *bahamensis* y *P. caribaea* var. *hondurensis*) con el uso de marcadores moleculares microsatélite nucleares.

Particulares:

- a) Estimar la variación y estructura genética del complejo de *Pinus caribaea* a través de su área de distribución natural.
- b) Evaluar los niveles de flujo genético y los tamaños efectivos de las poblaciones.
- c) Analizar las relaciones genéticas de las poblaciones en estudio y proponer las posibles rutas de migración de genes.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. ÁREA DE ESTUDIO Y COLECTA DE MATERIAL

La zona de estudio incluye las áreas de distribución natural representativas del complejo *Pinus caribaea* Morelet (*Pinus caribaea* var. *caribaea*, *Pinus caribaea* var. *bahamensis* y *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) las cuales se localizan en la isla de Cuba, Islas Bahamas, México, Belice, Guatemala, Honduras y Nicaragua. El número de poblaciones por variedad incluidas en este estudio, se seleccionó de acuerdo al tamaño del área de distribución natural que ocupa cada variedad, tomando en cuenta que los sitios de colecta estuvieran poco perturbados y no presentaran indicios de ser plantaciones (Figura 4).

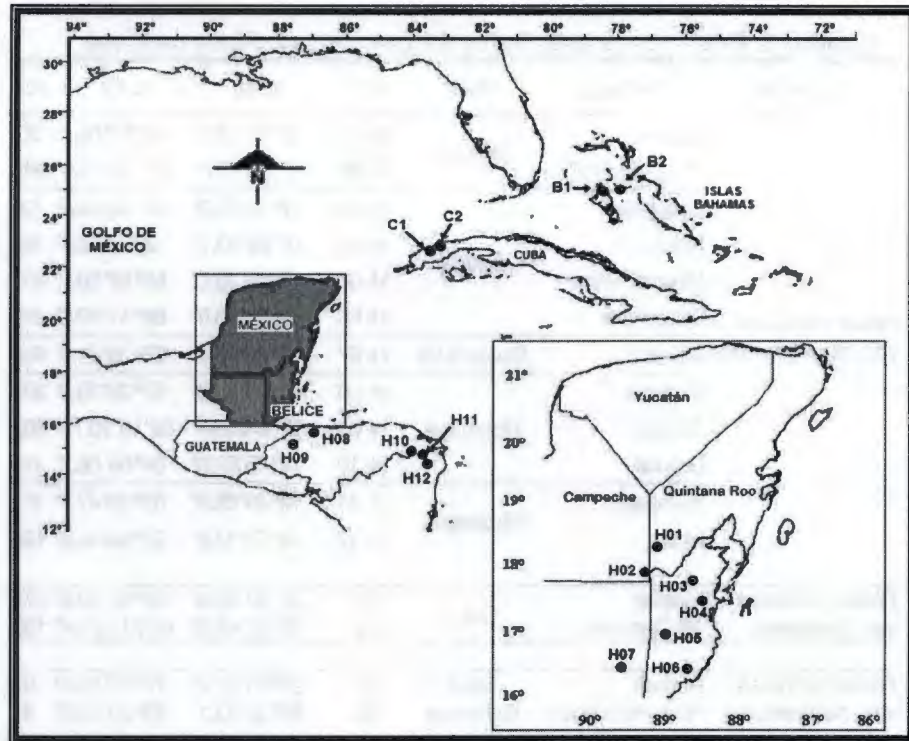


Figura 4. Distribución de las poblaciones estudiadas del complejo de *Pinus caribaea* en la cuenca del Caribe. H-01 a H-12, poblaciones correspondientes a *P. caribaea* var. *hondurensis*, C1 y C2 poblaciones de la variedad *caribaea*; B1 y B2 corresponden a la variedad *bahamensis*.

En cada población se eligieron aleatoriamente entre 13 y 30 árboles, esto de acuerdo al tamaño y características particulares de cada población, cuidando también que la separación entre los árboles muestreados fuera de más de 100 m para evitar el efecto de coancestría, aunque en las poblaciones insulares el tamaño poblacional fue el factor determinante del tamaño de muestra. En cada sitio de colecta se obtuvieron los datos geográficos: latitud, longitud y altitud (Cuadro 3), así mismo se observó la presencia de las principales especies vegetales asociadas al pino.

El material foliar (acículas) colectado se identificó por árbol y población, se mantuvo bajo condiciones de frío (10-15°C) durante el traslado hasta su almacenamiento final en un ultracongelador a -80°C para su posterior procesamiento en laboratorio.

Cuadro 3. Poblaciones estudiadas del complejo de *Pinus caribaea*.

Variedad	Población	País	C. I.	L. N.	L. O.	Alt.
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	Caobas	México	H-01	18° 14' 77.5"	88° 57' 60.4"	35
	Pioneros del Río		H-02	17° 53' 05.0"	89° 10' 44.0"	68
	Carmelitas		H-03	17° 48' 12.2"	88° 32' 55.0"	13
	Rock	Belice	H-04	17° 24' 43.1"	88° 26' 2.4"	16
	Mountain Pine		H-05	16° 59' 35.0"	88° 57' 50.1"	501
	Deep River		H-06	16° 29' 16.0"	88° 41' 08.3"	31
	Dolores	Guatemala	H-07	16° 29' 07.7"	89° 25' 34.9"	438
	Mezapa		H-08	15° 34' 18.6"	87° 36' 38.2"	306
	Trinidad	Honduras	H-09	15° 5' 54.37"	88° 15' 10.74"	200
	Leimus		H-10	14° 45' 57.0"	84° 08' 08.7"	90
	Waspam	Nicaragua	H-11	14° 43' 09.8"	83° 58' 47.1"	87
	Moss		H-12	14° 27' 13.8"	83° 54' 14.4"	128
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>caribaea</i>	Viales	Cuba	C1	22° 32' 48.4"	83° 42' 29.5"	239
	Mill Cumbres		C2	22° 47' 45.9"	83° 21' 57.44"	185
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>bahamensis</i>	Andros	Islas	B1	25° 00' 31.2"	77° 30' 06.9"	9
	New Providence	Bahamas	B2	24° 55' 13.1"	78° 00' 49.8"	4

C. I.=Clave de identificación, L. N.=Latitud norte, L. O.=Longitud oeste, Alt.=Altitud (msnm)

2.2. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN genómico se extrajo de acículas conforme al método Miniprep CTAB 2X modificado por Vázquez-Lobo (1996). La calidad del ADN proveniente de cada árbol se verificó en geles de agarosa al 2%. La electroforesis se realizó en un equipo Wide mini-sub Cell GT, BioRad, a 120V durante 15 minutos. En aquellas muestras donde se detectó RNA se agregó 1 μ l ribonucleasa (10 mg/ml) para eliminarlo.

El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Beckman Couiter DU 650 Spectrophotometer) diluyendo 2 μ l de muestra de ADN en 1 ml de agua destilada estéril y obteniendo la lectura de absorbancia a 260 nm. La concentración de ADN se calculó aplicando la fórmula (1). Posteriormente se realizaron las diluciones pertinentes para obtener una concentración de 50 ng/ μ l en cada muestra con la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$.

$$[\text{ADN}] \text{ (ng}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 500 \text{ (factor dilución)} \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)} \quad (1)$$

2.3. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES

El estudio comprendió la amplificación de siete microsatélites nucleares derivados de *Pinus taeda*: PtTX2037, PtTX2123, PtTX2146, PtTX3013, PtTX3020, PtTX3025 y PtTX3029 (Elsik *et al.*, 2000). Estos microsatélites fueron reportados como polimórficos y reproducibles para *P. caribaea* var. *hondurensis* (Delgado, en realización; Furlan *et al.*, 2007; Shepherd *et al.*, 2002). Las características de estos iniciadores se describen en el Cuadro 4.

La amplificación de los microsatélites se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones de reacción y de amplificación fueron realizadas de acuerdo a Elsik *et al.* (2000) y Furlan *et al.* (2007). La mezcla de reacción para cada individuo consistió de buffer de PCR 1X (200 mM Tris-HCL con pH 8.4; 500 mM KCl, Invitrogen), 0.2 mM de dNTP's (Invitrogen); 0.22 μ M de iniciador sentido y antisentido (Invitrogen); de 2 a 4 μ M de cloruro de magnesio (Invitrogen); 0.2 μ l Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l, Invitrogen) y 50-100 ng ADN genómico, todo llevado a un volumen final de 23 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (GeneAmp PCR System, Applied Biosystem) usando el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, después dos ciclos conformados: 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C durante 35 segundos; 20 ciclos que comprenden: desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, 45 segundos a temperatura de alineamiento disminuyendo 0.5°C cada ciclo, extensión a 72°C por 1 minuto; después 20 ciclos más comprendiendo: desnaturalización 1 minuto a 94°C, 1 minuto a la temperatura final de alineamiento y una extensión por 1 minuto a 72°C; la extensión final fue a

72°C durante 5 minutos y finalmente disminución de la temperatura a 4°C. La temperatura inicial de alineamiento (T_m) fue específica para cada iniciador (Cuadro 4). La amplificación de los fragmentos específicos para cada iniciador se verificó al visualizar los productos de PCR en geles de agarosa (2%) teñidos en un baño de bromuro de etidio (50 µg/ml), previa separación de fragmentos mediante electroforesis utilizando una cámara horizontal (Wide mini-sub Cell GT, BioRad).

Cuadro 4. Características de los siete loci de microsatélites nucleares amplificados en *Pinus caribaea*.

Iniciador	Motivo de repetición	Secuencia (5'-3')	T_m	R. T.	N. A.
PiTX2037	(GTGA) ₈ (GT) ₁₄	F: GCCTTTAGATGAATGAACCGA R: TAAGCGGGATATTATAGAGTTT	63	197-261	13
PiTX2123	(AGC) ₈	F: GAAGAACCCACAAACACAAG R: GGGCAAGAATTC AATGATAA	57	195-207	5
PiTX2146	(GAG) ₈ ...(CAG) ₈ CGGCAG) ₈ CGG (CAG) ₈	F: CCTGGGGATTGGATTGGGTATTG R: ATATTTTCCTTGGCCCTTCCAGACA	57	162-192	9
PiTX3013	(GTT) ₁₀	F: GCTTCTCCATTA ACTAATTCTA R: TCAAAATTGTT CGTAAACCTC	63	116-137	4
PiTX3020	(CAA) ₉	F: GTCGGGGAAGTGAAAGTA R: CTAGGTGCAAGAAAAGAGTAT	65	194-215	6
PiTX3025	(CAA) ₁₀	F: CACGCTGTATAATAACAATCTA R: TTCTATATTCGCTTTTAGTTTC	59	250-280	10
PiTX3029	(GCT) ₈ ...(GCT) ₈ *(GCT) ₈	F: CTTGTTGCTGCTTCTGC R: AACAAAATAATATAAATGCTCTGC	63	255	3

T_m =Temperatura de alineamiento (°C), R. T.=Rango del tamaño de alelos (pb), N. A.=Número de alelos por locus (Elsik *et al.*, 2000; Furlan *et al.*, 2007*)

Las muestras amplificadas de cada población se prepararon añadiendo a cada una 5 µl de buffer de carga (formamida, conteniendo 0.45% de azul de bromofenol y 0.25% de xileno-cianol), posteriormente se desnaturalizaron a 94°C durante 5 minutos. 5 µl de cada una de éstas se cargaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 5% (acrilamida/bis-acrilamida 40%) con urea (7M) y TBE (0.5%). La electroforesis se realizó en un equipo Thermo EC160 DNA Sequencing System, a 50-60W de poder constante durante 1.5 a 3.5 hrs, dependiendo del microsatélite empleado (Cuadro 5). Los geles se revelaron por el método de tinción de Nitrato de plata propuesto por Echt *et al.* (1996), y la determinación del tamaño de los fragmentos se realizó visualmente, utilizando como referencia un marcador de 10 pb.

Cuadro 5. Condiciones para la secuenciación de los diferentes loci amplificados en el complejo de *Pinus caribaea*.

Iniciador	Condiciones	Tiempo
PtTX2037	50 watts	2:00 hrs.
PtTX2123	54 watts	2:00 hrs.
PtTX2146	54 watts	2:00 hrs.
PtTX3013	54 watts	1:40 hrs.
PtTX3020	60 watts	2:30 hrs.
PtTX3025	54 watts	3:00 hrs.
PtTX3029	50 watts	2:00 hrs.

2.4. ANÁLISIS DE DATOS

Los diferentes tamaños de alelos obtenidos con todos los microsatélites se arreglaron en una base de datos. De los siete microsatélites amplificados, dos loci han sido reportados con presencia de alelos nulos, el PtTX2037 y PtTX3020 (Williams *et al.*, 2000) y también el PtTX2037 pero por Shepherd *et al.* (2002). Sin embargo, el pequeño tamaño de muestra que emplearon en estos dos estudios (de 5 a 14 individuos por población y diez megagametofitos haploides, respectivamente) podría representar un sesgo en el resultado. Tomando en cuenta este dato, se estimó la frecuencia de alelos nulos para cada locus (Brookfield, 1996) por medio del programa Micro-Checker v. 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Este programa usa un método de simulación de Monte Carlo (bootstrap) para generar la frecuencia de homocigos y la frecuencia de las diferencias en el tamaño de alelos heterocigos, asume que la población esta en equilibrio Hardy-Weinberg y es capaz de discriminar entre desviaciones a causa de alelos nulos, deslices en la alineación o dominancia de alelos cortos.

Variación genética

La variación genética se estimó con base en las frecuencias alélicas y tomando en cuenta el modelo de mutación de un paso (SMM; Kimura y Ohta, 1978). Los índices de variación considerando tres niveles (poblaciones, variedades y especie) fueron los siguientes: número total de alelos por población (n), número promedio de alelos por locus (A) y número efectivo de alelos (A_e), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) así como el índice de diversidad genética promedio o de Nei (H) (Nei, 1973). Las frecuencias de alelos por población e índices de variación genética (A , n , H_o , H_e , y H) así como el índice de endogamia (F_{IS}) de cada población se

realizaron en el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005). En este mismo programa se realizó la prueba exacta por locus para determinar si las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (Guo y Thompson, 1992) con los parámetros: 100,000 pasos en la cadena de Markov y 5000 pasos previos al inicio. El número efectivo de alelos se obtuvo mediante la fórmula: $N_e = 1 / \sum p_i^2$ (De Vincent *et al.*, 2004).

El tamaño efectivo (N_e) para la especie se obtuvo indirectamente con el uso del valor promedio del flujo genético Nm mediante la fórmula: $N_e = 2 \times 3.1416 \times Nm$ (Slatkin y Barton, 1989). Se estimó también de manera indirecta para cada población de acuerdo a la fórmula: $\theta = 1 / (1 - H_e)^2 - 1$ modificada para microsatélites con el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005).

Estructura genética

Se realizaron tres aproximaciones para determinar la estructura genética presente en las poblaciones de *Pinus caribaea*, de acuerdo con información *a priori* de posibles grupos (variedades) o sin ningún previo planteamiento de alguna agrupación:

Primera aproximación: la estructura genética entre poblaciones se calculó con el modelo SMM (R_{ST}) (Slatkin, 1995) probando tres agrupamientos: 1) total de poblaciones de las tres variedades como un grupo, 2) poblaciones agrupadas de acuerdo a las variedades y 3) grupos de poblaciones en *P. caribaea* var. *hondurensis* de acuerdo a su distribución geográfica (norte, centro, sur).

Segunda aproximación: se realizó un análisis de inferencia bayesiana de la estructura genética de acuerdo con Corander *et al.* (2003) cuya ventaja es combinar la información de varios loci en un modelo de probabilidad sencillo en vez de simplificar en un solo promedio como ocurre en el tradicional F_{ST} . Este análisis consistió en obtener un agrupamiento de individuos y otro de poblaciones (grupos de individuos), de manera que se identifiquen grupos genéticamente divergentes. En el caso del agrupamiento de individuos, se probaron de 2 a 20 grupos (K) con 30 réplicas para cada uno de ellos y seleccionando aquel K grupo con el menor valor del logaritmo natural de verosimilitud ("logml"). Para el agrupamiento de poblaciones se indicó *a priori* cada uno de los grupos (16 poblaciones). Estos análisis se realizaron mediante el programa BAPS 3 (Corander *et al.*, 2003).

Tercera aproximación: se realizó un análisis de simulación de alineamiento (Dupanloup *et al.*, 2002). Este procedimiento permite definir grupos de poblaciones que son geográficamente homogéneas y maximiza la diferenciación genética entre las mismas (Heuertz *et al.*, 2004). Este se basa en un procedimiento de alineamiento simulado, cuyo algoritmo usa una búsqueda aleatoria que no acepta solo cambios que disminuyen (o aumentan) para optimizar una función particular, sino también cambios que

lleven a soluciones sub-óptimas. Las estimaciones fueron realizadas asumiendo valores de 1 a 9 K grupos, con 10, 000 iteraciones para cualquiera de las 200 condiciones iniciales aleatorias. El mejor agrupamiento se determinó como aquel que presentó un valor de F_{CT} mayor y significativo, además de tener una explicación biológica congruente. Este análisis se realizó con el programa SAMOVA 1.0 (Análisis Espacial de la Varianza Molecular) (Dupanloup *et al.*, 2002).

Adicionalmente, se realizó un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) para estimar la varianza genética en cada uno de los modelos de estructura bajo los niveles: entre poblaciones (F_{ST}), entre individuos (F_{IS}) y dentro de individuos (F_{IT}). Este análisis se realizó en el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005).

Flujo genético y aislamiento por distancia

El flujo genético (Nm) total para la especie se estimó de manera indirecta de acuerdo al modelo finito de islas de Crow y Aoki (1984) conforme a la formula: $Nm=1-F_{ST}/4(F_{ST})\alpha$, Donde: $\alpha= [n/n-1]^2$ y n =número de poblaciones. Además, se estimó el flujo genético (Nm) entre pares de poblaciones de acuerdo a la formula: $Nm=1-F_{ST}/4(F_{ST})$ de Wright (1969) con el programa Genetix 4.03 (Belkhir *et al.*, 2004).

De manera complementaria, se realizó un análisis de aislamiento por distancia (Slatkin, 1993) basado en un modelo poblacional de islas, el cual examina la relación del flujo genético con la distancia geográfica entre pares de poblaciones. Se realizó un gráfico de correlación simple y se determinó el coeficiente de correlación en el programa Statistica (StatSoft Inc., 2005). La confiabilidad estadística se determinó con una prueba de Mantel con 10,000 permutaciones aleatorias (Sokal y Rohlf, 1995; Rousset, 1997) usando las matrices de flujo genético (Nm) y distancias geográficas entre pares de poblaciones con el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005).

Relaciones genéticas

Finalmente, para conocer la manera como están relacionadas genéticamente las poblaciones y las posibles rutas de migración, se estimaron las distancias genéticas entre pares de poblaciones de acuerdo con dos modelos; uno específico para microsatélites y uno generalmente aplicado en este tipo de estudios: 1) la distancia promedio cuadrada ($\delta\mu^2$) propuesta por Goldstein *et al.* (1995), la cual tiene incorporadas las características del modelo de mutación de un paso e independencia del tamaño de la población, y 2) la distancia genética D_a propuesta por Nei *et al.* (1983) modificada de Cavalli-Sforza (1969). A partir de esta información, se realizó un análisis de Neighbour-joining y se estimó su significancia con 1,000

permutaciones (Takezaki y Nei, 1996). Los dendrogramas se construyeron con el método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) en el programa POPTREE2 (Takezaki *et al.*, 2010).

Capítulo 3. Resultados

El análisis preliminar de datos reveló la presencia de alelos nulos en los locus PtTX2146, PxTX2037 y PtTX3029. En los dos primeros fue posible eliminar su presencia de acuerdo a las frecuencias de genotipos probables en base al método de estimación de alelos nulos de Brookfield (1996). Sin embargo, el locus PxTX3029 no se logró corregir con este procedimiento probablemente porque presentó un 40% de datos faltantes y una alta frecuencia de alelos nulos (40-90%) en nueve poblaciones, por lo tanto se excluyó del análisis. Se identificaron los tamaños de alelos por locus para cada población (Figura 5).

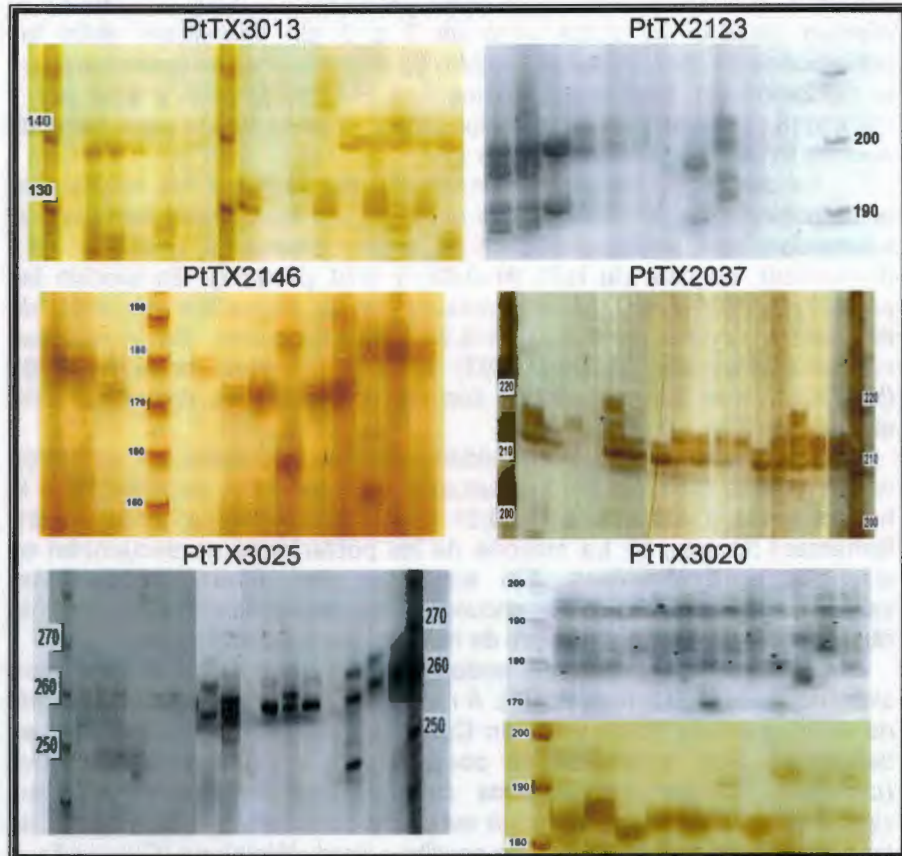


Figura 5. Tamaños de alelos por locus obtenidos en geles de poli(acrilamida (5%) con seis microsatélites nucleares en poblaciones de *Pinus caribaea*.

3.1. VARIACIÓN GENÉTICA

A nivel de especie se obtuvo un total de 36 alelos. El número de alelos por locus varió de cuatro para los loci PtTX2123 y PxTX2037 hasta nueve para el locus PxTX2146 (Anexo 1).

A nivel de población, el número total de alelos por población varió desde 14 alelos hasta 25 alelos. En las poblaciones de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* se presentó el mayor número de alelos; H07 (n=25; Guatemala), H05 (n=24; Belice) y H08 (n=24; Honduras). En contraste, las poblaciones que presentaron el menor número de alelos fueron de la misma variedad, pero se distribuyen en la zona norte (México), n=18 para H01 y n=14 para H02, siendo estas mismas poblaciones las que presentaron el menor número de alelos promedio por locus (Cuadro 6). El número efectivo de alelos varió de 2 a 3 sin diferencias entre las poblaciones de cada variedad (Cuadro 6). Alelos únicos se presentaron en la población B1 (Bahamas) en los loci PtTX3025 (247 y 263 pb) y PtTX3013 (137 pb) y en la población H05 que presentó un alelo único en el locus PtTX2146 (159 pb) (Anexo 1).

La diversidad genética promedio (H) por variedad fue muy similar entre poblaciones (Cuadro 6). Sin embargo, en la variedad *hondurensis* sobresalen tres poblaciones con la mayor diversidad genética: H12 (H=0.5688), seguida de H11 (H=0.52) y H10 (H=0.52). En cambio las poblaciones H01 y H02 (México) presentaron los promedios más bajos de diversidad genética, H=0.36 y H=0.42 respectivamente. En la variedad *caribaea* sobresale C1 (H=0.5263) y en la variedad *bahamensis* B2 (H=0.53), como las poblaciones con los promedios de diversidad más altos.

Los valores de heterocigosidad esperada promedio por población variaron entre 0.35 (en H02, México) a 0.63 (en H07, Guatemala) y la heterocigosidad observada de 0.31 (en H01, México) a 0.59 (en B1, Bahamas) (Cuadro 6). La mayoría de las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Sin embargo, para *Pinus caribaea* var. *caribaea* una población se encuentra en desequilibrio (C2; $p>0.05$) observándose un menor número de heterocigos a los esperados.

El valor del índice de endogamia por variedad fue bajo pero significativo ($F_{IS}=0.100$; $p=0.001$). A nivel de poblaciones éste índice varió de -0.20 (H04 en Belice y C1 en Cuba) a 0.27 (H06 en Belice y B2 en Bahamas). Solo para H06 se observó este valor como significativo ($p=0.008$). En general podemos suponer que no existen procesos significativos de endogamia. Este resultado corrobora que la mayoría de las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (Cuadro 6).

Cuadro 6. Variación genética obtenida con seis loci de microsatélites nucleares para las poblaciones del complejo de *Pinus caribaea*.

P	N	n	A	A _e	H	H _o	H _e	N _e	F _{IS}
H-01	24	18	3	2.1	0.3697 (0.239)	0.3757 (0.214)	0.4668 (0.206)	36 (16)	0.0306
H-02	14	14	2.5	1.8	0.4212 (0.269)	0.3095 (0.232)	0.3510 (0.243)	14 (8)	0.1014
H-03	19	19	3.2	2.8	0.5082 (0.324)	0.4410 (0.230)	0.5676 (0.138)	231 (393)	0.0546
H-04	18	21	3.5	3.1	0.4778 (0.309)	0.5229 (0.166)	0.5934 (0.134)	129 (83)	-0.2060
H-05	30	24	4	3	0.4744 (0.304)	0.5656 (0.106)	0.5812 (0.138)	351 (457)	0.0968
H-06	22	23	3.8	3	0.5095 (0.309)	0.4908 (0.217)	0.5781 (0.225)	943 (4607)	0.2762*
H-07	20	25	4.2	3.2	0.5056 (0.309)	0.5367 (0.101)	0.6336 (0.127)	777 (3633)	-0.0332
H-08	25	24	4	3.2	0.4514 (0.280)	0.5206 (0.232)	0.6001 (0.217)	303 (447)	0.1177
H-09	16	22	3.7	2.6	0.5000 (0.308)	0.4531 (0.172)	0.5894 (0.157)	121 (152)	0.2039
H-10	21	22	3.7	2.5	0.5205 (0.306)	0.5159 (0.143)	0.5527 (0.128)	169 (210)	-0.0871
H-11	24	22	3.7	3	0.5284 (0.333)	0.5371 (0.113)	0.6212 (0.066)	373 (695)	-0.1248
H-12	21	23	3.8	2.8	0.5688 (0.354)	0.5161 (0.140)	0.6160 (0.064)	169 (210)	0.0247
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>					0.499 (0.30)	0.493 (0.10)	0.622* (0.09)	610 (141)	0.082 <i>p</i> =0.006
C1	19	20	3.3	2.8	0.5263 (0.319)	0.5226 (0.177)	0.5736 (0.112)	118 (56)	-0.2089
C2	18	19	3.2	2.5	0.4635 (0.302)	0.3843 (0.147)	0.5546* (0.158)	67 (52)	-0.1362
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>caribaea</i>					0.500 (0.31)	0.462 (0.13)	0.583* (0.10)	297 (277)	-0.177 <i>p</i> =0.996
B1	16	20	3.3	2.6	0.4980 (0.321)	0.5914 (0.132)	0.5586 (0.103)	121 (152)	0.2043
B2	13	19	3.2	2.8	0.5338 (0.342)	0.4336 (0.178)	0.5936 (0.095)	322 (1239)	0.2742
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>bahamensis</i>					0.490 (0.31)	0.530 (0.09)	0.605 (0.09)	327 (421)	0.260 <i>p</i> =0.014
Promedio general					0.494 (0.296)	0.496 (0.092)	0.632* (0.0914)	818 (167)	0.100 <i>p</i> =0.001

P=Poblaciones, N=número de individuos por población, n=número total de alelos por población, A=número de alelos promedio por locus, A_e=número efectivo de alelos, H=diversidad genética promedio, H_o=heterocigosidad observada, H_e=heterocigosidad esperada, N_e=tamaño efectivo y F_{IS}=divergencia genética dentro de poblaciones (Índice de endogamia). Desviación estándar entre paréntesis. *p*<0.05*.

Para la especie *Pinus caribaea* el tamaño efectivo (N_e) fue de 15 individuos. La variedad *hondurensis* presentó un N_e mayor con relación a las variedades *caribaea* (297 individuos) y *bahamensis* (327). A nivel de poblaciones H06 ($N_e=942$; Belice) y H07 ($N_e=777$; Guatemala) presentaron el mayor tamaño efectivo, en cambio las poblaciones de México, H02 ($N_e=14$) y H01 ($N_e=36$) obtuvieron los menores tamaños (Cuadro 6).

3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA

Primera aproximación: el análisis de la estructura genética considerando a todas las poblaciones como un grupo presentó un valor de R_{ST} de 0.08044 ($p<0.001$), lo que implica una moderada diferenciación genética. Así mismo se encontró un valor moderado de estructura genética entre variedades $R_{ST}=0.09167$ ($p<0.001$). Sin embargo, en la variedad *hondurensis* no se encontró estructura genética (Cuadro 7). Estos resultados sugieren una estructura en *Pinus caribaea* de acuerdo a variedades.

Cuadro 7. Estructura genética de acuerdo a tres modelos de análisis para el complejo de *Pinus caribaea*.

Modelos	R_{ST} (SMM)	Valor p
Modelo 1. Entre el total de las poblaciones	0.08044	0.0001
Modelo 2. Entre variedades	0.09167	0.0001
Modelo 3. Entre grupos de <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>		
Grupo 1: H01, H02, H03, H04, H05, H06 y H07.	0.00031	0.49071
Grupo 2: H08 y H09.		
Grupo 3: H10, H11 y H12.		

El análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) demostró que entre variedades, el mayor porcentaje de variación se presenta dentro de individuos ($F_T:0.18427$; $p=0.001$) y un bajo porcentaje entre poblaciones ($F_{SC}:0.04183$; $p=0.037$) o entre variedades ($F_{CT}:0.09167$; $p=0.001$) y dentro de poblaciones ($F_{IS}:0.06274$; $p=0.001$). Esto significa que la mayor diferenciación genética se está dando a nivel de individuos dentro de las poblaciones, por igual en las tres variedades (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de Varianza Molecular AMOVA para el complejo de *Pinus caribaea*.

TOTAL DE POBLACIONES				
F. V.	G. L.	S. C.	C. V.	P. V.
Entre poblaciones	15	9279.978	13.86207	8.04443
Entre individuos dentro de poblaciones	304	43315.240	9.94121	5.76908
Dentro de individuos	320	41509.500	148.51552	86.18649
Total	639	94104.718	172.31881	
VARIEDADES				
F. V.	G. L.	S. C.	C. V.	P. V.
Entre variedades	2	4102.866	16.69068	9.16740
Entre poblaciones dentro de variedades	13	5177.112	6.91817	3.79982
Entre individuos dentro de poblaciones	304	43315.240	9.94121	5.46024
Dentro de individuos	320	41509.500	148.5155	81.57254
Total	639	94104.718	182.0656	

F. V.=fuente de variación, G. L.=grados de libertad, S. C.=suma de cuadrados, C. V.=componentes de varianza y P. V.=porcentaje de variación.

Segunda aproximación: el resultado obtenido con el análisis de BAPS determinó como mejor agrupamiento la formación de tres grupos de individuos ($\log_{10}I=3636$). Este análisis reveló la separación de los individuos pertenecientes a las poblaciones H01 y H02 (mayormente en rojo) de los que conforman las poblaciones C1, C2, B1 y B2 (mayormente en verde). Las demás poblaciones (H03 a H12) conforman una mezcla de los tres grupos (Figura 6a). Esto permite identificar que las poblaciones en la variedad *hondurensis* son más variadas entre sí.

El análisis de estructura identificando la formación de grupos genéticamente divergentes formó la presencia de 8 agrupaciones ($\log_{10}I=3746.4$). En la variedad *hondurensis* se diferenciaron cinco grupos y en la variedad *bahamensis* las dos poblaciones que la conforman son diferentes, en cambio para la variedad *caribaea* ambas poblaciones son semejantes (Figura 6b). Esto sugiere la presencia de una estructura a nivel de variedades y dentro de ellas.

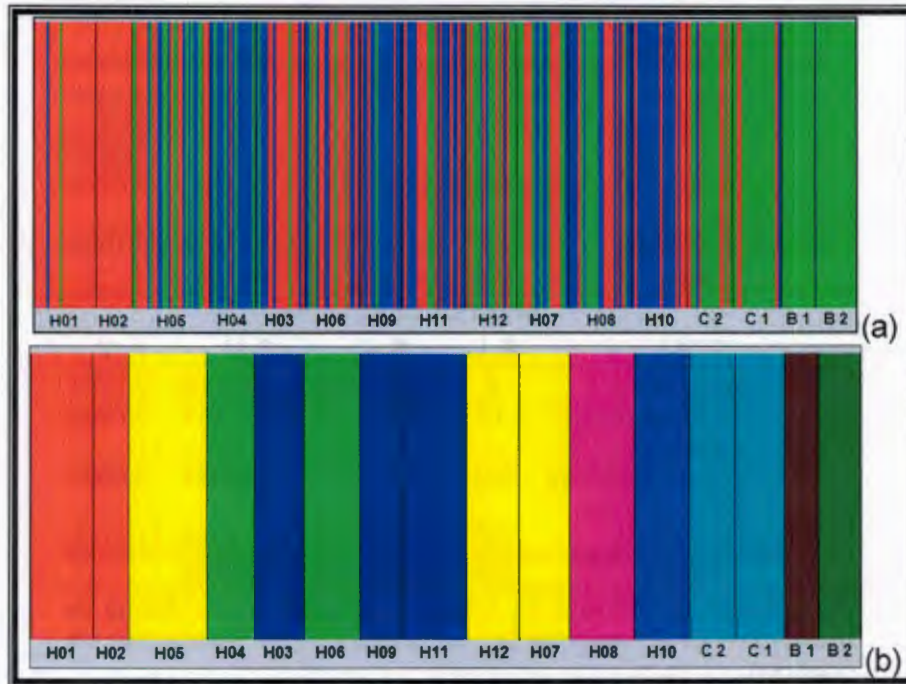


Figura 6. Análisis bayesiano de varianza molecular (BAPS) para el complejo de *Pinus caribaea*. Estructura genética estimada a nivel de individuos (a) y poblaciones (b). Colores iguales indican un mismo grupo.

Tercera aproximación: el análisis de SAMOVA (Cuadro 9) permitió identificar dos posibles agrupaciones, una con 3 K grupos y otra con 4 K grupos. El valor más alto de F_{CT} fue de 0.54 ($p < 0.01$) para la formación de 3 grupos, sin embargo con 4 grupos se separan 3 de las 4 poblaciones que conforman las variedades insulares.

Estas dos agrupaciones coinciden en separar a las poblaciones de *Pinus caribaea* var. *caribaea* (C1 y C2) del resto de poblaciones que corresponden a las variedades *bahamensis* y *hondurensis*. Además en la variedad *bahamensis* solo se identifica a la población B2 como un grupo genéticamente diferente.

Cuadro 9. Análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) para el complejo de *Pinus caribaea*.

K	F _{CT} (valor p)	Agrupamiento	Variedad
3	0.54019 (0.0049)	1) C2	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>caribaea</i>
		2) C1	
		3) Resto de las poblaciones	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>bahamensis</i> <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>
4	0.46638 (0.0001)	1) C2	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>caribaea</i>
		2) C1	
		3) B2	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>bahamensis</i>
		4) Resto de las poblaciones	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> <i>Pinus caribaea</i> var. <i>bahamensis</i>

3.3. FLUJO GENÉTICO Y AISLAMIENTO POR DISTANCIA

El flujo genético (Nm) calculado para todas las poblaciones fue de 2.5 migrantes por generación. A nivel de variedades el flujo genético fue mayor para *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (7 migrantes) en comparación con las variedades *caribaea* (3.9 migrantes) y *bahamensis* (3 migrantes). El flujo entre las dos variedades de las islas del Caribe fué de dos migrantes entre C2 y B2, hasta 3.7 entre C2-B1 y en C1-B2 (Cuadro 10). Cabe resaltar que solo tres de las doce poblaciones de la variedad *hondurensis* (H01, H02 y H10) presentaron menos de un migrante con las poblaciones C1 (variedad *caribaea*), B1 y B2 (*bahamensis*).

Entre pares de poblaciones se encontraron valores desde cero migrantes (en 17 pares de poblaciones, ver Cuadro 10) hasta un máximo de más de 20 migrantes (H03-H09 y H01-H02). La población H02 es la que presentó los valores más bajos de flujo, tanto con poblaciones de su misma variedad como con las variedades insulares (Cuadro 10).

Cuadro 10. Flujo genético entre pares de poblaciones del complejo de *Pinus caribaea*.

	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	C1	C2	B1
H02	23.66	0													
H03	3.10	1.07	0												
H04	1.19	0.66	3.31	0											
H05	2.78	1.76	2.88	3.29	0										
H06	2.02	0.98	3.03	4.21	3.77	0									
H07	1.43	0.81	4.30	9.65	13.85	3.60	0								
H08	1.01	1.26	1.24	1.34	2.90	1.72	1.99	0							
H09	1.54	0.67	20.62	9.38	3.71	4.37	12.56	1.3	0						
H10	2.02	1.05	12.04	2.72	1.73	2.71	2.06	1.3	4.01	0					
H11	2.89	1.17	0	7.87	4.36	6.55	5.9	1.91	0	16.58	0				
H12	1.77	0.86	3.68	5.14	6.67	6.20	0	1.47	8.19	1.81	6.03	0			
C1	0.92	0.59	1.74	2.61	3.65	2.97	4.44	1.47	2.47	0.94	2.11	3.7	0		
C2	1.52	1.41	1.70	1.58	9.20	3.53	3.54	3.11	1.68	1.13	1.96	3.21	3.93	0	
B1	0.76	0.53	1.18	3.03	2.82	2.44	4.64	1.78	2.43	0.91	1.90	5.86	3.67	1.99	0
B2	0.95	0.75	1.46	1.64	3.22	1.85	4.82	1.57	2.0	0.90	1.76	3.94	2.66	3.70	3.0

No se determinó la existencia de aislamiento por distancia (coeficiente de determinación=0.0638 $p=0.992$). Sin embargo, se observa una baja correlación negativa entre las distancias geográficas y el flujo genético ($r=-0.257$; $p=0.005$). Esto demuestra una ligera tendencia en la disminución del flujo genético (Nm) conforme aumenta la distancia (Figura 7). A pesar de esto, la relación no es suficiente para demostrar que exista diferenciación genética entre poblaciones debido al incremento de la distancia geográfica y disminución de flujo genético.

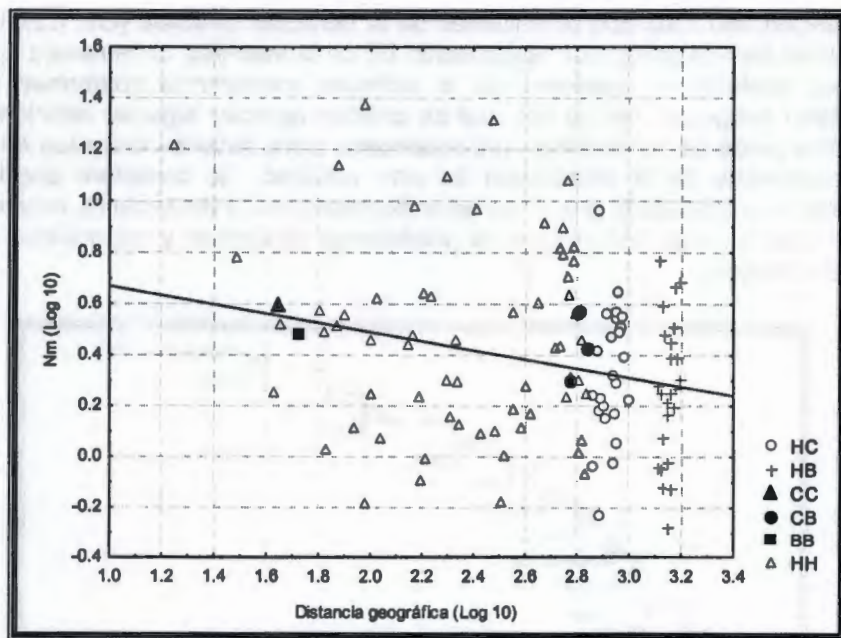


Figura 7. Correlación entre distancias geográficas y flujo genético del complejo de *Pinus caribaea*. Transformación Log(10). Identificación de acuerdo a variedades, H: *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, C: *Pinus caribaea* var. *caribaea* y B: *Pinus caribaea* var. *bahamensis*.

3.4. RELACIONES GENÉTICAS

Las relaciones genéticas obtenidas con los dos modelos de distancias fueron similares en cuanto a la identificación de dos grandes grupos, pero diferentes en las poblaciones que los conforman (Figura 8). El filograma con las distancias $(\delta\mu)^2$ forma dos agrupamientos, en el primero separa las poblaciones de la variedad *caribaea* (C1 y C2) junto con una población de la variedad *hondurensis* (H06). En el segundo grupo se aprecia un escalamiento de relaciones con poblaciones de la variedad *hondurensis* y la variedad *bahamensis* (B1 y B2). Esto sugiere que la variedad *hondurensis* presenta similitudes con la variedad *bahamensis*.

En contraste, la topología obtenida con la distancia D_a relaciona inicialmente en el primer grupo a las poblaciones H01 y H02 de la variedad *hondurensis*, considerándolas como más ancestrales de todas las demás. En el segundo grupo se observan tres subgrupos, en el primero únicamente se separa la población de la variedad *bahamensis* (B1), que se relaciona con un segundo subgrupo en el cual se muestra la

relación entre las dos poblaciones de la variedad *caribaea* (C1, C2), las cuales se relacionan con la población B2 de la variedad *bahamensis*. Las diez poblaciones restantes de la variedad *hondurensis* conforman un último subgrupo, dentro del cual se pueden apreciar algunas relaciones entre pares de poblaciones, principalmente entre aquellas ubicadas en el centro-norte de la distribución de esta variedad. Se considera que las relaciones genéticas presentes en el filograma con la distancia D_a explican de manera más congruente las condiciones biológicas y geográficas de este complejo.

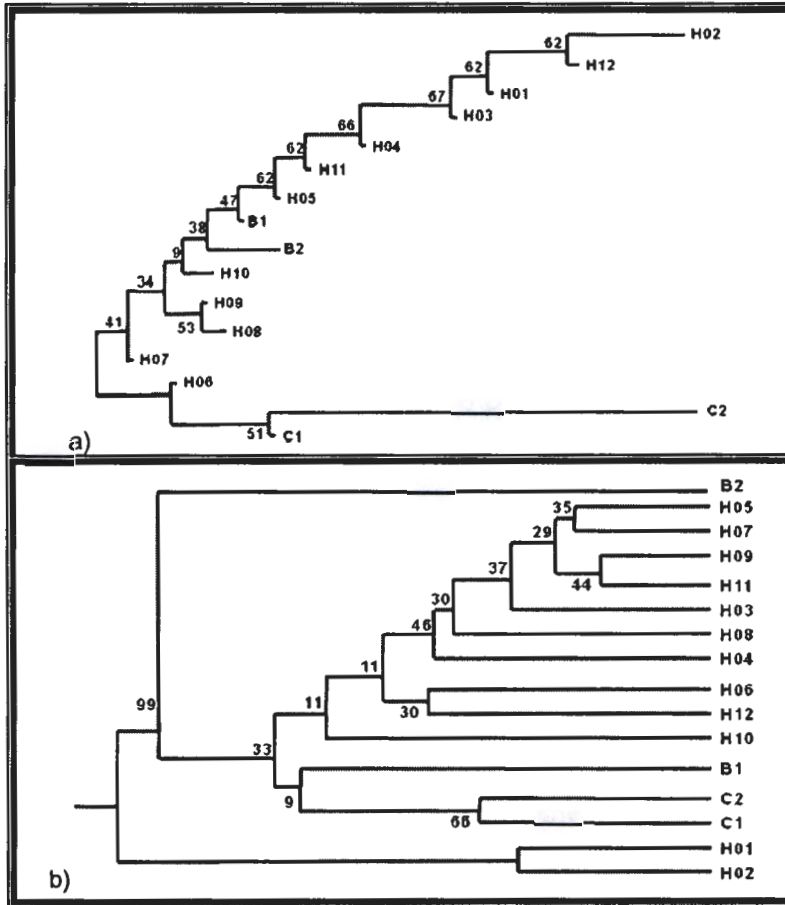


Figura 8. Filograma mostrando las relaciones genéticas entre poblaciones del complejo de *Pinus caribaea*. a) $\delta\mu_2$ y b) D_a . Bootstrap basado en 1000 réplicas. B=*P. caribaea* var. *bahamensis*, C=*P. caribaea* var. *caribaea* y H=*P. caribaea* var. *hondurensis*.

Capítulo 4. Discusión

4.1. DIVERSIDAD GENÉTICA

Las poblaciones de las tres variedades del complejo de *Pinus caribaea* estudiadas en este trabajo presentan una considerable variación genética, la cual es menor a la obtenida en otras especies de pino con el uso de SSRn (Williams *et al.*, 2000; Shepherd *et al.*, 2002; Dvorak *et al.*, 2009). El número de alelos observados en este estudio (36 totales) se encuentra por abajo del intervalo que se ha obtenido en otras especies de pino (*P. resinosa* n=45, Boys *et al.*, 2005; *P. pinaster* n=62 y 82, Mariette *et al.*, 2001 a, b; y *P. taeda* n=172, Williams *et al.*, 2000). La riqueza de alelos entre las variedades insulares de *Pinus caribaea* es muy similar (n=19.5), no así para la variedad continental en donde la mayoría de las poblaciones tienen mayor número de alelos (n=21), lo que significa una mayor variación para la variedad *hondurensis*. Ahora bien, cabe mencionar que estos estimadores son sensibles al tamaño de muestra y número de loci empleados (Williams *et al.* 2000), por lo que la comparación entre especies o poblaciones debe ser cautelosa.

El número promedio de alelos por locus que presenta *P. caribaea* (A=3.4) también se encontró por debajo de los valores reportados para otras siete especies de pinos (ver Cuadro 13), y solo ligeramente superior al reportado para *P. resinosa* (A=2.9). A nivel de variedades, la variedad *hondurensis* presentó más alelos en promedio por locus y las poblaciones con los valores mayores fueron la H07, H08 y H05. A pesar de que *Pinus caribaea* presenta un considerable número de alelos totales (36 alelos), el número promedio de alelos por locus es bajo (intervalo de 2.5-4.2), indicando un desbalance de la diversidad alélica por locus. Así por ejemplo, tomando en cuenta todas las poblaciones el locus PtTX2146 presentó 9 alelos, en cambio los locus PtTX2123 y PtTX2037 solo tuvieron 4 alelos.

El número efectivo de alelos que pueden estar presentes en una población es un mejor estimador de la diversidad genética en comparación con el número de alelos totales y promedio por locus, al involucrar no solo la presencia o ausencia de alelos sino también su frecuencia. *Pinus caribaea* presentó un promedio menor de A_e (3.5) en comparación a los reportados en la literatura para otras especies del género (3.7 a 5.1; Mariette *et al.*, 2001b; Rajora *et al.* 2000; Al Rabah'Ah 2003). Entre las variedades de *Pinus caribaea*, el valor promedio de alelos efectivos es muy similar entre ellas, variando de 2.65 (var. *caribaea*) a 2.75 en la variedad *hondurensis*. Sin embargo, en la variedad *hondurensis* se presentaron poblaciones (50% de ellas) con valores por encima de 3.0. En general, la presencia de un número efectivo de alelos similar entre

todas las poblaciones sugiere que *P. caribaea* tiene un considerable número de alelos cuyas frecuencias son equitativas. Esto se corrobora al no apreciarse un importante efecto de alelos únicos, ya que sólo se presentaron cuatro y en muy baja frecuencia (0.03-0.06).

El principal indicador de variación genética es la heterocigosidad (H) preferida por ser menos sensible al tamaño de muestra y por su significado directo al ser sinónimo de diversidad. En este aspecto, *P. caribaea* presentó una H_e promedio de 0.6322, indicando que se encuentra dentro de los valores reportados de 0.50 a 0.80 para otras especies de pinos (Karhu, 2001). Solo las poblaciones H01 y H02 de la variedad *hondurensis* presentaron valores por debajo de dicho intervalo ($H_e=0.46$ y $H_e=0.35$ respectivamente). Estas poblaciones se ubican geográficamente en el extremo norte de la distribución de la variedad; además, una de las poblaciones tiene un tamaño extremadamente pequeño, ya que solo cuenta con 14 individuos (H14). Por tanto, estas condiciones podrían estar generando un aislamiento geográfico de las poblaciones, con la consecuente pérdida de variación genética.

La heterocigosidad observada fue menor a la esperada en la mayoría de las poblaciones, pero estas no se desvían significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). Una excepción es la población C2, distribuida en Cuba, la cual no se encontró en dicho equilibrio ya que presentó un muy bajo valor de heterocigosidad observada con respecto al esperado y esta diferencia fue significativa. Esta población no presenta endogamia ($F_{IS} = -0.136$) por lo tanto esta baja heterocigosidad observada puede deberse a un pequeño tamaño de población original (efecto de cuello de botella) o actual. A nivel de variedades, la heterocigosidad observada fue mayor para *bahamensis*, seguida de *hondurensis* y menor para *caribaea*, esta última se encuentra fuera de equilibrio H-W. Finalmente cabe mencionar, que en las poblaciones de la zona sur de Mesoamérica, que corresponde a la región geográfica continental de la especie, se encuentra la mayor diversidad genética.

Por tanto, los resultados muestran que el proceso de endogamia no es importante ($F_{IS}=0.100$; ver Cuadro 7), y sugiere que el complejo Caribaea presenta un sistema efectivo de entrecruzamiento entre individuos poco relacionados genéticamente. Dvorak *et al.* (2009), obtuvieron resultados más altos, en *P. oocarpa* Schiede ex Schltdl, *P. tecunumanii* Eguluz *et J. P. Perry* y *P. patula* Schiede ex Schltdl. *et Cham* con el uso de SSRn, donde el índice de F_{IS} fue de 0.11 a 0.15 (Cuadro 11). Pero en cambio, para estas tres especies se encontraron muchas poblaciones fuera de equilibrio H-W y con valores positivos de F_{IS} por lo que consideran que existe un déficit de heterocigos y presencia de endogamia. Igualmente, en *P. resinosa*, a pesar de contar con una amplia distribución, se estimaron valores de F_{IS} mayores (0.5) en algunas

poblaciones. La presencia de un importante exceso de homócigos y la desviación del equilibrio H-W, fue atribuido al sistema de apareamiento con un alto nivel de endogamia por autofecundación o por el apareamiento de individuos muy relacionados genéticamente (Boys *et al.*, 2005).

El tamaño efectivo de población promedio para *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (610 individuos) es muy similar al obtenido en *P. resinosa* (615 individuos, Boys, *et al.* 2005). Tanto la variedad *hondurensis* como *P. resinosa* son de amplia distribución y sus poblaciones ocupan extensiones más amplias en comparación con las variedades *caribaea* y *bahamensis* las cuales son de distribución restringida (islas). Cabe resaltar que las poblaciones H01 y H02, presentaron los tamaños efectivos más pequeños, sin embargo estos valores, pueden considerarse apropiados con relación al tamaño censal de las poblaciones (H01 de 150 individuos y H02 con 14 árboles en total).

En general podemos considerar que en las poblaciones de las tres variedades de *P. caribaea* no se han presentado factores externos que hayan afectado históricamente los niveles de variación genética, tales como; diferencia en la proporción de sexos, endogamia, deriva génica, procesos de selección que favorezcan o eliminen alelos, y/o la existencia de cambios drásticos del tamaño poblacional durante su historia evolutiva.

Dvorak *et al.* (2005), menciona que el posible origen de *P. caribaea* pudo darse en Centroamérica y nuestros resultados corroboran esta hipótesis, ya que las poblaciones que contienen la mayor diversidad genética se ubican en la zona sur de Mesoamérica lo cual sugiere a esta región como un posible centro de origen o diversificación del complejo *P. caribaea*.

Cuadro 11. Variación y estructura genética en diferentes especies de *Pinus* basada en loci de microsatélites nucleares.

S.G.	Especie	No. loci	n	A	A _e	H _o	H _e	F _{ST}	F _{IS}	Nm	Referencia
S	<i>P. strobus</i>	12	122	9.4	4.5	.521	.607				Rajora et al., 2000
P	<i>P. pinaster</i>	3	62			.646	.827				Mariette et al., 2001(a)
P	<i>P. pinaster</i>	3	82	9.2	3.7	.645		.111	.140		Mariette et al., 2001(b)
P	<i>P. resinosa</i>	5	45	2.9		.185	.508	.280	.504	0.42	Boys et al., 2005.
P	<i>P. radiata</i>	8		12.9	5.1	.677	.782				Kumar & Richardson, 2005
P	<i>P. radiata</i>			8.2			.730	.145	.207		Karhu et al., 2006
P	<i>P. taeda</i>	18	172	4.9		.526	.610				Williams et al., 2000
P	<i>P. taeda</i>	18		10.8		.520	.679	.041		3.78	Al-Rabah'Ah, 2003
P	<i>P. oocarpa</i>	11		5.1		.540	.710	.131	.150	2.49	Dvorak et al., 2009
P	<i>P. tecunumanii</i>	11		4.9		.550	.650	.075	.109	3.14	Dvorak et al., 2009
P	<i>P. patula</i>	11		4.5		.490	.590	.083	.138	2.26	Dvorak et al., 2009
P	<i>P. caribaea</i> var.	4	12	3		.720	.530				Shepherd et al., 2002
	<i>hondurensis</i>	6		2.3		.250	.250	.021	.008		Furlan et al., 2007
	PROMEDIO		82.5	6.5	4.4	.522	.623	.111	.179	2.42	

Continúa...

S. G.	Especie	No. loci	n	A	A _e	H _o	H _e	F _{ST}	F _{IS}	Nm	Referencia
P	<i>P. caribaea</i> var. <i>caribaea</i>	6	21	3.2	2.6	.462	.583	.008	-.177	3.9	Presente estudio
P	<i>P. caribaea</i> var. <i>bahamensis</i>	6	25	3.2	2.7	.530	.605	.072	.260*	3	Presente estudio
P	<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	6	33	3.6	2.8	.493	.623	.040*	.082*	7	Presente estudio

S. G.=Subgénero, S:*Strobus* P:*Pinus*; n=número total de alelos; A=número de alelos promedio por locus; A_e=alelos efectivos; H_o=heterocigosidad observada; H_e=heterocigosidad esperada; F_{ST}=diferencia entre poblaciones; F_{IS}=coeficiente de endogamia; Nm=flujo genético; p<0.05*.

4.2. PATRONES DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Los tres tipos de análisis realizados para determinar la estructura genética de las poblaciones del complejo de *Pinus caribaea* identifican a las variedades como la principal agrupación de diferenciación genética. En una primera aproximación (AMOVA) observamos que un 0.080 de la variación genética en el complejo de *Pinus caribaea* se encuentra distribuida entre el total de las poblaciones, en cambio entre variedades encontramos un 0.091. Estos valores de diferenciación genética (R_{ST}) son similares al promedio obtenido para otras especies de pino con el uso de SSRn ($R_{ST}=0.111$, Cuadro 11) y ligeramente menor al promedio obtenido para coníferas (0.116, Petit et al., 2005). Aunque no es conveniente hacer comparaciones entre diferentes marcadores, existen trabajos que se han realizado con isoenzimas en *Pinus caribaea* var. *caribaea* (Zheng y Ennos, 1999), var. *hondurensis* (Dvorak et al., 2005) y var. *bahamensis* (Zheng y Ennos, 1999; Cuadro 2). Los resultados indican la presencia de una baja estructura genética en poblaciones de las variedades *caribaea* y *hondurensis* (F_{ST} de 0.020 y 0.023 respectivamente), así como una estructura genética moderada en la variedad *bahamensis* ($F_{ST}=0.078$). En cambio en el presente estudio, encontramos una mayor diferenciación genética entre las poblaciones de la variedad *hondurensis* ($F_{ST}=0.04$), menor para la variedad *caribaea* ($F_{ST}=0.008$), y similar para la variedad *bahamensis* (0.072), aunque ésta última no fue significativa estadísticamente. Estos resultados indican que a pesar de la distribución restringida de estas variedades a las islas, aun mantienen una variación genética similar en sus respectivas poblaciones.

Por su parte, tanto el análisis bayesiano de estructura poblacional (BAPS), como el análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA), también permitieron visualizar un grado significativo de diferenciación genética entre variedades, la cual está asociada a su distribución geográfica. De acuerdo con el análisis de BAPS la mayor estructura genética se presentó con la conformación de ocho grupos, de los cuales tres identifican a dos variedades insulares (var. *bahamensis* y var. *caribaea*), y el resto de los grupos a la variedad *hondurensis*. Para la variedad *caribaea* las dos poblaciones conforman un solo grupo; esto podría deberse a que ésta se encuentra solo en la zona norte de la isla de Cuba y la distancia entre las dos poblaciones es relativamente pequeña (44.27 km) por lo que la diferenciación genética entre ellas no es muy fuerte, lo que sugiere que ambas poblaciones conforman una misma entidad evolutiva. En contraste, para la variedad *bahamensis* sus dos poblaciones se identifican como dos grupos genéticamente distintos, lo cual corresponde a su distribución geográfica insular, por lo que podríamos considerarlas como dos entidades evolutivas divergentes. En cuanto a la

variedad *hondurensis*, cuatro de los cinco grupos generados se encuentran relacionados con el área de distribución geográfica de las poblaciones: zona norte (poblaciones H01 y H02; México), zona noreste (H04 y H06; Belice), zona centro este (H08; Honduras) y zona sur (H10 sur de Honduras y H11 distribuida en Nicaragua; con excepción de H03, H09) (ver figura 5). El quinto grupo se conforma por las poblaciones H05 (Belice), H07 (Guatemala) y H12 (Nicaragua). Éstas se encuentran geográficamente muy distantes pero presentan una similaridad genética que las separa de los demás grupos. Una explicación para la conformación de este grupo, podría ser la presencia de características ecológicas o topográficas similares en las tres poblaciones. Sin embargo, esto tendría que comprobarse con estudios particulares de dichas características en estas poblaciones.

Igualmente, los resultados obtenidos con el análisis de SAMOVA indican una asociación importante de los grupos ($K=4$) con relación a las variedades y con el área geográfica en donde se distribuyen. Las poblaciones incluidas en estos grupos difieren relativamente poco de las poblaciones incluidas en los grupos generados con el método de BAPS: Los dos primeros grupos incluye a cada una de las dos poblaciones de la variedad *caribaea* (C1 y C2; de Cuba), el tercer grupo incluye a la var. *bahamensis* (B2) y el cuarto grupo incluye a las poblaciones de la var. *hondurensis* y a la otra población de la var. *bahamensis* (B1). Por tanto, las dos aproximaciones se diferencian en la manera de agrupar a la variedad *caribaea*. Esto puede deberse principalmente a los algoritmos que utiliza cada método: BAPS inicia definiendo a priori el número óptimo de los posibles grupos y entonces asigna los individuos a estos grupos (Excoffier y Heckel. 2006). Por otro lado, SAMOVA es un programa que utiliza un método de simulación lineal con el cual se definen grupos de poblaciones que presentan la máxima diferencia genética entre sí (Dupanloup *et al.*, 2002). Este último método generó un valor de diferenciación ($F_{CT}=0.466$) entre grupos mayor al obtenido con el análisis de AMOVA ($F_{ST}=0.09$), lo cual corrobora esta estructuración genética. Un comportamiento similar de estos dos métodos de análisis se presenta en el estudio realizado por Tollefsrud *et al.* (2008), sobre la estructura genética de 170 poblaciones de *Picea abies* (L.) H. Karst. distribuida en Europa. Al utilizar el algoritmo de SAMOVA se identificó dos grandes grupos representados por las poblaciones distribuidas en la zona norte y sur, así como una subestructuración definida dentro de la zona sur. En cambio para la zona norte, el máximo agrupamiento fue de dos, ya que conforme se aumentaba el número de K grupos, disminuía el valor de F_{CT} y solo aumentaba el número de grupos pero incluyendo solo una población. Por tanto, se considera que el agrupamiento obtenido con BAPS es el más robusto y el que refleja la estructura genética para el complejo de *Pinus caribaea*.

4.3. FLUJO GENÉTICO Y AISLAMIENTO POR DISTANCIA

Los niveles de flujo genético obtenidos para las poblaciones de las variedades fue alto ($N_m=2.5$), valor que es relativamente mayor al promedio obtenido en otras especies de pinos ($N_m=2.42$; ver Cuadro 11). A nivel de las variedades el mayor flujo se presentó en las poblaciones de la variedad *hondurensis* ($N_m=7.0$). Este resultado es opuesto a lo que se esperaría debido a la distribución amplia de esta variedad en Mesoamérica: teóricamente, a mayor distancia geográficamente el flujo genético entre las poblaciones debe de ser menor y por lo tanto la diferenciación genética es mayor (Slatkin, 1993). Este patrón solo se presenta con algunos pares de poblaciones distribuidos al Norte (H02 y H04, H06, H07, H09 y H12), y centro-sur (H07 y H12; Guatemala y Nicaragua, H09 de Honduras y H11 de Nicaragua), las cuales presentan menos de un migrante por generación. Por tanto, a pesar de la distribución geográfica amplia de esta variedad, el flujo genético está evitando la diferencia genética entre las poblaciones. Wright (1931) señala que un número de migrantes de 1 o más individuos por generación por población es suficiente para prevenir la diferenciación genética entre poblaciones.

Varios estudios, tanto de especies de bosque templado (Schnabel *et al.*, 1991; Dow y Ashley, 1998; Latta y Mitton, 1997; Ledig 1998; González-Martínez *et al.*, 2002) como de bosque tropical (Hamrick *et al.*, 1993; Boshier *et al.*, 1995), han reportado que la dispersión de polen es frecuentemente el mayor contribuyente al flujo de genes y que la estructura genética espacial resulta principalmente de la limitada dispersión de semillas. Ledig (1998), menciona que el flujo genético en coníferas es muy alto (4.6-17.2 migrantes por generación), el cual se da principalmente a través de la dispersión por polen ya que es mucho más extenso que el de las semillas. El polen de las coníferas se puede mover más de 600 km en la superficie terrestre (DiGiovanni *et al.*, 1996 en Al-Rabab'Ah, 2003). En cambio el movimiento de las semillas alcanza menores distancias y depende del tamaño y peso de las mismas, esperando que a mayor peso menor distancia de dispersión. Por ejemplo, en *P. taeda* se ha estimado que sus semillas que miden entre 5 y 6 mm y cuentan con un ala se diseminan aproximadamente entre 61-91 m viento a favor y solo 23-30 m en otras direcciones. En cambio, *P. pinaster* (piñonero) cuyas semillas miden entre 7 y 11 mm, no presentan un ala y son comestibles, se ha estimado que se dispersan una distancia de ~12 m (Savolainen *et al.*, 2007). La dispersión de semillas a poca distancia en las especies piñoneras puede provocar la presencia de una estructura genética.

Para este estudio, es posible que no existan barreras geográficas o diferencias ecológicas que afecten de manera significativa el flujo genético, a pesar de que actualmente varias de las poblaciones se encuentran

fragmentadas o presenten tamaños censales pequeños (poblaciones de Guatemala, Belice y México). Probablemente, los tamaños de las poblaciones en el pasado fueron más grandes y de distribución continua, pero la pérdida de áreas forestales debido a diversos factores antropogénicos y ambientales (como incendios, huracanes o tala immoderada; Hernández, 1997) han provocando su fragmentación la cual podría ser reciente (<http://www.sagan-gea.org/hojared/portada1.htm>) por lo que su efecto todavía no se ve reflejado en la disminución de los niveles de flujo genético. Además, no se presentó un patrón de aislamiento por distancia entre las poblaciones, aunque existe una correlación baja pero significativa entre las distancias geográficas y genéticas ($r=-0.257$, $p=0.005$). Esto podría deberse principalmente al distanciamiento geográfico entre variedades, ya que, aunque se observa una asociación aleatoria más que lineal dentro de cada variedad, existe una tendencia a un mayor flujo genético entre las poblaciones del continente y menor entre las poblaciones distribuidas en las islas (ver Figura 7).

4.4. RELACIONES GENÉTICAS Y RUTAS DE DISPERSIÓN

Con la reconstrucción del filograma, basado en las distancias genéticas (D_a) de Nei *et al.* (1983), también encontramos fuertes evidencias de una agrupación de las poblaciones por variedades, sugiriendo que éstas representan tres linajes evolutivos pero que aún se encuentran en proceso de especiación. Es interesante observar que las dos poblaciones distribuidas en México forman un grupo independiente del resto de las poblaciones, ya sean de la variedad *hondurensis*, *bahamensis* o *caribaea*, las cuales tiene un origen más reciente en comparación con las dos poblaciones de México. Las dos poblaciones de la variedad *caribaea* están representadas en un mismo subgrupo y esta relacionado a la población de la variedad *bahamensis* (B1, Bahamas), la cual parece tener un origen más ancestral que las dos poblaciones de la variedad *caribaea*. Esta asociación probablemente se debe a su distribución geográfica, la población B1 se localiza en una de las Islas Bahamas (Andros) que es más cercana a la isla de Cuba en comparación con la isla de New Providence en donde se localiza la población B2. La población B2, es la más basal y diferenciada del resto de las poblaciones que se incluyen en el segundo clado o grupo. Por lo que, forma un linaje independiente que se ha mantenido diferenciado a través de su evolución. Además, ésta población es la más cercanamente relacionada a las poblaciones de México (H01 y H02). Estos resultados son comparables a otros estudios filogenéticos obtenidos con marcadores isoenzimáticos, en los que se ha demostrado que las variedades *caribaea* y *bahamensis*

representan entidades evolutivas distintas (Zeng y Ennos, 1999) así como las variedades *bahamensis* y *hondurensis* (Matheson *et al.*, 1989).

En cuanto al posible origen de este complejo, Eckert y Hall (2006) estudian las relaciones filogenéticas, biogeográficas y los patrones de diversificación para el género *Pinus* mediante el análisis de secuencias de cloroplasto, obteniendo un clado en donde se asocian las variedades *bahamensis* y *hondurensis*, y otras especies de la subsección *Australes*, pero la variedad *caribaea* se presenta como un grupo hermano. En contraste, en un estudio realizado por Dvorak *et al.* (2000b) en donde utiliza RAPD's, encuentran que la variedad *hondurensis* se encuentra relacionada a la variedad *caribaea*. Además supone que una forma ancestral de la variedad *caribaea* es la especie fundadora de otros taxa de la región Florida/Caribe (*Pinus elliotii* var. *densa*, *P. caribaea* var. *bahamensis* y *P. elliotii* var. *elliottii*). La diferencia en cuanto a que la variedad *caribaea* es más ancestral que la variedad *hondurensis* puede deberse a que Eckert y Hall solo estudian algunos individuos de cada variedad, mientras que Dvorak *et al.* y en nuestro trabajo se estudian varios individuos y poblaciones representativas de cada variedad. Esto se presenta particularmente para la variedad *hondurensis*, la cual tiene la mayor distribución geográfica de las tres variedades. Además la información que cada marcador aporta independientemente es diferente, pero lo que en la actualidad se recomienda realizar este tipo de análisis con diferentes marcadores (morfológicos, bioquímicos y moleculares) que permitan obtener resultados más precisos.

La estructura genética obtenida con el análisis de BAPS corrobora algunos de los grupos obtenidos en el filograma (ver figuras 6 y 8). Ambos análisis separan a las poblaciones que se localizan en la zona norte de la distribución en Mesoamérica de la variedad *hondurensis* (distribuidas en México), otro grupo incluye a las poblaciones de la variedad *caribaea* (C1 y C2), y en otros dos grupos se encuentran incluidas las dos poblaciones de la variedad *bahamensis* de manera independiente (B1 y B2), el resto de las poblaciones de la variedad *hondurensis* se incluyen en los cinco grupos restantes (poblaciones de la var. *hondurensis* distribuidas en el centro-sur de Belice, centro-sur de Honduras y Nicaragua). Por lo tanto, el análisis de BAPS y el filograma sugieren una importante relación entre los grupos formados y su distribución geográfica, la cual corresponde a la identidad de variedades. Aunque en el grupo que incluye a las diez poblaciones restantes de la variedad *hondurensis* (Belice, Honduras y Nicaragua) se aprecia cierta separación de acuerdo a la distribución geográfica (principalmente en la parte norte de su distribución en Belice), esta separación no es muy clara para el centro y sur de esta área. Esto se corrobora con el análisis de aislamiento por distancia el cual no fue significativo tanto para las variedades como para las poblaciones dentro

de la variedad *hondurensis*. Un estudio interesante que están realizando Jardon *et al.* (en revisión) con las mismas variedades pero con el uso de microsatélites de cloroplasto, sugieren esta misma relación, pero ellos si encuentran un patrón de aislamiento por distancia muy claro ($r=0.815$, $p<0.001$). Por tanto, estas diferencias pueden deberse al tipo de marcador molecular utilizado; en la mayoría de las coníferas el cloroplasto se hereda vía paterna a través del movimiento del polen que es haploide (1N) (Tani *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2005). Esta condición facilita el seguimiento de las rutas de dispersión o movimiento de genes, sin que este se vea afectado por el efecto de la recombinación, como es el caso de los microsatélites nucleares (2N).

En la actualidad existen dos hipótesis generales sobre las rutas de dispersión y colonización de especies de pinos en la Cuenca del Caribe. La primera hipótesis postula que la migración inicial se dio de un ancestro del sureste de Norteamérica, desde el sur de la Florida hacia las islas del Caribe y pasaron a Centroamérica (Farjon, 1996; Adams y Jackson, 1997). En cambio, la segunda hipótesis postula que la dispersión pudo presentarse desde Centroamérica hacia las islas de Cuba y las Antillas (Mirov, 1967; Dvorak *et al.*, 2000b; 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con esta última hipótesis, ya que tanto el filograma como el análisis de agrupamiento de poblaciones (BAPS), sugieren que ésta se pudo dar desde las poblaciones localizadas en la Península de Yucatán en México hacia las poblaciones de las islas de Cuba y Bahamas, y finalmente una posterior dispersión en Centroamérica (Belice, Honduras y Nicaragua).

Mirov (1967) señala que los pinos migraron desde el norte de los Estados Unidos hacia México y Centroamérica desde inicios del periodo Terciario (≈ 70 millones de años, MA) y hacia algunas islas del Caribe durante el Eoceno y el Mioceno (≈ 55 a 20 MA). Sin embargo, considera que es muy difícil comprobar la penetración post-Terciaria de pinos desde Yucatán al este de Cuba, o la aparición de pinos en las Bahamas, debido a la dificultad para comprobar la dispersión de semillas o plantas de pino en esa época, lo cual probablemente no pueda ser explicado sin la aceptación de la posibilidad de migración sobre el agua (Asprey y Robbins, 1953). Posteriormente Dvorak (2000b) planteó que el origen de este complejo de pinos pudo iniciarse a través de un ancestro tropical proveniente de *Pinus oocarpa* (Schiede ex Schldl.), el cual habría migrado hacia el sur a lo largo del oeste de la costa del Golfo de México, a través de Yucatán hasta Centroamérica. Este ancestro de *P. caribaea* se habría separado antes de la divergencia de los pinos *Austroales* y eventualmente evolucionaría para dar origen a la entidad actual denominada *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, la que posteriormente migraría hacia Centroamérica. La forma ancestral de *P. caribaea* pudo

haber migrado de manera lenta e infrecuente desde Centroamérica hacia Cuba y eventualmente a las Bahamas. Posteriormente, *Pinus caribaea* var. *caribaea* posiblemente migró al centro de la península de la Florida por la ruta de las Bahamas, Cuba o la Española, porque el sur de la Florida estuvo sumergida hasta el Pleistoceno y el establecimiento de pinos en esta área no era posible antes de ese tiempo.

Los dos argumentos más fuertes que sustentan esta hipótesis son, i) la presencia de conexiones terrestres (una isla y puentes terrestres de arrecifes de coral) entre Centroamérica y Cuba a principios del Terciario, en el Eoceno y el Mioceno (≈ 55 a 20 MA) (Schuchert, 1935; Asprey y Robbins, 1953) incluso conexiones terrestres entre Cuba con Yucatán y con la Florida (Alain, 1958), y ii) la dispersión de semillas por aves migratorias, murciélagos, corrientes marinas o de aire y tormentas tropicales (Mirov, 1967; Alain, 1958; Eguluz-Piedra, 1985; Hedges, 1996) se han sugerido para explicar la migración o posible movimiento de genes. Las investigaciones paleogeográficas y biogeográficas en conjunto con la teoría sobre la tectónica de placas, permiten establecer un posible escenario que explica igualmente esta hipótesis. De acuerdo a los mapas paleogeográficos la cercanía entre el bloque Maya y Cuba occidental, así como las corrientes marítimas (Circum Tropical y la del Caribe) pudieron favorecer la migración de biota terrestre desde el continente hacia la isla. Esto se vio intensificado desde el Plioceno hasta el Holoceno (3.7-0 MA) al cerrarse el Istmo de Panamá (Iturralde-Vinent 2004-2005). El posible movimiento de los pinos desde Centroamérica hacia Cuba, se justifica igualmente por la baja probabilidad que existe para que sus semillas hayan sido llevadas por corrientes de aire desde el continente (sureste de Norteamérica) a las islas (Cuba y Bahamas) debido a la alta velocidad de los vientos en el Caribe, los cuales se mueven hacia la Florida y no a partir de ella. También las Bahamas emergieron recientemente (durante o después del Plioceno, ≈ 2 MA) y nunca han estado conectadas con las otras islas del Caribe. Por lo tanto la migración de pinos a las Bahamas aparentemente fue por origen aéreo y reciente (Mirov, 1967). La particular distribución de *P. caribaea* en al menos 6 de las islas Bahamas y sin que existan ninguna de las otras especies de pinos del Caribe en ellas (Mirov, 1967) hizo suponer a Little y Dorman (1954) que este tipo de distribución pudiera ser causado por diferentes factores tales como una rápida tasa de migración, o su gran edad y, las irregularidades de migración de los pinos a través del agua.

Para el caso de la variedad *hondurensis*, Dvorak *et al.* (2005), consideran que la distribución de esta variedad en Mesoamérica fue más amplia y continua en el pasado, extendiéndose hasta la parte norte de la península de Yucatán. Los reportes de registros de polen en el Petén (Guatemala), han demostrado que los bosques en la región incluían pinos,

encinos, y olmos, junto con algunos elementos de bosque lluvioso, que datan de entre los años 8000 y 7000 AC (Leyden, 1984 en Dvorak *et al.*, 2005). Por lo tanto, la distribución y abundancia de la variedad *hondurensis* sin duda se expandió y contrajo con los cambios del clima en Yucatán durante los últimos 10,000 años. Presuntamente durante un periodo de miles de años, esta variedad migró hacia el este por la costa norte de América Central en la actual Nicaragua y finalmente hacia el sur por los valles secos centrales de Honduras a El Salvador (Dvorak *et al.*, 2005).

De acuerdo con Dvorak (2000b), los tiempos de divergencia estimados en base al registro fósil de pino (Krupkin *et al.*, 1996) sugieren que el grupo *Australes* al cual pertenece *Pinus caribaea*, se separó de un grupo conformado por un clado Californiano y uno Mesoamericano hace aproximadamente 10 a 12 millones de años. Sin embargo, Willyard *et al.* (2007) y Gernandt *et al.* (2008) con base en datos moleculares de cloroplasto (*matK*, *rbcL*, *rpl20/rps18S18* y el *trnV*), 11 loci nucleares y caracteres no moleculares, reportan un tiempo de divergencia más amplio y reciente para las subsecciones *Australes*, *Ponderosae* y *Contortae* (entre 5 y 18 millones de años). Aunque estos tiempos de divergencia pueden no ser totalmente correctos, si pueden ser puntos de referencia para indicar que el ancestro de *P. caribaea* pudo haberse separado más recientemente que dichos clados. Para corroborar esta hipótesis podemos estimar el tiempo durante el cual estas variedades divergieron, basándonos en la estimación del ancestro común más reciente, el tiempo generacional para cada variedad y la tasa de mutación estimada para SSRn. El tiempo de coalescencia puede ser obtenido con el estimado de $\theta = 4N_e\mu$ (para ADN diploide; Hartl y Clark 1997), y la tasa de mutación (μ) reportada para los SSRn de 1×10^{-3} (Boys *et al.*, 2005), estas estimaciones serían de 818, 210 generaciones atrás. Considerando un intervalo de tiempo generacional a la primera reproducción de 10 (Okoro, 1984) y 15 años (Jardón *et al.*, en revisión), el inicio de la diversificación pudo presentarse entre 8, 182, 100 y 12, 273, 150 años, o sea entre 8 -12 MA lo cual coincide con los tiempos de divergencia propuestos por Dvorak *et al.* (2000b) y cae dentro del intervalo que consideran Willyard *et al.* (2007) y Gernandt *et al.* (2008), aunque de acuerdo a estos últimos autores, esta especie pudiera ser más reciente.

4.5. RECOMENDACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

La diversidad genética es el elemento básico de la diversidad biológica y proporciona la materia prima por la cual las especies evolucionan y se adaptan a las condiciones cambiantes (Keystone Center,

1991). En árboles forestales de larga vida, la diversidad genética puede ser necesaria como amortiguador frente a la variación ambiental, así como proporcionar un cambio en la escala de tiempo evolutivo (Ledig *et al.*, 1998). En la actualidad los especialistas forestales requieren de conocer los patrones de variación genética para proponer las estrategias de conservación que requiere cada especie, para lo cual los marcadores moleculares son muy útiles ya que pueden rápidamente evaluar las diferencias entre poblaciones y ofrecen una guía sobre que conservar.

De acuerdo a lo anterior y tomado en cuenta los resultados obtenidos en este estudio con marcadores SSRn, podemos identificar y proponer a aquellas poblaciones susceptibles de conservar de acuerdo a la variación genética que poseen. La riqueza alélica es un primer punto a considerar, ya que se sugiere conservar todas aquellas poblaciones con el mayor número de alelos a pesar de la frecuencia en la que estos se encuentren. De acuerdo a lo anterior, para *Pinus caribaea* var. *hondurensis* la población H07 (Guatemala), sería la indicada para la conservación al tener el mayor número de alelos ($n=25$) y además la mayor variación ($H_o=0.537$ y $H_e=0.634$), aunque en general las poblaciones de la zona sur (desde H05 hasta H12) representan la mayor variación para la especie, por lo que podrían representar poblaciones ideales para conservar tanto *in situ* como *ex situ*. En los casos de *Pinus caribaea* var. *caribaea* y la variedad *bahamensis*, sus poblaciones presentan números de alelos similares. Sin embargo, sobresale la población C1 para la variedad *caribaea* con una mayor variación. En cambio para la variedad *bahamensis* ambas poblaciones tienen prioridad de conservación, ya que representan entidades evolutivas que han estado diferenciando, ambas presentan más variación que las poblaciones de Cuba a pesar de su condición de islas, y la población B1 presenta alelos únicos que indican cierta diferenciación genética.

El caso de las poblaciones de la variedad *hondurensis* H01 y H02 es particular, ya que al ser las menos variadas, con el menor tamaño poblacional y localizadas al extremo norte de la distribución de esta variedad requieren de un trato especial por la importancia que revisten al ser también las más ancestrales. Estas poblaciones requieren de ser conservadas dándoles manejos específicos. La población H01 cuenta con un fuerte plan de manejo forestal por parte de sus poseedores y es reconocida como una especie amenazada en México (NOM-059) por lo que está protegida (Dvorak *et al.*, 2005); en cambio la población H02 es una nueva localidad para esta variedad en México y el poco número de árboles con el que cuenta ($N=14$) requiere promover la regeneración natural y asegurar su establecimiento y permanencia que permita incrementar el tamaño poblacional.

Ahora bien, aunque para especies forestales se ha considerado que el hábitat natural es la mejor estrategia de conservación (Rogers y Ledig 1996), la conservación *ex situ* puede ayudar cuando la conservación *in situ* se ve afectada por la pérdida de hábitat debido a la influencia de actividades humanas, fuego, viento, introducción de plagas y enfermedades o cambio climático; incluso conservar especies forestales *ex situ* sirve para evaluar su adaptación y productividad en otros ambientes con posibilidades de lograr plantaciones de alto rendimiento. Por lo tanto, es necesario tener estrategias de conservación con métodos integrales *in* y *ex situ* (Ledig *et al.*, 1998). Particularmente, en *P. caribaea* se conoce que requiere del fuego para su regeneración y sobrevivencia de manera natural, y por ello necesita de áreas "desmontadas" o de aclareos y un control del nivel de agua, ya que las zonas donde habita son generalmente inundables y llamados bajos, por lo que la práctica para la regeneración *in situ* en el área natural de distribución principalmente en México y Centroamérica requiere de la práctica de quemas controladas y sistemas de drenaje que aseguren la permanencia de los bosques de esta especie. Como señala puntualmente Dvorak *et al.* (2005), quizá sea necesario aprender aún más sobre cómo los antiguos Mayas manejaban "los bajos".

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos con seis microsatélites nucleares permitieron definir una variabilidad genética importante pero menor para *Pinus caribaea* (36 alelos totales, $A=3.5$, $A_e=3$, $H_o=0.49$, $H_e=0.63$) en comparación a otras especies de pinos. Particularmente, *P. caribaea* var. *hondurensis* presenta la mayor variación genética ($H_o=0.49$, $H_e=0.62$) en comparación con las variedades *caribaea* y *bahamensis*, principalmente en las poblaciones localizadas en la zona centro-sur de Mesoamérica (H07 y H11). Además la mayoría de las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg, corroborado por un bajo nivel de endogamia ($F_{IS}=0.100$ $p<0.05$).

P. caribaea presenta una estructura genética moderada y se debe principalmente al agrupamiento en variedades ($R_{ST}=0.092$). Esto se ve reflejado por el alto flujo genético encontrado entre poblaciones (2.5 migrantes por generación), principalmente dentro de cada variedad. Además, de la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia, lo cual indica que la distribución geográfica aun no ha jugado un papel importante en la diferenciación de estas poblaciones.

Las relaciones genéticas agruparon a las poblaciones de acuerdo a las diferentes variedades. Por lo cual, es factible suponer, que las variedades representan tres linajes evolutivos que aún se encuentran en proceso de especiación.

Los resultados obtenidos en este estudio, concuerdan con la hipótesis de la posible dispersión del *Pinus caribaea* desde Centroamérica hacia las islas del Caribe, ya que tanto el filograma como el análisis de agrupamiento de poblaciones (BAPS), indican que ésta se pudo dar desde las poblaciones localizadas en la Península de Yucatán en México hacia las poblaciones de las islas de Cuba y Bahamas hace aproximadamente 8 a 12 millones de años, y finalmente una posterior dispersión en Centroamérica (Belice, Honduras y Nicaragua).

5.1. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una importante variación genética presente en el complejo de *Pinus caribaea* y aunque no se determinó un patrón de aislamiento por distancia significativo, si se observó cierta tendencia a una mayor diferenciación genética con respecto a la distancia geográfica, principalmente entre variedades. Esto permite plantear la necesidad de evaluar más poblaciones en las islas principalmente de las Bahamas, ya que se tiene conocimiento de que habita en otras islas con lo que se podría obtener más información. Por

otro lado, se podrían buscar las razones que expliquen la alta diversidad genética de *Pinus caribaea* las cuales podrían estar relacionados con la diversidad de hábitats que ocupa (tipos vegetación, altitud, tipo de suelos, etc.) que puede haber propiciado procesos de mutación y así, la adquisición de nuevos alelos. No obstante, sería necesario contar con hipótesis robustas del origen del grupo y estudios que involucren los mismos marcadores, para proponer un escenario evolutivo y explicar la tendencia a la alta diversidad. También es importante determinar la posible asociación de esta variación a caracteres de interés forestal como tasa de crecimiento, resistencia a plagas o enfermedades, calidad de madera entre otros, con el fin de buscar aquellas poblaciones o individuos dentro de poblaciones con las mejores características y proponerlos para el manejo específico en plantaciones comerciales, recordando que esta especie es la mas usada en plantaciones fuera de su hábitat natural gracias a sus características de crecimiento.

REFERENCIAS

- Adams, D. C. and F. J. Jackson. (1997). *A phylogenetic analysis of the southern pines (Pinus subsecc. Australes Loudon): biogeographical and ecological implications*. Proceedings of the Biological Society of Washington, 110(4):681-692.
- Al-Rabab'Ah, M. A. (2003). *Evolutionary dynamic of Pinus taeda L. in the late quaternary: an interdisciplinary approach*. Dissertation PhD. Texas A & M University. United States of America. 264 p.
- Alain, H. (1958). *La Flora de Cuba: sus principales características y su origen probable*. Revista Sociedad Cubana Botánica 15:36-59.
- Arteaga, M. B. and A. C. Pérez. (2001). *Pinus maximinoi H. E. Moore: una especie prometedora para plantaciones forestales en el trópico*. Foresta Veracruzana, 3(2):63-70.
- Asprey, G. F. and R. G. Robbins. (1953). *Vegetation of Jamaica*. Ecological Monographs, 23(4):359-412.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste and F. Bonhomme. (1996-2004). Genetix 4.03, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Birks, J. S. and R. D. Barnes. (1990). *Provenance variation in Pinus caribaea, P. oocarpa and P. patula ssp. tecunumanii*. Tropical Forestry Papers. No. 21. 40 p.
- Boshier, D. H., M. R. Chase and K. S. Bawa. (1995). *Population genetics of Cordia alliodora (Boraginaceae), a Neotropical tree. Gene flow, neighborhood, and population substructure*. American Journal of Botany, 82(4):484-490.
- Boys, J., M. Cherry and S. Dayanandan. (2005). *Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of red pine (Pinus resinosa, Pinaceae)*. American Journal of Botany, 92(5):833-841.
- Brookfield, J. F. Y. (1996). *A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency*. Molecular Ecology, 5(3):453-455.
- Butcher, P. A., J. C. Glaubitz and G. F. Moran. (1999). *Aplicaciones de los marcadores microsatélites en la domesticación y conservación de árboles forestales*. Recursos Genéticos Forestales No. 27. Depósito de documentos de la FAO. Departamento de Montes. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 12 p.

- Cato, S. A. and T. E. Richardson. (1996). *Inter- and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and the inheritance of plastids in Pinus radiata D. Don*. Theoretical and Applied Genetics, 93:587-592.
- Cavalli-Sforza, L. L. (1969). *Human diversity*. Proceedings of the 12th international congress of genetics. Tokyo. 3:405-416.
- Corander, J., P. Waldmann and M.J. Sillanpää. (2003). *Bayesian analysis of genetic differentiation between populations*. Genetics, 163:367-374.
- Cornide-Hernández, M. T. (2002). *Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas*. Editorial Feliz Varela. La Habana, Cuba. 366p.
- Crow, J. F. and K. Aoki. (1984). *Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81:6073-6077.
- Culley, T. M., L. E. Wallace, K. M. Gengler-Nowak and D. J. Crawford. 2002. *A comparison of two methods of calculating G_{ST} , a genetic measure of population differentiation*. American Journal of Botany, 89:460-465.
- Challenger, A. (1998). *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro*. CONABIO. Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México. pp. 790-791.
- De Vicente, M. C., C. López and T. Fulton. (2004). *Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de aprendizaje*. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), Roma Italia.
- Delgado, V. P., D. Piñero, A. Chaos, L. Pérez-Nasser and E. R. Alvarez-Buylla, (1999). *High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine Pinus rzedowskii (Pinaceae)*. American Journal of Botany, 86(5):669-676.
- Delgado, P., A. Cuenca, A. E. Escalante, F. F. Molina and D. Piñero. (2002). *Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences*. Revista Chilena de Historia Natural, 75: 27-37.
- Devey, M. E., M. M. Sewell, T. L. Uren and D. B. Neale. (1999). *Comparative mapping in loblolly and radiata pine using RFLP and microsatellite markers*. Theoretical and Applied Genetics, 99:656-662.
- Dow, B. D. and M. V. Ashley. (1998). *High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites*. Journal of Heredity, 89:62-70.

- Dupanloup, I., S. Schneider and L. Excoffier. 2002. *A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations*. *Molecular Ecology*, 11(12):2571-2581.
- Dvorak, W. S., E. A. Gutiérrez, G. R. Hodge, J. L. Romero, J. Stock and O. Rivas. (2000a). *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. En: *Conservation & testing of tropical & subtropical forest tree species by the CAMCORE Cooperative*. Collage of natural resources. Raleigh, N. C., USA. pp. 12-33.
- Dvorak, W. S., A. P. Jordon, G. P. Hodge and J. L. Romero. (2000b). *Assessing evolutionary relationships of pines in the Oocarpae and Australes subsections using RAPD markers*. *New Forests*, 20:163-192.
- Dvorak, W. S., J. L. Hamrick and E. A. Gutiérrez. (2005). *The origin of Caribbean pine in the seasonal swamps of the Yucatán*. *International Journal of Plant Sciences*, 166(6):985-994.
- Dvorak, W. S., K. M. Potter, V. D. Hipkins and G. R. Hodge. (2009). *Genetic diversity and gene exchange in Pinus oocarpa, a Mesoamerican pine with resistance to the pitch canker fungus (Fusarium circinatum)*. *International Journal of Plant Sciences*, 170(5):609-626.
- Echt, C. S., P. Marquardt, M. Hseih and R. Zahorchak. (1996). *Characterization of microsatellite markers in eastern white pine*. *Genome*, 39:1102-1108.
- Echt, C. S., G. G. Vendramin, C. D. Nelson and P. Marquardt. (1999). *Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species*. *Canadian Journal of Forest Research*, 29: 365-371.
- Eckert, A. J. and B. D. Hall. (2006). *Phylogeny, historical biogeography, and patterns of diversification for Pinus (Pinaceae): Phylogenetic test of fossil-based hypotheses*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40:166-182.
- Eguiarte, F. L. E. (1990). *Genética de poblaciones de Astrocaryum mexicanum Liemb., en los Tuxtlas, Veracruz*. Tesis. Centro de Ecología. UNAM. pp. 2-4.
- Eguiarte, F. L. E. and G. A. González. (2007). *De genes y magueyes. Estudio y conservación de los recursos genéticos de tequila y el mezcal*. *Ciencias*, 87:28-35.
- Eguiluz, P. T. (1985). *Descripción botánica de los pinos mexicanos*. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 45 p.
- Elsik, G. C., T. V. Minihan, E. S. Hall, M. A. Scarpa and G. C. Williams. (2000). *Low-copy microsatellite markers for Pinus taeda L.* *Genome*, 43:550-555.

- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. (2005). *Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis*. Evolutionary Bioinformatics Online, 1:47-50.
- Excoffier, L., G. and Heckel, G. (2006). *Computer programs for population genetic data analysis: a survival guide*. Nature Reviews Genetics, 7:745-758.
- Farjon, A. (1996). *Biodiversity of Pinus (Pinaceae) in Mexico: speciation and palaeo-endemism*. Botanical Journal of the Linnean Society, 121:365-384.
- Farjon, A. and B. T. Styles. (1997). *Pinus (Pinaceae)*. Flora Neotropical Monograph 75. New York Botanical Garden, New York. 291 p.
- Farjon, A. (2005). *Pines, drawings and descriptions of the genus Pinus*. 2a. edition. Brill Leiden Boston. Netherlands. 235 p.
- Francis, J. K. (1992). *Pinus caribaea Morelet. Caribbean pine*. Department of Agriculture, Forest Service Southern Forest Experiment Station. New Orleans, US. 10 p.
- Freeland, J. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd. England. 388 p.
- Furlan, R. A., E. S. Mori, E. V. Tambarussi, C. Bueno de Morales, F. A. de Jesús and L. Zimback. (2007). *Estrutura genética de populações de melhoramento de Pinus caribaea var. hondurensis por meio de marcadores microsatélites*. Bragatia Campinas, 66(4):553-563.
- Furnier, G. R. (2004). "Métodos para medir variación genética en las plantas", en: *Manejo de recursos genéticos forestales*. Vargas, H. J., B. V. Bermejo, y F. T. Ledig (eds.). Segunda Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. pp. 20-30.
- Futuyma, D. J. (2000). *Evolutionary Biology*. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA. pp. 365-396.
- Gernandt, D. S., G. Geada López, G. S. Ortiz García and A. Liston. (2005). *Phylogeny and classification of Pinus*. Taxon, 54(1):29-42.
- Goldstein, D. B., A. Ruiz Linares, L. Cavalli-Sforza and W. Feldman. (1995). *Genetic absolute dating based on microsatellite and the origin of modern humans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92:6723-6727.
- González-Martínez S. C., S. Gerber, M. T. Cervera, J. M. Martínez-Zapater, L. Gil and R. Alía. (2002). *Seed gene flow and fine-scale structure in a Mediterranean pine (Pinus pinaster Ait.) using nuclear microsatellite markers*. Theoretical and Applied Genetics, 104:1290–1297.
- Guo, S. and E. Thompson. (1992). *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles*. Biometrics, 48:361-372.

- Hamrick, J. L., D. A. Murawski and J. D. Nason. (1993). *The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations*. *Vegetatio*, 107/108:281–297.
- Hartl, D. L. and A. G. Clark. (1997). *Principles of population genetics*. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 542 p.
- Hedges, S. B. (2006). *Paleogeography of the Antilles and origin of west Indian terrestrial vertebrates*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93(2):231–244
- Hernández, H. (1997). "Programa Nacional de Reforestación: Estrategias de corto y mediano plazo (1995-2000)", en: *Manejo de Recursos Genéticos Forestales*, Vargas, J. J., Bermejo, B. y Ledig, F.T. (eds.). pp. 241-252.
- Heuertz, M.; M. Fineschi, R. Anzidei, D. Pastorelli, L. Salvini, N. Paule, N. Frascaria-Lacoste, J. Hardy, X. Vekemans and G. G. Vendramin (2004). *Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (Fraxinus excelsior L.) in Europe*. *Molecular Ecology*, 13:3437-3452.
- Hicks, M., D. Adams, S. O'Keefe, E. Macdonald and R. Hodgetts (1998). *The development of RAPD and microsatellite makers in lodgepole pine (Pinus contorta var. latifolia)*. *Genome*, 41:797-805.
- Hodge, G. R., W. S. Dvorak and J. L. Romero. (2001). *Growth and provenance variation of Pinus caribaea var. hondurensis as an exotic species*. *Southern African Forestry Journal*, 190:43-51.
- Karhu, A. (2001). *Evolution and applications of pine microsatellites*. Oulu University Press. Oulu, Finland. 52p.
- Karhu, A., C. Vogl, G. F. Moran, J. C. Bell and O. Savolainen. (2006). *Analysis of microsatellite variation in Pinus radiata reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19:167-175.
- Kent, J. and T. E. Richardson. (1997). *Fluorescently labelled, multiplexed chloroplast microsatellites for high-throughput paternity analysis in Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forest Science*, 27:305-312.
- Kimura, M. and G. H. Weiss. (1964). *The stepping stone model of population structure and the decrease of the genetic correlation with distance*. *Genetics*, 49:561-567.
- Kimura, M. and J. F. Crow. (1964). *The number of alleles that can be maintained in a finite population*. *Genetics*, 49:725-738.
- Kimura, M. and T. Ohta. (1978). *Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(6):2868-2872.
- Kostia, S., S.L. Varvio, P. Vakkari and P. Pulkkinen. (1995). *Microsatellite sequences in a conifer, Pinus sylvestris*. *Genome*, 38:1244-1248.

- Krupkin, A. B., A. Liston and S. H. Strauss. (1996). *Phylogenetic analysis of the hard pines (Pinus Subgenus Pinus, Pinaceae) from chloroplast DNA restriction site analysis*. American Journal of Botany 83(4):489-498.
- Krutovskii K. V. and D. B. Neale. (2001). *La genómica forestal para la conservación de la diversidad genética adaptable*. Recursos Genéticos Forestales No. 29. Depósito de documentos de la FAO. Departamento de Montes. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 5 p.
- Kumar, S. and T. E. Richardson. (2005). *Inferring relatedness and heritability using molecular markers in radiata pine*. Molecular Breeding, 15:55-64.
- Latta, R. G. and J. B. Mitton. (1997). *A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in limber pine (Pinus flexilis James)*. Genetics, 146:1153-1163.
- Ledig, F. T. (1998). "Genetic variation in *Pinus*", in: *Ecology and biogeography in Pinus*. Richardson D. M. (ed). Cambridge University Press. pp. 251-280.
- Ledig, F. T., J. J. Vargas-Hernández and K. H. Johnsen. (1998). *The Conservation of Forest Genetic Resources, Case Histories from Canada, Mexico, and the United States*. Journal of Forestry, 96(1):31-41.
- Leyden, B. W. (1984). *Guatemalan Forest synthesis after Pleistocene aridity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81:4856-3859.
- Little, E.L. and K.W. Dorman. (1954). *Slash pine (Pinus elliottii), including south Florida slash pine: Nomenclature and description*. Research Paper No. 36. Department of Agriculture, Forest Service, Southeastern Forest Experimental Station. Asheville, N. C. U.S. 82 p.
- Little, E. L. Jr. and W. B. Critchfield. (1969). *Subdivisions of the genus Pinus (pines)*. United States Department of Agriculture, Forest Service, Washington D. C. Miscellaneous publication 1144. 51 p.
- Lugo, L., A. Mora, C. Suárez and M. Montarulio. (2006). *Relación entre la mortalidad y los suelos en las plantaciones de pino caribeño del oriente de Venezuela*. Revista Forestal Latinoamericana, 39:57-83.
- Mariette, S., D. Chagné, S. Decroocq, G. G. Vendramin, C. Lalanne, D. Madur and C. Plomion. (2001a). *Microsatellite markers for Pinus pinaster Ait.* Annals of Forest Science, 58:203-206.
- Mariette, S., D. Chagné, C. Lézier, P. Pastuszka, A. Raffin, C. Plomion and A. Kremer. (2001b). *Genetic diversity within and among Pinus pinaster populations: comparison between AFLP and microsatellite markers*. Heredity, 86:469-479.

- Matheson, A. C., J. C. Bell and R. D. Barnes. (1989). *Breeding systems and genetic structure in some Central America pine populations*. *Silvae Genetica*, 38:107-113.
- Mirov, N. T. (1967). *The genus Pinus*. The Ronald Press Company. New York, USA. 610 p.
- Myers, N. (1989). *Deforestation rates in tropical forests and their climatic implications*. Friends of the Earth. London, England. 78 p.
- Nason, D. J. (2002). "La estructura genética de las poblaciones de árboles", en: *Ecología y conservación de Bosques Neotropicales*. Guariguata, M. R. y Catan, G. H. (eds.). Libro Universitario Regional. Costa Rica. pp. 300-322.
- Nei, M. (1973). *Analysis of gene diversity in subdivided populations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70:3321-3323.
- Nei, M., F. Tajima and Y. Tateno. (1983). *Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II Gene frequency data*. *Journal of Molecular Evolution*, 19:153-170.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. *Protección ambiental-especies nativas de México de Flora y Fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo*. SEMARNAT, México. 153 p.
- Okoro, O. O. (1984). *Influence of flowering habit of Pinus caribaea var. hondurensis Barr. et Golf. on seed yield*. *Proceedings of Inaugural Meeting of the Botanic Society of Nigeria*, Ilorin, Nigeria.
- Palmberg-Lerche, C. (2001). *Conservación de la diversidad biológica forestal y de los recursos genéticos forestales*. Recursos Genéticos Forestales No. 29. Depósito de documentos de la FAO. Departamento de Montes. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 4 p.
- Pérez, N. (1990). *Biología reproductiva y estructura genética de Psychotria faxlucens (Rubiaceae) en los Tuxtlas, Veracruz*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Petit, R. J., J. Duminil, S. Fineschi, A. Hampe, D. Salvini and G. G. Vendramin. (2005). *Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations*. *Molecular Ecology*, 14:689-701.
- Powell, W., M. Morgante, R. McDevitt, G. G. Vendramin and J. A. Rafalski. (1995). *Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines*. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, 92:7759-7763.

- Poynton, R. J. (1977). *Tree planting in Southern Africa. Vol. 1. The Pines*. Forestry Research Institute. Department of Forestry, Republic of South Africa. 576 p.
- Rajora, O. P., M. H. Rahman, G. P. Buchert and B. P. Dancik. (2000). *Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (Pinus strobus) in Ontario, Canada*. *Molecular Ecology*, 9:339-348.
- Rentaría, A. M. (2007). "Breve revisión de los marcadores moleculares", en: *Ecología molecular*. Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (ed). Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). pp. 541-566.
- Rogers, D. L. and F. T. Ledig. (1996). *The status of temperate North American forest genetic resources*. Report 16. University of California Genetic Resources Conservation Program. Davis, California. 85 p.
- Rousset, F. (1997). *Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance*. *Genetics*, 145:1219-1228.
- Savolainen, O., P. Tanja and T. Knurr. (2007). *Gene flow and local adaptation in trees*. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38:595–619.
- Schnabel, A., R. H. Lauschman and J. L. Hamrick. (1991). *Comparative genetic structure of two co-occurring tree species: Macura pomifera (Moraceae) and Gleditsia triacanthos (Leguminosae)*. *Heredity*, 67:357-364.
- Schuchert, C. (1935). *Historical geology of the Antillean-Caribbean region*. John Wiley & Son, Inc., New York. 881 p.
- Shepherd, M., M. Cross, T. L. Maguire, M. J. Dieters, C. G. Williams and R. J. Henry. (2002). *Transpecific microsatellites for hard pines*. *Theoretical and Applied Genetics*, 104:819-827
- Shepherd, M., M. Cross, M. J. Dieters and R. Henry. (2003). *Genetic maps for Pinus elliottii var. elliottii and P. caribaea var. hondurensis using AFLP and microsatellite markers*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (8):1409–1419.
- Simpson, J. (1997). *Amplified fragment length polymorphisms*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60:73-76.
- Slatkin, M. (1980). *The distribution of mutant alleles in a subdivided population*. *Genetics*, 95:503-523.
- Slatkin, M. and N. H. Barton. (1989). *A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow*. *Evolution*, 43:1349-1368.

- Slatkin, M. (1993). *Isolation by distance in equilibrium and non equilibrium population*. *Evolution*, 47:264-279.
- Slatkin, M. (1994). "Gene flow and population structure", en: *Ecological Genetics*. Editorial L. A. Real. Princeton University Press, Princeton, NJ. pp. 3-17.
- Slatkin, M. (1995). *A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency*. *Genetics*, 139:457-462.
- Smith, D. N. and M. E. Devey. (1994). *Occurrence and inheritance of microsatellites in Pinus radiata*. *Genome*, 37:977-983.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. (1995). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. W. H. Freeman and Co. New York. 887 p.
- Soranzo, N., J. Provan and W. Powell. (1998). *Characterization of microsatellite loci in Pinus sylvestris L.* *Molecular Ecology*, 7:1247-1263.
- Stasolla, C., L. Kong, E. C. Yeung and T. A. Thorpe. (2002). *Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38:93-105.
- Stat-Soft, Inc. (2005). *STATISTICA (data analysis software system)*. Version 7.1, www.statsoft.com.
- Takezaki, N. and M. Nei. (1996). *Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA*. *Genetics*, 144:389-399.
- Takezaki, N., M. Nei. and K. Tamura. (2010). *POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with windows interface*. *Molecular Biology and Evolution*, 27:747-752.
- Tani, N., K. Maruyama, N. Tomaru, K. Uchida, M. Araki, Y. Tsumura, H. Yoshimaru and K. Ohba. (2003). *Genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in Pinus parviflora Sieb. & Zucc. (Pinaceae) populations*. *Heredity*, 91:510-518.
- Tollefsrud, M. M., R. Kissling, F. Gugerli, Ø. Johnsen, T. Skroppa, R. Cheddadi, W. O. Van der Knaap, M. Lataaowa, R. Terhürne-Berson, T. Litt, T. Geburek, C. Brochmann and C. Sperisen. (2008). *Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen*. *Molecular Ecology*, 17:4134-4150.
- UICN. (2010). *Unión internacional para la conservación de la naturaleza*. Lista Roja de Especies Amenazadas. Versión 2010,1. <www.iucnredlist.org>. Consultado el 27 de abril 2010.

- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills and P. Shipley. (2004). *Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data*. *Molecular Ecology Notes*, 4:535-538.
- Van Wyk, G. (2002). "*Pinus caribaea* Morelet", in: *Pines of silvicultural importance*. Forestry Compendium (compiled). CABI Publishing. UK. pp. 38-49.
- Vázquez-Lobo, A. (1996). *Evolución de hongos endófitos del género Pinus L.: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares*. Tesis Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. 66 p.
- Vendramin, G. G., L. Lelli, P. Rossi and M. Morgante. (1996). *A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae*. *Molecular Ecology*, 5:595-598.
- Vidakovic, M. (1991). *Conifers: morphology and variation*. USDA, Forest Service. English edition. CAB International, Wallingford, Oxon. UK. 756 p.
- Wallace, L. E. 2002. *The cost of inbreeding in Plantanthera leucophaea (Orchidaceae)*. *American Journal of Botany*, 90(2):235-242. 2003.
- Waser, P. M. and C. Strobeck. (1998). *Genetic signatures of interpopulation dispersal*. *Tree*, 13:43-44.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham. (1984). *Estimating F-statistics for the analysis of population structure*. *Evolution*, 38:1358-1370.
- Williams C.G. C.G. Elsik and R.D. Barnes. (2000). *Microsatellite analysis of Pinus taeda L. in Zimbabwe*. *Heredity*, 84:261-268.
- Wright, S. (1931). *Evolution in mendelian populations*. *Genetics*, 16:97-159.
- Wright, S. (1943). *Isolation by distance*. *Genetics*, 28:114-138.
- Wright, S. (1951). *The genetical structure of populations*. *Annals of Eugenics*, 15:323-354.
- Wright, S. (1969). *Evolution and the genetics of populations, Vol. 2. The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.
- Yañez, A. V. O. (2002). *Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de Camote (Ipomea batatas (L.) Lam)*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú. Version electrónica. 108 p.
- Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. (2002). *Strategies for microsatellite isolation: a review*. *Molecular Ecology*, 11:1-16.
- Zheng, Y. Q. and R. A. Ennos. (1999). *Genetic variability and structure of natural and domesticated populations of Caribbean pine (Pinus caribaea Morelet)*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98:765-771.

Anexo. Frecuencias alélicas obtenidas con seis microsatélites nucleares para las 16 poblaciones de *Pinus caribaea*.

Locus	T.A.	Poblaciones															
		H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	C1	C2	B1	B2
PtTX2037	206	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.159	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000
	208	0.104	0.000	0.263	0.389	0.250	0.477	0.575	0.060	0.719	0.619	0.354	0.119	0.526	0.222	0.469	0.269
	212	0.125	0.071	0.053	0.111	0.333	0.273	0.275	0.780	0.094	0.262	0.125	0.024	0.289	0.667	0.313	0.308
	216	0.063	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.050	0.000	0.063	0.024	0.063	0.000	0.079	0.056	0.031	0.038
PtTX2123	191	0.000	0.036	0.132	0.000	0.017	0.114	0.050	0.320	0.063	0.119	0.083	0.048	0.105	0.000	0.313	0.000
	198	0.083	0.000	0.237	0.250	0.150	0.295	0.150	0.200	0.313	0.357	0.271	0.214	0.316	0.111	0.219	0.308
	201	0.917	0.964	0.632	0.528	0.717	0.273	0.550	0.320	0.531	0.524	0.396	0.452	0.368	0.222	0.438	0.615
	204	0.000	0.000	0.000	0.167	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.158	0.056	0.031
PtTX2146	155	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.068	0.000	0.020	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.250	0.538
	159	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	162	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.025	0.020	0.000	0.143	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000
	165	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	174	0.000	0.000	0.132	0.306	0.000	0.250	0.125	0.060	0.094	0.381	0.146	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	177	0.333	0.321	0.158	0.167	0.217	0.341	0.125	0.180	0.094	0.119	0.146	0.262	0.553	0.250	0.250	0.154
	181	0.354	0.679	0.237	0.139	0.133	0.182	0.060	0.000	0.188	0.310	0.208	0.095	0.053	0.111	0.000	0.000

Continúa...

	183	0.000	0.000	0.105	0.111	0.133	0.091	0.200	0.160	0.094	0.048	0.042	0.476	0.263	0.417	0.438	0.269
	185	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.068	0.075	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.132	0.083	0.000	0.038
	111	0.250	0.000	0.368	0.222	0.367	0.000	0.450	0.400	0.500	0.000	0.458	0.048	0.000	0.111	0.063	0.000
PITX3013	125	0.021	0.071	0.184	0.028	0.100	0.000	0.125	0.060	0.000	0.024	0.000	0.000	0.316	0.139	0.000	0.192
	128	0.000	0.000	0.000	0.139	0.000	0.023	0.050	0.100	0.000	0.024	0.000	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000
	134	0.875	0.607	0.447	0.278	0.633	0.955	0.475	0.440	0.625	0.571	0.563	0.619	0.632	0.861	0.219	0.615
	136	0.000	0.000	0.000	0.111	0.033	0.023	0.000	0.100	0.000	0.085	0.104	0.143	0.053	0.000	0.031	0.115
	137	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000
	140	0.000	0.000	0.211	0.056	0.200	0.000	0.225	0.260	0.375	0.286	0.292	0.143	0.000	0.000	0.000	0.077
	142	0.104	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000
	145	0.000	0.321	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	111	0.000	0.000	0.158	0.389	0.033	0.000	0.050	0.040	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000	0.688	0.000
PITX3020	167	0.042	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.094	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000
	181	0.313	0.214	0.105	0.472	0.333	0.432	0.325	0.260	0.188	0.286	0.271	0.429	0.158	0.222	0.281	0.115
	185	0.000	0.000	0.053	0.000	0.000	0.045	0.125	0.020	0.156	0.119	0.042	0.071	0.000	0.000	0.000	0.154
	187	0.167	0.214	0.263	0.056	0.200	0.182	0.175	0.100	0.063	0.000	0.083	0.167	0.316	0.472	0.000	0.269
	195	0.479	0.500	0.474	0.361	0.333	0.341	0.275	0.460	0.438	0.500	0.521	0.333	0.316	0.306	0.250	0.154
	111	0.000	0.000	0.105	0.111	0.133	0.000	0.050	0.160	0.063	0.085	0.083	0.000	0.211	0.000	0.438	0.308

Continúa...

PTX3025	247	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	
	252	0.292	0.179	0.237	0.028	0.167	0.091	0.225	0.240	0.156	0.143	0.250	0.286	0.053	0.083	0.156	0.462
	263	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	
	267	0.000	0.000	0.132	0.556	0.500	0.341	0.500	0.360	0.500	0.000	0.271	0.381	0.579	0.222	0.781	0.538
	268	0.667	0.786	0.632	0.361	0.317	0.386	0.225	0.360	0.344	0.810	0.438	0.190	0.105	0.194	0.000	0.000
	272	0.042	0.036	0.000	0.000	0.017	0.045	0.000	0.000	0.000	0.048	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

