

RESUMEN / ABSTRACT

El análisis de la genealogía de alelos o haplotipos ha revolucionado en la última década el estudio de la estructura genética de las poblaciones. En la actualidad no solamente se puede estudiar la cantidad de variación genética en una población, sino también se pueden inferir los procesos que históricamente son responsables de esa estructura genética. Este enfoque está apoyado por la teoría de coalescencia que analiza los patrones de divergencia de alelos o haplotipos bajo diferentes supuestos no sólo relacionados con los aspectos genéticos de las poblaciones sino también con los aspectos demográficos históricos. Estas innovaciones al estudio de la estructura genética tienen impacto en al menos dos grandes áreas de la biología evolutiva. La primera de ellas tiene que ver con los aspectos de conservación de regiones que albergan a las especies estudiadas para generar estrategias de conservación más acorde con los procesos históricos por los que han pasado las especies. La segunda de ellas está asociada a una concepción de la especie que toma en cuenta estos resultados históricos. En este trabajo presentamos los resultados de los análisis que hemos iniciado para generar una estrategia de conservación de los bosques de coníferas mexicanos usando como un sistema modelo el complejo específico formado por *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*. Nuestros resultados muestran que ha habido patrones de fragmentación, aislamiento por distancia y eventos de ampliación del rango de estas especies han ocurrido. Además muestran que el fenómeno de hibridación introgresiva está ocurriendo entre estas especies en forma asimétrica siendo más importante el flujo génico de *P. montezumae* a *P. pseudostrobus* que viceversa.

<sup>1</sup> Artículo por invitación.

\*Departamento de Ecología Evolutiva. Instituto de Ecología, UNAM. Apartado Postal 70-275, México D.F. 04510, México.  
E-mail: pinero@servidor.unam.mx

# Sistemática Filogeográfica y sus Aplicaciones a la Evolución y Conservación de los Bosques de Coníferas en México: El Caso de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus*<sup>1</sup>

Patricia Delgado\* y Daniel Piñero\*

## INTRODUCCIÓN

En el siglo XIX, Darwin, Wallace y otros evolucionistas se dieron cuenta que para entender mejor los patrones de la evolución y en último término los procesos o mecanismos que producen esos procesos, se requería tener un enfoque que tuviera en cuenta tanto los aspectos temporales (esto es el cambio de los linajes en el tiempo) como los aspectos espaciales (la estructura de los linajes en el espacio). La paleontología, entonces se ha ocupado exclusivamente de los patrones temporales de los linajes, mientras que la sistemática, normalmente se ocupa de los patrones actualistas de la diversidad biológica. Otras ramas de la teoría de la evolución como la genética de poblaciones. También ha restringido su área de acción a las especies existentes.

Recientemente, por el impulso que le ha dado Avise (2000) en la última década al estudio de la filogeografía y por otro lado el impulso que la teoría de coalescencia de genes (Hudson 1990; Tavaré, 1984) le ha dado al entendimiento de los patrones históricos de variabilidad genética, se han desarrollado varios programas de cómputo (Posada *et al.*, 2000) que analizan los datos de variabilidad genética en forma explícita tanto en el espacio como en el tiempo.

La forma en la que esta teoría se aplica depende de la expresión en una red de haplotipos si son marcadores multilocus o de alelos si solamente se estudia un locus. Esta red establece una relación de parentesco entre los alelos (Templeton, 2001). Las inferencias biológicas al relacionar esta estructura genética con la estructura geográfica descansan en varios supuestos simples. El primero se refiere a que los haplotipos ancestrales probablemente serán los más abundantes. El segundo es que estos haplotipos más antiguos o ancestrales ocuparán un lugar central en la red de haplotipos. Así, si encontráramos que uno de los haplotipos más antiguos está en el

PALABRAS CLAVE: *Pinus*; filogeografía; hibridación; especiación; conservación.

KEYWORDS: *Pinus*; phylogeography; hybridization; speciation; conservation.

Gene or haplotype analysis has revolutionized during the last decade the study of the population structure in populations. Presently, we can not only study the amount of genetic variation in a population but we can also infer the historical processes that are responsible for the observed genetic structure. This approach is supported by coalescence theory that studies gene and haplotype patterns of divergence under different assumptions not only related to population genetics but also with historical population demography. These innovations to the study of population structure have impact on at least two areas of evolutionary biology. The first one has to do with conservation aspects of regions where the studied species grow by producing conservation strategies as consequence of the historical processes that have affected populations. The second one is related to a species concept that takes into account these historical processes. In this work we present the results of an analysis that we have started in order to generate a conservation strategy of conifer forests in Mexico using as a model the species complex formed by *P. montezumae* and *P. pseudostrobus*. Our results show that fragmentation patterns, isolation by distance and events of range expansion have occurred in these species. They also show that introgressive hybridization is playing an important role on maintaining the structure seen particularly because it is asymmetric being more important from *P. montezumae* to *P. pseudostrobus* than from *P. pseudostrobus* to *P. montezumae*.

borde de la distribución geográfica podríamos suponer que hubo una migración ancestral de ese haplotipo. Si por otro lado los haplotipos ancestrales ocupan posiciones geográficamente separadas pero cercanas a haplotipos que genéticamente son cercanas, entonces la inferencia biológica sugerirá que hubo fragmentación (si no hay haplotipos intermedios en posiciones geográficas intermedias) o flujo genético restringido y aislamiento por distancia (si hay haplotipos intermedios en posiciones geográficas intermedias). Templeton y sus colaboradores han podido desarrollar una metodología para que esta inferencia esté apoyada estadísticamente, así que se pueden tener estimaciones más o menos soportadas acerca de fenómenos históricos que afectaron la diversidad genética y su distribución geográfica.

Estos análisis tienen dos vertientes adicionales que mejoran ampliamente nuestra visión de la naturaleza y de la distribución y formación de las especies.

La primera de ellas, se refiere a que se puede llevar a cabo el mismo análisis para diferentes grupos taxonómicos en las mismas regiones al estilo de los análisis biogeográficos que inició Robert Wallace en el siglo XIX o Humboldt en el siglo XVIII. Estos análisis permiten reconstruir la historia de diferentes regiones o áreas geográficas, estableciendo dónde están los centros de mayor diversidad genética, las migraciones y los efectos que los procesos de vicarianza o fragmentación geográfica han tenido en la distribución actual de la diversidad genética.

La segunda, se refiere a que estos análisis permiten la incorporación de varias especies (las particularmente útiles son aquellas que forman complejos que han divergido recientemente o que se cruzan frecuentemente) lo que permite establecer una historia ya no de una especie solamente sino más bien de un linaje filogenético. Así se puede estudiar con detalle los límites de las especies y aquéllas que son filogenéticamente más cercanas.

Además los datos obtenidos de esta manera, pueden también ser utilizados de dos maneras diferentes para entender la estructura que debe de tener un sistema de conservación.

Por un lado, se pueden establecer mecanismos de conservación que atiendan la parte sistemática de un grupo de organismos, tomando en cuenta no solamente a las especies más útiles, atractivas o raras, sino también atendiendo a la historia evolutiva del linaje como un todo. Así, los procesos evolutivos, al ser mejor entendidos, pueden ser utilizados de una mejor manera en las decisiones que afectan las políticas de conservación de una región o de un linaje.

Un sistema interesante para este tipo de estudios lo proporciona el grupo de las coníferas, para el cual existen varios precedentes del

origen y evolución de especies por hibridación introgresiva (Edwards *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1987; Bucci *et al.*, 1998; Wang y Szmidt, 1990; Matos y Schaal, 2000; Wang *et al.*, 2001). Estos estudios se han desarrollado con diferentes tipos de datos ya sean morfológicos como moleculares. Siendo, actualmente los microsatélites (SSRs), marcadores recomendables para la realización de este tipo de estudios, ya que son altamente polimórficos, son codominantes, selectivamente neutros y compatibles con los supuestos de la genética de poblaciones. En particular para el género *Pinus*, se han desarrollado algunos microsatélites tanto del ADN nuclear (nSSR), como de organelos citoplasmáticos, microsatélites de cloroplasto (cpSSR) y la mitocondria (mtSSR).

Aunado a esto, al ser los microsatélites altamente polimórficos pueden ser ventajosos con relación al uso de secuencias, por un lado, se debe analizar con precaución la variación que se ha encontrado en el ADN nuclear, ya que ésta se puede haber generado por duplicaciones, o por la presencia de familias multigénicas (Rieseberg y Soltis, 1991). Este último genera un alto grado de homogeneidad dentro y entre especies, proceso conocido como evolución concertada. Estos fenómenos pueden distorsionar la historia evolutiva sobre los organismos en estudio y confundir las relaciones filogenéticas (Rieseberg y Soltis, 1991). Es decir, se pueden presentar aparentes reticulaciones, o escenarios de hibridación introgresiva. Por otro lado, estudios que analizan secuencias para estudios intraespecíficos en el ADN citoplasmático (ADN de cloroplasto o mitocondrial) tienen niveles muy bajos de variabilidad y la información que se obtiene a nivel.

Asimismo, se han utilizado secuencias de regiones específicas del genoma, microsatélites y RFLPs para detectar la dinámica histórica de la hibridación introgresiva sobre una genealogía de genes. El análisis de dichas genealogías está basado en una teoría de la genética de poblaciones que se ha desarrollado recientemente, llamada teoría de coalescencia (Tavaré, 1984; Hudson,

1990). Esta teoría se basa en el análisis filogenético de eventos evolutivos que sucedieron en el pasado a nivel de poblaciones. Un árbol de genes muestra cuáles genes son más relacionados con otros y el tiempo cuando ocurrieron los ancestros más comunes de diferentes genes (Hudson, 1990). Cuando los linajes de una población se juntan o "coalescen" en un ancestro común, se conoce como la coalescencia (Hudson, 1990), y la edad de este ancestro común se conoce como el tiempo de coalescencia. Para un gen todos los diferentes alelos de una población tienden a coalescer, ordenando o reconstruyendo así la historia de las poblaciones. Actualmente, existen varios problemas que pueden ayudar a realizar estas reconstrucciones como el "TCS" de Clemen *et al.*, (2000), que proporciona información de las topologías generadas con base a parsimonia con confiabilidad igual o superior al 95%. Además, la genealogía generada puede ser correlacionada con la distribución geográfica de los diferentes genes o haplotipos, realizando un análisis sumamente fino de la relación genealógica y geográfica, así como de las inferencias de los posibles procesos evolutivos que dieron origen a esa dinámica, como, flujo genético, barreras geográficas, aislamiento por distancia, entre otras. (Templeton y Sing, 1993; Templeton *et al.*, 1995; Posada *et al.*, 2000)

Los procesos genealógicos dependen de factores demográficos que son los que nos van a hablar de las mutaciones que son fijadas o perdidas por selección a través de la historia de una población, y que por tanto, nos permiten proyectar un escenario histórico de las poblaciones. Sin embargo, para realizar una reconstrucción de la historia ancestral de haplotipos dentro de linajes particulares, se requiere del uso de genes que tengan tasas de mutación constantes sobre modelos de mutación neutrales. Es decir, que para reconstruir la historia de las relaciones ancestrales el marcador genético no debe de estar influenciado por recombinación, selección o migración, de tal manera que nos hablen únicamente de la historia de los linajes, y que sin embargo nos permita hacer inferencias de la

historia de los procesos genealógicos, que dependen fuertemente de factores como el tamaño de las poblaciones, de la estructura geográfica y de la selección.

Se han realizado varios estudios con base en los análisis de coalescencia utilizando secuencias y sitios de restricción (Templeton y Sing, 1995; Matos y Schaal, 2000), así como de datos de microsatélites. Uno de estos trabajos es el realizado por Matos y Schaal (2000), el cual trata de documentar eventos de hibridación introgresiva entre *Pinus montezumae* y *P. hartwegii*. Para ello hacen un análisis de coalescencia con base en sitios de restricción del ADN de cloroplasto, y demuestra que la hibridación entre estas especies resulta por la captura de cloroplasto entre ambas especies. Este evento es proyectado en una reconstrucción genealógica de familias de haplotipos agrupados no dentro de las especies, sino entre regiones donde las poblaciones de las dos especies crecen asociadas. Sin embargo, este evento no fue reportado significativamente. No encontró muchos polimorfismos y las frecuencias de los polimorfismos más ancestrales fueron bajas. La reconstrucción de la genealogía no proporcionó resultados que nos hablen acerca del proceso histórico de la introgresión, por lo que el aspecto central del trabajo fue la aplicación de los análisis de coalescencia y de métodos robustos para corregir árboles de genes sobre aspectos de hibridación.

Como se puede ver, los microsatélites nucleares (nSSR), son regiones recombinantes para las que la teoría de coalescencia no puede ser aplicada y los microsatélites de cloroplasto (cpSSR) cumplen con todos los supuestos de dicha teoría. Por tanto, el presente trabajo se realizó con dos aproximaciones generales. Por un lado, se usó la teoría clásica de la genética de poblaciones para el estudio de la hibridación introgresiva con ambos marcadores genéticos. Por el otro lado se usaron las bases teóricas y metodológicas de la coalescencia fueron aplicadas en el estudio de la dinámica histórica de la hibridación introgresiva con base en cpSSR.

En este trabajo, se estudió la estructura y diversidad genética, así como se detectaron posibles eventos de hibridación introgresiva en 13 poblaciones de dos especies de pino (*P. montezumae* y *P. pseudostrobus*), representadas por poblaciones alopátricas y simpátricas del área de su distribución natural en México y Guatemala. Para estas especies se han sugerido posibles eventos de hibridación introgresiva. Estas especies están muy relacionadas filogenéticamente, pertenecen a la subsección, Ponderosae (subgénero *Pinus*), y presentan caracteres morfológicos y anatómicos compartidos. Este proyecto fue realizado con datos morfológicos, microsatélites nucleares y microsatélites de cloroplasto porque nos interesa entender cómo se expresa la hibridación en marcadores que se heredan uniparentalmente (cloroplasto) con aquéllos que se heredan biparentalmente (nucleares) y cómo ello se expresa en caracteres que se utilizan comúnmente en el diagnóstico de las especies. En este trabajo se presentan algunos de los resultados obtenidos con los marcadores moleculares tanto nucleares como del cloroplasto para ejemplificar este enfoque de investigación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo con 13 poblaciones de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus* (Tabla 1), que representan poblaciones alopátricas de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* y poblaciones híbridas de ambas especies. Los criterios para definir si las poblaciones son o no híbridas atienden a caracteres morfológicos que tradicionalmente se han utilizado para discriminar entre estas dos especies.

### *Material vegetativo, extracción de ADN y productos de PCR.*

Se colectó tejido vegetativo de 312 individuos de *P. montezumae* and *P. pseudostrobus* para atestiguar polimorfismos intra e interespecíficos con base en 6 cpSSR en un total

Tabla 1. Ubicación geográfica y altitud de los sitios de colecta de las poblaciones tipo; puras y posibles híbridas de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.

Población	Especie	Tipo	Localidad y/o Estado y/o País	Ubicación geográfica	Altitud (msnm)
V1	<i>P. pseudostrobus</i> <i>P. montezumae</i>	Híbrida	Malacatepec, Edo. de México	100°09'4" 19°21'16"	3100
A2	<i>P. pseudostrobus</i> <i>P. montezumae</i>	Híbrida	Anganguaco, Michoacán	100°22'45" 19°32'22"	2850
T3	<i>P. pseudostrobus</i> <i>P. montezumae</i>	Híbrida	Temascaltepec, Edo. de México	100°42'03" 19°28'13"	3100
E4	<i>P. pseudostrobus</i> <i>P. montezumae</i>	Híbrida	Zitácuaro, Michoacán	100°38' 19°60'	1700
S5	<i>P. pseudostrobus</i>	Pura	Tuxtepec, Oaxaca	96°26'31" 96°26'31"	2144
D6	<i>P. pseudostrobus</i>	Pura	Aguililla, Michoacán	102°55'36" 18°49'17"	2370
M7	<i>P. montezumae</i>	Pura	Tlaxcala	98°52'08" 19°50'30"	2100
M8	<i>P. montezumae</i>	Pura	Puebla	98°32' 19°51'	3000
S9	<i>P. montezumae</i> <i>P. pseudostrobus</i>	Híbrida	San Cristóbal, Chiapas	92°25'60" 16°44'25"	2440
H10	<i>P. montezumae</i>	Pura	Ixmiquilpan, Hidalgo	99° 30' 21" 20° 30' 18"	2100
T11	<i>P. montezumae</i>	Pura	Totonicapán, Guatemala	91° 24' 08" 14° 55' 60"	2374
G12	<i>P. pseudostrobus</i>	Pura	Caoqué, Jalpa Guatemala	90° 41' 66" 14° 38' 23"	2043
C13	<i>P. montezumae</i>	Pura	Cuernavaca, Morelos	99° 30' 20" 19° 42' 41"	2010

de 13 poblaciones; se colectaron 5 poblaciones puras de *P. montezumae*, 3 puras de *P. pseudostrobus* y 5 putativas híbridas. Las poblaciones con híbridos putativos se definieron de la información preexistente de su ubicación geográfica y con base en diferencias morfológicas de acículas, conos y corteza (Delgado en preparación). Se extrajo ADN genómico utilizando el método de extracción Miniprep CTAB, modificado por Vázquez-Lobo (1996). Los 6 cpSSR (T)n pares de iniciadores que se usaron fueron derivados del cloroplasto secuenciado de *Pinus thumbergii*; Pt1254, Pt9400, Pt1520, Pt3025, Pt7195, Pt8730 (Vendramin *et al.*, 1996). Las amplificaciones fueron realizadas con base en el método propuesto por Vendramin *et al.*, (1996). Los fragmentos fueron obtenidos con un secuenciador automático (Pharmacia). Se uti-

lizaron marcadores de tres SSRcp pares de iniciadores que producen tres diferentes fragmentos (50, 100 and 150 bp). La separación de los fragmentos se realizó sobre geles desnaturantes de poliacrilamida al 6% (7M Urea) de 0.35 mm de espesor y se corrieron a 1350 V, durante 80 min.

#### *Diversidad genética y subdivisión de las poblaciones.*

Todas las estimaciones se obtuvieron con base en las frecuencias de los haplotipos, que resultan de la combinación de alelos de todos los SSRcp bajo el modelo de mutación de un paso (SMM). Se obtuvieron estimaciones de la diversidad genética dentro de las poblaciones ( $H_E$ , Slatkin, 1995) y la media del número de dife-

rencias para pares de haplotipos ( $\pi$ , Tajima, 1993). La divergencia entre poblaciones fue calculada con el modelo IAM ( $F_{ST}$ ) y SMM ( $R_{ST}$ ). Un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), se utilizó para analizar la estructura genética de tres grupos de poblaciones, el primero formado por cinco poblaciones de *P. montezumae*, el segundo por 5 híbridas y el tercero por tres de *P. pseudostrobus*: Los componentes de variación se dividieron en tres grupos: entre grupos  $\emptyset CT$ , entre poblaciones dentro de grupos  $\emptyset SC$  y dentro de poblaciones  $\emptyset ST$ . La significancia de los valores fue obtenida por 1000 permutaciones no paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992). El flujo genético ( $Nm$ ) se estimó indirectamente a partir de la  $R_{ST}$  siguiendo la fórmula propuesta por Slatkin, (1991). Para la obtención de los parámetros y estadísticos estimados se usó el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000).

### *Reconstrucción filogenética y coalescencia.*

El conjunto de haplotipos obtenidos fue utilizado para la elaboración de una matriz de distancias genéticas ( $D_A$ ) de acuerdo a Nei *et al.*, (1983). A partir de las distancias genéticas ( $D_A$ ) se realizó un análisis de neighbour-joining con base a el modelo SMM (Slatkin, 1995), tanto para las poblaciones puras de *P. montezumae* (3) y de *P. pseudostrobus* (5) utilizadas como control, así como para el total de las poblaciones (13). Su significancia se estimó a través de una prueba de 1000 permutaciones (Takezaki y Nei, 1996). Para la reconstrucción del filograma (neighbour-joining), se usó el programa NJBAFD (Takezaki, 2000).

Posteriormente se realizó una selección de los haplotipos que presentaron frecuencias absolutas superiores a 2, que fue el valor de la frecuencia mínima de haplotipos compartidos entre poblaciones, y de haplotipos diagnóstico compartidos entre especies y poblaciones putativas híbridas para la elaboración de una matriz y reconstruir un árbol genealógico de mínima extensión (MST) entre haplotipos (Excoffier y Smouse, 1994). El árbol de genes reconstruido

se considera como una variable para estimar estadísticos poblacionales, que están relacionados con los componentes de variación y que están en función explícita de la información filogenética. El árbol de mínima extensión fue construido con el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000). Por otra parte, la misma matriz de distancias genéticas absolutas se usó para reconstruir una red de haplotipos con base en la estimación de los límites de parsimonia de acuerdo a Templeton (1992). Este procedimiento comienza calculando el máximo número de pasos mutacionales entre haplotipos siguiendo las conexiones más parsimoniosas con una probabilidad igual o mayor que 0.95 (Templeton, 1992). La red de haplotipos fue obtenida con el programa TCS (Clement *et al.*, 2000). La corrección de ambigüedades para la red de haplotipos fue realizada con base en la metodología propuesta por Crandall *et al.*, (1994). Las asociaciones que generaron muchas ambigüedades fueron corregidas de acuerdo a uno de los supuestos de la coalescencia donde los haplotipos más frecuentes son los más ancestrales, e internos (Crandall *et al.*, 1994). Posteriormente, cuando las probabilidades de unión de dos o más haplotipos eran las mismas (de acuerdo a las frecuencias), se corrigió utilizando las diferencias de una base entre pares de haplotipos como la conexión más parsimoniosa. Finalmente, el análisis de clados anidados de los haplotipos con relación a su distribución geográfica (Nested Cladistic Analysis: NCA), así como las inferencias de la demografía histórica fueron determinados con la metodología de Templeton *et al.*, (1995), y con el uso del programa GeoDis, de Posada *et al.*, (2000).

## RESULTADOS

### *Diversidad genética y subdivisión de las poblaciones.*

Las amplificaciones de PCR de 18 microsatélites de cloroplasto confirman la presencia de los fragmentos en las especies de estudio. De 18 cpSSR ensayados, 6 fueron

polimórficos. El tamaño de los fragmentos varió de 2 a 8 pb. Se obtuvo un total de 29 alelos (de 4 a 6 alelos por locus) y 146 haplotipos. Se presentó un alelo único en la población D6 (Pt7195:143 pb) y en las poblaciones S5 y G12 de *P. pseudostrobis*. (Pt8730:159 pb). En *P. montezumae* se encontró solo un alelo único en las poblaciones M7 y M8 (Pt1254: 64 pb). En algunas de las poblaciones mezcladas se encontraron alelos únicos como en las poblaciones T3, E4 y S9 (Pt7195: 144 pb) y en las poblaciones A2 y T3 (Pt1520:124). Los alelos únicos que se presentaron en haplotipos diagnóstico para cada especie fueron: para *P. pseudostrobis* el 66, 146, 163, 125, 141 y 90, para *P. montezumae* el 145, 127, y 140. El 69% de los 146 haplotipos presentaron frecuencias menores a 0.05 entre los 312 individuos analizados. Para *P. montezumae* 48 de 53 (90.6%), en *P. pseudostrobis* 39 de 42 (93%) y para las poblaciones mezcladas 70 de 72 (97%). Los haplotipos más frecuentes fueron: 67, 147, 160, 126, 141, 89, tanto en poblaciones puras como mezcladas. Los haplotipos más frecuentes para las poblaciones puras de *P. montezumae* fueron: (67, 147, 161, 126, 141, 89), (67, 147, 161, 126, 140, 89), (67, 147, 161, 126, 140, 88) y (67, 146, 161, 127, 141, 89). Para *P. pseudostrobis* los haplotipos: (67, 147, 160, 126, 141, 89) y (67, 147, 159, 126, 141, 89) y para las poblaciones mezcladas el haplotipo: (67, 146, 163, 126, 141, 89). Los haplotipos con frecuencias absolutas superiores a 2, así como los haplotipos diagnóstico (compartidos entre las dos especies e híbridos) se presentan en la Tabla 2.

Considerando las frecuencias de los 146 haplotipos para el análisis, se encontró que en todos los parámetros estimados las poblaciones más diversas genéticamente ( $H_E$ ) fueron T3 ( $H_E = 0.5404$ ) y E4 ( $H_E = 0.5115$ ). Dichas poblaciones han sido identificadas como posibles híbridas por lo que están representadas por individuos de las dos especies en estudio (Tabla 3). Para *P. montezumae* se obtuvieron valores altos en dos poblaciones M7 ( $H_E = 0.4752$ ) y M8

( $H_E = 0.448$ ) seguido de dos poblaciones de *P. pseudostrobis* la población S5 ( $H_E = 0.4571$ ) y la 6D ( $H_E = 0.4130$ ). Los valores más bajos se presentaron en las poblaciones distribuidas en Guatemala, en la población G11 ( $H_E = 0.0779$ ) y la población T11 ( $H_E = 0.0616$ ) para *P. pseudostrobis* y *P. montezumae* respectivamente (Tabla 3).

Similarmente, para la divergencia genética entre poblaciones los valores más altos se presentaron en las poblaciones híbridas usando los modelos SMM e IAM en la estimación ( $R_{ST} = 0.449$ ;  $F_{ST} = 0.273$ ) seguido de las poblaciones puras de *P. montezumae* ( $R_{ST} = 0.258$ ;  $F_{ST} = 0.270$ ). La menor diferenciación entre poblaciones se presentó en *P. pseudostrobis* ( $R_{ST} = 0.166$ ;  $F_{ST} = 0.146$ ) (Tabla 3). El análisis jerárquico de la varianza molecular fue relativamente alto entre poblaciones ( $R_{ST} = 0.4037$ ;  $P < 0.000$ ) y entre poblaciones dentro de grupos ( $R_{SC} = 0.3483$ ;  $P < 0.000$ ). Mientras que la diversidad media entre grupos ( $R_{CT}$ ) fue de 0.0844 ( $P = 0.05$ ). El porcentaje de la variación total que corresponde a la diversidad entre grupos fue de 8.44 %, entre poblaciones dentro de grupos de 31.93%, dejando el mayor porcentaje de haplotipos dentro de las poblaciones con 59.63%. Las estimaciones del flujo genético oscilaron entre 1.272 y 3.52 con una media de 1.45 lo cual sugiere que existe un intercambio genético moderado entre las poblaciones de ambas especies analizadas.

### Reconstrucción filogenética y coalescencia.

Primeramente, realizamos la reconstrucción de un árbol de neighbour-joining basado sobre las distancias genéticas de Nei ( $D_A$ ) que incluye las poblaciones puras de cada especie para utilizarlo como control de clasificación de las especies para los análisis posteriores. El resultado reveló dos grupos definidos (figura no mostrada), cada uno conformado por las poblaciones de cada especie. El dendrograma obtenido para las 13 poblaciones muestra dos grupos; el primer grupo está formado tanto por las poblaciones putativas híbridas como las poblaciones pu-

**Tabla 2.** Frecuencias absolutas de los haplotipos diagnóstico obtenidas en 13 populations of *P. montezumae*, *P. pseudostrobis* e híbridas. En la primer columna se indica el número de los haplotipos diagnóstico y el número de los haplotipos de las frecuencias totales. En la segunda columna se indican los haplotipos de seis cpSSR (Pt1250, Pt7195, Pt8739, Pt31520, Pt3025, Pt9400, respectivamente). Las columnas indican las frecuencias absolutas obtenidas para cada población.

Haplotipo	VI	A2	T3	E4	S5	D6	M7	M8	S9	H10	T11	G12	C13	Total
1-1 (67/147/160/126/141/89)	9				3	1					5		4	22
2-2 (67/146/160/126/136/89)	2				2									4
3-3 (67/147/161/126/136/89)	1									1				2
4-4 (67/147/160/125/141/89)	1										1			2
5-6 (67/146/160/126/142/90)	2		2	1										5
6-7 (67/146/160/126/141/89)	3				1	2			1		2			9
7-9 (66/147/160/126/141/89)	1					3								4
8-10 (67/147/160/126/140/89)	1						3							4
9-11 (67/148/161/126/141/89)	1									1	1			3
10-12 (67/146/163/126/141/89)		8	1											9
11-18 (67/146/163/126/142/90)		1	1											2
12-19 (67/146/163/126/142/89)		2												2
13-21 (66/146/163/126/141/89)		1				1								2
14-22 (67/145/163/125/142/89)		1	1											2
15-24 (67/145/163/125/141/89)		2												2
16-27 (68/146/160/126/141/89)			2											2
17-30 (66/146/160/126/141/89)			1		1	1								3
18-43 (67/147/160/126/141/90)				3	2	1								6
19-44 (67/147/161/127/141/89)				1								5	1	7
20-52 (67/146/160/126/141/90)				3	3				1					7
21-58 (67/147/161/127/140/89)				1			1						1	3
22-59 (67/145/160/126/141/90)				1		1			4					6
23-62 (67/146/160/126/136/90)					2									2
24-65 (67/147/160/126/142/90)					2									2
25-68 (67/147/161/127/142/89)					1							1		2
26-72 (67/148/160/126/141/89)						1					2			3
27-74 (67/146/160/125/141/89)						2								2
28-76 (67/145/160/126/141/89)						2	1		4					7
29-81 (67/145/161/126/141/90)						2								2
30-85 (67/147/161/126/141/88)							2	5						7
31-86 (67/147/161/125/140/88)							2							2
32-92 (67/145/160/126/140/89)							1		1					2
33-94 (66/147/161/125/141/89)							2							2
34-95 (67/147/161/126/141/89)								1		7			12	20
35-96 (67/147/163/126/140/89)							1	1		1				3
36-98 (67/147/161/126/140/89)							2			6			3	11
37-99 (67/147/161/125/141/89)								2		2				4
38-100 (67/147/161/126/140/88)								2						2
39-107 (68/146/161/126/141/88)								2						2
40-114 (66/145/160/126/141/89)									2					2
41-116 (66/145/160/125/141/90)									2					2
42-121 (67/144/160/126/141/89)									2					2
43-129 (67/147/159/126/141/89)											4			4
44-137 (67/145/161/127/141/89)												4		4
45-138 (67/146/161/127/141/89)												7		7
46-146 (67/147/160/127/140/89)													2	2
<b>Total</b>														<b>206</b>

ras de *P. pseudostrobis*. Mientras que el segundo, está representado por las poblaciones puras de *P. montezumae* (Fig. 1). Estos resultados sugieren por un lado, que las poblaciones híbridas son filogenéticamente más relacionadas a las poblaciones puras de *P. pseudostrobis* que a las poblaciones de *P. montezumae*, y por el otro lado, que la introgresión es unidireccional, con introgresión de material citoplasmático de *P. montezumae* hacia las poblaciones híbridas y de *P. pseudostrobis*.

Las relaciones genealógicas de los 46 haplotipos, con base en el árbol de mínima extensión (MST), forman tres grupos de haplotipos; el primero que está conformado por la mayoría de haplotipos de *P. montezumae*, especie a la cual pertenecen los dos haplotipos con mayores frecuencias (H1 y H34), mezclados con haplotipos también presentes en individuos híbridos y de *P. pseudostrobis*. El segundo grupo está conformado por la mayoría de los haplotipos presentes en *P. pseudostrobis* y los



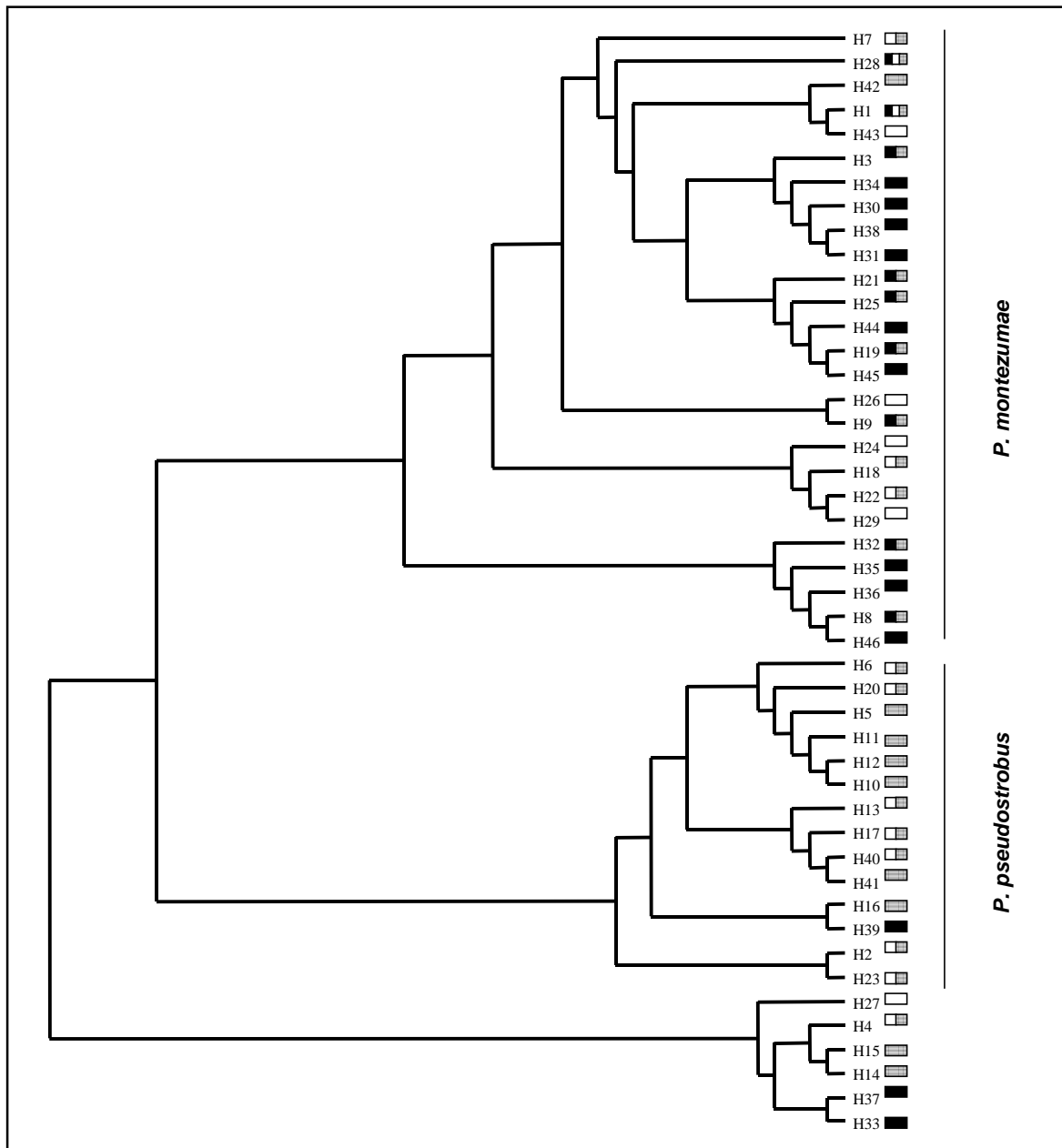
**Tabla 3.** Estimados de la variación y estructura genética de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobis* e híbridas, en México y Guatemala (las estimaciones de la estructura genética fue obtenida con los modelos IAM y SMM). N= Tamaño de muestra; A= número de alelos; H= número de haplotipos;  $H_E$  = Diversidad genética;  $\pi$ = Media de diferencias entre pares de haplotipos;  $F_{ST}$  = diferenciación genética entre poblaciones de acuerdo al modelo de mutación paso a paso (SMM);  $R_{ST}$  = diferenciación genética de acuerdo al modelo de mutación de alelos infinitos (IAM).

Especie							IAM	SMM
Población	N	A	H	$H_E$	$\pi$	$F_{ST}$	$R_{ST}$	
<b>Posibles híbridas</b>								
V1	24	10	11	0.272(0.186)	1.63(1.00)			
A2	24	14	15	0.298(0.199)	0.74(1.00)			
T3	24	21	19	0.540(0.322)	3.24(1.73)			
E4	24	20	20	0.512(0.307)	3.07(0.51)			
S9	24	15	15	0.345(0.223)	2.07(1.20)			
Media		16	16	0.393(0.248)	2.37(1.09)	0.27	0.45	
<i>P. pseudostrobis</i>								
S5	24	15	17	0.457(0.280)	2.74(1.51)			
D6	24	15	19	0.413(0.258)	2.48(1.39)			
G12	24	13	14	0.078(0.092)	1.44(0.91)			
Media		14	16	0.316(0.210)	2.20(1.27)	0.15	0.17	
<i>P. montezumae</i>								
M7	24	16	18	0.475(0.289)	2.85(1.56)			
M8	24	17	17	0.449(0.276)	2.69(1.48)			
H10	24	18	12	0.240(0.169)	1.44(0.91)			
T11	24	13	9	0.062(0.073)	0.31(0.33)			
C13	24	8	11	0.179(0.136)	1.07(0.73)			
Media		14	13	0.281(0.210)	1.68(1.00)	0.27	0.26	
<b>Media general</b>		<b>15</b>	<b>15</b>	<b>0.330(0.210)</b>	<b>1.97(1.00)</b>	<b>0.23</b>	<b>0.29</b>	

híbridos. Un tercer clado está conformado tanto por un haplotipo de *P. pseudostrobis* e híbridos y por dos haplotipos de *P. montezumae*. Los resultados sugieren que las poblaciones presentan una introgresión ancestral, ya que uno de los haplotipos de mayor frecuencia y por tanto más ancestral (H1), está representado en las dos especies y en una población híbrida (V1). Nuevamente, se observa una introgresión asimétricamente mayor de *P. montezumae* hacia las poblaciones de *P. pseudostrobis* (datos no mostrados).

Los valores de parsimonia obtenidos para la reconstrucción de la red de haplotipos fueron altos en todos los pasos ( $P = 0.95$ ). Sin embargo, se generaron varias ambigüedades fundamentalmente de homoplasias entre los

haplotipos H1-H34, H36-H35-H10, H1-H28-H42, y H16-H39-H17, las cuales fueron corregidas como se describe en el apartado de materiales y métodos. La red de haplotipos muestra a dos de los haplotipos más frecuentes como centros de diferenciación (H34 y H1) cada uno forma parte de un subgrupo 4-1 y 4-2 respectivamente (Fig. 2). El subgrupo 4-1 incluye a 23 haplotipos, la mayoría representados por *P. montezumae*, los cuales integran a las 13 poblaciones estudiadas. El subgrupo 4-2 está formado por 22 haplotipos de los cuales la mayoría pertenecen a la especie *P. pseudostrobis*, conformado por haplotipos de 8 de los sitios de estudio. Estos dos subgrupos concuerdan con el filograma obtenido, excepto que en el filograma se muestra un tercer grupo formado por 6 haplotipos, los que están representados en el

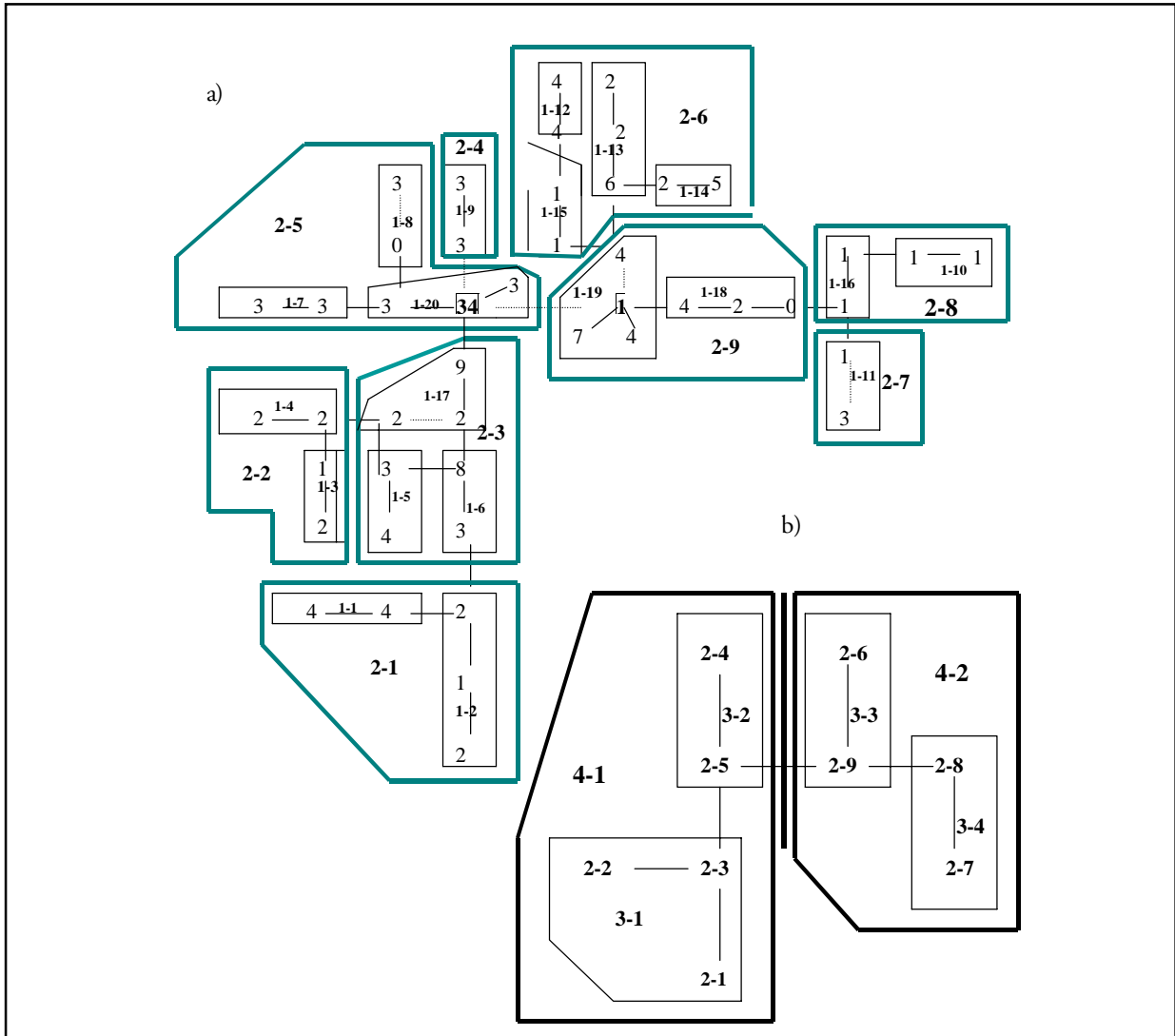


**Figura 1.** Relaciones genealógicas de los haplotipos (cpSSR) con base en el método de mínima extensión (MST), de Excoffier y Smouse (1994). Los rectángulos negros representan a los haplotipos obtenidos en las poblaciones puras de *P. montezumae*, los rectángulos blancos representan a los haplotipos de las poblaciones puras de *P. pseudostrobilus*, los rectángulos grises representan a los haplotipos diagnóstico de las poblaciones putativas híbridas, los rectángulos con dos o tres colores representan a las combinaciones de haplotipos presentes en los tres tipos de poblaciones ( $p = 0.05$ ).

grupo 4-2 de la red de haplotipos. H4 y H27 pertenecen a *P. pseudostrobilus* y son haplotipos internos, dos haplotipos de híbridos H15 y H14 que son externos, y los haplotipos H33 y H37 que fueron corregidos por las diferencias en sus tamaños con relación a los haplotipos que los conectan, quedando dentro del subgrupo-1 como

haplotipos terminales, pero muy cercano al haplotipo H34 interno y ancestral.

Los resultados del análisis de clados anidados y las distancias geográficas se muestran en la Fig. 2. Los patrones predominantes indican un evento inicial de continua expansión del área del



**Figura 2.** Análisis de clados anidados de las distancias geográficas con relación a 46 haplotipos obtenidos con cpSSR, de 13 poblaciones de *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*, e híbridas. Las diferentes columnas de izquierda a derecha muestran el incremento de los niveles de anidamiento, hasta el clado 5-1. Los recuadros reflejan la estructura de los clados anidados del nivel inferior inmediato. Los haplotipos se representan al principio del esquema (izquierda). Los niveles de los clados (No), las distancias de los clados (Dc) y de los clados anidados (Dn), se presentan en la parte superior del esquema. Una “S” subíndice indica que la distancia es significativamente pequeña al 95% de confiabilidad, y una “L” subíndice indica que la distancia es significativamente grande. Así como para los clados o haplotipos terminales “T” o internos “I”. Estas distancias también son agrupadas en la parte inferior de los recuadros, indicados por el símbolos “I-T”.

clado 4-1, representado fundamentalmente de haplotipos de *P. montezumae*, seguido de flujo genético con aislamiento por distancia y fragmentación. Mientras que en el clado 4-2 se presentó un patrón inicial de flujo genético restringido, resultado del aislamiento por distancia, seguido de un proceso de colonización, y en los clados más externos o terminales fragmenta-

ción y asilamiento por distancia. Este clado está representado fundamentalmente por haplotipos de *P. pseudostrobus* e híbridos. Nuevamente, se observa un patrón claro de introgresión de haplotipos de *P. montezumae* hacia las poblaciones de *P. pseudostrobus*, donde la introgresión se representa en el clado 2-3, muy cerca del centro del clado 4-1 por lo que es un clado

interno, y el clado 2-2 que es terminal o externo. Este resultado sugiere un patrón de introgresión ancestral.

## DISCUSIÓN

En este estudio, se demostró que los marcadores cpSSR pueden ser de gran ayuda para discriminar especies o taxa que estén muy relacionadas filogenéticamente, como es el caso de *P. montezuma* y *P. pseudostrobus*. En estudios similares que utilizan otros marcadores, el número de haplotipos específicos por especie es menor (Matos y Schaal, 2000; Wagner *et al.*, 1987; Kutil y Williams, 2001), o bien, no se obtienen fragmentos específicos para cada especie. Este estudio que trata sobre la estructura genética e introgresión de las mismas especies pero con base a microsatélites nucleares, donde la recombinación genética no permitió detectar con claridad la dinámica de la introgresión. Al detectar un mayor número de polimorfismos así como polimorfismos específicos de las especies y de poblaciones híbridas, los cpSSR pueden ser considerados potencialmente útiles para realizar estudios finos de la dinámica histórica de las especies y de la introgresión en el género *Pinus*.

### Variación y estructura genética.

La hibridación introgresiva es central en estudios evolutivos y de especiación. Este proceso ha sido ampliamente documentado en varias especies de pinos (Lanner, 1974; Bucci *et al.*, 1998; Matos y Schaal, 2000), y que por lo menos hasta ahora se conoce que ha dado origen a una especie, *P. densata*, por introgresión ancestral (Wang y Szmids, 1990; Wang *et al.*, 2001). En particular para las dos especies en estudio, se tiene conocimiento de que *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* son capaces de intercambiar material genético, evidenciado por características morfológicas en las poblaciones naturales (Perry, 1991) y en plantaciones artificiales (De la Garza y Nepomuceno; INIFAP com. pers.). En este estudio, nosotros obtuvi-

mos valores de diversidad genética, tanto de  $H_E$  como de  $\pi$  relativamente altos, comparables a los obtenidos con cpSSR para otras especies de pino de amplia distribución geográfica, como *P. leucodermis* ( $H_E = 0.316$ ; Powell *et al.*, 1995), y *P. halepensis* ( $H_E = 0.222$ ; Bucci *et al.*, 1998). Además, los valores obtenidos para ambos estimadores en las poblaciones putativas híbridas fueron superiores a las poblaciones puras de cada especie. Este resultado es un indicador de que existe introgresión en las poblaciones mezcladas, en este caso las poblaciones que presentaron mayores valores de diversidad genética fueron dos de las poblaciones ubicadas en el Estado de México dentro del Eje Neovolcánico. Esta región ha sido denominada como centro de origen de nuevas especies de plantas por la hibridación introgresiva (Rzedowski, 1978).

Es interesante observar que la estructura genética en promedio para todas las poblaciones fue marcada ( $R_{ST} = 0.302$ ), promedio que cae en el rango obtenido con cpSSR para otras especies de pinos, como del complejo *Halapensis* (0.074- 0.32; Bucci *et al.*, 1998), o del complejo *montezumae*, con RFLPs de cloroplasto (0.014-0.475; Matos y Schaal, 2000), así como con el promedio general que se ha obtenido para todas las especies del género estudiadas ( $F_{ST} = 0.240$ , Delgado *et al.*, 2002). El mayor valor de estructura genética se encontró entre las poblaciones híbridas ( $R_{ST} = 0.450$ ), resultado que, aunado a la presencia de haplotipos únicos en varias de estas poblaciones puede sugerir que la hibridación introgresiva ha ocurrido de manera continua a través de muchas generaciones, y que en la actualidad se ve reflejada en existencia de variantes novedosas o propias de los individuos híbridos que habitan en estos sitios.

### Relaciones genealógicas.

También, encontramos fuerte evidencia de incorporación de material citoplasmático de manera unidireccional en las relaciones filogenéticas de las poblaciones estudiadas así como de los haplotipos. Como se observa en la Fig. 1,

las poblaciones de *P. montezumae* se agrupan en un grupo claramente definido, mientras que las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* y las poblaciones putativas híbridas se agrupan en un segundo clado. Topología que se observa más claramente en las relaciones genéticas de los haplotipos donde varios haplotipos obtenidos en individuos de las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* e híbridas son más relacionados genealógicamente con los haplotipos de *P. montezumae*, que con *P. pseudostrobus*, por lo que se agrupan dentro del clado que representa a *P. montezumae* (Fig. 1). Estos resultados indican dos aspectos relevantes, el primero que las poblaciones híbridas son originales o indígenas de *P. pseudostrobus*, y que presentan haplotipos recientes o novedosos. Segundo, que la introgresión ocurre a través del polen de las poblaciones de *P. montezumae* hacia las poblaciones de *P. pseudostrobus*, donde estas poblaciones actúan en su mayoría como árboles madre o receptoras de polen.

#### *Análisis de clados anidados e inferencias históricas.*

Recientemente se ha demostrado que el análisis de la estructura genética es más robusto utilizando los métodos de coalescencia, para analizar la estructura genealógica de los genes o haplotipos con relación a su distribución geográfica (Templeton, 1998). Estos métodos se están aplicando actualmente a nivel supraespecífico pero con taxa que son poco divergentes como es el caso de las especies en estudio (Crandall *et al.*, 1994). Los datos obtenidos para las especies estudiadas sugieren un alto nivel de estructura geográfica de las poblaciones. Esto indica que los grupos de anidamiento están formados por linajes independientes, en este caso, de dos linajes evolutivos representados en los niveles más altos en el análisis. Esto es, por el clado-4-1, conformado en su mayoría de haplotipos de *P. montezumae* y el clado 4-2 representado en su mayoría por haplotipos de *P. pseudostrobus*. Así como un tercer linaje no independiente representado por la introgresión

citoplasmática de *P. pseudostrobus* dentro del clado 4-1 de *P. montezumae*, linaje que al ser dependiente del linaje de *P. montezumae* (clado 4-1), podría encontrarse en procesos de especiación.

Las asociaciones de los diferentes haplotipos y clados de anidamiento nos indican dos procesos importantes de la historia demográfica de las poblaciones de acuerdo a la clave sugerida por Templeton (1995). El primero es un modelo de expansión contigua del área (clado 4-1). Este modelo fue descrito por Cann *et al.*, (1987), y supone que la expansión de las poblaciones se debe a la dispersión de los individuos en áreas contiguas, como un movimiento gradual a través del tiempo marcado por eventos de coalescencia en el cloroplasto. Ejemplos de expansión se observan en todos los niveles de anidamiento: clados 1-4, 1-20, 3-1, y 4-1. Así como eventos de flujo genético por aislamiento por distancia en varios de los grupos de anidamiento de nivel más bajo como el clado 1-2, 2-1 y 2-2. La mayoría de los episodios de flujo genético, incluyen a los clados representados por haplotipos de *P. montezumae* e híbridos, estos últimos conforman un linaje evolutivo, que incluye introgresión ancestral dentro de los clados 2-1, 2-2 y 2-3, probablemente iniciada durante el evento más fuerte de expansión, representado dentro del clado 4-1. Otro proceso demográfico interesante es el de fragmentación que se detectó en los clados 1-6, 1-9 y 2-5. Los haplotipos que conforman estos clados están representados por poblaciones puras de *P. montezumae* distribuidas en Puebla, Hidalgo Tlaxcala y Morelos. Tenemos entonces, dos rutas de los procesos, la primera una expansión contigua del rango a la parte NE seguido de fragmentación, y segundo, una expansión de la parte NW seguida de flujo genético y episodios recientes de fragmentación en poblaciones de *P. montezumae*, flujo genético en poblaciones híbridas y de *P. pseudostrobus*, y de expansión contigua en poblaciones de *P. montezumae* y poblaciones híbridas. En contraste, la otra parte de la historia (clado 4-2), está representada por eventos de flujo genético debido al aislamiento

por distancia en todos los niveles de anidamiento, clado representado por haplotipos de *P. pseudostrobus* e híbridos. En algunos clados más terminales del clado 3-3 y 3-4, se observaron procesos de colonización (clado 2-6) y expansión (2-7). Es de gran interés observar el clado 2-6 donde se presentó el evento de colonización, que es definido como el establecimiento abrupto o rápido de una población en una nueva área geográfica (Templeton, 1998). Este clado está conformado por haplotipos de las poblaciones puras de *P. pseudostrobus* y las poblaciones híbridas distribuidas en el Estado de México y Michoacán, y que forman parte del Eje Volcánico Transversal, además de Chiapas, Oaxaca y Guatemala, este clado incluye a los haplotipos más recientes. Por otra parte, es importante mencionar que el único evento de expansión contigua registrado en este clado (4-2), fue para un haplotipo (H35) de *P. montezumae* y un híbrido (H10) en el clado 1-11, estos haplotipos generaron homoplasias dentro de la red, las cuales no se lograron corregir claramente por lo que su interpretación demográfica debe verse con cuidado. Resumiendo, los eventos evolutivos determinados en el clado 4-2 indican que históricamente se han presentado eventos de aislamiento por distancias seguidos por un evento de colonización y nuevamente flujo genético con aislamiento por distancia. Este patrón es interesante ya que muestra que por un lado, varios de los haplotipos se presentan tanto en poblaciones híbridas como puras de *P. pseudostrobus* y por otro lado, que algunos de los haplotipos catalogados como híbridos representan haplotipos externos, por lo que podrían ser de origen reciente por hibridación.

En general se puede decir que *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* son dos especies distintas con gran capacidad de intercambiar material genético y donde las restricciones reproductivas no son muy fuertes. También, se demostró que la información de caracteres morfológicos como evidencia de hibridación introgresiva, sigue siendo diagnóstica de hibridación, ya que especies con poblaciones que muestran morfologías mezcladas (como en el presente estudio), esto se corro-

bora con datos moleculares, donde la hibridación introgresiva es más factible de detectar en comparación a especies con caracteres morfológicos disímiles, donde la detección de eventos de introgresión es esporádica. Tal es el caso del estudio de Matos y Schaal (2000), donde se detectaron eventos de introgresión entre las especies estudiadas, las que tienen caracteres morfológicos completamente distintos, e incluso presentan diferencias de distribución altitudinal entre las áreas donde habitan. En el presente estudio la introgresión observada fue independiente de la distribución geográfica o altitudinal de las especies, y se presenta a través de toda el área de distribución de las poblaciones de *P. pseudostrobus* e híbridas.

Algunas de las explicaciones posibles acerca de la introgresión unidireccional observada pueden ser i) diferente tiempo del desarrollo del polen entre las especies ii) mayor producción de polen de *P. montezumae* iii) mayor pérdida de óvulos de *P. pseudostrobus* y iv) menor tamaño de algunas poblaciones de *P. pseudostrobus*. Todas estas explicaciones pueden estar dadas por cambios ambientales contrastantes entre las poblaciones, ya sea por eventos climáticos o geológicos pasados (fragmentación del ambiente) o por una perturbación humana reciente. El primer argumento se sustenta en los resultados obtenidos de la distribución de los haplotipos de las poblaciones representadas en el clado 4-1, donde observamos que en el pasado, las poblaciones tendieron a tener la mayor expansión pero que a través del tiempo éstas no han presentado otro evento igual de manera significativa. Esto se ve reflejado en los eventos de aislamiento por distancia que se observan como más comunes actualmente. El segundo argumento se explica fundamentalmente para el clado 4-2, donde se agrupa la mayoría de haplotipos de *P. pseudostrobus*. Esta especie de pino, ha sido la de mayor importancia económica como producto maderable, lo que ha contribuido a la disminución del tamaño de sus poblaciones. Por ello, el patrón de aislamiento por distancia se ve incrementado a medida que aumentan los niveles de anidamiento, presentando así, haplotipos

que al pasar de las generaciones pueden persistir como un linaje independiente con las oportunidades de dispersarse a otras localidades por flujo genético restringido. Históricamente, se conoce que el género *Pinus* tuvo su mayor diversificación hace 20 Myr (Millar, 1993). Los cambios climáticos asociados a las glaciaciones cíclicas que se presentaron durante este período fragmentaron o aislaron las poblaciones de muchas especies en refugios separados geográficamente. Al final de la última glaciación (hace 18 000 años), el clima fue más cálido con la retracción de los glaciares propiciando una rápida migración de especies fuera de las áreas de refugio, muchas de las cuales se expandieron dentro de áreas que previamente no fueron habitadas (Webb y Bartlein, 1992). Probablemente, *P. montezumae* presentó una expansión anterior a las glaciaciones por lo que pudo abarcar un área geográfica mayor y que actualmente está representada por poblaciones fragmentadas. En contraste, *P. pseudostrobus* podría tener capacidades adaptativas más restringidas que *P. montezumae*, por lo que su historia evolutiva ha sido probablemente determinada a través de eventos de flujo restringido por aislamiento por distancia. En efecto y de acuerdo a Farjon y Styles (1997), existe registro fósil de conos del Terciario que podrían ser los ancestros de ambas especies y sustentar la hipótesis antes mencionada. Para *P. montezumae* existe registro fósil de conos que son muy parecidos a los de la especie, encontrados en Colorado, que datan del Oligoceno tardío (hace 26.5 Ma), y otros fósiles de conos que se asemejan a *P. pseudostrobus*, en Nevada, que datan del Mioceno (12.5 Ma) (Axelrod, 1986). Esta información demuestra que ambas especies están muy relacionadas históricamente y que ambas tuvieron una distribución más al norte en el pasado. Por ello, es probable que se haya presentado primero el proceso de expansión contigua de *P. montezumae*, antes de las últimas glaciaciones por lo que puede considerarse un origen más ancestral que *P. pseudostrobus*, especie para la cual su proceso histórico de aislamiento y flujo genético detectado es posterior a las glaciaciones. Tenemos

entonces, un escenario histórico del origen de dos linajes divergentes, los dos primeros que representan la especiación culminada de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, hace más de 15 a 20 mil años, y un tercer linaje no independiente que forma parte del linaje de *P. montezumae*, originado por la hibridación introgresiva ancestral, ya que forma un linaje interno y basal dentro del clado 4-1 de *P. montezumae*. Probablemente, este linaje no independiente en la actualidad se encuentra en procesos de especiación, hipótesis que es sustentada por los haplotipos únicos y de origen reciente obtenidos en estas poblaciones híbridas. Por otro lado, aparte de haber obtenido patrones interesantes de la dinámica histórica de las especies estudiadas, fuimos capaces de obtener información que implica a la conservación "in situ" de las poblaciones que podrían ser centros de diversificación y de origen de nuevos linajes evolutivos, como son las poblaciones V1, A2, T3, E4, y S9 putativas híbridas.

A pesar de que se obtuvieron resultados importantes y se lograron establecer patrones evolutivos de la dinámica de la hibridación introgresiva entre estas especies, así como detectar las posibles rutas de la migración de polen, es importante seguir con la elaboración de estudios con estas especies que incluyan un mayor tamaño de muestra, colectando ejemplares de sitios que no fueron analizados (e.g. Veracruz, Guerrero, Colima y Chiapas), así como de estudios con ADN de mitocondria, ya que al ser heredada vía materna permitiría conocer las rutas de la migración del flujo genético por la diseminación de semillas, y así obtener un escenario evolutivo que permita complementar la historia de estas especies.

## AGRADECIMIENTOS

Estamos muy agradecidos con el Instituto de Mejoramiento Genético de Plantas Forestales de Florencia Italia, por su ayuda en la obtención de los datos de cpSSR. También, con Rodolfo Salas por su ayuda en el uso de los programas

de análisis, y colecta de ejemplares, así como Alejandra Vázquez-Lobo, Omar Chassim, Fabiola Ramírez, Oscar Rodríguez y Rocío Esteban. Agradecemos a Felipe Nepomuceno y Pilar de la Garza, por su ayuda en la selección de las poblaciones posibles híbridas y comentarios importantes de campo. Al Dr. Luis Eguiarte, por sus comentarios y sugerencias de los análisis y del escrito. Este trabajo fue financiado por CONACYT-4715N de DP y CONABIO, R116, de PD y DP. Este trabajo es parte de la tesis doctoral que Patricia Delgado está llevando a cabo en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

## REFERENCIAS

- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. EUA.
- Axelrod, D. I. (1986). Cenozoic history of some western American pines. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 73:565-641.
- Bucci, G., M. Anzidei, A. Madaghiele, and G. G. Vendramin. (1998). Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halapensis-complex pine species using chloroplast SSR markers. *Molecular Ecology*, 7: 1633-1643.
- Cann, R. L., M. Stoneking, and A. C. Wilson. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325: 31-36.
- Clemen M., D. Posada, and K. A. Crandall. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 10:1657-1660.
- Crandall, K. A., A. R. Templeton, and CH. F. Sing. (1994). Intraspecific phylogenetics; problems and solutions, In: *Models Phylogeny Reconstruction* (ed. R. W. Scotland, D. J. Siebert, and D. M. Williams), Systematics Association Special Volume No. 52, pp. 273-97, Clarendon Press, Oxford.
- Cooper, G., W. Amos., D. Hoffman, and D. C. Rubinsztein. (1996). Network analysis of human Y microsatellite haplotypes. *Human Molecular Genetics*, 5:1759-1766.
- Delgado P., A. Cuenca., A. E. Escalante., F. Molina, and D. Piñero. (2002). Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 27-37.
- Edwards, M. A., J. L. Burke., J. L. Hamrick and R. A. Price. (1997). Frequency and direction of hybridization in sympatric populations of *Pinus taeda* and *P. echinata* (Pinaceae). *American Journal of Botanic*, 84: 879-883.
- Excoffier, L., P. Smouse, and J. Quattro. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier, L. y P. L. Smouse. (1994). Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics*, 136: 343-347
- Farjon, A. y B. T. Styles. (1997). *Pinus* (Pinaceae). New York Botanical Garden. New York
- Hudson R. R. (1990). Gene genealogies and coalescent process. Pp, 1-42, In: *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, (ed) D. Futuyma and J. Antonovics. Oxford University Press, Oxford.
- Kutil B. L. and C. G. Williams. (2001). Triplet-repeat microsatellites shared among hard and soft pines. *The Journal of Heredity*, 92: 327-332.
- Lanner, R. M. (1974). A new pine from Baja California and the hybrid origin of *Pinus quadrifolia*, *Southwestern Naturalist*, 19: 75-95.
- Matos J. A. and Schaal B. A. (2000). Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A coalescent approach to hybridization. *Evolution*, 54:1218-1233.
- Millar C. I. (1993). Impact of the Eocene on the evolution of *Pinus*. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 80: 471-498.
- Nei, M., F. Tajima, and Y. Taneto. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153-170.
- Perry J. L. (1991). *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Posada D., K. A. Crandall, and A. R. Templeton. (2000). GeoDis: a program for the cladistic analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9: 487-488.
- Powell, W. M., R. Morgante., G. G. 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 of the National Academy of Sciences USA*, 92: 7759-7763.



- Rieseberg, L. H., and Soltis, D. E. (1991). Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*, 5: 65-84.
- Rieseberg, L. H. and J. F. Wendel 1993. Introgression and its consequences in plants. In: *Hybrid zones and the Evolutionary Process*, R. G. Harrison (ed), Oxford Univ. Press, Oxford, England, pp. 70-109.
- Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*. Limusa, México.
- Schneider, S., D. Roessli, and L. Excoffier. (2000). *Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Slatkin, M. (1991). Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetic Research Cambridge* 58:167-175.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Tajima, F. (1993). Measurement of DNA polymorphism. In *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to molecular paleopopulation biology*. Takahata, N. and A. G. Clark (eds). Tokio, Sunderland, MA: Japan Scientific Society Press, Sinauer Associates, Inc., p. 37-59.
- Takezaki N. (2000). *NJBAFD: a program for neighbor-joining tree construction from allele frequency data*. National Institute of Genetics, Japan.
- Takezaki, N. and M. Nei. (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic tree from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.
- Tavaré, S. (1984). Line of descent and genealogical processes, and their applications in populations genetic models. *Theoretical Population Biology*, 26:119-164.
- Templeton A. R. (1992). Human origins and analysis of mitochondrial DNA sequences. *Science*, 255: 737.
- Templeton A. R. and C. F. Sing. (1993). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analysis under cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659-669.
- Templeton, A. R., E. Routman, and A.C. Phillips. (1995). Separating Population Structure from Population History: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 761-782.
- Templeton, A. R. (1998). Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7:381-397.
- Templeton, A. R. (2001). Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status processes. *Molecular Ecology*, 10: 779-791.
- 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.
- Vendramin, G. G., L. Lelli., P. Rocci., and M. Morgante. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5: 595-598.
- Wagner, D. B., G. R. Furnier., M. A. Saghai-Marooft., S. M. Williams., B. P. Dancik, and R. W. Allard. (1987). Chloroplast DNA polymorphism in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84: 2097-2100.
- Wang X. R. Y A. E. Szmidt. (1990). Evolutionary analysis of *Pinus densata* (Master) a putative Tertiary hybrid. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 641-647.
- Wang X-R., A. E. Szmidt, y O. Savolainen. (2001). Genetic composition and diploid hybrid speciation of high mountain pine *Pinus densata*, Native to the Tibetan Plateau. *Genetics*, 159: 337-246.
- Webb, T. y P. J. Bartlein. (1992). Global changes during the last 3 billion years: climatic controls and biotic responses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23: 141-143.