



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estructura genética de *Pinus hartwegii* Lindl. en el Parque
Nacional La Malinche

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jessica Juan Espinosa

Directora

Dra. Bárbara Cruz Salazar

Codirectora

Dra. Lorena Ruiz Montoya

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre de 2023



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estructura genética de *Pinus hartwegii* Lindl. en el Parque Nacional La Malinche

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jessica Juan Espinosa

Comité tutorial

Directora:

Dra. Bárbara Cruz Salazar

Codirectora:

Dra. Lorena Ruiz Montoya

Tutores

Dr. Alejandro Valdez Mondragón

Dr. José Luis Martínez y Pérez

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre de 2023

FINANCIAMIENTO

El presente estudio se realizó con el apoyo a estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Beca no. 1150315), en el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala con registro en el Programa Nacional de Posgrado-CONACyT (PNPC). Además, se contó con recurso parcial del proyecto CONACYT-PRONACES CF 15033 “Genética de comunidades arbóreas de bosque templado en un gradiente de disturbio antropogénico: implicaciones para la conservación de la biodiversidad”, así como de recurso personal de las directoras de tesis: Dra. Lorena Ruiz Montoya y Dra. Bárbara Cruz Salazar.



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Jessica Juan Espinosa** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Estructura genética de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 16 DE 2023

DR. ALEJANDRO VALDEZ MONDRAGÓN

DRA. BÁRBARA CRUZ SALAZAR

DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ Y PÉREZ

DR. ALEJANDRO FLORES MANZANERO

DR. FRANCISCO ALBERTO RIVERA ORTIZ



CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

**COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante **Jessica Juan Espinosa** titulada “Estructura genética *Pinus hartwegii* en El Parque Nacional La Malinche” para optar por su grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de **Jessica Juan Espinosa** fue revisado por mí como directora de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de agosto el documento final de la tesis fue procesado con el programa Turnitin marcando poco texto con similitudes (<1%). Los textos detectados con similitud fueron corregidos por la estudiante en su totalidad.

Por lo anterior, confirmo que **la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE
Tlaxcala, Tlaxcala, a 18 de septiembre de 2023

Dra. Bárbara Cruz Salazar
Directora de tesis



Sistema Institucional de Autogestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por la oportunidad de realizar y pertenecer al programa de Maestría en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para realizar mis estudios de posgrado (Beca no.1150315).

A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Bárbara Cruz Salazar, Dra. Lorena Ruiz Montoya, Dr. José Luis Martínez y Pérez y Dr. Alejandro Valdez Mondragón por las observaciones, comentarios y sugerencias durante este proceso que me impulsaron a mejorar y finalizar esta etapa.

A mis revisores del jurado: Dr. Alejandro Flores Manzanero, Dr. Francisco Alberto Rivera Ortíz y la Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya por los comentarios y sugerencias finales que permitieron mejorar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres Natalia y Francisco por todo el amor, por apoyarme en cada decisión y paso que doy, por empujarme a seguir mis sueños. Los amo con toda mi alma y son mi gran ejemplo de vida.

A mi hermano Francisco, a Roselia y Soto, mis peques Camila, Héctor, Fernando y Jorge, los quiero mucho.

A las doctoras Bárbara y Lorena por la guía, la paciencia, el apoyo y las enseñanzas en cada etapa del posgrado. A los doctores Alejandro Valdez y José Luis Martínez por las aportaciones y comentarios que me permitieron ir mejorando en todo el trayecto, y claro las palabras de aliento en cada tutorial.

A los doctores Alejandro Flores, Francisco A. Rivera (nos vemos en el camino jejeje) y la Dra. Yendi por aceptar revisar mi trabajo, su disponibilidad y aportaciones.

A nuevas amistades que conocí en el CTBC, pasó mucho tiempo para vernos fuera de la pantalla, pero esas pocas veces fueron muy gratas. Braulio Ricardo Perez Alba por tan bonita amistad y compañerismo, por alojarme en tu casa cuando necesitaba, que bueno que estuvimos juntos en la maestría. A Saul George Miranda por el compañerismo y compartir su conocimiento. A Zuñy Pérez Carreto y Adriana por alojarme también, por ser tan bonitas compañeras y gratas personas, ojalá nos volvamos a encontrar.

A esas hermosas amistades de tantos años: Lorena Ramírez y Viviana Pérez por estar presentes todos los días, tan bonita amistad que hemos forjado y ese último viaje a Tlaxcala, me fueron a sacar del encierro. A Susana Franco que siempre me escucha y nunca me regaña, aquí estamos siempre, eres una gran fuente de fortaleza, te quiero. Anita Cuautle que siempre tengo presente, aunque nos perdamos la pista mucho tiempo, pero la amistad y el cariño nos unen. Maguito Santiago, David House, Daniela y Paquito Sandoval gracias por no abandonarme en el proceso, las llamadas y mensajes de ánimo. Por todas las experiencias fuera y dentro de la academia desde la licenciatura, vamos caminando este viaje. A Jazmín Nieto L. (Jaz Jaz), te has

convertido en una muy bonita y gran amiga, agradezco todos los mensajes, las llamadas y el apoyo mutuo, eres una bonita persona.

A Víctor Hugo G. Sánchez por estar todos los días y noches (aún en la distancia), por compartir conocimientos y experiencias, por todo el cariño que ha llenado mi vida. Gracias por el tiempo en Chihuahua, por los hermosos momentos (y los no tan buenos), eres un gran biólogo, colega, amigo y compañero de vida, te admiro y te quiero tanto.

Gracias a todas y todos.

RESUMEN

En México, los bosques templados constituyen el 16 % de la cobertura forestal total. De esta proporción, un 14 % es ocupado por bosques de pino. *Pinus hartwegii* Lindl. está adaptada a zonas altas y frías, por lo que constituye el límite de la vegetación arbórea en las montañas de México. Aunque 86 % de sus poblaciones se encuentran resguardadas en Áreas Naturales Protegidas, su hábitat exclusivo y único podría reducirse o incluso desaparecer debido al cambio climático y a cambios ambientales de origen antrópico. Ante esta situación, la diversidad genética juega un papel crucial en la conservación de las especies, ya que es necesaria para que las poblaciones respondan a dichos cambios. El objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad y estructura genética de poblaciones de *P. hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche para proponer estrategias de conservación. Dado que las poblaciones de *P. hartwegii* se desarrollan en un contexto de constante cambio de uso de suelo, y posiblemente es la principal causa de reducción y aislamiento de las poblaciones, se esperaba encontrar baja diversidad y alta estructura genética poblacional. Con base en la variación genética de 10 microsatélites de ADN de cloroplasto, se analizó la diversidad genética en seis poblaciones de *P. hartwegii* distribuidas en dos laderas del Parque Nacional La Malinche (norte y sur). Se identificaron 103 haplotipos y una diversidad genética promedio (H) de 0.9901. La mayor variación genética se observó dentro de las poblaciones. La F_{ST} no mostró diferenciación significativa entre poblaciones, no obstante, el Análisis Espacial de Componentes Principales indicó una estructuración genética débil entre laderas. La alta diversidad genética, junto con la escasa estructura genética espacial podrían deberse a una limitada dispersión de las semillas, más que a la dispersión del polen. Basándose en estos resultados, se propone el establecimiento de dos Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales para *P. hartwegii*: (1) las poblaciones de ladera norte, y (2) las poblaciones de la ladera sur, además de establecer rodales semilleros en poblaciones que presentan la mayor diversidad genética.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Bosque templado.....	3
2.2. Cambio de uso de suelo	3
2.3. Cambio climático antropogénico	4
2.4. Diversidad genética.....	7
2.5. Estructura genética.....	8
2.6. Estructura genética espacial.....	8
2.7. Genética de la conservación	9
2.8. Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales	10
2.9. Investigaciones genéticas en <i>Pinus</i>	11
2.10. Técnicas moleculares para estudios de diversidad genética.....	11
2.11. ADN de cloroplasto.....	12
2.12. Especie de estudio: <i>Pinus hartwegii</i>	13
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS.....	19
6. METODOLOGÍA	20
6.1. Zona de estudio	20
6.2. Material biológico.....	20
6.3. Extracción de ADN mediante método CTAB	22
6.4. Amplificación de loci de microsatélites de ADN de cloroplasto.....	22
6.5. Análisis de datos	24
6.5.1. Estandarización de datos	24
6.5.2. Diversidad genética	24
6.5.3. Estructura genética	24
6.5.4. Estructura genética espacial.....	25
7. RESULTADOS.....	27
7.1. Diversidad genética.....	27

7.2.	Estructura genética.....	28
7.2.1.	Análisis de varianza molecular.....	28
7.2.2.	F _{ST} por pares de poblaciones	28
7.2.3.	Análisis Factorial de Componentes Principales	30
7.2.4.	Análisis Discriminante de Componentes Principales.....	31
7.3.	Estructura genética espacial (EGE)	33
7.3.1.	Análisis de autocorrelación espacial.....	33
7.3.2.	Prueba de Mantel (Aislamiento por distancia)	34
7.3.3.	Análisis espacial de Componentes Principales.....	34
8.	DISCUSIÓN.....	36
9.	CONCLUSIONES.....	41
10.	PERSPECTIVAS E IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	42
11.	REFERENCIAS	44
12.	GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	59
13.	ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Microsatélites de ADN de cloroplasto utilizados para determinar la diversidad y estructura genética poblacional de <i>Pinus hartwegii</i> del Parque Nacional La Malinche.	23
Tabla 2.	Número de muestras amplificadas por locus y por población. Rango de tamaño de cpSSR de <i>Pinus hartwegii</i>	27
Tabla 3.	Parámetros de diversidad genética en poblaciones de <i>Pinus hartwegii</i> del Parque Nacional La Malinche, con base en 10 loci de microsatélites de cloroplasto.	28
Tabla 4.	Análisis de Varianza Molecular de poblaciones de <i>Pinus hartwegii</i> en el Parque Nacional La Malinche.	28
Tabla 5.	Valores por pares de diferenciación genética (F _{ST}) entre poblaciones de <i>Pinus hartwegii</i> en el Parque Nacional La Malinche.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parque Nacional La Malinche.....	2
Figura 2. <i>Pinus hartwegii</i> :	14
Figura 3. Distribución de <i>Pinus hartwegii</i> en México y área de estudio.	21
Figura 4. Bosque de pino de las alturas (<i>Pinus hartwegii</i>).....	21
Figura 5. Mapa de calor con dendrograma de los valores de diferenciación genética (FST) ..	29
Figura 6. Análisis Factorial de Componentes Principales (AFCP)	30
Figura 7. Análisis discriminante de componentes principales	31
Figura 8. Análisis de reasignación exitosa	32
Figura 9. Autocorrelación espacial.....	33
Figura 10. Aislamiento por distancia.	34
Figura 11. Estructura genética espacial sPCA.....	35

1. INTRODUCCIÓN

Los bosques templados son comunidades dominadas por árboles altos, mayormente pinos (*Pinus*) y encinos (*Quercus*), frecuentemente asociados a otras especies como *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham., *Juniperus* spp., *Arbutus xalapensis* Kunth, *Salix paradoxa* Kunth, y *Pseudotsuga menziesii* Mirb. Estas asociaciones vegetales se encuentran en zonas montañosas con clima templado a frío, entre los 2000 y 3400 msnm. En México, se distribuyen en mayor grado en el norte y sur de Baja California, a lo largo de las Sierra Norte de Oaxaca, la Sierra Madre de Chiapas y Los Altos de Chiapas, y ocupan actualmente 16 % (323,200 km²) del territorio mexicano (CONABIO, 2021).

De las especies del género *Pinus*, México es considerado un centro secundario de diversificación al contar con cerca del 50 % de las especies que existen en el mundo, además de que cuenta con un alto porcentaje de endemismos (>55 %) concentrados en islas biogeográficas (CONABIO 2021; Sánchez-González 2008). *Pinus hartwegii* (pino de las alturas) se distribuye entre los 3400 hasta los 4000 msnm, es una especie adaptada a ambientes fríos y de extrema altitud, por lo que representa el límite altitudinal de la vegetación arbórea (Viveros-Viveros y cols. 2009). Tiene una distribución discontinua desde el noreste de México hasta Guatemala. En la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM), se localiza en las montañas de gran altitud, tales como, los volcanes Pico de Orizaba, Popocatepetl, Iztaccíhuatl, Nevado de Toluca y La Malinche.

El Parque Nacional La Malinche (PNLM) se decretó como Área Natural Protegida en 1938 (CONANP 2013), es el reservorio más importante de biodiversidad en el estado de Tlaxcala, ya que cuenta con un registro de 937 especies de plantas, vertebrados, hongos y mixomicetos (Fernández y López 2005; López-Téllez 2019) (Figura 1A). A pesar de tener la categoría de Parque Nacional, La Malinche ha sufrido un notable deterioro en la cubierta vegetal debido a actividades humanas, como la tala ilegal y el cambio de uso de suelo. Esto ha transformado sus bosques en zonas de uso agrícola y pecuario, lo que disminuye drásticamente las poblaciones de especies arbóreas (Figura 1B) (López-Téllez 2019; Ramón y Aguilar 2021).

La reducción del tamaño poblacional y la pérdida de poblaciones de una especie modifican los procesos ecológicos y evolutivos. En poblaciones pequeñas que permanecen así por largos periodos, el flujo genético se reduce y la deriva genética se intensifica, lo que puede generar cambios importantes en la diversidad y estructura genética (Rocha y Gasca 2007). La pérdida de la diversidad genética aumenta la probabilidad de sufrir enfermedades o efectos genéticos deletéreos (Hedrick 2011). Mientras que, la estructura genética depende de los patrones y niveles de flujo genético, pues actúa como una fuerza cohesiva entre las poblaciones: si estas se mantienen aisladas, la variación en las frecuencias alélicas entre las poblaciones incrementará (Hedrick 2011; Aguirre 2007).

Ya que el pino de las alturas es una especie altamente vulnerable por la extrema exclusividad de su hábitat y las intensas actividades de cambio de uso de suelo en el PNLM, este estudio evaluó la diversidad y estructura genética de poblaciones de *P. hartwegii* en el PNLM, con lo cual es posible reportar el estado de la variabilidad genética de las poblaciones y definir unidades de manejo para conservar el flujo genético entre ellas. La información derivada de esta investigación es de gran utilidad para el diseño de estrategias de conservación y manejo de poblaciones de *P. hartwegii* del PNLM.

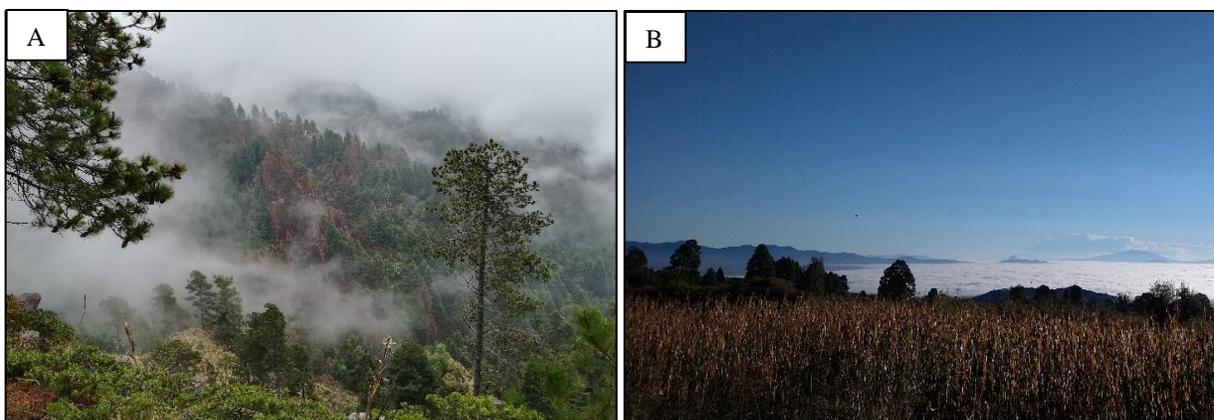


Figura 1. Parque Nacional La Malinche. A) Bosque de oyamel (*Abies religiosa*) y pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) en la ladera sur. B) Zonas de cultivo en la ladera este del parque, al fondo se observa el Pico de Orizaba (Fotos: Saúl George Miranda).

2. ANTECEDENTES

2.1. Bosque templado

Los bosques templados constituyen el 16 % de la extensión total de áreas forestales en México. De esta cifra, el 25 % es ocupado por bosques de encino, el 70% por bosques de pino y pino encino, y un 5 % por otras especies de coníferas, de modo que los bosques templados son los de mayor distribución en el territorio nacional (CONABIO 2021; Galicia y cols. 2018). Los bosques templados proveen una gran variedad de servicios ecosistémicos, ya que son fuente de alimentos y recursos maderables. Además, participan en la regulación climática, captura de carbono y agua, y al ser el hábitat de muchas especies, mantienen la biodiversidad. Estos bosques no solo cumplen una función ambiental, sino que también proveen de servicios culturales por ser espacios recreativos, comunitarios y educativos (Galicia y cols. 2018; Monárrez-González y cols. 2018).

En México, se han llevado a cabo una variedad de diversos estudios en relación a los bosques templados, como análisis de diversidad faunística (Almazan-Nuñez y cols. 2009; García-Gómez y cols. 2011; Guzmán-Mendoza y cols. 2014; Ugalde-Ledezma y cols. 2010), diversidad y estructura vegetal (Dávila-Lara y cols. 2019; Granados y cols. 2014; Manzanilla-Quijada y cols. 2020; Silva-García y cols. 2021), estudios sociales (Galicia y cols. 2018; López-Téllez y cols. 2019), de almacenamiento y dinámica del carbono (Galicia y cols. 2016), y de efectos del cambio climático (Gómez-Pineda y cols. 2020; Gutiérrez y Trejo 2014; Manzanilla-Quñones y cols. 2018; 2019).

2.2. Cambio de uso de suelo

El concepto de “uso de suelo” hace referencia al conjunto de actividades humanas que se desarrollan sobre la cobertura del suelo. Por lo tanto, el cambio de uso de suelo es la modificación de la cobertura natural para satisfacer necesidades sociales y económicas (Geist y Lambin 2002). Alrededor de una cuarta parte del suelo en el mundo ha sido transformado y modificado, y está en continua erosión debido al constante cambio de uso de suelo. Este proceso contribuye al aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, pérdida de ecosistemas naturales y la disminución de la biodiversidad (Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático IPCC 2019).

La Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA, 2015) establece que dentro de los Parques Nacionales no se permiten asentamientos humanos ni actividades agrícolas y pecuarias. No obstante, cuando el Parque Nacional La Malinche (PNLM) fue decretado una Área Natural Protegida (ANP), en una parte de la superficie del polígono se encontraban asentamientos humanos. Esto condujo a implementar una regulación del uso del suelo y aprovechamiento de recursos naturales a través de una zonificación (López-Téllez y cols. 2019).

Desafortunadamente, el PNLM ha sufrido un notable deterioro en la cubierta vegetal debido al constante cambio de uso de suelo para la expansión de la frontera agrícola, ganadera y el desarrollo de infraestructura, incluyendo la tala ilegal, la demanda de madera y el ocoteo (López-Téllez y cols. 2019; Ramón y Aguilar 2021). Aunado a esto, durante las décadas de los ochenta y noventa el desarrollo industrial en los estados de Puebla y Tlaxcala presentó un proceso de expansión, lo que incrementó la demanda de viviendas en la zona de influencia del PNLM. Esto corresponde con lo reportado por Ramón y Aguilar (2021), quienes identificaron tasas anuales de crecimiento poblacional en la Zona Metropolitana Puebla-Tlaxcala que oscilaron entre el 1.5 % al 6 % anualmente, en el periodo comprendido entre 1950 al 2010.

A pesar de que la mancha urbana no ha alcanzado el polígono del PNLM, Ramón y Aguilar (2021) sugieren que el proceso de cambio de uso de suelo amplía las zonas de cultivo hacia los bosques del parque. Esta expansión ha resultado en una pérdida de aproximadamente 7,000 ha de bosque en solo 40 años.

2.3. Cambio climático antropogénico

Mediciones de las condiciones atmosféricas han documentado un incremento de la temperatura global en el planeta desde finales del siglo XIX, fenómeno conocido como *Calentamiento Global Antropogénico* (Caballero y cols. 2007). Nos encontramos cerca de superar los límites máximos de temperatura registrados en los últimos 40 años. Las concentraciones de gases de efecto invernadero están alcanzando niveles globales sin precedentes, y se estima que la temperatura media anual mundial aumente 1.5°C a principios de la década de 2030 (Caballero y cols. 2007; IPCC 2022). Este aumento provocará que los

cambios drásticos en el clima, como la disminución de hielo en los polos, episodios de precipitación intensa, olas de calor, aumento en los niveles del mar, sequías y aumento en la actividad ciclónica, entre otros, continúen e incluso incrementen (Díaz Cordero 2012, IPCC 2022).

Actualmente, la relación entre la biodiversidad y el clima ha captado una creciente preocupación dentro de la comunidad científica a nivel global debido a su efecto en los diferentes grupos taxonómicos (Van Der Putten y cols. 2010). Las consecuencias del cambio climático se expresan en varios niveles, éstos se pueden observar en la fenología de las especies, en las interacciones bióticas y en el rango de distribución de estas (Ceccarelli y Rabinovich 2015; Van Der Putten y cols. 2010).

Diversos estudios sugieren que se esperan expansiones o retracciones en la distribución de las especies con respecto a su distribución actual, con una tendencia general de movimientos latitudinales y a elevaciones más altas (Ceccarelli y Rabinovich, 2015; Sáenz-Romero y cols. 2020; Sáenz-Romero 2015; Van Der Putten y cols. 2010; Zuckerberg y cols. 2009). Sin embargo, la respuesta que tendrá cada grupo taxonómico a estos cambios dependerá de los requerimientos térmicos, tolerancias y adaptaciones de cada especie, así como de la complejidad térmica del hábitat (Lara-Resendiz y cols. 2019).

Estudios llevados a cabo en diversas latitudes y elevaciones señalan a los ecosistemas de bosques de clima boreal y templado como los más sensibles al cambio climático (Manzanilla-Quñones y cols. 2019). Diversas investigaciones que han modelado la distribución de especies de la familia Pinaceae en México, bajo diferentes escenarios de cambio climático, proponen una reducción importante de la distribución a futuro. *Pinus leiophylla* Schltdl. & Cham., *Abies religiosa*, *P. teocote* Cham. & Schltdl. y *P. hartwegii*, son algunas de las especies que podrían presentar impactos significativos en términos de su distribución (Cruz-Cárdenas y cols. 2016; Gómez-Pineda y cols. 2020; Gutiérrez y Trejo 2014; Manzanilla-Quñones y cols. 2019; Sáenz-Romero y cols. 2015).

Por su parte, Gutiérrez y Trejo (2014) predicen cambios significativos en las condiciones climáticas idóneas de la distribución de cinco especies arbóreas (*Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltdl., *P. hartwegii*, *Abies hickelii* Flous & Gausson, *Quercus laurina* Bonpl. y *Quercus*

ocoteifolia Liebm.) en los bosques templados de México. Estos autores proponen que, debido a los cambios en el clima, existe la posibilidad de que se produzcan extinciones locales para el año 2050.

Es importante destacar que, no todas las especies o poblaciones sufrirán una reducción en su rango de distribución debido al cambio climático. Se ha documentado en diversas especies que el cambio climático puede tener efectos positivos, como la ampliación del hábitat potencial. Algunos ejemplos de esto se observan en especies como el reptil termófilo iguana del desierto (*Dipsosaurus dorsalis* Baird & Girard 1852) (ver Lara-Resendiz y cols. 2019). Así como en insectos vectores de enfermedades como los Triatominos, que transmiten la enfermedad de chagas (Ceccarelli y Rabinovich 2015). Además, es posible que algunas especies se vean beneficiadas al expandir sus rangos de distribución hacia latitudes y altitudes más altas, como la mariposa *Aricia agestis* (Denis & Schiffermüller 1775) (ver Menéndez y cols. 2008).

Pinus hartwegii es una especie altamente vulnerable a los efectos del cambio climático, ya que sus poblaciones enfrentan los cambios en la disponibilidad de agua superficial, aumento de temperatura y reducción de la humedad, condiciones que afectan su desarrollo. De acuerdo con Gutiérrez y Trejo (2014), las condiciones ambientales necesarias en los bosques subalpinos para la prosperidad de *P. hartwegii* se perderán en un 86 % en todo el país, y prácticamente las poblaciones remanentes se encuentran resguardadas en Áreas Naturales Protegidas, dentro de la FVTM.

Por otro lado, Manzanilla-Quiñones y cols. (2019) predicen una reducción en la distribución actual de *P. hartwegii* en el PNLM de hasta un 19.6 % (54.3 ha). Algunos autores señalan que la variabilidad genética de la especie puede verse disminuida (Iglesias y cols. 2004; Viveros-Viveros y cols. 2014). Sin embargo, si las poblaciones mantienen niveles altos de diversidad genética, estos pueden incrementar las probabilidades de resistir cambios en el entorno, responder a enfermedades y plagas, e incluso adaptarse a nuevos ambientes (Frankham y cols. 2002).

2.4. Diversidad genética

La diversidad genética es el conjunto de variaciones heredables (alelos y genotipos) que se producen en cada organismo, los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Hartl y Clark 1997). La variación genética constituye el material básico de los cambios evolutivos y ofrece una visión hacia el futuro, ya que mediante el potencial evolutivo las poblaciones pueden responder a cambios ambientales (variabilidad adaptativa) (Allendorf y cols. 2013; Frankham y cols. 2002; Loeschcke y cols. 1994; Pertoldi y cols. 2007). Además, la diversidad genética proporciona una visión retrospectiva de los linajes evolutivos de los taxa y de la estructura actual dentro y entre poblaciones (Allendorf y cols. 2013).

En el contexto de la conservación, la variación genética es importante en dos aspectos jerárquicos fundamentales: (1) las diferencias genéticas entre individuos de una población; y (2) las diferencias genéticas entre poblaciones de una misma especie (Allendorf y cols. 2013). Usualmente la diversidad genética se caracteriza a través de polimorfismos, es decir, la presencia de diferentes variantes alélicas de un conjunto de loci (Allendorf y cols. 2013).

Los parámetros genéticos fundamentales son la heterocigocidad promedio y la diversidad alélica que hay en una población, especie o grupo de especies (Frankham y cols. 2002). La cantidad de variación genética presente en una población proporciona información sobre su estructura demográfica (disminución del tamaño poblacional, tasas de movimiento inter poblacional, relaciones y divergencias entre poblaciones) y la historia evolutiva de una población (Allendorf y cols. 2013). Una baja variabilidad genética puede ser indicativo de un evento de reducción drástica en el tamaño de la población (e.g. cuellos de botella) (Allendorf y cols. 2013), mientras que, la divergencia entre las poblaciones refleja las tasas de flujo genético (migración) (Allendorf y cols. 2013).

La variabilidad genética presente entre y dentro de las poblaciones es resultado de múltiples factores, como el efecto diversificador de la mutación, la selección natural, el flujo genético, y la deriva genética (Hedrick 2011). Esta última en particular, tiende a cambiar las frecuencias alélicas al azar y eventualmente fijar o inducir la pérdida de alelos en una población, en tanto que, el flujo genético tiende a producir homogeneidad genética en las poblaciones (Hedrick 2011; Eguiarte 1986). En pequeñas poblaciones, la pérdida de la

variabilidad genética aumenta la probabilidad de experimentar una serie de efectos genéticos deletéreos como la depresión por endogamia (una reducción de la adecuación de los individuos por apareamiento entre congéneres), y la pérdida del potencial evolutivo (Hedrick 2011; Primack 2014; Edmands 1999).

2.5. Estructura genética

La estructura genética es resultado de las diferencias de las frecuencias alélicas, y las diferencias de la variación genética entre individuos y poblaciones (Eguiarte y cols. 2010, Allendorf y cols. 2013). Una estructura genética alta indica diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, mientras que, una baja estructura genética representa pocas diferencias en las frecuencias alélicas (Eguiarte y cols. 2010). Uno de los métodos más utilizados para evaluar la estructura genética son los estadísticos F de Wright (1931), también conocidos como coeficientes de consanguinidad.

F_{IS} se refiere a la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia (Allendorf y cols. 2013). Actúa como una medida de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) (Hardy 1908: Weinberg 1908) dentro de las poblaciones (Allendorf y cols. 2013; Frankham 2002). Por otro lado, F_{ST} o índice de fijación, indica la probabilidad de que dos alelos extraídos aleatoriamente en dos poblaciones sean idénticos por descendencia (Allendorf y cols. 2013). Este índice sirve como una medida de la divergencia de frecuencias alélicas entre las poblaciones (Allendorf y cols. 2013; Frankham 2002). Por último, F_{IT} es un indicador que evalúa la desviación general de las proporciones del HW en todas las poblaciones (Allendorf y cols. 2013; Frankham 2002).

2.6. Estructura genética espacial

La estructura genética espacial (EGE) se puede definir como la distribución no aleatoria de genotipos y alelos en una población, resultado de diferentes factores, por ejemplo, eventos históricos, el sistema de apareamiento, características del paisaje, y procesos evolutivos como la selección natural (Vekemans y Hardy 2004; Allendorf y cols. 2022). A escala espacial fina el flujo genético puede limitarse y provocar un exceso de apareamiento por proximidad a

causa de la distancia principalmente, o bien, debido a la resistencia de algún atributo del paisaje (Vekemans y Hardy 2004; Troupin y cols. 2006).

En poblaciones de plantas, se han realizado diversos estudios sobre EGE a escala fina, en los que se ha observado que los sitios de reclutamiento adecuados y las distancias de dispersión del polen y las semillas son los principales factores que determinan la estructura (Vekemans y Hardy 2004, Hernández-Velasco y cols. 2017). También, es conocido que la densidad de la población influye sobre la magnitud de la EGE. Por ejemplo, Troupin y cols. (2006) mencionaron que, en poblaciones densas, la dispersión de semillas puede verse reducida debido a vientos menos intensos, lo que causa una mayor EGE.

El conocimiento de la estructura genética espacial es importante, ya que en combinación con estudios ecológicos y de historia de vida es posible conocer la dinámica de las poblaciones y conservar la capacidad evolutiva de las especies (Troupin y cols 2006).

2.7. Genética de la conservación

La genética de la conservación es una disciplina aplicada, cuyo principal objetivo es preservar a las especies en riesgo de extinción como entidades dinámicas capaces de enfrentar cambios ambientales a largo plazo (Frankham y cols. 2002). Esta disciplina se fundamenta en la genética de poblaciones y la evolución, las cuales contribuyen a la biología de la conservación de numerosas formas. Principalmente, porque proporcionan herramientas para describir la diversidad genética y las bases teóricas para entender los mecanismos que producen los cambios evolutivos (Frankham y cols. 2002; Loeschcke y cols. 1994).

La genética de la conservación se enfoca en diversos aspectos que incluyen la pérdida de la diversidad genética, los efectos de la endogamia, la depresión exogámica, la estructura genética, la relación de parentesco por medio de filogenias y la definición de unidades de manejo dentro de las poblaciones (Allendorf y cols. 2013; Frankham y cols. 2010). Adicionalmente, proporciona las bases genéticas para proponer estrategias de conservación que permitan minimizar los riesgos de extinción de poblaciones pequeñas (Frankham y cols. 2002; Loeschcke y cols. 1994).

2.8. Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés, 2014) establece que los recursos genéticos forestales (RGF) son el material hereditario que se encuentra dentro y entre las especies arbustivas y de árboles que tienen un valor social, científico, ambiental o económico real o potencial. Para conservar estos recursos genéticos forestales, se requiere de la implementación de estrategias de conservación *ex situ* e *in situ* (FAO, 2014).

La conservación *in situ* implica que una población determinada se mantiene dentro de la comunidad de la que forma parte, en el ambiente en el que se ha desarrollado y tiene la ventaja teórica de permitir el cambio evolutivo (Ledig 2004). Identificar poblaciones con diversidad genética reducida y/o distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas permite dirigir esfuerzos de conservación hacia ellas (González 2003). Sin embargo, aún se siguen buscando métodos que permitan distinguir de forma inequívoca “unidades” de conservación. Actualmente una de las estrategias para proteger parte de la diversidad genética de especies de pinos *in situ* es el establecimiento de redes de Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (UCRGF) (Arzate Fernández 2016; Ledig 2004). Estas UCRGF se entienden como poblaciones forestales que a efectos de la conservación se consideran genéticamente distintas, estas diferencias se establecen por los niveles de diversidad y flujo genético entre poblaciones (Teissier du Cross 2001; Ledig 2004).

Teissier du Cross (2001) menciona que diversos estudios se basan en el flujo genético que se observa entre poblaciones para establecer estas redes de UCRGF. Estos estudios buscan definir la dimensión de las unidades de conservación que permitan cumplir los siguientes objetivos: (1) asegurar una regeneración suficiente, (2) fomentar la diversidad genética, y (3) mantener las características ecológicas y genéticas de las unidades de la red de conservación. Para cumplir estos objetivos, es necesario que las unidades de conservación tengan un mínimo de individuos reproductivos, así como delimitar una zona de protección alrededor de las mismas (Teissier du Cross 2001).

2.9. Investigaciones genéticas en *Pinus*

Hasta hace unas décadas, en estudios de diversidad y estructura genética en especies del género *Pinus*, las aloenzimas eran uno de los marcadores más utilizados para estimar la diversidad genética (Delgado y cols. 2002). Sin embargo, ahora los microsatélites de cloroplasto son cada vez más utilizados para estudios de diversidad y estructura genética debido a su alto grado de polimorfismo, herencia uniparental y ausencia de recombinación (Ebert y Peakall 2009).

Delgado y Piñero (2002) obtuvieron una diversidad genética alta con microsatélites de cloroplasto en poblaciones híbridas de *Pinus montezumae* Lamb. y *P. pseudostrobus* Lindl., en comparación con *P. leucodermis* (*P. heldreichii* Christ) (Powell y cols. 1995) y *P. halepensis* Mill. (Bucci y cols. 1998). En otras especies, como *P. uncinata* Ramond ex DC. (Dzialuk y cols. 2009) y *P. sylvestris* L. (Robledo-Arnuncio y cols. 2005) se reportaron altos niveles de diversidad haplotípica con microsatélites de cloroplasto ($H = 0.986$ y $H = 0.978$ respectivamente), pero una diferenciación significativa entre las poblaciones estudiadas (Dzialuk y cols. 2009).

Respecto a *P. hartwegii*, hasta el momento solo se ha reportado un estudio donde se evalúa la diversidad genética con isoenzimas en un gradiente altitudinal del Parque Nacional Pico de Tancítaro, Michoacán, México (Viveros-Viveros y cols. 2009). Los autores encontraron una moderada pero significativa diferenciación genética entre poblaciones ($F_{ST} = 0.111$) a pesar de las cortas distancias entre ellas. De acuerdo con los resultados reportados, los autores sugieren establecer dos unidades de conservación de recursos genéticos forestales: la primera entre los 3,000 msnm a 3,350 msnm y la segunda a 3,600 msnm.

2.10. Técnicas moleculares para estudios de diversidad genética

Los marcadores moleculares son una herramienta con múltiples aplicaciones en la conservación biológica. Entre los más utilizados, se encuentran los microsatélites o secuencias repetidas cortas (SSR, por sus siglas en inglés). Estos son, como lo dice su nombre, secuencias repetidas en tándem (1 a 6 pares de bases) que se encuentran en baja frecuencia en regiones codificantes y no codificantes (Schlötterer 2004; Zane y cols. 2002).

Estos marcadores presentan un elevado grado de polimorfismo, y en los SSR nucleares (nSSR) se mantiene la herencia mendeliana y codominancia (Aranguren-Méndez y cols. 2005; González 2003).

Con los microsatélites se puede evaluar el aislamiento inter poblacional (estructura genética poblacional, distancias genéticas), así como definir unidades de conservación, lo que demuestra su gran relevancia en la conservación, tanto a nivel específico como poblacional (Frankham y cols. 2002; González 2003).

En particular para el género *Pinus*, recientemente se han desarrollado microsatélites tanto de ADN nuclear (nSSR), como de organelos citoplasmáticos (i.e. microsatélites de mitocondria, mtSSR; y de cloroplasto, cpSSR) (Delgado y Piñero 2002). Estos últimos pueden ser de gran ayuda para discriminar especies o taxa que estén muy relacionados filogenéticamente, así como para realizar estudios finos a nivel intraespecífico (Delgado y Piñero 2002).

2.11. ADN de cloroplasto

En organismos fotosintéticos, los cloroplastos son organelos en donde se realiza este proceso metabólico (Rentería 2007; Espinosa y Chávez 2019). Cada cloroplasto tiene sus propios ribosomas y múltiples regiones nucleotídicas (de 8 a 10 moléculas) dentro del ADN organizado en un solo cromosoma circular (Rentería 2007). El ADN de cloroplasto contiene cuatro regiones claramente definidas: una región larga de copia única (LSC; Large Single Copy region), una región corta de copia única (SSC; Small Single Copy region); y dos regiones repetidas inversas (IR) (Espinosa y Chávez 2019). Dentro de estas regiones podemos encontrar genes, ARNs de transferencia, genes ribosomales, intrones y exones (Espinosa y Chávez 2019).

En la mayoría de las gimnospermas, como las coníferas, los cloroplastos se heredan de manera uniparental, la herencia es vía paterna y no están sujetos a recombinación (Freeland 2005). Por lo tanto, los cambios acumulados que se observan en las poblaciones se deben sólo a los procesos demográficos y de mutación (Freeland 2005). Esta particularidad permite contestar preguntas evolutivas puntuales como el monitoreo de flujo genético, inferencias de

parámetros demográficos para determinar patrones evolutivos (Rentería 2007), así como llevar a cabo estudios filogeográficos y analizar eventos de introgresión e hibridación (Vázquez-Domínguez 2007).

Aunque los microsatélites de cloroplasto (cpSSR) pueden parecer similares a los microsatélites nucleares, los cpSSR tienen varias características importantes. Una de ellas es que debido a su herencia y haploidía todo el genoma está ligado (Freeland 2005), por lo tanto, a pesar de que en ocasiones se describen como múltiples marcadores independientes todos forman un solo gen (locus). Los cpSSR proporcionan una representación de la historia evolutiva; dado que su material genético solo representa una parte de la información genética total de uno de los padres, el tamaño efectivo de la población (N_e) se reduce a la mitad (Ebert y Peakall 2009). Esta característica hace que estos marcadores sean potencialmente más efectivos en detectar procesos demográficos, y son una importante herramienta en estudios filogenéticos, de diversidad y estructura genética, y de hibridación en plantas (Freeland 2005; Ebert y Peakall 2009; Wheeler y cols. 2014).

2.12. Especie de estudio: *Pinus hartwegii*

Pinus hartwegii mide entre 15 m y 30 m de altura; su diámetro oscila de 40 cm a 70 cm; la corteza es agrietada de color pardo rojizo (Figura 2A). Las ramas bajas son perpendiculares al fuste y la copa es gruesa, redondeada y de color grisáceo. Presenta de tres a cinco acículas por fascículo con una longitud de 8 cm a 17 cm, son de color verde claro, su forma dorsal es ancha con la costilla media ligeramente levantada (Figura 2B). Los estróbilos femeninos son ovoides, de color rojizo muy oscuro, resinosos y miden entre seis y 12 cm de largo; las semillas son aladas de color negro y miden entre cinco a siete mm de largo (Figura 2C) (Martínez 1948; Pérez 1984; Iglesias-Andreu y Tivo-Fernández 2006). La dispersión de especies con semillas aladas, como *P. hartwegii*, se ven favorecidas por el viento (anemófila) y pueden esparcirse rápidamente hasta dominar el sitio (Figura 2D).

En La Malinche un cono de *P. hartwegii* tiene una producción promedio de alrededor de 140 semillas maduras (Alba-Landa 2003). El porcentaje de germinación se ha reportado entre el 33.65 % a 98.87 % en lugares como el Ajusco e Iztaccíhuatl respectivamente (Ortega-Mata y cols. 2003). Se sabe que las semillas de esta especie germinan entre los 15° C a 30° C,

principalmente las semillas provenientes de altitudes bajas y medias (3250 msnm a 3700 msnm), y su capacidad de germinación disminuye a los 10°C (George Miranda y cols. 2022). En cuanto disminuye la disponibilidad de agua, las semillas retrasan el inicio de la germinación (George Miranda y cols. 2022).

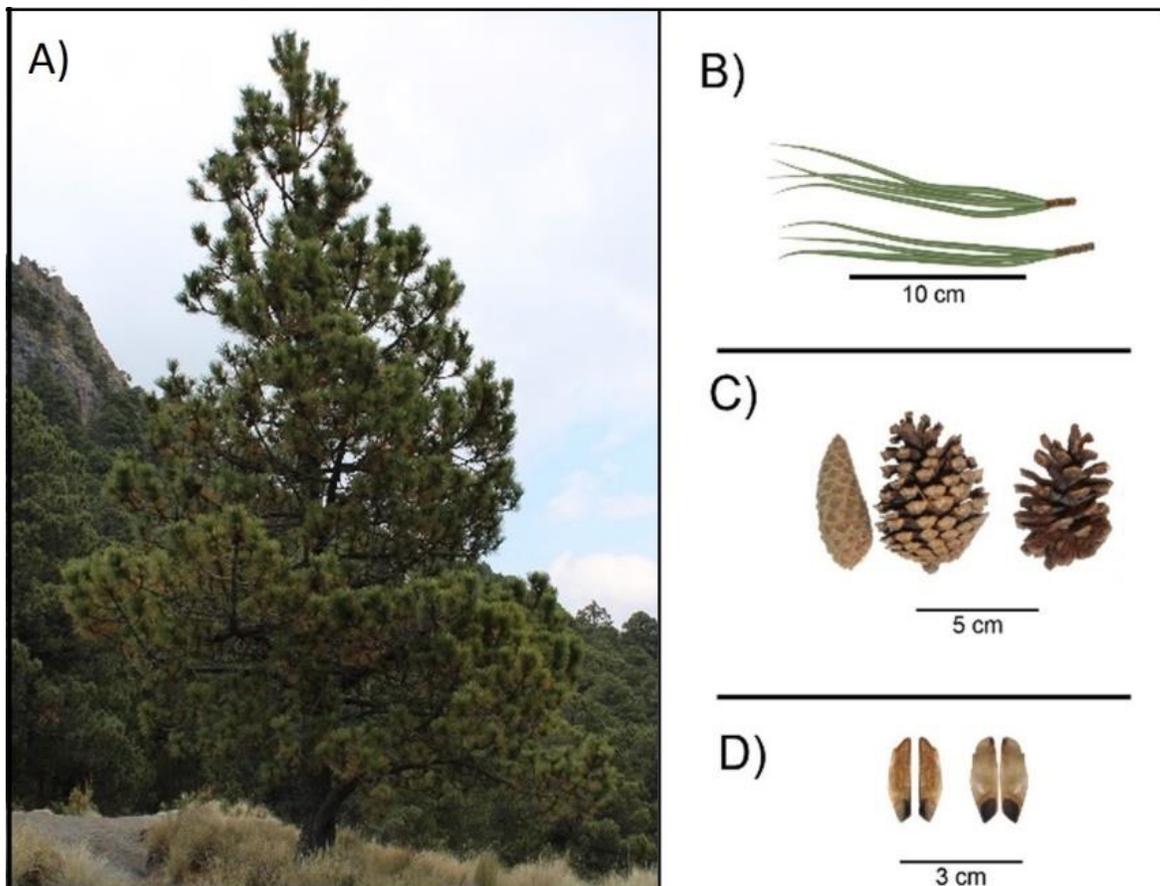


Figura 2. *Pinus hartwegii*: A) individuo adulto, B) acículas, C) estróbilos femeninos y D) semillas.

El ciclo fenológico de los estróbilos femeninos de *P. hartwegii* tiene una duración de dos años, el desarrollo y maduración de los estróbilos masculinos tarda aproximadamente cuatro meses, pero el estróbilo femenino requiere de mayor tiempo, ya que este proceso incluye la maduración de las semillas (Franquiz-Domínguez 2018). La liberación del polen ocurre entre los meses de abril, mayo y junio, mientras que la liberación de semillas se da entre los meses

de noviembre, diciembre y enero en el PNLM (Franquiz-Domínguez 2018). El polen de *P. hartwegii* tiene una forma elíptica con dos sacos aéreos, estos granos son lisos y ligeros, lo cual favorece su transporte por viento, y al igual que otras especies de coníferas sus dimensiones oscilan entre las 20 a 100 micras (Tivo-Fernández e Iglesias Andreu 2003).

2.13. Estudios de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche (PNLM)

En el PNLM se han realizado diversos estudios en la ecología de *P. hartwegii* (patrones fenológicos, regeneración natural, estructura vertical y horizontal, éxito reproductivo, germinación en gradientes altitudinales). Portillo-Díaz (2017), reportó que la regeneración natural de *P. hartwegii* es baja en el PNLM y está estrechamente relacionada con la altitud, ya que las condiciones de temperatura y humedad difieren a lo largo del gradiente altitudinal y latitudinal (Portillo-Díaz 2017). A su vez, la altitud influye en el estado fitosanitario del bosque, ya que, en las partes altas no hay infestación por muérdago y en altitudes media y baja se observa un alto porcentaje de individuos infestados.

Por otro lado, Franquiz-Domínguez (2018) encontró que los individuos de *P. hartwegii* de las laderas norte y sur del PNLM, presentan diferencias en el surgimiento y en el tiempo de permanencia en cada una de las etapas de la fenología reproductiva (inicio, desarrollo y maduración). Además, la intensidad (número de individuos en las etapas reproductivas) es mayor en las altitudes superiores, lo cual se asocia con las condiciones de temperatura y humedad idóneas para *P. hartwegii* (Portillo-Díaz 2017; Franquiz-Domínguez 2018).

En cuanto al éxito reproductivo y germinación de *P. hartwegii* en el PNLM, solamente se tienen datos de la ladera sur del Parque. Montero-Nava (2020) reportó que a altitudes bajas (3,250 – 3,550 msnm) los valores de desarrollo y eficiencia de semillas son altas; mientras que, en las altitudes más altas (3,850 – 4,000 msnm) se presentaron mayores índices de endogamia.

Con respecto a la germinación, George-Miranda y cols. (2022) identificaron que en la ladera sur del PNLM, las semillas con mayores tasas de germinación se encuentran en la parte baja y media, las cuales germinaron en un amplio rango de condiciones de temperatura y disponibilidad de agua. Por el contrario, los requerimientos de temperatura y disponibilidad

de agua fueron más específicos en semillas provenientes de mayores altitudes durante la germinación.

De acuerdo con estos estudios, se puede observar que las poblaciones de *P. hartwegii* en el PNLM tienen una alta adaptabilidad a condiciones ambientales específicas que ocurren a través del gradiente altitudinal, estas características suponen que ante un cambio mínimo en temperatura y humedad podrían impactar significativamente en la dinámica poblacional de la especie.

3. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la diversidad y estructura genética es fundamental para establecer y definir acciones de manejo y conservación de especies vulnerables. En México, son escasos los trabajos sobre la diversidad y estructura genética de poblaciones de *P. hartwegii*, por lo que es de gran interés científico generar más información al respecto. Este estudio aporta conocimiento relevante de la genética poblacional de *P. hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche, con lo cual será posible proponer Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales de la especie en el Parque.

4. HIPÓTESIS

Sí el flujo genético entre las poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche es limitado, entonces la diversidad genética será baja, mientras que la estructura genética será alta.

5. OBJETIVOS

5.1. General:

Evaluar la estructura genética de poblaciones de *Pinus hartwegii* Lindl. en el Parque Nacional La Malinche (PNLM) para identificar unidades de conservación.

5.2. Particulares

1. Estimar la diversidad genética de las poblaciones de *P. hartwegii* en el PNLM para identificar poblaciones vulnerables.
2. Estimar la estructura genética de *P. hartwegii* en el PNLM para inferir los niveles de flujo genético inter e intra poblacional.
3. Identificar Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (grupos genéticos diferenciados) de *Pinus hartwegii* en el PNLM para proponer acciones puntuales de conservación.

6. METODOLOGÍA

6.1. Zona de estudio

El Parque Nacional La Malinche (PNLM), se ubica en los estados de Tlaxcala y Puebla, entre los 19° 06' 30" - 19° 20' 19" latitud Norte y los 97° 55' 32" - 98° 09' 55" latitud Oeste en la zona centro-oriente de México, y forma parte de la Faja Volcánica Transmexicana (Figura 3B). El volcán La Malinche es uno de los más antiguos en México, con un rango altitudinal que va de los 2,300 msnm hasta los 4,461 msnm que es la cima de la montaña (López-Domínguez y Acosta 2005).

El bosque de *P. hartwegii* se encuentra por arriba de los 3,400 msnm y hasta los 4,000 msnm, constituye el límite altitudinal de la vegetación arbórea, ocupando el 3.2 % de la superficie arbolada del PNLM (Rojas y cols. 2008; Viveros-Viveros y cols. 2009). En general es un bosque monoespecífico, de baja altura (ocho metros a 20 metros) y de densidad media a baja (CONANP 2013) (Figura 4).

En altitudes de 3,500 msnm puede estar asociado con bosques de *Abies religiosa*. El estrato arbustivo está constituido por *Juniperus monticola* Martínez, pero también destacan *Senecio cinerarioides* Kunth, *Senecio salignus* DC., y frecuentemente *Baccharis conferta* Kunth en sitios perturbados. Por último, el estrato herbáceo se compone principalmente de gramíneas como *Stipa ichu* (Ruiz & Pav) Kunth, *Festuca toluensis* Kunth y *Muhlenbergia macroura* (Humb., Bonpl. & Kunth) Hitchc., de las cuales, algunas se presentan en los páramos de altura (López-Domínguez y Acosta 2005).

6.2. Material biológico

Se ubicaron seis poblaciones de *P. hartwegii*, en dos laderas del PNLM (ladera norte y ladera sur). Estas poblaciones se encuentran distribuidas en tres niveles altitudinales: (1) el límite superior (~3900 msnm), (2) el nivel medio (~3750 msnm), y (3) el nivel inferior de la distribución de la especie (~3500) (Figura 3A). En cada nivel altitudinal se estableció un transecto sobre el cual se recolectaron acículas jóvenes y sin daño aparente de 20 individuos separados al menos cada 30 m, obteniendo en total 120 muestras.

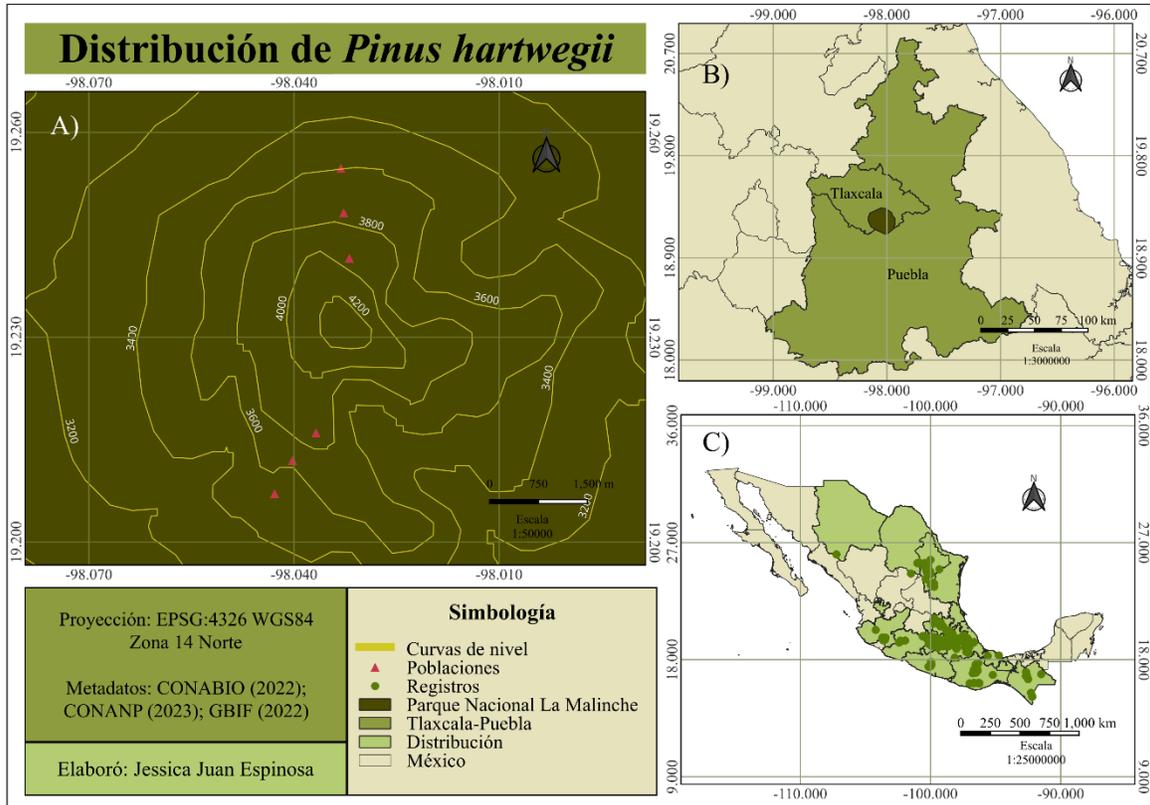


Figura 3. Distribución de *Pinus hartwegii* en México y área de estudio. A) Poblaciones de estudio de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche. B) Ubicación del Parque Nacional La Malinche. C) Distribución de *Pinus hartwegii* en México.

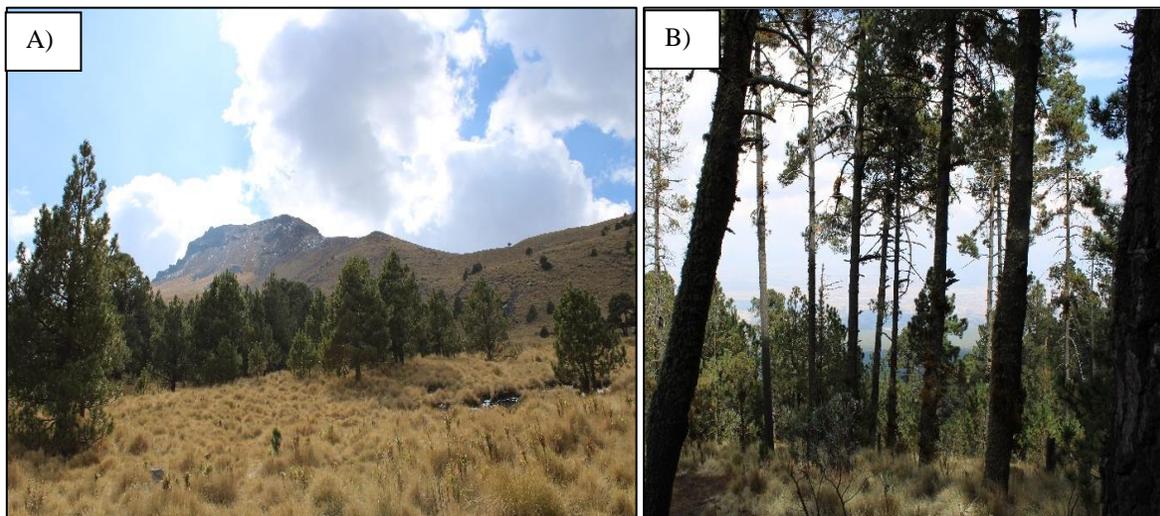


Figura 4. Bosque de pino de las alturas (*Pinus hartwegii*). Ambas fotografías en la ladera norte del Parque Nacional La Malinche: A) a 3900 msnm y B) a ~3700 msnm.

Las muestras de cada individuo fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml, con buffer Tris-EDTA pH 8.0 (Sigma-Aldrich). Cada muestra se rotuló con un ID especificando nombre de la especie, fecha, colectores, ladera, nivel altitudinal y posición geográfica tomada con GPS (Garmin eTrex[®] 10) (Anexo 1). Una vez en el laboratorio, las 120 muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento.

6.3. Extracción de ADN mediante método CTAB

El ADN se extrajo a partir de 200 mg a 300 mg de tejido foliar (acículas), mediante el método CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio; Doyle y Doyle 1990) (Anexo 2). Al utilizar acículas, es preferible utilizar métodos que eliminen polifenoles, polisacáridos y compuestos terpenoides. Debido a esto, el método de CTAB, es de las técnicas de extracción más utilizadas para una gran gama de especies fotosintéticas, ya que es un detergente catiónico que cumple la función de solubilizar principalmente polisacáridos (Cazal y cols. 2018; Palomera 2002). Se ha demostrado que con este método de extracción se puede obtener una cantidad importante de ADN de buena calidad tanto en hongos (Cazal y cols. 2018) como en plantas (Falcon y Varela 2007), por lo que resulta ser un método útil de extracción de ADN para el análisis de diversos marcadores moleculares.

Las muestras de ADN obtenidas se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la presencia de ADN (Anexo 3). Posteriormente, se determinó la concentración y calidad mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000, para proseguir con la amplificación de los loci de microsatélite de ADN de cloroplasto.

6.4. Amplificación de loci de microsatélites de ADN de cloroplasto.

Se amplificaron 10 loci de microsatélites de cloroplasto diseñados para *Pinus thunbergii* Parl. y *P. leucodermis* (Pt26081, Pt30204, Pt45002, Pt63718, Pt71936, Pt87268, Pt107148, Pt107517, Pt109567, Pt110048) (Tabla 1, Vendramin y cols. 1996). Los 10 loci se prepararon en reacciones de PCR individuales, cada reacción con 6 µl de Taq PCR Master Mix (Quiagen) 1µl de primer F (Forward), 1µl de primer R (Reverse) y 1 µl de ADN genómico total.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador BIO-RAD T100™ (Thermal Cycler). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: etapa de activación inicial de 94°C durante cinco minutos. Posteriormente, cada ciclo de PCR consistió en un minuto de desnaturalización a 94° C, seguido de un minuto de alineación de los primer a temperaturas específicas (T_m = temperatura de alineamiento de los primers) (Tabla 1) y un minuto de extensión a 72°C. Después de 32 ciclos, se dio una extensión final de ocho minutos a 72°C. Cada producto de PCR se visualizó en geles de poliacrilamida al 2% para definir la reacción exitosa. Finalmente, se visualizó por electroforesis capilar con el equipo QiAxcel (Qiagen) para la detección de genotipos.

Tabla 1. Microsatélites de ADN de cloroplasto utilizados para determinar la diversidad y estructura genética poblacional de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional La Malinche.

Locus	Secuencia (5'-3')	Tm	Ubicación	Número de unidades repetidas
Pt26081	CCCGTATCCAGATATACTTCCA TGGTTTGATTCATTCGTTTCAT	58.8	<i>rpoB</i>	(T)14 (T)11
Pt30204	TCATAGCGGAAGATCCTCTTT CGGATTGATCCTAACCATAACC	58.8	<i>clpP</i>	(A)12 (G)10
Pt45002	AAGTTGGATTTTACCCAGGTG GAACAAGAGGATTTTTTCTCATACA	50	<i>rbcL – atpB spacer</i>	(T)15 (T)9
Pt63718	AAGTTGGATTTTACCCAGGTG GAACAAGAGGATTTTTTCTCATACA	50	<i>rpl2</i>	(T)10 (T)9
Pt71936	TTCATTGGAAATACACTAGCCC AAAACCGTACATGAGATTC	50	IRF169	(T)16 (T)14
Pt87268	GCCAGGGAAAATCGTAGG AGACGATTAGACATCCAACCC	50	<i>trnI</i> (GAU)- <i>trnA</i> (UGC) spacer	(T)14 (T)10 C(T)5
Pt107148	GTTTCATTCCGGATCCTTAAAA GTACTTTCCTCAGCCAATCTG	50	<i>trnP</i> (GGG)- <i>trnV</i> (GAC) spacer	(T)10 (T)10
Pt107517	AAAGCTTTTATTGCGGCC ATGGCAGTTCCAAAAAAGC	50	<i>rpl32</i>	(T)11 (T)11
Pt109567	TATTATCGAACAACGAGAATAATCC TCACTGTCACTCTACAAAACCG	50	<i>rps12</i>	(T)11G(T)3 (T)9G(T)2
Pt110048	TAAGGGGACTAGAGCAGGCTA TTCGATATTGAACCTTGGACA	50	<i>rps12</i> intrón	(T)10 (T)9

Pinus thunbergii (pt) y *Pinus leucodermis* (pl); vendramin y cols. 1996). T_m = temperatura de alineamiento.

6.5. Análisis de datos

6.5.1. Estandarización de datos

Una de las principales limitaciones de los microsatélites tiene que ver con los métodos de evaluación porque pueden introducir variaciones en los tamaños de los alelos; estos errores resultan de varias fuentes, desde la amplificación en PCR, las características del marcador e incluso los instrumentos de electroforesis capilar (Morin y cols. 2009). Por lo que, una vez obtenida la base inicial de datos con los tamaños de los microsatélites se realizó un “binning” con el software Allelogram v. 2.2 (Morin y cols. 2009) (Anexo 4).

El “binning” permite la normalización automatizada y/o manual de los tamaños de los alelos entre grupos de datos, de modo que se puedan observar y corregir cambios sistemáticos de tamaño debido a diferencias electroforéticas (Morin y cols. 2009). Se estableció un rango de error de 10 pb para normalizar los tamaños de los alelos, este rango se definió con base a la resolución de lectura de los pares de bases del equipo de electroforesis capilar QIAxcel (Qiagen 2008). Debido a la ausencia de recombinación y herencia uniparental, cada haplotipo individual se definió por la combinación de los 10 fragmentos de loci de *P. hartwegii*, por lo que el conjunto de estos se consideró como un solo locus (Freeland 2005).

6.5.2. Diversidad genética

La diversidad genética por población se obtuvo mediante los siguientes parámetros: frecuencia haplotípica (F_h), número efectivo de haplotipos (N_{eh}), número de haplotipos (N_a) y la diversidad haplotípica (H) con el software GenAlEx v. 2.0.4. (Peakall y Smouse 2012).

6.5.3. Estructura genética

Para probar estructura genética, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) entre poblaciones y entre laderas en RStudio v. 4.2.1 (2022), utilizando la función *poppr.amova* del paquete *poppr* (Kamvar y cols. 2015). La significancia estadística se obtuvo con la función *randtest* con 100,000 repeticiones, con el paquete *ade4* (Dray y Dufour 2007). Después, se calculó la diferenciación genética (F_{ST}) por pares de poblaciones de acuerdo con

Weir y Cockerman (1984) con la función *pairwise.WCfst* del paquete *hierfstat* (Goudet y cols. 2022; Goudet 2005; Weir y Goudet 2017), la significancia estadística se realizó con una prueba de X^2 . Se graficó un mapa de calor de los resultados de F_{ST} por pares de poblaciones con la función *heatmap* del paquete *stats*.

Posteriormente, se examinaron los patrones de variación genética con un Análisis Factorial de Componentes Principales con la función *bca*, utilizando el paquete *ade4* (Dray y Dufour 2007), donde las poblaciones se definieron como un factor *a priori*. También, se realizó un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DPCA por sus siglas en inglés), el cual es un método multivariado que permite resumir la diferenciación genética entre grupos, y pasando por alto la variación dentro del grupo, logrando la mejor discriminación de individuos en grupos predefinidos (Jombart y cols. 2010). Este método también permite estimar la probabilidad de asignación de los individuos a cada grupo, por lo que se realizaron ambos análisis.

Para realizar el DAPC, primero se realizó un análisis de validación cruzada con la función de *xvalDapc* (10,000 repeticiones), esta función permite decidir el número de componentes principales (CP) a retener para realizar el DAPC disminuyendo el riesgo de sobreestimar el modelo al retener un mayor número de CP (paquete *adegenet*; Jombart y cols. 2010). Debido a que los cpSSR son altamente variables, se realizó un análisis de reasignación exitosa (basada en las funciones discriminantes) de individuos a sus grupos predefinidos, es decir, a las poblaciones *a priori*. Esta reasignación se realizó con la función de *assingplot*, del paquete *adegenet* (Jombart y cols. 2010).

6.5.4. Estructura genética espacial

El patrón espacial de variación genética se evaluó con un análisis de autocorrelación espacial con GenAlEx v. 2.0.4. (Peakall y Smouse 2012). Este análisis evalúa la similitud genética (distancia genética de Nei) entre pares de individuos en diferentes clases de distancia (km), mostrando la escala en la que se producen los patrones espaciales (Peakall y Smouse 2006). Se requieren como entradas para dicho análisis una matriz de distancia genética y una matriz de distancia geográfica, ambos se realizaron en GenAlEx v. 2.0.4.

Debido a que la precisión del análisis de autocorrelación depende del tamaño de clase de distancia y el número clases de distancia (Peakall y cols. 2003), y estos no se pueden calcular *a priori*, se ejecutaron cuatro análisis a diferentes tamaños de distancia. El primero se ejecutó en clases de distancia equivalentes a 10 m con 10 clases de distancia. El segundo con distancias de 20 m y ocho clases de distancia. El tercero con distancias de 30 m y cinco clases de distancia. El cuarto con distancias de 50 m y cuatro clases de distancia. Se evaluó la significancia estadística de cada análisis con intervalos de confianza del 95% y 9999 permutaciones (Peakall y Smouse 2006; Smouse y cols. 2008). Se concluyó una autocorrelación significativa cuando el valor de r observado estuvo fuera de los intervalos de confianza del 95% (líneas rojas intermitentes) y la barra de error sobre r no interceptó el eje \times en $r = 0$ (Peakall y cols. 2003).

Después, se implementó una prueba de Mantel para probar aislamiento por distancia. Para ello, se calcularon las distancias genéticas (euclidianas) con la función *dist* del paquete *stats* (R Core Team). Posteriormente se calcularon las distancias geográficas (euclidianas) con la función *distm* del paquete *Geosphere* (Hijmans y cols. 2017). Se transformaron los datos a clases de distancia (120 clases de distancia) con la función *vec2dist* del paquete *mefa* (Solymos, 2021). Con las clases de distancia genética y geográficas se realizó la prueba de Mantel con la función *mantel.randtest* (1000 permutaciones) del paquete *ade4* (Dray y Dufour 2007), y se ajustó con la función *lm* del paquete *stats*. Para visualizar si la correlación entre las distancias genéticas y geográficas es continua o distante, se realizó un mapa de densidad de kernel bidimensional con la función *kde2d* del paquete *MASS* (Ripley y cols. 2023).

Finalmente, se implementó un análisis espacial de componentes principales (sPCA, por sus siglas en inglés), el cual está diseñado para investigar patrones espaciales en la variabilidad genética, dados los genotipos multilocus (a nivel individual) o en las frecuencias alélicas (a nivel población) y las coordenadas espaciales. Para ello, primero se estimó la estructura local y global a nivel de individuos y de poblaciones con una red de tipo Gabriel. Los análisis se realizaron con el programa R v. 4.2.1 (2022), con la función *spca* del paquete *ade4* (Jombart y cols. 2008; 2015).

7. RESULTADOS

7.1. Diversidad genética

Se amplificaron 10 loci de microsatélites de ADN de cloroplasto, no obstante, no en todos los individuos se logró la amplificación exitosa. Las amplificaciones se dieron en el rango de 107 individuos (Pt87268) a 119 individuos (Pt26081) (Tabla 2).

Tabla 2. Número de muestras amplificadas por locus y por población. Rango de tamaño de cpSSR de *Pinus hartwegii*.

Población		PN1	PN2	PN3	PS1	PS2	PS3	Total
Locus	Rango de tamaño de cpSSR	N	N	N	N	N	N	N
Pt45002	145 pb – 175 pb	20	19	20	20	19	20	118
Pt30204	125 pb -155 pb	20	19	20	20	19	19	117
Pt107517	85 pb – 115 pb	18	15	20	20	18	16	107
Pt63718	95 pb – 105 pb	20	19	19	20	20	20	118
Pt71936	125 pb – 155 pb	18	18	17	16	18	20	107
Pt110048	85 pb – 135 pb	20	19	19	20	20	19	118
Pt109567	105 pb – 125 pb	20	19	19	20	20	19	118
Pt87268	125 pb – 175 pb	15	16	19	19	17	19	105
Pt26081	105 pb – 125 pb	19	20	20	20	20	20	119
Pt107148	115 pb – 135 pb	20	20	19	20	20	19	118

PN1= ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2= ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3= ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1= ladera sur, altitud 3500msm; PS2= ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3= ladera sur, altitud 3900 msnm; N= número de individuos. Pb = pares de bases.

Se encontraron 103 haplotipos en los 120 individuos (Anexo 5). El número efectivo de haplotipos osciló entre 15 en la población de la ladera norte (PN2) a 18 en dos poblaciones de la ladera sur (PS1 y PS3). La diversidad haplotípica (H) se encontró de 0.984 en la población PN2 a 0.995 en las poblaciones PS1 y PS3 (Tabla 3). La diversidad haplotípica promedio fue de 0.990.

Tabla 3. Parámetros de diversidad genética en poblaciones de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional La Malinche, con base en 10 loci de microsatélites de cloroplasto.

Población	N	Na	Neh	H
PN1	20	18	16.667	0.989
PN2	20	18	15.385	0.984
PN3	20	18	16.667	0.989
PS1	20	19	18.182	0.995
PS2	20	18	16.667	0.989
PS3	20	19	18.182	0.995
Total	120	18.3	16.958	0.990

N = tamaño de la muestra por población; Na = número de haplotipos diferentes en cada población diferentes; Neh = número efectivo de haplotipos; H = diversidad haplotípica; PN1= ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2 = ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3 = ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1 = ladera sur, altitud 3500msm; PS2 = ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 = ladera sur, altitud 3900 msnm.

7.2. Estructura genética

7.2.1. Análisis de varianza molecular

El análisis de varianza molecular (AMOVA) de las poblaciones reveló que existe mayor variación genética dentro de las poblaciones (99.23 %) que entre las poblaciones (0.76 %) ($p = 0.0004$). En tanto que, el AMOVA entre laderas mostró que existe mayor variación genética dentro de las laderas (99.40 %) que entre laderas (0.594 %) ($p = 0.000$).

Tabla 4. Análisis de Varianza Molecular de poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche.

Porcentaje de variación			
Entre		Dentro	
Poblaciones	Laderas	Poblaciones	Laderas
0.76 %	0.59 %	99.23 %	99.40 %

7.2.2. F_{ST} por pares de poblaciones

Los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones fueron bajos (0.0006 a 0.0131), y sin diferenciación significativa entre ningún par de poblaciones (Tabla 5).

Tabla 5. Valores por pares de diferenciación genética (F_{ST}) entre poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche.

	PN1	PN2	PN3	PS1	PS2	PS3
PN1	-					
PN2	0.0057 ^{ns}	-				
PN3	0.0080 ^{ns}	0.0006 ^{ns}	-			
PS1	0.0079 ^{ns}	0.0105 ^{ns}	0.0079 ^{ns}	-		
PS2	0.0105 ^{ns}	0.0131 ^{ns}	0.0105 ^{ns}	0.0079 ^{ns}	-	
PS3	0.0079 ^{ns}	0.0105 ^{ns}	0.0054 ^{ns}	0.0028 ^{ns}	0.0054 ^{ns}	-

PN1 = ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2 = ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3 = ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1 = ladera sur, altitud 3500 msnm; PS2 = ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 = ladera sur, altitud 3900 msnm; ^{ns} = no significativo.

El mapa de calor con dendrograma mostró una agrupación de las poblaciones por ladera (i.e. norte, sur) con base en la F_{ST} pareada (Figura 5), sin embargo, no hay diferenciación significativa.

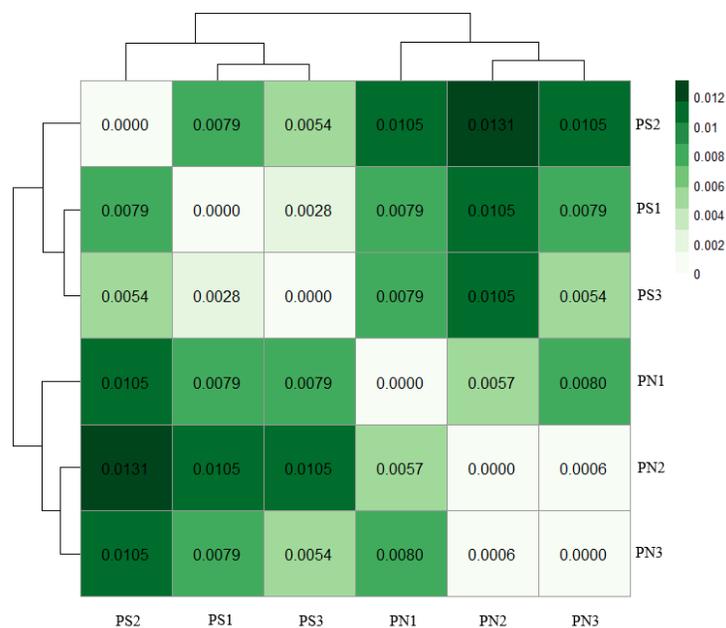


Figura 5. Mapa de calor con dendrograma de los valores de diferenciación genética (F_{ST}) por pares de seis poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche: PN1: ladera norte, altitud. 3500 msnm; PN2: ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3: ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1: ladera sur, altitud 3500 msnm; PS2 ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 ladera sur, altitud 3900 msnm. Escala de valores de verde fuerte (0.0131) a blanco (0).

7.2.3. Análisis Factorial de Componentes Principales

El Análisis Factorial de Componentes Principales agrupó a las poblaciones por laderas (Figura 6). Las poblaciones de la ladera norte (PN1, PN2 y PN3) se encuentran más agrupadas entre sí, que las poblaciones de la ladera sur (PS2, PS2, PS3).

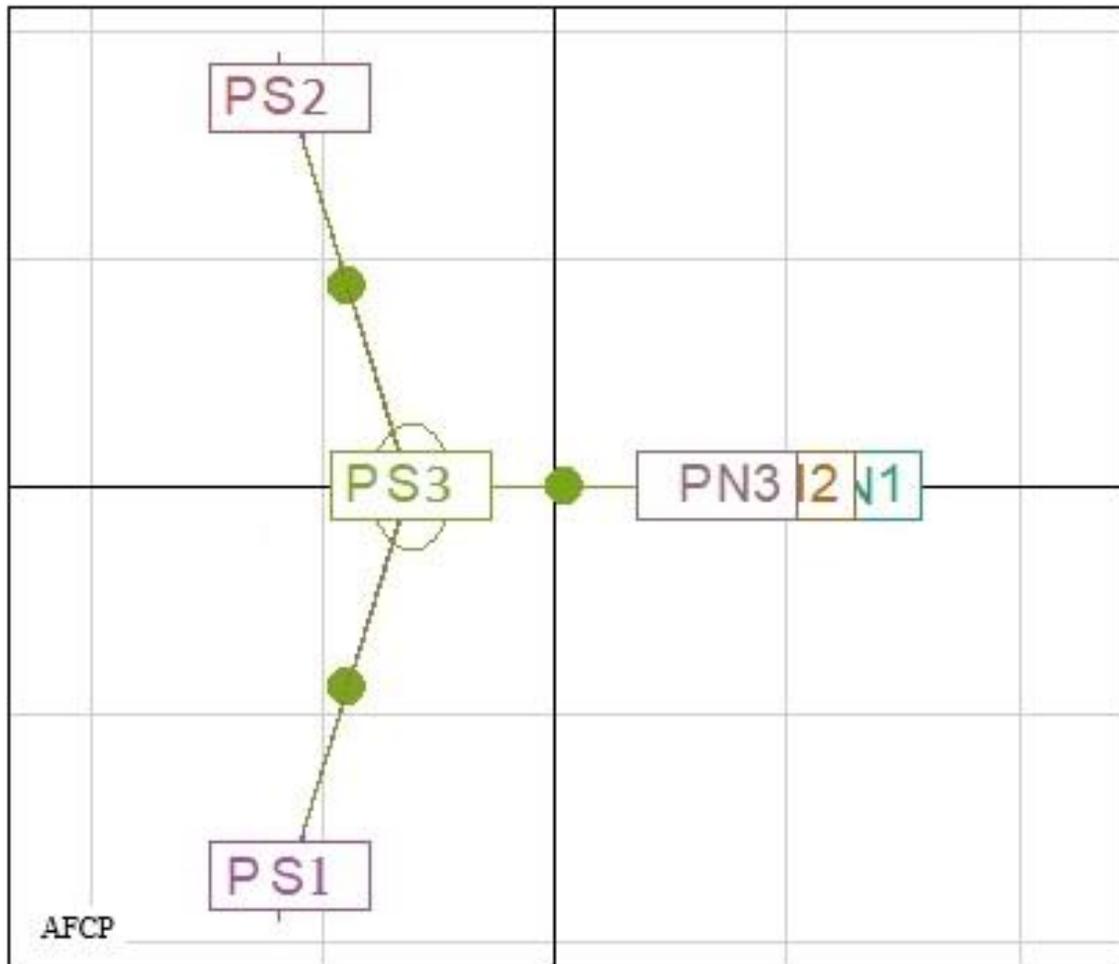


Figura 6. Análisis Factorial de Componentes Principales (AFCP) de la diversidad genética de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional La Malinche, con base en 10 loci de microsatélites de cloroplasto. PN1 = ladera norte, altitud 3500 msnm; NP2 = ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3 = ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1 = ladera sur, altitud 3500 msnm; PS2 = ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 = ladera sur, altitud 3900 msnm.

7.2.4. Análisis Discriminante de Componentes Principales

De acuerdo con la validación cruzada, los primeros 20 CP (de 100 PCA), por sus siglas en inglés) fueron suficientes para explicar la variación genética y realizar el análisis discriminante de componentes principales (DAPC) (Anexo 6). El gráfico de DAPC identificó un solo grupo genético, donde se observa que las poblaciones de la ladera sur son genéticamente más cercanas entre si. En cuanto a las poblaciones de la ladera norte, PN1 esta más lejano de PN2 y PN3 (Figura 3).

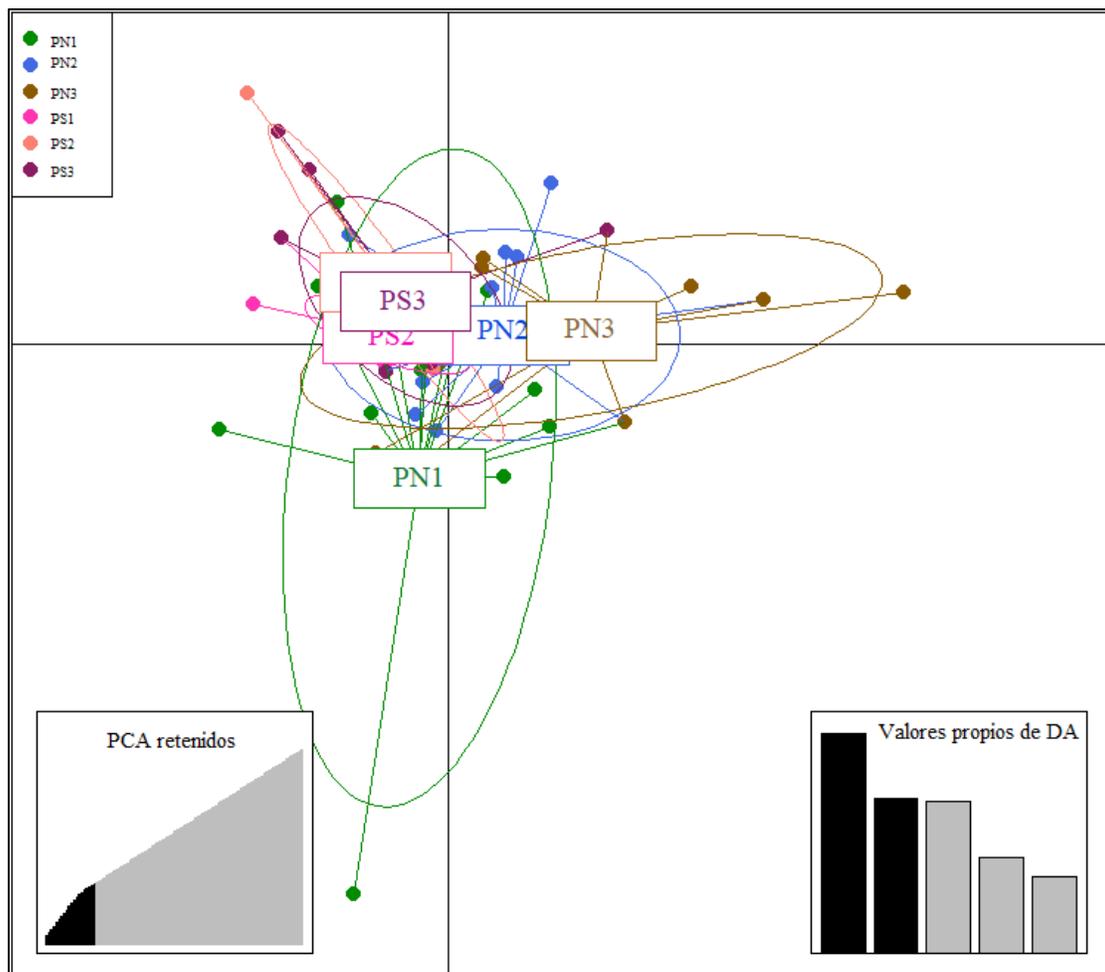


Figura 7. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) de seis poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche, utilizando 20 PCAs (en negro). En los valores propios se muestran las primeras cinco Funciones Discriminantes, de las cuales se utilizaron solo dos (barras en negro). PN1: ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2: ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3: ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1: ladera sur, altitud 3500msm; PS2 ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 ladera sur, altitud 3900 msnm. Los puntos muestran a los individuos y las elipses a los grupos genéticos.

El análisis de asignación de los individuos a los grupos predeterminados (poblaciones) muestra la probabilidad de pertenencia genética de cada individuo a la población de muestreo (color rojo) (Figura 8). En este caso, la mayoría de los individuos se asignaron a la población de origen, excepto algunos individuos en los que se identificó mayor afinidad genética a otras poblaciones (líneas amarillas: e.g. 17 NP2, 19 NP2; Figura 4).

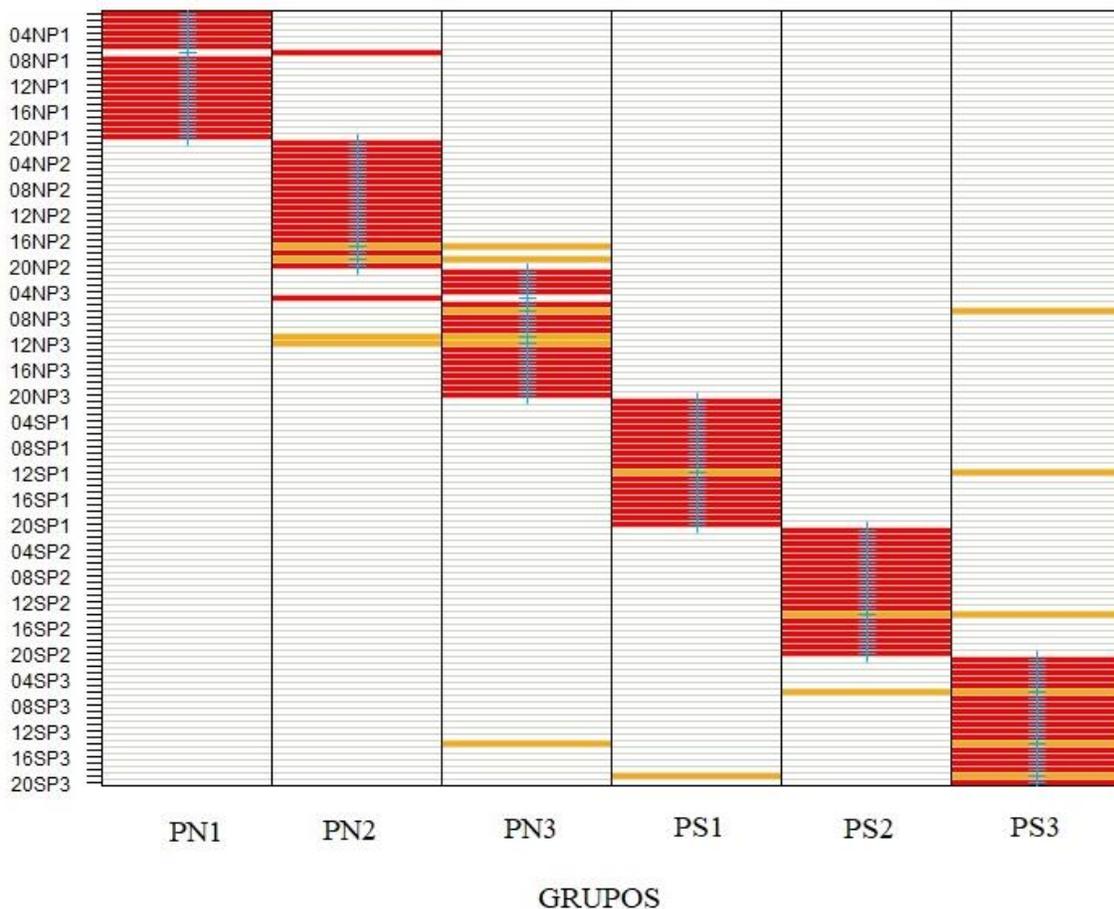


Figura 8. Análisis de reasignación exitosa (basado en funciones discriminantes de PCA) de seis poblaciones de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional La Malinche. PN1: ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2: ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3: ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1: ladera sur, altitud 3500msm; PS2 ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 ladera sur, altitud 3900 msnm. Los colores rojo y amarillo representan la probabilidad de membresía (pertenencia a un grupo genético; rojo = 1, amarillo= 0.5, blanco = 0). Las cruces azules sobre los rectángulos rojos corresponden a la asignación en el análisis de DAPC. El eje x corresponde a las poblaciones preestablecidas y el eje y a los individuos.

7.3. Estructura genética espacial (EGE)

7.3.1. Análisis de autocorrelación espacial

El análisis de autocorrelación espacial mostró valores positivos y significativos solo a los 40 m y 50 m (Figura 9).

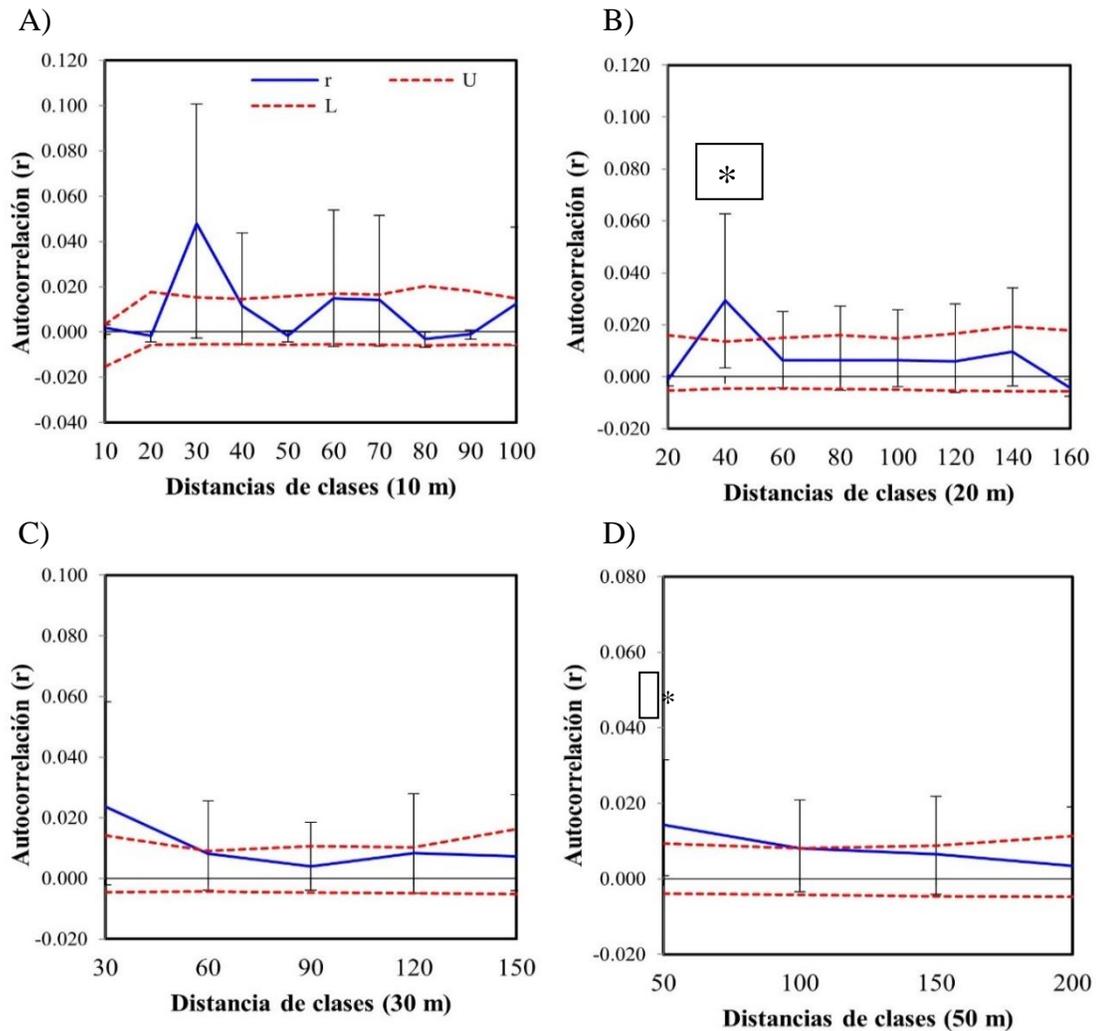


Figura 9. Autocorrelación espacial. Correlograma que muestra el coeficiente de autocorrelación espacial (r; línea azul) de todas las poblaciones. Las barras de error superior (U) e inferior (L) representan el intervalo de confianza de dos colas del 95% que se calculó con base a 9999 permutaciones. Las distancias de clases están establecidas cada 10 m (A), 20 m (B), 30 m (C) y 50 m (D). Se marcó con un * las distancias para las cuales la autocorrelación fue positiva y significativa.

7.3.2. Prueba de Mantel (Aislamiento por distancia)

La prueba de mantel detectó una correlación positiva y significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas ($r = 0.2448$; $p = 0.001$) que comprueba la presencia de aislamiento por distancia. El diagrama de la dispersión bidimensional de Kernel mostró dos nubes de puntos, lo que indica una diferenciación genética por parches entre las poblaciones de la ladera norte y las poblaciones de la ladera sur.

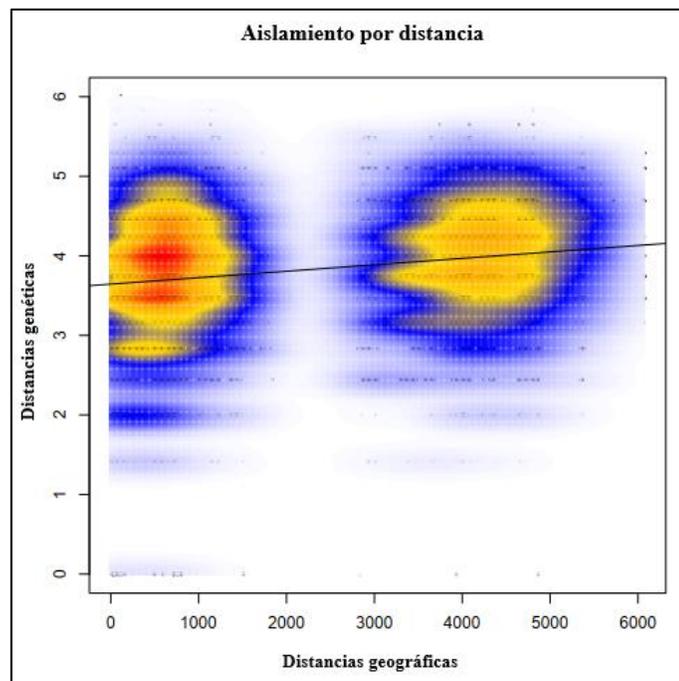


Figura 10. Aislamiento por distancia. Diagrama bidimensional de Kernel de la prueba de Mantel simple que ilustra el patrón de diferenciación genética en poblaciones de *Pinus hartwegii* con respecto a la correlación entre distancias geográficas euclidianas (eje x) y distancias genéticas (eje y).

7.3.3. Análisis Espacial de Componentes Principales

El Análisis Espacial de Componentes Principales (sPCA por sus siglas en inglés) mostró una estructura espacial a nivel global significativa ($p = 0.009$), pero no a nivel local ($p = 0.175$). Se identificaron dos grupos genéticos (uno en la ladera norte y otro en la ladera sur), y se observó la conectividad entre estos a través de las poblaciones de mayor altitud de

cada ladera (NP3 = latitud norte, altitud 3900 msnm y SP3 = latitud sur, altitud 3900 msnm) (Figura 11).

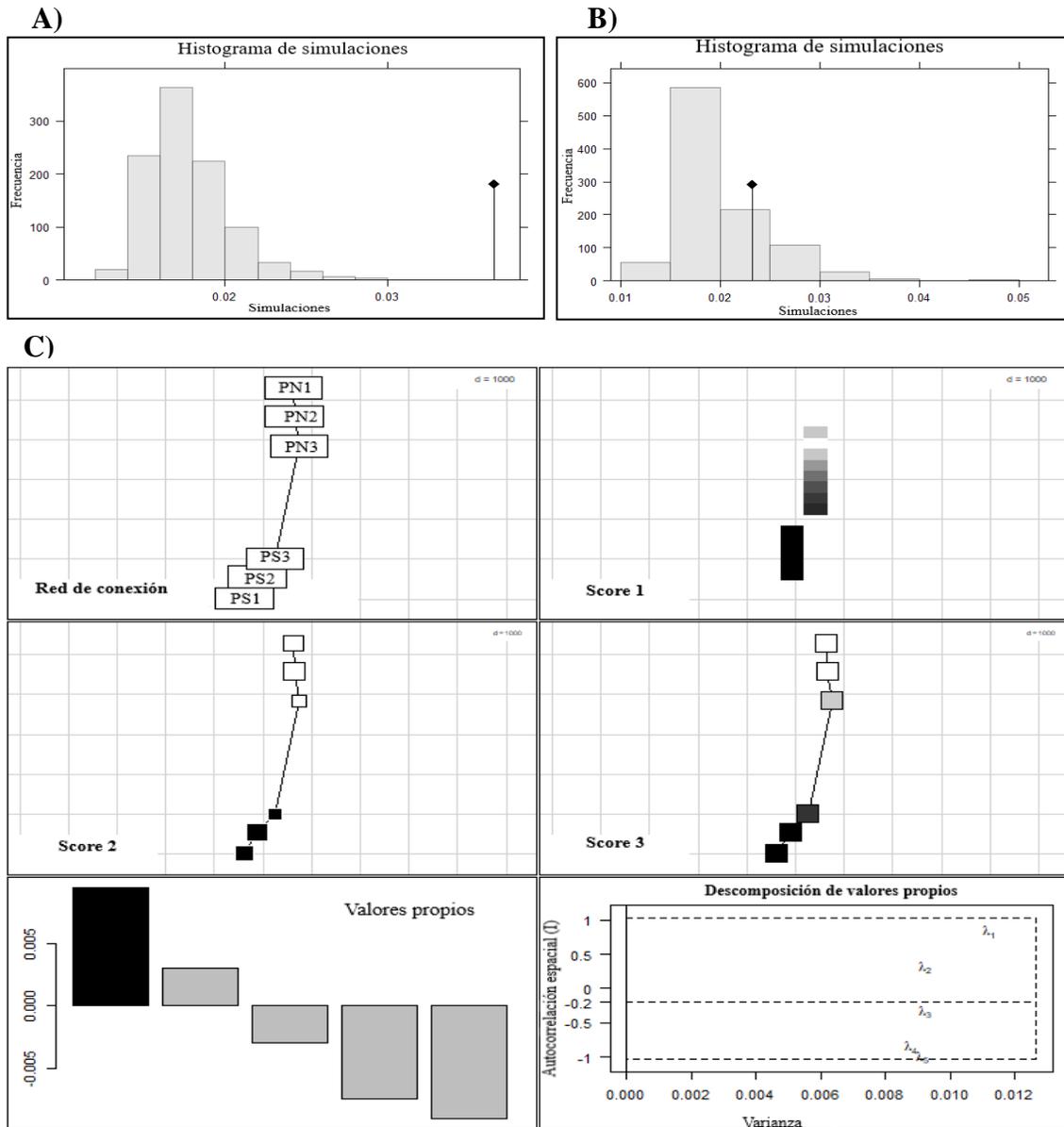


Figura 11. Estructura genética espacial sPCA. A) Análisis de estructura global; B) Análisis de estructura local. Los rombos negros indican la significancia estadística de las pruebas observadas contra las pruebas permutadas. C) Análisis Espacial de Componentes Principales (sPCA). La red de conexión muestra las relaciones espaciales posicionados por sus coordenadas geográficas. Score 1: interpolación local de puntuaciones en escala de grises. Score 2: Los cuadrados negros grandes están bien diferenciados de los cuadrados blancos grandes, pero los cuadrados pequeños están menos diferenciados. Score 3: en escala de grises representa los grupos genéticos. En los valores propios, la barra en color negro indica que solamente hay una estructura genética global. La descomposición de valores propios muestra mayor varianza y autocorrelación. PN1: ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2: ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3: ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1: ladera sur, altitud 3500msm; PS2 ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 ladera sur, altitud 3900 msnm.

8. DISCUSIÓN

La diversidad genética y su distribución dentro de las especies pueden tener efectos significativos en la supervivencia y evolución de éstos en un entorno cambiante (Dzialuk y cols. 2009). Determinar los niveles de diversidad y estructura genética es fundamental para establecer estrategias de conservación que contribuyan al mantenimiento de las especies como entidades capaces de evolucionar (Ledig 2004).

La identificación de los patrones de variación genética permite establecer Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (UCRGF) prioritarios. Se pueden considerar como una sola unidad de manejo si hay pocas diferencias entre las poblaciones. Por el contrario, si las poblaciones son muy diferentes, cada una representa una unidad genética que tendrían que conservarse independientemente para mantener su variabilidad (Ledig 2004). Los resultados no se ajustaron a la hipótesis de baja diversidad y alta estructura genética, contrariamente, se encontró una alta diversidad genética y una débil estructura espacial en función a la exposición de la ladera.

La diversidad genética promedio encontrada en *P. hartwegii* fue de $H = 0.9901$, valor mayor que lo reportado en otras especies de *Pinus*, usando cpSSR. Por ejemplo, Rai y Ginwal (2018) reportaron en *Pinus kesiya* Royle ex Gordon una diversidad haplotípica de $H = 0.654$; y Rodríguez-Banderas y cols. (2009) en *P. leiophylla* una $H = 0.760$. También, se han detectado valores semejantes a los encontrados en esta investigación, como en *P. uncinata* ($H = 0.986$, Dzialuk y cols. 2009) y *P. sylvestris* ($H = 0.978$, Robledo-Arnuncio y cols. 2005).

La alta diversidad genética encontrada en *P. hartwegii* y en otras especies de coníferas se puede explicar por las características de los microsátélites de cloroplasto (cpSSR). A pesar de que el ADN de cloroplasto presenta bajas tasas de mutación, el polimorfismo relativamente alto que se encuentra en los cpSSR es debido a su longitud variable resultado de la expansión y/o contracción de la región repetida (Freeland 2005; Provan y cols. 2001).

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) indicó que la mayor variabilidad genética se encuentra dentro de las poblaciones, como se ha reportado para otras especies de pinos, por ejemplo, *Pinus laricio* Savi (96.6%; Bonavita y cols. 2015) y *P. sylvestris* (92.79 %; Dzialuk y cols. 2009). Además, en nuestro caso, la mayor variabilidad se encontró dentro de las laderas (99.40 %). Al respecto, Bermejo-Velázquez (2004) mencionó que en especies que son predominantemente alógamas (polinización cruzada) y que son polinizadas por el viento, como los pinos, tienen menos del 10% de la variación entre las poblaciones, lo que coincide con este trabajo.

Los valores de F_{ST} por pares de poblaciones menores a 0.01 sin significancia estadística, indicaron una menor diferenciación entre poblaciones en comparación con otros estudios realizados con especies del género y analizados con cpSSR (e.g. $F_{ST} = 0.47$ en *P. kesiya*; Rai y Ginwal 2018). Por su parte, el Análisis Factorial de Componente Principales identificó a cada población como un grupo, sin embargo, este análisis resume la variabilidad genética entre individuos (entre y dentro de los grupos) y no es adecuado para tener una visión clara de la estructura genética (Jombart y cols. 2010). Por otro lado, el DAPC identificó un solo grupo genético, este análisis es más confiable con respecto al Análisis Factorial de Componentes Principales, debido a que maximiza la varianza entre grupos y minimiza la varianza dentro del grupo (Jombart y cols. 2010). Ambos resultados fueron consistentes con la baja diferenciación genética entre poblaciones, la cual no fue significativa.

Estos resultados se pueden explicar al considerar la historia de vida de *Pinus hartwegii*. Este pino es una especie longeva hasta 600 años (Villanueva-Díaz y cols. 2010) y con alta capacidad de dispersión del polen. Por ello, es probable que, debido a sus características, no haya una diferenciación genética significativa entre las poblaciones en un área de estudio tan pequeña como es el Parque Nacional La Malinche. Debido a lo anterior, es conveniente estudiar la estructura genética a una escala espacial mayor, sin embargo nuestra área de estudio nos permite estudiar la estructura espacial a escala fina, está es definida principalmente por la historia de vida (i. e. patrones de reproducción y dispersión), la distribución de los individuos en el espacio, la distancia que hay entre las poblaciones, la densidad de individuos, y la selección microambiental (De Lucas y cols. 2009; Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez 2013; Troupin y cols. 2006; Vekemans y Hardy 2004).

El análisis de autocorrelación espacial mostró una correlación positiva y significativa a los 40 y 50 m de distancia entre individuos y la prueba de Mantel indicó un aislamiento por distancia con una dispersión discontinua que representa la existencia de parches distantes y diferenciados (Thót y cols. 2019). La dispersión limitada de genes puede resultar en un exceso de apareamiento por proximidad y, en consecuencia, en un aislamiento por distancia dentro de una población continua (Wright 1943). Se sabe que el genoma del cloroplasto se dispersa inicialmente por el polen (que permite el flujo genético a grandes distancias) y luego por las semillas en el embrión (las cuales tienen tasas de dispersión más bajas que el polen), lo que implica que el ADN del cloroplasto se propague en todo el ciclo reproductivo en la mayoría de las coníferas (Méndez-González y cols. 2017).

En este caso, es probable que la dispersión restringida de las semillas sea el principal determinante del patrón de estructura genética espacial encontrada en *P. hartwegii* en el PNLM como lo sugieren diversos autores (De Lucas y cols. 2009; Vekemans y Hardy 2004; Wright 1943).

También se ha mencionado que la densidad poblacional y la selección microambiental influyen más que la dispersión limitada de las semillas en los patrones de EGE (Troupin y cols. 2006; Vekemans y Hardy 2004). En poblaciones con vegetación densa, las especies pueden tener una estructura genética espacial mayor, ya que la dispersión de las semillas se reduce por vientos menos intensos y por la interrupción de la autorrotación de las semillas por colisión con los árboles (Troupin y cols. 2006).

Respecto a la densidad, Portillo (2017) reportó que la mayor densidad de individuos de *P. hartwegii* en el PNLM se encuentra en la ladera norte, principalmente en poblaciones de mayor altitud y sugiere que la regeneración se ha mantenido baja. Esto puede indicar que existe heterogeneidad microambiental o una distribución irregular de las condiciones adecuadas para la regeneración. Bajo estas condiciones, tanto la densidad de las poblaciones como la heterogeneidad microambiental podrían limitar el flujo genético a través de la dispersión de las semillas y el establecimiento de plántulas en algunas zonas del Parque.

Por su parte, el sPCA identificó una estructura genética global donde se detectó que el flujo genético entre laderas norte y sur se da en las poblaciones de mayor elevación (PN3,

PS3). En cuanto a las poblaciones ubicadas en elevaciones bajas y medianas (3500 msnm y 3750 msnm), es probable que el flujo entre laderas sea poco constante (Renteria 2007).

Algunos autores proponen que más del 90% del flujo genético en las plantas se debe principalmente a la dispersión del polen (Allendorf y cols. 2002) y se ha reportado en algunas especies de pinos que este puede alcanzar grandes distancias, por ejemplo, *P. sylvestris* se puede dispersar hasta 100 km siendo aún viable (Robledo-Arnuncio 2005; 2011). No obstante, las tasas de migración del polen pueden verse influidas tanto por factores ambientales (e. g. condiciones del viento durante el transporte y/o corrientes ascendentes), como por la fenología de la floración (e. g. la sincronía de la floración) (Kavaliauskas y cols. 2022; Robledo-Arnuncio 2011).

En ese sentido, en las poblaciones de *P. hartwegii* del PNLM, Franquíz-Domínguez (2018) reportó que la liberación y receptividad del polen entre laderas coinciden en el mes de mayo lo que puede favorecer el intercambio genético. También hubo un mayor número de individuos con estructuras femeninas en la ladera sur, y un mayor número de individuos con estróbilos masculinos en la ladera norte en las elevaciones más altas (3900 msnm) (Franquíz-Domínguez 2018). Es posible que estas características en la sincronía reproductiva y la densidad de individuos que se encuentran en una fenofase reproductiva de *P. hartwegii* expliquen el intercambio genético entre las poblaciones de elevaciones más altas.

Por otro lado, la tala clandestina intensa que se observa en la ladera sur está alcanzando las poblaciones de elevaciones más bajas en la distribución de *P. hartwegii* (aprox. 3500 msnm; George-Miranda, comunicación personal, septiembre 2023). Tanto la tala clandestina, como el cambio de uso de suelo para el pastoreo no permiten la regeneración del bosque en ciertas zonas del parque, ya que ambas actividades aplastan a los individuos que apenas se están estableciendo (George-Miranda, comunicación personal, septiembre 2023). Aunque con los marcadores de cpSSR detectamos alta diversidad genética, no pudimos detectar el impacto de la fragmentación del hábitat, es importante recalcar que pueden disminuir rápidamente la diversidad genética de las poblaciones remanentes. Asimismo, los drásticos cambios ambientales que se esperan en las próximas décadas (e.g. incremento de las sequías y aumento de la temperatura) también tendrán consecuencias en los patrones de diversidad y

estructura genética de la especie, y por lo tanto en su permanencia en esta Área Natural Protegida.

A pesar de que en el PNLM las barreras ambientales (i.e. cambio de uso de suelo) pueden fragmentar a las poblaciones, y de que existen barreras geográficas importantes (e.g. Barranca Grande ubicada en la ladera este), los resultados indican que el flujo genético mantiene a las poblaciones de *P. hartwegii* como un solo grupo genético (población panmítica). Sin embargo, posiblemente la dispersión restringida de las semillas de *P. hartwegii* y los hábitats viables para la germinación y establecimiento tienen un efecto importante en la estructura genética espacial a escala fina, lo que está generando el aislamiento por distancia y el agrupamiento por ladera.

Debido a que la variación genética está débilmente estructurada por laderas, se recomienda establecer dos unidades de conservación de recursos genéticos forestales (UCRGF): uno en la ladera norte, y el otro en la ladera sur, con los siguientes objetivos: 1) asegurar una regeneración suficiente; 2) fomentar la diversidad genética; y 3) mantener las características ecológicas y genéticas de las unidades de la red de conservación (Teissier du Cross 2001). Para cumplir estos objetivos es necesario que las parcelas de conservación tengan un mínimo de individuos reproductivos, alrededor de 750 a 1150 individuos de acuerdo con Gregorius (1980), así como delimitar una zona de protección alrededor de las unidades de conservación. También, se proponen definir rodales semilleros, los cuales se pueden establecer con el aporte de la variabilidad genética de este proyecto, junto con la información disponible acerca de la producción de semillas (Montero-Nava 2020), la germinación (George-Miranda 2022) y la regeneración de *P. hartwegii* en el PNLM (Portillo 2017).

9. CONCLUSIONES

1. Con base en los loci de microsatélites de cloroplasto, *P. hartwegii* presenta una alta diversidad genética ($H = 0.9901$) en las poblaciones estudiadas.
2. La mayor variación genética se encontró dentro de las poblaciones (99.23 %) y dentro de las laderas (99.40 %), como sucede con la mayoría de las especies de coníferas.
3. Se detectó una estructura genética espacial débil por ladera con un patrón de aislamiento por distancia que se puede explicar por la dispersión limitada de las semillas, y otros factores microambientales que pueden estar jugando un papel importante en el flujo genético.
4. El flujo genético se presenta entre laderas norte y sur en las poblaciones de mayor elevación (PN3 y PS3).
5. Debido a que las poblaciones estudiadas de *P. hartwegii* presentan una estructura genética espacial entre laderas, se propone establecer dos UCRGF: una en la ladera sur y otra en la ladera norte.

10. PERSPECTIVAS E IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

El Programa de Manejo del Parque Nacional La Malinche atiende las problemáticas del Parque bajo seis subprogramas que siguen las siguientes líneas estratégicas: 1) protección; 2) manejo; 3) restauración; 4) conocimiento; 5) cultura y 6) gestión (CONANP 2013). El manejo del PNLM ubica unidades geográficas sujetas a políticas de manejo distintas, las cuales se denominan subzonas (seis subzonas en el PNLM) donde se establecen los permisos o restricciones de ciertas actividades.

De acuerdo con la información obtenida en el presente estudio, se sugiere implementar las siguientes estrategias de manejo y conservación de *P. hartwegii* en el Parque:

- Establecer dos Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales: la primera con poblaciones de ladera norte y la segunda con poblaciones de la ladera sur.
- Definir acciones en cada subprograma de manejo para la conservación de las poblaciones de *P. hartwegii* en el Parque, se proponen las siguientes:
 - **Manejo:**
 - (1) Disponer áreas de protección donde la regeneración y las tasas de germinación son bajas, pero con alta diversidad genética (PN1 y PS3 respectivamente).
 - (2) Establecer rodales semilleros en los sitios donde se observa mayor tasa de germinación y diversidad genética. En este caso, se proponen las poblaciones PS1 y PS2. Para la ladera norte, se recomienda repetir el experimento de germinación para establecer estos sitios, pero por la diversidad genética se pueden establecer en la población PN1.
 - **Protección:** Mantener la vigilancia en las poblaciones de conservación para evitar la tala clandestina y el mantenimiento de los rodales establecidos.
 - **Restauración:** Como propuesta de restauración, se pueden establecer actividades de silvicultura (cultivos y mantenimiento de bosques de *P. hartwegii*) en zonas fragmentadas del bosque de *P. hartwegii*, donde los

árboles semilleros provengan de poblaciones con alta diversidad genética y tasas de germinación (e. g. PN1 y PS1).

- **Conocimiento:** Generar y divulgar conocimiento sobre las especies forestales que se encuentran en el PNLM, principalmente del bosque de *P. hartwegii* y de los beneficios ecológicos de los que provee a los estados de Tlaxcala y Puebla, mediante actividades de difusión científica en centros educativos, así como en las comunidades que se encuentran dentro del polígono del Parque.
- **Cultura:** Promover actividades recreativas en el PNLM con visitas ordenadas a la Estación Biológica, así como recorridos interactivos en el Parque donde se impulse el conocimiento, el respeto y el cuidado de los bosques de *P. hartwegii*.
- Finalmente, es recomendable monitorear la diversidad genética con marcadores nucleares de las mismas poblaciones de *P. hartwegii* en el PNLM y ampliar la investigación en plántulas de diferentes generaciones, ya que esta información puede complementar y generar más datos sobre la estructura genética de la especie.

11. REFERENCIAS

- Aguirre Planter E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En Ecología Molecular. Eguiarte LE, Souza V y Aguirre X (Comp.). 49-59 p.
- Alba-Landa J, Aparicio-Rentería A, & Márquez Ramírez J. 2003. Potencial y eficiencia de reproducción de semillas de *Pinus hartwegii* Lindl. de dos poblaciones de México. Foresta Veracruzana 5(1): 23-26.
- Allendorf FW, Luikart GH y Aitken SN. 2013. Conservation and the genetics of populations. Editorial Wiley-Blackwell. UK.
- Allendorf FW, Funk WC, Aitken SN, Byrne M y Luikart G. 2022. Conservation and the genomics of populations. Oxford University Press. UK.
- Almazán-Nuñez RC, Puebla-Olivares F y Almazán-Juárez A. 2009. Diversidad de aves en bosques de pino-encino del centro de Guerrero, México. Acta Zoológica Mexicana (n.s) 25(1): 123-142.
- Aranguren-Méndez JA, Román-Bravo R, Isea W, Villasmill Y. y Jornada J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Asociación Latinoamericana de Producción Animal 13 (1): 30-42.
- Arzate-Fernández AM, Gutiérrez-González G y Heredia Bobadilla RL. 2016. Diversidad genética de dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca: una alternativa de conservación. Universidad Autónoma del Estado de México. Estado de México.
- Bermejo-Velázquez B. 2004. Análisis de la estructura genética en poblaciones de árboles forestales. En: Manejo de recursos genéticos forestales. Vargas Hernández JJ, Bermejo Velázquez B, Ledig FT, (eds.) Editorial Colegio de Postgraduados, Montecillo, México y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco.

- Bonavita S, Vendramin GG, Bernardini V, Avolio S y Regina TMR. 2015. The first SSR-based assessment of genetic variation and structure among *Pinus laricio* Poiret populations within their native area. *Plant Biosystems- An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 150 (6): 1271-1281.
- Bucci G, Anzidei M, Madaghiele A y Vendramin GG. 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in *Pinus halepensis*-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Molecular Ecology* 7: 1633-1643.
- Caballero M, Lozano S y Ortega B. 2007. Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: una perspectiva desde las ciencias de la Tierra. *Revista Digital Universitaria*. 8(10) 1-12.
- Cazal Martínez CC, Arrúa Alvarenga AA, Moura Mendes J, Reyes Caballero YM, Chávez AR y Kohli MM. 2018. Comparación de eficiencia entre dos protocolos de extracción de ADN genómico de *Magnaporthe* sp y su uso con marcadores moleculares. En: *Pyricularia* de trigo en Paraguay: Compendio de investigación. Chávez AR. y Kohli, MM (eds.). Editorial CAPECO. Paraguay.
- Ceccarelli S y Rabinovich JE. 2015. Global climate change effects on Venezuela's vulnerability to chagas disease is linked to the geographic distribution of five triatomine species. *Journal of Medical Entomology* 52(6): 1333-1343.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (22/11/2021). *Bosques Templados*. <https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/bosqueTemplado.html>.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2013. Programa de Manejo Parque Nacional La Montaña Malinche o Matlalcuéyatl. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Ciudad de México.
- Cruz-Cárdenas G, López-Mata L, Silva JT, Bernal-Santana N, Estrada Godoy E y López-Sandoval JA. 2016. Potential distribution model of Pinaceae species under climate change scenarios in Michoacán. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Medio Ambiente* 22(2): 135-148.

- Dávila-Lara MA, Aguirre-Calderón OA, Jurado-Ybarra E, Treviño-Garza E, González-Tagle MA y Trincado G. 2019. Estructura y diversidad de especies arbóreas en bosques templados de San Luis Potosí, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 6(18): 399-409.
- De-Lucas AI, González-Martínez C, Vendramin GG, Hidalgo E y Heuertz M. 2009. Spatial genetic structure in continuous and fragmented populations of *Pinus pinaster* Aiton. *Molecular Ecology* 18(22):4564-4576.
- Delgado P, Cuenca A, Escalante AE, Molina-Freaner F y Piñero D. 2002. Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 27-37.
- Delgado P y Piñero D. 2002. 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*. *Acta Universitaria* 12(2): 3-19.
- Díaz Cordero G. 2012. El cambio climático. *Ciencia y Sociedad*. 37(2): 227-240.
- Doyle JJ y Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dray S y Dufour AB. 2007. The ade4 package: implementing the Duality Diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22(4): 1-20.
- Dzialuk A, Muchewicz E, Boratynski A, Montserrat JM, Boratynska K y Burczyk J. 2009. Genetic variation of *Pinus uncinata* (Pinaceae) in determined with cpSSR markers. *Plant Systematics and Evolution* 277: 197-205.
- Ebert D y Peakall R. 2009. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cp SSR discovery and application to a wide array of plant species. *Molecular Ecology Resources* 9: 673-690.
- Edmands S. 1999. Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution*. 53(6): 1757-1768.

- Eguiarte LE. 1986. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. Ciencias 001: 31-38.
- Eguiarte LE, Aguirre-Planter E, Scheinvar E, González-González A y Souza V. 2010. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México 1-30.
- Espinosa LB y Chávez ES. 2019. El otro genoma de las plantas: los cloroplastos y su ADN. Centro de Investigaciones Científicas Yucatán. 201-206.
- Falcon LI y Valera A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. En: Ecología Molecular. Eguiarte, LE, Souza V y Aguirre X (Comp.) 506-511 p.
- FAO. 2014. Plan de acción mundial para la conservación, la utilización sostenible y el desarrollo de los Recursos Genéticos Forestales. Comisión de Recursos Genéticos para la alimentación y la agricultura.
- Fernández JAF y López-Domínguez JC. 2005. Biodiversidad del Parque Nacional Malinche, Tlaxcala, México. Coordinación General de Ecología del Gobierno del Estado de Tlaxcala, México.
- Frankham RJ, Ballou D y Briscoe DA. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. New York.
- Franquiz Domínguez F. 2018. Factores asociados a la fenología de *Pinus hartwegii* Lindl. (2018). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Freeland JR. 2005. Molecular Ecology. Editorial Jhon Wiley & Sons. Inglaterra.

- Galicia L, Gamboa Cáceres AM, Cram S, Chávez Vergara B, Peña Ramírez V, Saynes V y Siebe C. 2016. Almacén y dinámica del carbono orgánico del suelo en bosques templados en México. *Terra Latinoamericana* 34: 1-29.
- Galicia L, Chávez Vergara BM, Kolb M, Jasso-Flores RI, Rodríguez-Bustos LA, Solís E, Guerra de la Cruz V, Pérez-Campuzano E y Villanueva A. 2018. Perspectiva del enfoque socioecológico en la conservación, el aprovechamiento y pago de servicios ambientales de los bosques templados de México. *Madera y Bosques* 24(2): 1-18.
- Galpern P, Peres-Neto PR, Polfus J, Manseau M. 2014. MEMGENE: Spatial pattern detection in genetic distance data. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 116-1120.
- García-Gómez A, Castaño-Meneses G y Palacios-Vargas JG. 2011. Distribución y diversidad de colémbolos (Hexapoda: Collembola) en el gradiente altitudinal de un bosque templado en México. *Revista de Biología Tropical* 59(1): 315-327.
- Garrido-Garduño T y Vázquez-Domínguez E. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 1031-1054.
- Geist HJ y Lambin EF. 2002. Proximate causes and underlying driving forces of tropical deforestation. *BioScience* 52(2): 143-150.
- George-Miranda S, Guillén S, Viveros-Viveros H, Montero-Nava R y Martínez y Pérez JL. 2022. Low germination rate of *Pinus hartwegii* seeds from trees growing at high elevations: vulnerability to climate change? *Forest Ecology and Management* 507(2022): 1-9.
- Gómez-Pineda E, Sáenz-Romero C, Ortega-Rodríguez JM, Blanco-García A, Madrigal-Sánchez X, Lindig-Cisneros R, López-Toledo L, Pedraza-Santos ME y Rehfeldt GE. 2020. Suitable climatic habitat changes for Mexican conifers along altitudinal gradients under climatic change scenarios. *Ecological Applications* 30(2): 1-16.

- González EG. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59: 377-388.
- Goudet J. 2005. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5: 184-186.
- Goudet J, Jombart T, Kamvar ZN, Archer E y Hardy O. 2022. Package “hierfstat”: Estimation and Test of Hierarchical F-Statistics. CRAN.
- Granados C, Serrano Giné D y García-Romero A. 2014. Efecto de borde en la composición y la estructura de los bosques templados. Sierra de Monte-Alto, Centro de México. *Ecología Caldasia* 36(2): 269-287.
- Gutiérrez E y Trejo I. 2014. Efecto del cambio climático en la distribución potencial de cinco especies arbóreas de bosque templado en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 179-188.
- Guzmán-Mendoza R, Zavala-Hurtado JA, Castaño-Meneses G y León-Cortés JL. 2014. Comparación de la mirmecofauna en un gradiente de reforestación en bosques templados del centro occidente de México. *Madera y Bosques* 20(1): 71-83.
- Hamilton MB. 2009. *Population Genetics*. Wiley-Blackwell. 3er (ed.). UK.
- Hardy GH. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28: 49-50.
- Hartl DL y Clark AG. 1997. *Principles of population genetics*. 3ra Ed. Editorial Sinauer Associates.
- Hedrick PW. 2011. *Genetics of populations*. Editorial Jhons and Learning.
- Hernández-Velasco J, Hernández-Díaz JC, Fladung M, Cañadas-López A, Prieto-Ruiz JA y Wehenkel C. 2017. Spatial genetic structure in four *Pinus* species in the Sierra Madre Occidental, Durango, México.

- Hijmans RJ., Williams E, Vennes C y Hijmans MRJ. 2017. Package “geosphere”. Spherical trigonometry 1(17): 1-45.
- Iglesias A, Lourdes G, Alba Landa JL. Enriquez J. 2004. Estrategias para la conservación de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. En la región de Perote, Veracruz. Cuadernos de Biodiversidad 4-8.
- Iglesias-Andreu LG y Tivo-Fernández Y. 2006. Caracterización morfométrica de la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Veracruz, México. Ra Ximhai 2(2): 449-468.
- IPCC. 2019. Resumen para responsables de políticas. En: El cambio climático y la tierra: Informe especial del IPCC sobre el cambio climático, la desertificación, la degradación de las tierras, la gestión sostenible de las tierras, la seguridad alimentaria y los flujos de gases de efecto invernadero en los ecosistemas terrestres. Shukla PR, Skea J, Calvo Buendia E, Masson-Delmotte V, Pörtner HO, Roberts DC, Zhai P, Slade R, Connors S, van Diemen R, Ferrat M, Haughey E, Luz S, Neogi S, Pathak M, Petzold J, Portugal Pereira J, Vyas P, Huntley E, Kissick K, Belkacemi M, Malley J (eds). En prensa.
- IPCC. 2022. Summary for policymakers. Pörtner HO, Roberts DC, Plozanska ES, Mintenbeck K, Tignor M, Alegría A, Craig M, Langsdorf S, Löschke S, Möller V, Okem A (eds). In: Climate Change 2022: Impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the sixth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Pörtner HO, Roberts DC, Tignor M, Plozanska ES, Mintenbeck K, Alegría A, Craig M, Langsdorf S, Löschke S, Möller V, Okem A y Rama B (eds). Cambridge University Press, UK and New York.
- Jombart T, Devillard S, Dufour AB y Pointer D. 2008. Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. Heredity 101: 92-103.

- Jombart T, Devillard S y Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11(1): 1-15.
- Jombart T. 2015. A tutorial for the spatial Analysis of Principal Components (sPCA) using adegenet 2.0.0. Imperial College London.
- Kamvar ZN, Tabima JF, Everhart SE, Brooks JC, Krueger-Hadfield SA. 2015. Package poppr.
- Kavaliauskas D, Danusevicius D y Baliuckas V. 2022. New insight into genetic structure and diversity of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Lithuania based on nuclear, chloroplast and mitochondrial DNA markers. *Forest* 13: 1-21.
- Kimura M y Crow JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Lara-Resendiz RA, Galina-Tessaro P, Pérez-Delgadillo AG, Valdez-Villavicencia JH y Méndez-de la Cruz FR. 2019. Efectos del cambio climático en una especie de lagartija termófila de amplia distribución (*Dipsosaurus dorsalis*): un enfoque ecofisiológico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90: 1-11.
- Ledig FT. 2004. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. En Manejo de recursos genéticos forestales. Vargas Hernández JJ, Bermejo Velázquez B, Ledig FT, (eds.) Editorial Colegio de Postgraduados, Montecillo, México y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco.
- Legendre P. 1993. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? *Ecology* 74(6): 1659-1673.
- Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental. 2015. Diario Oficial de la Federación.

- Loeschcke V, Tomiuk J y Jain SK. 1994. Conservation Genetics. Editorial Springel Basel AG. 3-7 p.
- López-Domínguez JC y Acosta-Pérez R. 2005. Descripción del Parque Nacional La Malinche. En Biodiversidad del Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala. Fernández-Fernández, J. A. y López-Domínguez, J. C. Tlaxcala.
- López Téllez MC. 2019. Parque Nacional La Malinche y el impacto ecológico social de su decreto como Área Natural Protegida. Regiones y Desarrollo Sustentable XIX (36): 10-30.
- Manzanilla-Quijada GE, Mata Balderas JM, Treviño Garza EJ, Aguirre Calderon OA, Alanís Rodríguez E y Yerena Yamallel JI. 2020. Diversidad, estructura y composición florística de bosques templados del sur de Nuevo León. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 11(61): 94-123.
- Manzanilla-Quñones U, Aguirre Calderón O, Jiménez Pérez J, Treviño Garza EJ y Yerena Yamallel JI. 2018. Escenarios de cambio climático (CMIP-5) para tres áreas naturales protegidas en el Eje Neovolcánico Transversal. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 9(50): 514-537.
- Manzanilla-Quñones U, Aguirre Calderón OA, Jiménez Pérez J, Treviño Garza EJ y Yerena Yamallel JI. 2019. Distribución actual y futura del bosque subalpino de *Pinus hartwegii* Lindl. en el Eje Neovolcánico Transversal. Madera y Bosques 25(2), 836-843.
- Martínez M. 1948. Los pinos mexicanos. 2ª ed. México DF 361 p.
- Méndez-González ID, Jardón-Barbolla L y Jaramillo-Correa JP. 2017. Differential landscape effects on the fine-scale genetic structure of populations of a montane conifer from central Mexico. The Genetics & Genomes 13(30): 1-14.

- Menéndez R, González-Megías A, Lewis OT, Shaw MR y Thomas CD. 2008. Escape from natural enemies during climate-driven range expansion: a case study. *Ecological Entomology* 33: 413-421.
- Monárrez-González JC, Pérez-Verdín G, López-González C, Márquez-Linares MA y González-Elizondo MS. 2018. Efecto del manejo forestal sobre algunos servicios ecosistémicos en los bosques templados de México. *Madera y Bosques*, 24(2): 1-16.
- Montano V y Jombart T. 2017. An eigenvalue test for spatial principal component analysis. *BMC Bioinformatics* 18(1): 1-7.
- Montero Nava RM. 2020. Diferenciación de los indicadores reproductivos, sobrevivencia y crecimiento de plántulas de *Pinus hartwegii* procedentes de un gradiente altitudinal en el Parque Nacional La Malinche. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Morin PA, Manaster C, Mesnick SL y Holland R. 2009. Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data: overcoming the problems of allele size shift with ALLELOGRAM. *Molecular Ecology Resources* 9: 1451-1455.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- Ortega-Mata A, Mendizábal-Hernández L, Alba-Landa J, Aparicio Rentería A. 2003. Germinación y crecimiento inicial de *Pinus hartwegii* Lindl. de siete poblaciones del Estado de México. *Foresta Veracruzana* 5(2): 29-34.
- Palomera VA. Comparación de métodos de extracción de ADN en diferentes tejidos de tres especies de pinos blancos (*Pinus* spp.). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara. Jalisco.
- Peakall R, Ruibal M y Lindenmayer DB. 2003. Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* 57(5): 1182-1195.

- Peakall R y Smouse PE. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Peakall R y Smouse PE. 2012. Genalex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28(19):2537-2539.
- Pérez Rodríguez PM. 1984. Variación morfológica en acículas y conos de poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* del Eje Neovolcánico. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Pertoldi C, Bijlsma R y Loeschcke V. 2007. Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. *Biodiversity and Conservation* 16_ 4147-4163.
- Portillo Diaz CI. 2017. Estructura vertical y horizontal de bosques de *Pinus hartwegii* Lindl. en el Parque Nacional La Malinche: análisis de la regeneración natural y los factores que la afectan. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala.
- Powell W, Morgante M, McDevitt R, Vendramin GG y Rafalski A. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Science* 92: 7759-7763.
- Primack RB. 2014. *Essentials of conservation biology*. 6ta Ed. Editorial Sinauer Associates Incorporated. Pp 176-27.
- Provan J, Powell W y Hollingswoth PM. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology evolutionary. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16(3): 142-147.
- QIAGEN. 2008. QIAxcel User Manual. QIAGEN Group.

- Rai KC y Ginwal HS. 2018. Microsatellite analysis to study genetic diversity in Khasi Pine (*Pinus kesiya* Royle ex. Gordon) using chloroplast SSR markers. *Silvae Genetics* 67: 99-105.
- Ramón González JA y Aguilar AG. 2021. Expansión urbana irregular, cambio de uso del suelo y deterioro ambiental en la periferia norte de la Zona Metropolitana Puebla-Tlaxcala: el caso del Parque Nacional La Malinche. *Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía* 30(2): 441-458.
- Rentería MA. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En *Ecología Molecular*. Eguiarte LE, Souza V y Aguirre X (Comp.). 541-562 p.
- Ripley B, Venables B, Bates DM, Hornik K, Gebhardt A y Firth D. 2023. Package "MASS".
- Robledo-Arnuncio JJ y Gil L. 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94: 13-22.
- Robledo-Arnuncio JJ. 2011. Wind pollination over mesoscale distances: an investigation with Scots pine. *New Phytologist* 190: 222-233.
- Rocha M y Gasca J. 2007. Ecología molecular de la conservación. En *Ecología Molecular*. Eguiarte LE, Souza V y Aguirre X (Comp.). 251-278 p.
- Rodríguez-Banderas A, Vargas-Mendoza CF, Buonamici A y Vendramin GG. 2009. Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of Biogeography* 36: 1807-1820.
- Rojas-García F y Villers-Ruiz L. 2008. Estimación de la biomasa forestal del Parque Nacional Malinche Tlaxcala-Puebla. *Revista Ciencia Forestal en México* 33(104): 59-86.
- Sáenz-Romero C. 2015. Efectos potenciales del cambio climático en los recursos forestales. La sabanización de las regiones continentales de México. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* 15(30): 91-110.

- Sáenz-Romero C, Rehfeldt GE, Ortega-Rodríguez JM, Marín-Togo M, Madrigal-Sánchez X. 2015. *Pinus leiophylla* suitable habitat for 1961-1990 and future climate. *Botanical Sciences* 93(4): 709-718.
- Sáenz-Romero C, Charre- Medellín JF, Monterrubio-Rico T, Alvarez-Jara M y Crookston NL. 2020. Proyecciones de hábitat climático para biomas de Michoacán, en escenarios de cambio climático. *Ciencia Nicolatina* 79: 57-74.
- Sánchez-González A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques* 14(1): 107-120.
- Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5:63-69.
- Silva García JE, Aguirre Calderón OA, Alanís Rodríguez E, Jurado Ybarra E y Jiménez Pérez J. 2021. Estructura y diversidad de especies arbóreas en un bosque templado del noroeste de México. *Polibotánica Instituto Politécnico Nacional* 52: 89-102.
- Smouse PE, Peakall R y Gonzales E. 2008. A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. *Molecular Ecology* 17: 3389-3400.
- Solymos P. 2021. Package “mefa”.
- Teissier du Cros E. 2001. Conservación de los recursos genéticos forestales en Francia: evaluación y perspectivas. *Recursos Genéticos Forestales* 29 FAO.
- Tivo Fernández Y e Iglesias Andreu L. 2003. Evaluación del polen en *Pinus hartwegii* del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Foresta Veracruzana* 5(2): 41-48.
- Tóth EG, Tremblay F, Housset JM, Bergeron Y y Carcaillet C. 2019. Geographic isolation and climatic variability contribute to genetic differentiation in fragmented populations of the long-lived subalpine conifer *Pinus cembra* L. in the western Alps. *BMC Evolutionary Biology* 19 (190): 1-27.

- Troupin D, Nathan R y Vendramin GG. 2006. Analysis of spatial genetic structure in an expanding *Pinus halepensis* population reveals development of fine-scale genetic clustering over time. *Molecular Ecology* 15: 3617-3630.
- Ugalde-Ledesma S, Alcántara-Carbajal JL, Valdez-Hernández JI, Ramírez-Valverde G, Velázquez-Mendoza J y Tarángo-Arámbula LA. 2010. Riqueza, abundancia y diversidad de aves en un bosque templado con diferentes condiciones de perturbación. *Agrociencias* 44(2): 159-169.
- Valdez-Pérez ME, González Guerrero G, Morales Ibarra R y Bolaños Suarez RY. 2016. Reserva de carbono en biomasa forestal y suelos minerales en el Parque Nacional Malinche (México). *Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía* 25(1), 207-215.
- Van der Putten WH, Macel M y Visser ME. 2010. Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 365: 2025-2034.
- Vázquez Domínguez E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En *Ecología Molecular*. Eguiarte, LE., Souza V y Aguirre X (Comp.). 444-447 p.
- Vekemans X y Hardy OJ. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13: 921-935.
- Vendramin GG, Lelli L, Rossi P y Morgante M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595-598.
- Villanueva-Díaz J, Cerano Paredes J, Stahle DW, Constante García V, Vázquez Salem L, Estrada Ávalos J y Benavides Solorio JdD. 2010. Árboles longevos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 1(2): 7-29.
- Viveros-Viveros H, Sáenz-Romero C, Vargas-Hernández J, López-Upton J, Ramírez-Valverde G y Santacruz-Varela A. 2009. Altitudinal genetic variation in *Pinus*

- hartwegii* Lindl.: Height growth, shoot phenology, and frost damage in seedlings. *Forest Ecology and Management* 257: 836-842.
- Viveros-Viveros H, Sáenz-Romero C, Vargas-Hernández J, Tapia-Olivares BL, López-Upton J, Santacruz-Varela A. y Beaulieu J. 2014. Comparación de Qst vs. Fst en poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* Lindl. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37(2), 117-127.
- Weinberg W. 1908. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahresh. Verein f. vaterl. Naturk. In Wruttemberg* 64:368–382
- Weir BS y Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weir BS y Goudet J. 2017. A unified characterization of population structure and relatedness. *Genetics* 206: 2085-2103.
- Wheeler GL, Dorman HE, Buchanan A, Challagundla L y Wallace LE. 2014. A review of the prevalence, utility, and caveats of using chloroplast simple sequence repeats for studies of plant biology. *Applications in Plant Sciences* 2(12):1-12.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16(2): 97-159.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-137.
- Zane L, Bargelloni L y Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zuckerberg B, Woods AM y Porter WF. 2009. Poleward shifts in breeding bird distribution in New York State. *Global Change Biology* 15: 1866-1883.

12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Acícula: término utilizado en botánica para designar órganos (hojas de pinos) aciculares finos y largas. En forma de aguja.

ADN: ácido desoxirribonucleico, es un ácido nucleico que se encuentran en el núcleo o en algunos organelos (mitocondrias y cloroplastos) y contiene la información genética que se transmite de una generación a otra.

Alelo: forma alternativa de un gen (Allendorf y cols. 2022).

Alloenzima: una forma alélica de una enzima que se detecta mediante electroforesis de proteínas (Allendorf y cols. 2022)

AMOVA (Análisis de Varianza Molecular): enfoque estadístico para analizar la división de la variación genética total en una especie en componentes dentro y entre poblaciones o grupos en diferentes niveles de subdivisión jerárquica (Allendorf y cols. 2022).

Amplificación: aumento en el número de copias de un gen o de un segmento del genoma.

Área Natural Protegida: son zonas del territorio nacional en la que los ambientes originales no han sido significativamente alterados por la actividad del ser humano, o que sus funciones y ecosistemas requieren ser preservadas y restauradas, y de las cuales la nación ejerce soberanía y jurisdicción (LGEEPA 2015).

Autocorrelación espacial: es un procedimiento intrínsecamente geográfico que indica si hay dependencia espacial (Allendorf y cols. 2022).

Bosque templado: comunidades dominadas por árboles altos, mayormente pinos (*Pinus*) y encinos (*Quercus*), habitan zonas montañosas con clima templado a frío, entre los 2000 y 3400 msnm (CONABIO 2021) y se encuentran en ambos hemisferios del planeta.

Calentamiento global antropogénico: incremento en la temperatura global del planeta debido a la emisión de gases de invernadero por actividades humanas.

Cambio de uso de suelo: modificación de la cobertura natural para satisfacer necesidades sociales y económicas.

Clina: cambio direccional gradual en la frecuencia de un carácter o alelo a través de un gradiente geográfico o ambiental (Allendorf y cols. 2022).

Coefficiente de consanguinidad: una medida del nivel de endogamia en una población que estima la probabilidad de que un individuo posea dos alelos en un locus que son idénticos por descendencia (Allendorf y cols. 2022).

Conífera: grupo taxonómico más importante de las gimnospermas, son plantas con semillas e incluye a los géneros de pinos, cipreses, piceas, abetos entre otros.

Depresión endogámica: reducción de la adecuación de la progenie de apareamientos entre individuos emparentados en comparación con la progenie de individuos no emparentados (Allendorf y cols. 2022).

Deriva genética: Cambios aleatorios en las frecuencias alélicas en una población entre generaciones debido al muestreo al azar (Allendorf y cols. 2022).

Desnaturalización de ADN: separación de la doble hélice del ADN que ocurre cuando los puentes de hidrógeno se rompen por un cambio en el pH, cambio de calor o tratamiento químico, sin embargo, esta separación completa de las cadenas de ADN es reversible (Watson y cols. 2005).

Diversidad genética: variedad de alelos y genotipos presentes en una población, especie o grupo de especies (Frankham y cols. 2002).

Diversidad haplotípica: Una medida de la diversidad genética que describe el número y frecuencia de diferentes haplotipos y se define como la probabilidad de que dos haplotipos escogidos al azar dentro de una población sean distintos entre sí (Freeland 2005; Nei 1987).

Electroforesis: movimiento de proteínas o moléculas de ADN a través de un medio y de un campo eléctrico (Allendorf y cols. 2022).

Endogamia: apareamiento entre individuos emparentados que resulta en un aumento de la homocigosidad, ya que aumentan los alelos idénticos por descendencia (Allendorf y cols. 2022).

Equilibrio de Hardy-Weinberg: principio propuesto por Hardy y Weinberg en el que las frecuencias alélicas y genotípicas alcanzan un equilibrio en proporciones binomiales después de una generación y permanecen constantes en grandes poblaciones con apareamiento aleatorio y las cuales no experimentan migración, selección o mutación (Allendorf y cols. 2022).

Estructura genética: resultado de las diferencias de las frecuencias alélicas, y las diferencias de la variación genética entre individuos y poblaciones. Una alta estructura genética indica fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, al contrario, una baja estructura genética representa pocas diferencias en las frecuencias alélicas (Eguiarte y cols. 2010).

Estructura genética espacial: distribución no aleatoria en el espacio de genotipos y alelos en una población, que resulta de diferentes factores como: aislamiento geográfico puede deberse diferentes factores como el aislamiento geográfico, características del paisaje y que limitan el flujo genético y el apareamiento aleatorio (Vekemans y Hardy 2004).

Flujo genético: intercambio de información genética entre poblaciones a través de la migración (Allendorf y cols. 2022).

Frecuencia haplotípica: es el número de veces que se repite un haplotipo en una población o poblaciones.

Frecuencias alélicas: proporción de cada alelo en un locus dado en una población o poblaciones (Freeland 2005).

Gases de efecto invernadero: componentes gaseosos naturales y resultantes de las actividades humanas que se encuentran en la atmósfera y absorben radiación infrarroja atrapando el calor (dióxido de carbono, metano, óxido nitroso, vapor de agua, entre otros; IPCC 2019).

Gen: segmento de ADN que codifica proteínas, ARN o regula otros genes, se le considera la unidad básica de la herencia (Allendorf y cols. 2022).

Genética de la conservación: rama de la genética que se basa en la teoría de genética de poblaciones y las técnicas moleculares cuyo principal objetivo es preservar a las especies en riesgo de extinción como entidades dinámicas capaces de enfrentar cambios ambientales a largo plazo (Frankham 2002).

Genética de poblaciones: rama de la genética que estudia de manera empírica, experimental y teórica la variación genética en las poblaciones naturales, así como los factores que influyen en la cantidad y el patrón de la variación genética (Hedrick 2011).

Genotipo: la combinación de alelos presentes en un locus en un individuo (Frankham y cols. 2002).

Genoma: composición genética de una especie o individuo (Frankham y cols. 2002)

Haplotipo: combinación de alelos de diferentes loci que se heredan juntos, se encuentran en un solo cromosoma o en una molécula de ADN mitocondrial o de cloroplasto y en secuencias nucleares (Allendorf y cols. 2022).

Herencia uniparental: genes y elementos genéticos que se heredan de un solo progenitor. Este término se aplica más comúnmente a la herencia de genomas mitocondriales, cloroplastos y algunos cromosomas sexuales en organismos que se reproducen sexualmente (Freeland 2005).

Índice de fijación: mide la desviación de la heterocigosidad real en una población en relación con los niveles esperados en equilibrio de Hardy-Weinberg (Hamilton 2009).

Loci: plural de locus.

Locus: ubicación de un segmento de ADN en el genoma (Frankham y cols. 2002).

Marcador molecular: fragmento de ADN que puede ser identificado en el genoma.

Microsatélite: repeticiones en tándem de secuencias de ADN cortas de 1-6 nucleótidos. También conocidos como SSR (Allendorf y cols. 2022).

Mutación: cambio en la secuencia de ADN en la transmisión de la información genética de padres a hijos (Allendorf y cols. 2022).

Número efectivo de haplotipos: es el número de haplotipos que tiene mayor probabilidad de transmitirse a la siguiente generación. Teóricamente se define como el número de haplotipos que, si fueran igualmente frecuentes, darían como resultado la heterocigosidad observada (Kimura y Crow 1964).

Panmítico: apareamiento al azar.

Pares de bases: unidad que consta de dos nucleótidos (bases nitrogenadas). En el ADN hay cuatro bases que son: adenina, citosina, guanina y timina. En el ARN en vez de timina se encuentra el uracilo (Watson y cols. 2005).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, técnica cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN.

Polifenoles: compuestos químicos con propiedades antioxidantes que se encuentran en las plantas.

Polimorfismo: dos o más formas de un alelo en un locus (Allendorf y cols. 2022).

Polisacáridos: polímero formado por una gran sucesión de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos.

Potencial evolutivo: la capacidad de una especie para evolucionar y adaptarse a nuevas condiciones ambientales (Allendorf y cols. 2022).

Recursos Genéticos Forestales: el material hereditario que se encuentra dentro y entre las especies arbustivas y de árboles que tienen un valor social, científico, ambiental o económico real o potencial (FAO 2014).

Selección natural: contribución diferencial de los genotipos a la siguiente generación debido a las diferencias en la supervivencia y/o la reproducción (Allendorf y cols. 2022).

Tamaño efectivo de la población (N_e): el número de individuos reproductivos, ya que son éstos los que contribuyen genéticamente a la siguiente generación (Moreno Letelier 2007). También se define como el tamaño ideal de la población que experimenta la misma cantidad de deriva genética que la población observada (Allendorf y cols. 2022).

Terpenoides: compuestos aromáticos constituidos por unidades de isopreno que se encuentran en muchas especies de plantas.

T_m : temperatura de fusión de una secuencia de ADN en la cual las dos cadenas de ADN se empiezan a desnaturalizar y se pueden alinear los marcadores.

Unidades de Conservación de Recursos Genéticos Forestales: poblaciones forestales que a efectos de la conservación se consideran genéticamente distintas, estas diferencias se establecen por los niveles de diversidad y flujo genético entre poblaciones.

13. ANEXOS

Anexo 1. Datos de colecta

A1. Base de datos de la colecta de ejemplares georreferenciados de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche. ID = individuos; POB = población; PN1 = ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2 = ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3 = ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1 = ladera sur, altitud 3500 msnm; PS2 = ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 = ladera sur, altitud 3900 msnm.

ID	POB	Latitud	Longitud	ID	POB	Latitud	Longitud
1	PN1	19°15'16,7"	98°01'58,6"	31	PN2	19°15'05,32"	98°01'54,93"
2	PN1	19°15'16,84"	98°01'59,43"	32	PN2	19°14'53,63"	98°01'56,48"
3	PN1	19°15'17,07"	98°01'59,39"	33	PN2	19°14'53,45"	98°01'55,92"
4	PN1	19°15'16,60"	98°02'00,71"	34	PN2	19°14'53,43"	98°01'55,10"
5	PN1	19°15'16,33"	98°02'01,41"	35	PN2	19°14'53,12"	98°01'54,48"
6	PN1	19°15'16,22"	98°02'01,99"	36	PN2	19°14'53,02"	98°01'53,83"
7	PN1	19°15'16,63"	98°02'02,77"	37	PN2	19°14'53,06"	98°01'53,18"
8	PN1	19°15'17,15"	98°02'03,44"	38	PN2	19°14'52,82"	98°01'52,62"
9	PN1	19°15'17,35"	98°02'04,38"	39	PN2	19°14'52,95"	98°01'55,95"
10	PN1	19°15'17,43"	98°02'05,04"	40	PN2	19°14'52,86"	98°01'51,22"
11	PN1	19°15'16,78"	98°01'58,06"	41	PN3	19°14'29,58"	98°01'54,90"
12	PN1	19°15'16,92"	98°01'57,34"	42	PN3	19°14'29,71"	98°01'53,32"
13	PN1	19°15'16,79"	98°01'56,70"	43	PN3	19°14'29,35"	98°01'52,57"
14	PN1	19°15'16,55"	98°01'56,04"	44	PN3	19°14'29,12"	98°01'51,96"
15	PN1	19°15'16,46"	98°01'55,26"	45	PN3	19°14'28,69"	98°01'51,51"
16	PN1	19°15'16,27"	98°01'54,43"	46	PN3	19°14'29,31"	98°01'50,40"
17	PN1	19°15'16,35"	98°01'53,89"	47	PN3	19°14'29,23"	98°01'49,67"
18	PN1	19°15'16,38"	98°01'53,35"	48	PN3	19°14'29,60"	98°01'48,96"
19	PN1	19°15'16,33"	98°01'52,59"	49	PN3	19°14'29,27"	98°01'48,20"
20	PN1	19°15'16,36"	98°01'52,12"	50	PN3	19°14'28,28"	98°01'47,97"
21	PN2	19°14'53,60"	98°01'57,90"	51	PN3	19°14'36,88"	98°01'55,75"
22	PN2	19°14'53,65"	98°01'58,63"	52	PN3	19°14'29,87"	98°01'56,03"
23	PN2	19°14'53,60"	98°01'59,23"	53	PN3	19°14'30,39"	98°01'56,59"
24	PN2	19°14'53,65"	98°01'59,99"	54	PN3	19°14'30,73"	98°01'57,08"
25	PN2	19°14'53,91"	98°02'00,57"	55	PN3	19°14'31,31"	98°01'57,48"
26	PN2	19°14'53,91"	98°02'01,17"	56	PN3	19°14'31,82"	98°01'57,88"
27	PN2	19°14'53,97"	98°02'01,82"	57	PN3	19°14'32,16"	98°01'58,50"
28	PN2	19°14'53,96"	98°02'02,59"	58	PN3	19°14'32,55"	98°01'59,04"
29	PN2	19°14'53,87"	98°02'03,31"	59	PN3	19°14'33,16"	98°01'59,53"

30	PN2	19°14'54,14"	98°02'03,90"	60	PN3	19°14'33,31"	98°01'59,93"
----	-----	--------------	--------------	----	-----	--------------	--------------

ID	POB	Latitud	Longitud	ID	POB	Latitud	Longitud
61	PS1	19°12'25,52"	98°02'34,26"	91	PS2	19°12'42,89"	98°02'25,48"
62	PS1	19°12'25,21"	98°02'34,72"	92	PS2	19°12'43,29"	98°02'26,00"
63	PS1	19°12'25,42"	98°02'35,38"	93	PS2	19°12'43,53"	98°02'25,72"
64	PS1	19°12'25,54"	98°02'36,07"	94	PS2	19°12'42,69"	98°02'25,72"
65	PS1	19°12'25,47"	98°02'36,67"	95	PS2	19°12'43,16"	98°02'26,52"
66	PS1	19°12'26,02"	98°02'36,97"	96	PS2	19°12'44,34"	98°02'26,55"
67	PS1	19°12'25,66"	98°02'37,58"	97	PS2	19°12'45,26"	98°02'26,85"
68	PS1	19°12'25,72"	98°02'38,31"	98	PS2	19°12'45,44"	98°02'26,21"
69	PS1	19°12'26,17"	98°02'38,05"	99	PS2	19°12'45,85"	98°02'25,64"
70	PS1	19°12'26,19"	98°02'36,41"	100	PS2	19°12'44,87"	98°02'25,92"
71	PS1	19°12'23,75"	98°02'31,08"	101	PS3	19°12'55,58"	98°02'09,03"
72	PS1	19°12'25,06"	98°02'32,65"	102	PS3	19°12'55,58"	98°02'09,03"
73	PS1	19°12'25,67"	98°02'32,48"	103	PS3	19°12'56,97"	98°02'11,40"
74	PS1	19°12'24,80"	98°02'30"97"	104	PS3	19°12'56,22"	98°02'11,06"
75	PS1	19°12'24,45"	98°02'30,91"	105	PS3	19°12'55,82"	98°02'10,58"
76	PS1	19°12'24,95"	98°02'30,59"	106	PS3	19°12'55,31"	98°02'10,23"
77	PS1	19°12'24,61"	98°02'29,89"	107	PS3	19°12'55,03"	98°02'09,66"
78	PS1	19°12'25,03"	98°02'29,49"	108	PS3	19°12'54,67"	98°02'09,22"
79	PS1	19°12'25,91"	98°02'29,19"	109	PS3	19°12'54,57"	98°02'08,37"
80	PS1	19°12'25,68"	98°02'28,08"	110	PS3	19°12'54,06"	98°02'07,94"
81	PS2	19°12'43,00"	98°02'24,80"	111	PS3	19°12'57,94"	98°02'13,10"
82	PS2	19°12'42,71"	98°02'23,25"	112	PS3	19°12'58,77"	98°02'13,34"
83	PS2	19°12'42,64"	98°02'23,44"	113	PS3	19°12'59,34"	98°02'13,21"
84	PS2	19°12'42,86"	98°02'22,83"	114	PS3	19°12'59,76"	98°02'13,24"
85	PS2	19°12'43,39"	98°02'22,50"	115	PS3	19°13'00,03"	98°02'13,84"
86	PS2	19°12'43,88"	98°02'22,44"	116	PS3	19°13'00,74"	98°02'14,12"
87	PS2	19°12'44,57"	98°02'22,61"	117	PS3	19°13'01,33"	98°02'14,43"
88	PS2	19°12'45,27"	98°02'22,80"	118	PS3	19°13'01,87"	98°02'14,18"
89	PS2	19°12'45,70"	98°02'22,07"	119	PS3	19°13'02,27"	98°02'14,05"
90	PS2	19°12'42,71"	98°02'23,25"	120	PS3	19°13'03,01"	98°02'13,77"

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN con CTAB

Día 1

1. Moler de 100 a 200 mg de tejido foliar (acículas) con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino y eliminando al máximo las fibras.
2. Recuperar el polvo en un tubo de 1.5 ml y agregar de 0.5 a 1ml de buffer CTAB 2X. Pasar por un vortex 20 s.
3. Incubar a baño maría a 65° C toda la noche. Agitar los tubos cada 3 minutos mientras se está en el laboratorio.

Día 2

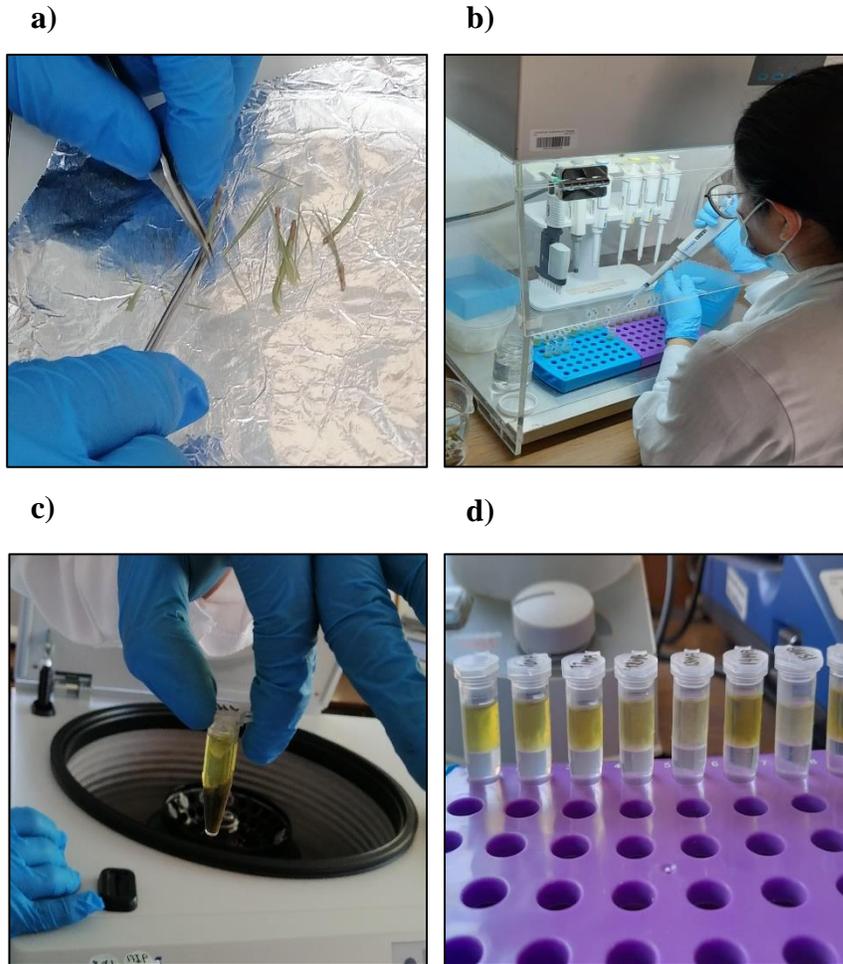
1. Retirar las muestras de la incubación y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 5 min. Agregar 400 µl de acetato de amonio al 7.5M. Pasar por un vortex 20 s.
2. Centrifugar a 4°C a 13000 rpm por 10 min. Trasladar ~700 µl de sobrenadante a un tubo nuevo.
3. Añadir a cada tubo 700 µl cloroformol:octanol (24:1), agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 4°C a 10000 rpm durante 10 min (después de la centrifugación el sobrenadante se debe observar transparente, si se observa turbio dar otro lavado con cloroformo).
4. Trasladar ~600 µl de sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 600 µl de alcohol isopropílico al 96%. Se debe evitar recuperar material de la difase que se forma. Dejar reposar 1 noche a -20°C.

Día 3

1. Centrifugar a 4°C a 13000 rpm durante 10 min. Eliminar el sobrenadante.
2. Limpiar el pellet agregando 300 µl de alcohol etílico al 80% frío y centrifugar a 13000 rpm durante 10 min.
3. Eliminar el sobrenadante decantándolo y dejar secar un día.

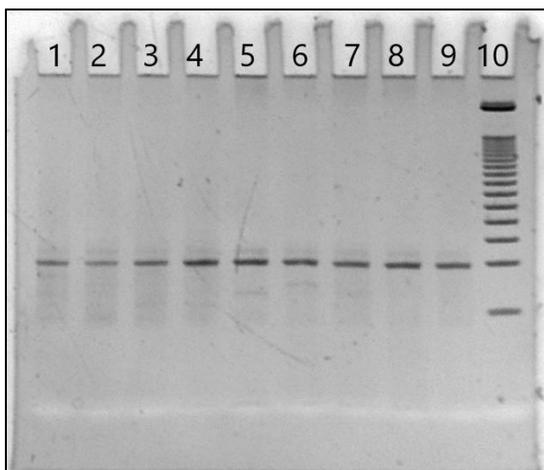
Día 4

1. Hidratar el pellet con 50 μ l de agua ultrapura (miliQ) o agua grado biología molecular.

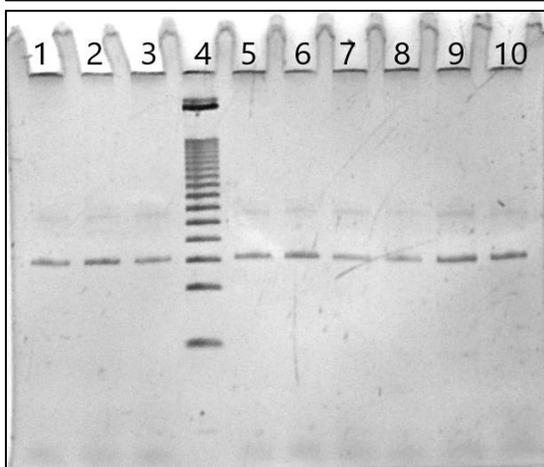


A2. a) Corte de acículas; b) inicio de procedimiento de extracción de ADN; c) centrifugación de muestras y d) difase que se forma después de la centrifugación.

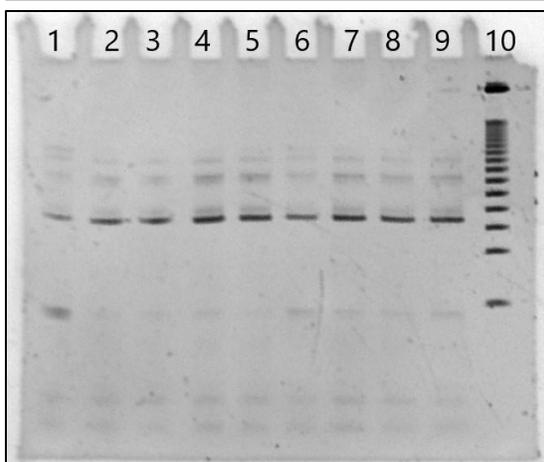
Anexo 3. Lectura de geles de poliacrilamida.



Gel	Marcador	Pozo	ID	POB
1	Pt63718	1	68	PS1
		2	66	PS1
		3	65	PS1
		4	88	PS2
		5	87	PS2
		6	86	PS2
		7	84	PS2
		8	83	PS2
		9	81	PS2
		10	Ladder	



Gel	Marcador	Pozo	ID	POB
2	Pt30204	1	76	PS1
		2	77	PS1
		3	78	PS1
		4	Ladder	
		5	79	PS1
		6	80	PS1
		7	11	PN1
		8	12	PN1
		9	13	PN1
		10	14	PN1



Gel	Marcador	Pozo	ID	POB
3	Pt45002	1	80	PS1
		2	42	PN3
		3	46	PN3
		4	47	PN3
		5	48	PN3
		6	51	PN3
		7	52	PN3
		8	53	PN3
		9	54	PN3
		10	Ladder	

A3. Geles de poliacrilamida al 2% para confirmar la amplificación de los marcadores Pt63718, Pt30204 y Pt45002. El marcador molecular es un Ladder de 50 pb. En cada tabla se indica el ID en cada pozo del gel. ID = individuo; POB = población.

Anexo 4. Base de datos (binning)

A4. Base de datos del tamaño en pares de bases de los microsátélites de cloroplastos de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche. ID = individuo; POB = población; columnas con el nombre del microsátélite de cloroplasto; PN1 = ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2 = ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3 = ladera norte, altitud 3900 msnm; PS1 = ladera sur, altitud 3500 msnm; PS2 = ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 = ladera sur, altitud 3900 msnm.

ID	POB	Pt45002	Pt30204	Pt107517	Pt63718	Pt71936	Pt110048	Pt109567	Pt87268	Pt26081	Pt107148
1	PN1	145 165	155 155	105 105	105 105	0 0	85 105	105 125	155 155	115 115	115 115
2	PN1	145 165	155 155	105 105	105 105	0 0	85 105	105 125	165 165	115 115	125 125
3	PN1	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	85 105	105 115	0 0	115 115	125 125
4	PN1	165 165	155 155	0 0	95 95	125 145	85 105	105 125	0 0	115 115	125 125
5	PN1	165 165	155 155	0 0	95 95	125 145	85 105	105 125	0 0	115 115	125 125
6	PN1	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	165 165	115 115	125 125
7	PN1	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
8	PN1	175 175	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	0 0	115 115	125 125
9	PN1	175 175	145 145	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	165 165	115 115	125 125
10	PN1	175 175	145 145	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	0 0	115 115	125 125
11	PN1	165 165	155 155	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
12	PN1	165 165	155 155	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	155 155	115 115	125 125
13	PN1	165 165	155 155	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	125 165	0 0	125 125
14	PN1	165 165	145 145	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
15	PN1	165 165	155 155	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
16	PN1	165 165	155 155	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
17	PN1	165 165	155 155	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	125 165	115 115	125 125
18	PN1	165 165	155 155	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
19	PN1	165 165	145 145	115 115	105 105	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
20	PN1	165 165	145 145	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125

ID	POB	Pt45002	Pt30204	Pt107517	Pt63718	Pt71936	Pt110048	Pt109567	Pt87268	Pt26081	Pt107148
21	PN2	155 165	155 155	0 0	95 95	0 0	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
22	PN2	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
23	PN2	155 175	155 155	0 0	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
24	PN2	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
25	PN2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	115 115	125 125
26	PN2	155 165	155 155	105 105	95 95	155 155	95 105	105 125	135 165	115 115	125 125
27	PN2	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	95 115	105 125	135 165	115 115	125 125
28	PN2	155 165	155 155	0 0	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
29	PN2	155 165	155 155	105 105	95 95	145 145	95 105	105 125	135 165	115 115	125 125
30	PN2	155 165	145 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
31	PN2	165 165	155 155	105 105	105 105	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
32	PN2	165 165	155 155	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
33	PN2	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	0 0	105 105	125 125
34	PN2	165 165	145 145	0 0	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
35	PN2	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
36	PN2	165 165	145 145	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	0 0	115 115	125 125
37	PN2	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
38	PN2	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	95 105	105 125	0 0	115 115	125 125
39	PN2	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	95 105	105 125	135 165	115 115	125 125
40	PN2	165 165	155 155	105 105	95 105	125 155	95 105	105 125	135 165	115 115	125 125

ID	POB	Pt45002	Pt30204	Pt107517	Pt63718	Pt71936	Pt110048	Pt109567	Pt87268	Pt26081	Pt107148
41	PN3	165 165	155 155	105 105	95 95	0 0	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
42	PN3	165 165	145 145	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
43	PN3	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
44	PN3	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	125 125	125 125
45	PN3	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
46	PN3	165 165	145 145	105 105	105 105	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
47	PN3	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
48	PN3	165 165	155 155	115 115	95 95	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
49	PN3	165 165	145 145	95 105	95 95	125 145	85 105	105 125	155 175	115 115	125 125
50	PN3	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	125 155	115 115	125 125
51	PN3	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	95 105	105 125	135 165	115 115	125 125
52	PN3	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
53	PN3	165 165	155 155	105 105	95 95	0 0	85 105	105 125	125 155	115 115	115 115
54	PN3	165 165	145 145	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
55	PN3	165 165	145 145	105 105	105 105	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
56	PN3	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
57	PN3	165 165	145 145	105 105	0 0	0 0	85 105	0 0	0 0	115 115	0 0
58	PN3	165 165	145 145	105 105	105 105	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
59	PN3	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	0 0	105 125	125 155	115 115	125 125
60	PN3	165 165	145 145	115 115	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125

ID	POB	Pt45002	Pt30204	Pt107517	Pt63718	Pt71936	Pt110048	Pt109567	Pt87268	Pt26081	Pt107148
61	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
62	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	0 0	95 105	105 125	125 155	115 115	125 125
63	PS1	165 165	155 155	95 95	95 95	125 145	95 105	105 125	135 165	115 115	125 125
64	PS1	165 165	155 155	95 95	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
65	PS1	165 165	155 155	95 95	95 95	0 0	85 105	105 125	0 0	115 115	125 125
66	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
67	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
68	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
69	PS1	165 165	145 145	85 85	95 95	125 145	85 105	105 125	125 165	115 115	125 125
70	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
71	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	0 0	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
72	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
73	PS1	165 165	145 145	95 95	95 95	125 145	85 135	105 125	125 155	115 115	125 125
74	PS1	155 165	145 145	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	125 155	115 115	125 125
75	PS1	165 165	145 145	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	135 165	115 115	125 125
76	PS1	155 165	155 155	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
77	PS1	165 165	135 155	95 95	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
78	PS1	165 165	135 155	95 95	105 105	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
79	PS1	165 165	125 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
80	PS1	165 165	135 155	95 95	95 95	0 0	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125

ID	POB	Pt45002	Pt30204	Pt107517	Pt63718	Pt71936	Pt110048	Pt109567	Pt87268	Pt26081	Pt107148
81	PS2	165 165	135 145	95 95	95 95	125 145	85 85	105 125	155 155	115 115	125 125
82	PS2	0 0	0 0	0 0	95 95	0 0	85 105	105 125	0 0	115 115	125 125
83	PS2	165 165	135 145	95 95	95 105	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
84	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	0 0	115 115	125 125
85	PS2	165 165	135 155	0 0	95 95	125 145	95 105	105 125	0 0	115 115	125 125
86	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	165 165	115 115	125 125
87	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	135 155	115 115	125 125
88	PS2	165 165	135 145	105 105	95 95	0 0	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
89	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
90	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
91	PS2	165 165	135 145	95 95	105 105	125 155	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
92	PS2	165 165	125 145	95 95	95 95	125 155	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
93	PS2	165 165	125 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 155	115 115	125 125
94	PS2	165 165	135 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
95	PS2	165 165	135 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	135 135
96	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
97	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 165	115 115	125 125
98	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	125 155	115 115	125 125
99	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	95 105	105 125	135 155	115 115	125 125
100	PS2	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125

ID	POB	Pt45002	Pt30204	Pt107517	Pt63718	Pt71936	Pt110048	Pt109567	Pt87268	Pt26081	Pt107148
101	PS3	155 165	135 155	0 0	105 105	125 145	0 0	105 125	135 165	115 115	125 125
102	PS3	165 165	135 155	0 0	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
103	PS3	165 165	135 145	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
104	PS3	175 175	135 145	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	135 135
105	PS3	165 165	0 0	0 0	95 95	125 145	85 105	125 125	0 0	115 115	125 125
106	PS3	165 165	135 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
107	PS3	165 165	135 155	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
108	PS3	165 165	135 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	0 0
109	PS3	165 165	135 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
110	PS3	165 165	135 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
111	PS3	165 165	125 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
112	PS3	165 165	135 135	95 95	95 95	125 145	95 105	105 125	125 155	115 115	125 125
113	PS3	165 165	135 155	95 95	95 95	125 145	95 105	105 125	125 155	115 115	125 125
114	PS3	165 165	155 155	105 105	95 95	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
115	PS3	165 165	135 155	95 95	95 95	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	125 125
116	PS3	165 165	135 145	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	125 155	115 115	135 135
117	PS3	165 165	135 145	105 105	105 105	125 155	85 105	105 125	135 165	115 115	135 135
118	PS3	165 165	135 145	105 105	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
119	PS3	165 165	145 145	95 95	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125
120	PS3	165 165	135 145	0 0	95 95	125 145	85 105	105 125	135 165	115 115	125 125

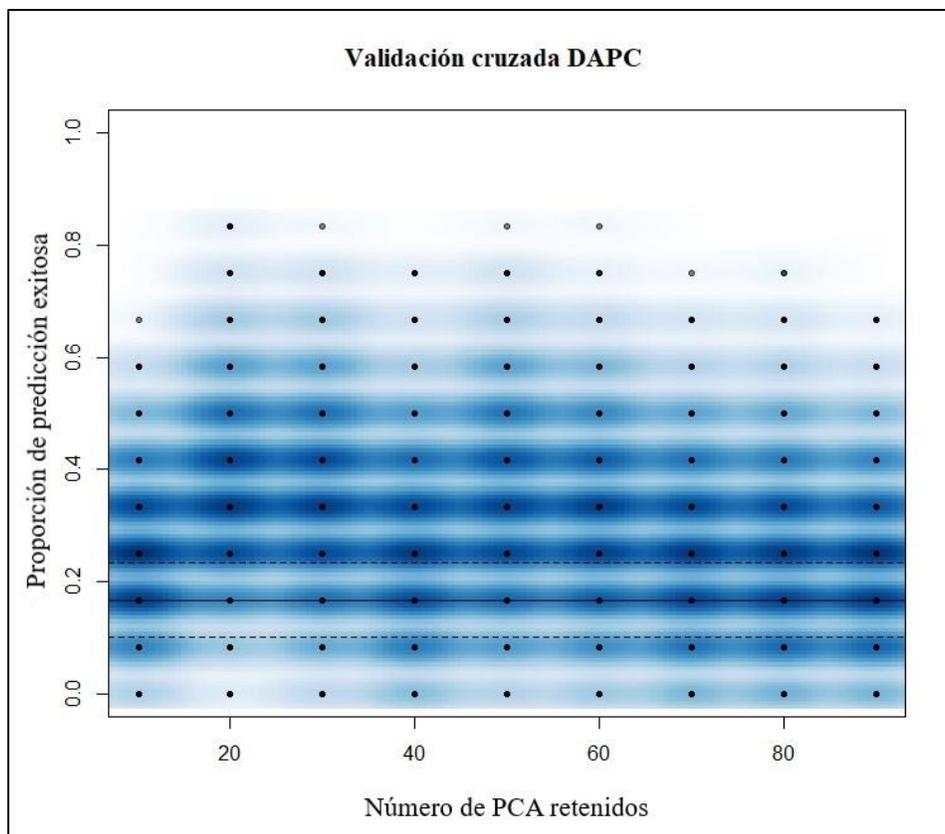
Anexo 5. Haplotipos

A5. Haplotipos de 10 loci de microsatélites de cloroplasto de individuos de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional La Malinche. ID = individuo; POB = población; PN1= ladera norte, altitud 3500 msnm; PN2 = ladera norte, altitud 3750 msnm; PN3 = ladera norte, altitud 3900 msnm. PS1 = ladera sur, altitud 3500 msnm; PS2 = ladera sur, altitud 3750 msnm; PS3 = ladera sur, altitud 3900 msnm.

ID	POB	Haplotipo	ID	POB	Haplotipo	ID	POB	Haplotipo
1	PN1	1633011521	21	PN2	2601011422	41	PN3	4631011422
2	PN1	1633011722	22	PN2	4531111422	42	PN3	4531211422
3	PN1	4631211022	23	PN2	3601211422	43	PN3	4531111322
4	PN1	4601111022	24	PN2	4531111422	44	PN3	4531111132
5	PN1	4601111022	25	PN2	0000000022	45	PN3	4531111422
6	PN1	4531111722	26	PN2	2631431422	46	PN3	4533111122
7	PN1	4531111422	27	PN2	4631241422	47	PN3	4631211122
8	PN1	5531111022	28	PN2	2601211422	48	PN3	4641211122
9	PN1	5531131722	29	PN2	2631331422	49	PN3	4521111622
10	PN1	5531131022	30	PN2	2511111422	50	PN3	4531131122
11	PN1	4633211322	31	PN2	4633111422	51	PN3	4631231422
12	PN1	4633211522	32	PN2	4631111422	52	PN3	4631211422
13	PN1	4633211202	33	PN2	4531111012	53	PN3	4631011121
14	PN1	4533211122	34	PN2	4501211422	54	PN3	4531211422
15	PN1	4633211122	35	PN2	4531111422	55	PN3	4533111422
16	PN1	4633211122	36	PN2	4531211022	56	PN3	4531111122
17	PN1	4633211222	37	PN2	4631211422	57	PN3	4530010020
18	PN1	4633211422	38	PN2	4631231022	58	PN3	4533111422
19	PN1	4543211422	39	PN2	4631231422	59	PN3	4531101122
20	PN1	4533211422	40	PN2	4632231422	60	PN3	4541111122

ID	POB	Haplotipo	ID	POB	Haplotipo	ID	POB	Haplotipo
61	PS1	4511111122	81	PS2	4311111522	101	PS3	2403101422
62	PS1	4511031122	82	PS2	0001011022	102	PS3	4401111422
63	PS1	4611131422	83	PS2	4312111122	103	PS3	4331211122
64	PS1	4611211422	84	PS2	4431111022	104	PS3	5333211423
65	PS1	4611011022	85	PS2	4401131022	105	PS3	4001112022
66	PS1	4511211422	86	PS2	4431131722	106	PS3	4311111122
67	PS1	4511211122	87	PS2	4431131322	107	PS3	4431111422
68	PS1	4511111322	88	PS2	4331011322	108	PS3	4331111120
69	PS1	4511111222	89	PS2	4431111322	109	PS3	4331111122
70	PS1	4511111122	90	PS2	4431211422	110	PS3	4331111422
71	PS1	4511011122	91	PS2	4313211322	111	PS3	4131111122
72	PS1	4511111422	92	PS2	4111211322	112	PS3	4211131122
73	PS1	4511121122	93	PS2	4131111322	113	PS3	4411131122
74	PS1	2531131122	94	PS2	4311111122	114	PS3	4631211122
75	PS1	4531131422	95	PS2	4331111123	115	PS3	4411211122
76	PS1	2611111422	96	PS2	4431111122	116	PS3	4333211123
77	PS1	4411211422	97	PS2	4431111222	117	PS3	4333211423
78	PS1	4413211422	98	PS2	4431131122	118	PS3	4331111422
79	PS1	4111111322	99	PS2	4431131322	119	PS3	4511111422
80	PS1	4411011322	100	PS2	4431111122	120	PS3	4301111422

Anexo 6. Análisis Discriminante de Componentes Principales.



A6. Validación cruzada de Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) de seis poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional La Malinche. La cantidad de PC retenidos en cada DAPC varía a lo largo del eje *x*; la proporción de predicción exitosa varía a lo largo del eje *y*. Los puntos negros son las réplicas individuales y la densidad de los puntos se muestra en azul.