



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estructura genética de dos cohortes de
Pinus leiophylla en Tlaxcala, México

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Braulio Ricardo Pérez Alva

Codirectoras

Dra. Bárbara Cruz Salazar
M. en C. Gema Lilia Galindo Flores

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2023



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estructura genética de dos cohortes
de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala, México

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Braulio Ricardo Pérez Alva

Comité Tutorial

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya
Dr. Guillermo Alejandro Pérez Flores
Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2023



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 **Braulio Ricardo Pérez Alva** titulada “**Estructura genética de dos cohortes de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala, México**” para optar por su grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de **Braulio Ricardo Pérez Alva** 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 el estudiante en su totalidad.

Por lo anterior, confirmo que **el 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 16 de agosto 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



**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 **Braulio Ricardo Pérez Alva** realiza para la obtención del grado de **Maestro 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 dos cohortes de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala, México”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 09 DE AGOSTO DEL 2023

DRA. YENDI EBENEZER NAVARRO NOYA

DRA. BÁRBARA CRUZ SALAZAR

DR. ARTURO ESTRADA TORRES

DR. GUILLERMO ALEJANDRO PÉREZ FLORES

DR. ALEJANDRO FLORES MANZANERO

FINANCIAMIENTO

- Esta investigación fue realizada en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) y en el Laboratorio de Interacciones Bióticas del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB), de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx).
- Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) FORDECYT-PRONACES proyecto CF-15033 “Genética de comunidades arbóreas de bosque templado en un gradiente de disturbio: implicaciones para la conservación de la biodiversidad”. También, el estudiante recibió una beca de manutención para sus estudios de maestría (número: 1146517) otorgada por la misma institución (CONACyT).



**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 **Braulio Ricardo Pérez Alva** realiza para la obtención del grado de **Maestro 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 dos cohortes de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala, México”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 09 DE AGOSTO DEL 2023

DRA. YENDI EBENEZER NAVARRO NOYA

DRA. BÁRBARA CRUZ SALAZAR

DR. ARTURO ESTRADA TORRES

DR. GUILLERMO ALEJANDRO PÉREZ FLORES

DR. ALEJANDRO FLORES MANZANERO

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado del CTBC, UATx, por permitirme desarrollar este proyecto y brindarme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos, así como el desarrollo de diferentes habilidades en mi formación académica.
- Al CONACyT, por la beca de maestría (número: 1146517).
- Al Comité Tutor y Evaluador, quienes a través de sus comentarios, observaciones y preguntas fortalecieron esta investigación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- A la Dra. Bárbara Cruz Salazar, por la oportunidad de desarrollar este proyecto del cual termine fascinado, también por los consejos y enseñarme a que puedo lograr siempre más.
- A la M. en C. Gema L. Galindo Flores y al Dr. Guillermo A. Pérez Flores, por permitirme seguir aprendiendo de su conocimiento, por acompañarme y apoyarme desde el inicio de mi trayecto académico, por siempre darme esos buenos consejos e ideas que me han permitido plasmar en infografías, ilustraciones, carteles, etc., la pasión que tengo por las plantas.
- A la Dra. Yendi E. Navarro Noya y al Dr. Arturo Estrada Torres por escucharme cuando lo necesitaba y por su tiempo.
- A las amistades que fui conociendo y quienes me apoyaron de manera paralela en estos dos años de maestría: Jesús Ángel, Adriana y Jessica, en mi memoria siempre permanecerá mi aprecio por ustedes.
- A las mujeres de mi familia que me educaron, abuela Regina, tía Clara, Alba mi madre y Valeria mi hermana.
- A Regina mi abuela materna y a Oliva mi abuela paterna, gracias por inculcarme el amor a las plantas, sin ustedes yo no sería el mismo, pues me habría perdido de mucho.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Abiótico:** componente(s) del medio ambiente que no es producido por organismos vivos (p.ej.: viento, temperatura o lluvia) (Collin 2004).
- **Acícula:** hoja de forma larga, muy angosta, puntiaguda, a manera de aguja (Rzedowski y Rzedowski 2005)
- **Antropogénico:** causado por o como resultado de las actividades humanas (Collin 2004).
- **Biótico:** componente vivo del ambiente (Collin 2004).
- **Deriva genética:** cambio aleatorio en la frecuencia de genes (Collin 2004).
- **Endogamia:** apareamiento entre individuos estrechamente relacionados (Collin 2004).
- **Flujo genético:** movimiento de genes entre poblaciones a través del mestizaje, la dispersión y la migración (Collin 2004).
- **Genotipo:** constitución genética de un organismo (Collin 2004).
- **Homocigoto:** relativo a una célula u organismo que tiene dos formas idénticas (alelos) de un gen (Collin 2004).
- **Locus:** La posición de un gen en un cromosoma (nota: el plural es loci.) (Collin 2004).
- **Mutación:** un cambio hereditario que ocurre en un gen (Collin 2004).
- **Selección natural:** proceso de cambio evolutivo por el cual la descendencia de organismos con ciertas características es más capaz de sobrevivir y reproducirse que la descendencia de otros organismos, cambiando así gradualmente la composición genética de una población (Collin 2004).

RESUMEN

La fragmentación del hábitat debido al cambio de uso de suelo, disminuyen el tamaño poblacional e incrementan el aislamiento reproductivo, estas condiciones modifican la dinámica poblacional y la acción de los procesos evolutivos, lo que afecta la estructura genética de las poblaciones y en consecuencia su conservación. En especies longevas como las coníferas, los efectos de los cambios ambientales en la estructura genética son tardíos por lo que es necesario considerar distintas cohortes para conocer los cambios en la distribución de la diversidad genética. En Tlaxcala, el cambio de uso de suelo ha intensificado la reducción de poblaciones arbóreas, entre ellas las de *Pinus leiophylla*. Esta investigación tuvo como objetivo estudiar los cambios en la estructura genética en distintas cohortes de poblaciones de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala. Se esperaba una diferenciación genética entre cohortes, siendo mayor en plántulas que en adultos. Para poner a prueba las predicciones se colectó tejido vegetativo de adultos y plántulas de las únicas tres poblaciones existentes en el estado (La Malinche, Nanacamilpa e Ixtacuixtla); en las poblaciones sin plántulas se colectaron semillas para su germinación. El ADN genómico se extrajo con la técnica CTAB, posteriormente se amplificaron dos regiones intergénicas de cloroplasto (*trnL-trnF* y *trnT-trnL*) que se secuenciaron mediante un secuenciador ABI Prism 3730XL. La estructura genética por cohorte se obtuvo mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), una red de haplotipos, un análisis bayesiano y una prueba de Mantel simple. El análisis general no detectó estructura genética entre cohortes, pero cuando se estudió por localidad se identificó una diferenciación entre adultos y plántulas en La Malinche, además la Φ_{ST} global fue baja pero significativa. La información obtenida sugiere flujo genético constante entre las poblaciones evaluadas, a excepción de La Malinche, en donde posiblemente la asincronía reproductiva evita el flujo genético. Es necesario estudiar la sincronía y fenología reproductiva en *P. leiophylla* para determinar su efecto en la estructura genética, además, se recomienda continuar estudios de genética de poblaciones y genética del paisaje con otros marcadores moleculares, por ejemplo, mitocondriales y nucleares. Para conservar a las poblaciones de esta conífera es necesario cuidar los tamaños poblacionales y la conectividad entre las poblaciones.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Marco teórico.....	3
1.1.1. Cambios de uso de suelo.....	3
1.1.2. Diversidad genética.....	4
1.1.3. Estructura genética.....	4
1.1.4. Marcadores moleculares.....	5
1.1.5. <i>Pinus leiophylla</i> Schiede ex Schltdl. & Cham.	6
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Estudios genéticos en <i>Pinus leiophylla</i> Schiede ex Schltdl. & Cham.	10
2.2. Cambios de la estructura genética entre generaciones	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
5. HIPÓTESIS	13
6. PREDICCIONES	13
7. OBJETIVOS	14
7.1. Objetivo general	14
7.2. Objetivos específicos	14
8. METODOLOGÍA	15
8.1. Zona de estudio.....	15
8.1.1. Parque Nacional La Malinche	16
8.1.2. Nanacamilpa	16
8.1.3. Ixtacuixtla	16
8.2 Colecta de tejido vegetativo	17
8.2.1 Colecta de semillas.....	17
8.3. Extracción, cuantificación y amplificación del ADN	19

8.4.1 Diversidad genética	21
8.4.2 Estructura genética	22
9. RESULTADOS	23
9.1 Diversidad genética	23
9.2 Estructura genética	25
9.2.1 Análisis de varianza molecular (AMOVA)	25
9.2.2 Red de haplotipos	28
9.2.3 Análisis Bayesiano	30
9.2.4 Prueba de Mantel simple	31
11. DISCUSIÓN	32
12. CONCLUSIONES	36
13. PERSPECTIVAS	37
14. REFERENCIAS	38
15. ANEXOS	48
15.1 Descripción de las muestras de <i>Pinus leiophylla</i> y visualización de geles de electroforesis	48
15.2 Sitios de estudio	61
15.3 Protocolo de extracción CTAB 2x (Doyle y Doyle 1987) modificado para tejido foliar seco o fresco	64
15.4 Constitución y preparación de reactivos CTAB 2x	65
15.5 Protocolo de cuantificación de DNA	66

1. INTRODUCCIÓN

En México, el cambio de uso de suelo es la principal causa de la pérdida de biodiversidad. El bosque templado mexicano representa uno de los ecosistemas con gran diversidad de especies y es un componente fundamental para la regulación del clima global y la infiltración del agua pluvial. No obstante, se ha perdido el 50% de su extensión debido a la sobreexplotación de los recursos forestales y al cambio de uso de suelo (Allen y cols. 2010; Contreras-Medina y cols. 2010; del-Val y Sáenz-Romero 2017; Rosenberger y cols. 2017; Méndez-Encina y cols. 2021).

Entre las principales consecuencias de la fragmentación debido al cambio de uso de suelo, destacan la disminución del tamaño poblacional y el aislamiento reproductivo, condiciones que intensifican la acción de la deriva genética y endogamia. Los efectos incluyen la reducción de la diversidad genética, ya que la deriva genética fija alelos de manera azarosa y la endogamia incrementa la frecuencia de genotipos homocigotos (Frankham y cols. 2002; Maya-García y cols. 2017). Cuando las poblaciones se mantienen aisladas, el flujo genético se reduce considerablemente, lo que evita la introducción de variantes genéticas en las poblaciones e impide la compensación de la pérdida de diversidad. Estos procesos en conjunto incrementan la estructura genética y la vulnerabilidad de las poblaciones ante posibles plagas, enfermedades y cambios ambientales (Frankham y cols. 2002; Van Geert y cols. 2008; Farwig y cols. 2008; Maya-García y cols. 2017).

Una de las especies arbóreas con una pérdida considerable de sus poblaciones es *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. Esta conífera se distribuye en 23 entidades federativas de México dentro de un rango altitudinal que comprende desde los 1,500 hasta los 3,000 metros sobre el nivel del mar (m snm). No obstante, en la Faja Volcánica Transmexicana su distribución se ha reducido dramáticamente debido al cambio de uso de suelo (CONAFOR, 2007; Sáenz-Romero y cols. 2015; Villaseñor 2016; Rodríguez-Trejo 2021). Un ejemplo es el estado de Tlaxcala, una de las entidades en donde se distribuye y se ha perdido hasta un 74% de la cobertura forestal nativa a causa de actividades agrícolas (Galicia y cols. 2013). En este estado, únicamente permanecen algunas pequeñas poblaciones remanentes de *P. leiophylla*, todas ellas inmersas en una matriz de cultivos y asentamientos humanos (obs. pers. Pérez-Alva, B.).

A pesar de que *P. leiophylla* es considerada una especie pionera que podría beneficiarse de la apertura del bosque maduro, y que entre los pinos es una de las especies más tolerantes a la sequía, fuego y defoliación, los cambios de uso de suelo han reducido severamente sus poblaciones (Sáenz-Romero y cols. 2015). Un efecto aditivo de los cambios de uso de suelo en *P. leiophylla* es la infestación de organismos parásitos (e.g. escarabajo descortezador, *Dendroctonus* sp.), ya que el estrés fisiológico al que son sometidas las plantas, debido a la pérdida de hábitat, incrementa la susceptibilidad a no resistir ataques de fitopatógenos (Baquedano y Castillo 2006; Allen y cols. 2010; Palacios-Romero y cols. 2017). Esta problemática ha causado la pérdida de 645 hectáreas de bosque templado en Tlaxcala, en especial poblaciones enteras de *P. leiophylla* (SENASICA 2021), lo que ha intensificado la reducción poblacional. Debido a esto, conocer la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *P. leiophylla* en Tlaxcala podría ser útil para la elaboración de estrategias de conservación (Palacios Romero y cols. 2015; Sáenz-Romero y cols. 2015; del-Val y Sáenz-Romero 2017).

1.1. Marco teórico

1.1.1. Cambios de uso de suelo

El cambio de uso de suelo origina la pérdida, fragmentación y degradación del hábitat, que en conjunto influyen en la dinámica de las poblaciones, y modifica la tasa de natalidad, mortalidad y migración. Al cambiar el uso de suelo de un área forestal a zonas agrícolas o de otro uso humano, las interacciones abióticas y bióticas también se modifican (Maxwell y cols. 2016; Hansen y cols. 2012; Newbold y cols. 2020).

Cuando la cobertura vegetal se reemplaza por campos de cultivo o asentamientos humanos, se alteran los procesos ecológicos e hidrológicos, así como la capacidad del bosque para absorber y reciclar compuestos atmosféricos. A escala local, la desertificación, degradación y salinización del suelo son algunas consecuencias del cambio de uso de suelo. La diversidad, es otro componente que es alterado por la modificación en el uso de suelo, ya que puede ocasionar la desaparición gradual de las poblaciones (Lambin y cols. 2001; WMO y UNEP 2007; Farwig y cols. 2008; Van Geert y cols. 2008; Contreras-Medina y cols. 2010).

El centro de México es una de las zonas donde el suelo forestal ha sido cambiado drásticamente para darle un uso agrícola y urbano (Bocco y cols. 1999; Franco-Maass y cols. 2006; Ramón-González y Aguilar 2021). Distintas publicaciones reportaron que la mayor pérdida de la vegetación se presenta en el estado de Michoacán (821,936 ha, 14.02%), en el Parque Nacional Nevado de Toluca (9,700 ha, 17.96%) y en la Zona Metropolitana Puebla-Tlaxcala (2,509 ha, 1.04%). Sin importar el grupo taxonómico, se ha observado que el cambio de uso de suelo puede poner en peligro a las poblaciones y de no tomar medidas que promuevan su conservación, estas pueden extinguirse a nivel local (Bocco y cols. 1999; Franco-Maass y cols. 2006; Contreras-Medina y cols. 2010; Zamora-Gutierrez y cols. 2017; Ramón-González y Aguilar 2021).

1.1.2. Diversidad genética

La diversidad genética se refiere a la totalidad de las variantes genéticas en una especie. La diversidad genética está determinada principalmente por el flujo genético, la mutación, la deriva genética y la selección natural (Piñero y cols. 2008; Kim y cols. 2011; Bilgen y Kaya 2017; Tong y cols. 2019). Esta se puede medir con distintos parámetros, según el marcador molecular utilizado. En secuencias se obtiene: (1) el número de sitios segregativos (s), que son las posiciones en donde hay polimorfismo en un grupo de secuencias; (2) la diversidad nucleotídica (π), que se define como la proporción de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias elegidas al azar de una población; (3) el número de haplotipos (h), que indica el número de variantes genéticas encontradas en una población (e.g. secuencias, loci); y (4) la diversidad haplotípica (Hd), la cual representa la probabilidad de que dos haplotipos muestreados aleatoriamente sean diferentes (Li y Sadler 1991; Fu 1994; de-Jong y cols. 2011; Cruz-Salazar y cols. 2018; 2019).

La diversidad genética está directamente relacionada con la conservación de las especies, pues permite que algunos organismos sobrevivan mejor que otros en el ambiente, por lo tanto, es un componente fundamental para comprender si una población se encuentra en riesgo (Piñero y cols. 2008; Kim y cols. 2011; Bilgen y Kaya 2017; Tong y cols. 2019).

1.1.3. Estructura genética

La estructura genética explica la distribución de genes y genotipos en la escala espaciotemporal, y permite inferir el balance entre el flujo genético, la deriva genética y la mutación (Neigel 2002; Kim y cols. 2011; Bilgen y Kaya 2017; Tong y cols. 2019). Con base en el análisis de secuencias de ADN, la estructura genética se determina a partir de los siguientes parámetros (los estadísticos F de Wright) obtenidos en distintos niveles jerárquicos: Φ_{ST} , Φ_{SC} y Φ_{CT} . El primero de ellos, Φ_{ST} , determina el grado de diferenciación genética promedio, que resulta al comparar las frecuencias alélicas de todas las posibles combinaciones de poblaciones, sin importar el nivel jerárquico (Figura 1A). Φ_{SC} determina la estructura genética dentro de una agrupación (categoría), por ejemplo, la diferenciación genética entre poblaciones con una misma elevación o poblaciones de una localidad (Figura 1B). Mientras que, Φ_{CT} determina la

estructura genética entre dos o más agrupaciones (categorías), por ejemplo, la diferenciación genética entre poblaciones de diferente elevación o de diferentes localidades (Figura 1C) (Wright 1950; Weir y Cockerham 1984; Excoffier y cols. 1992).

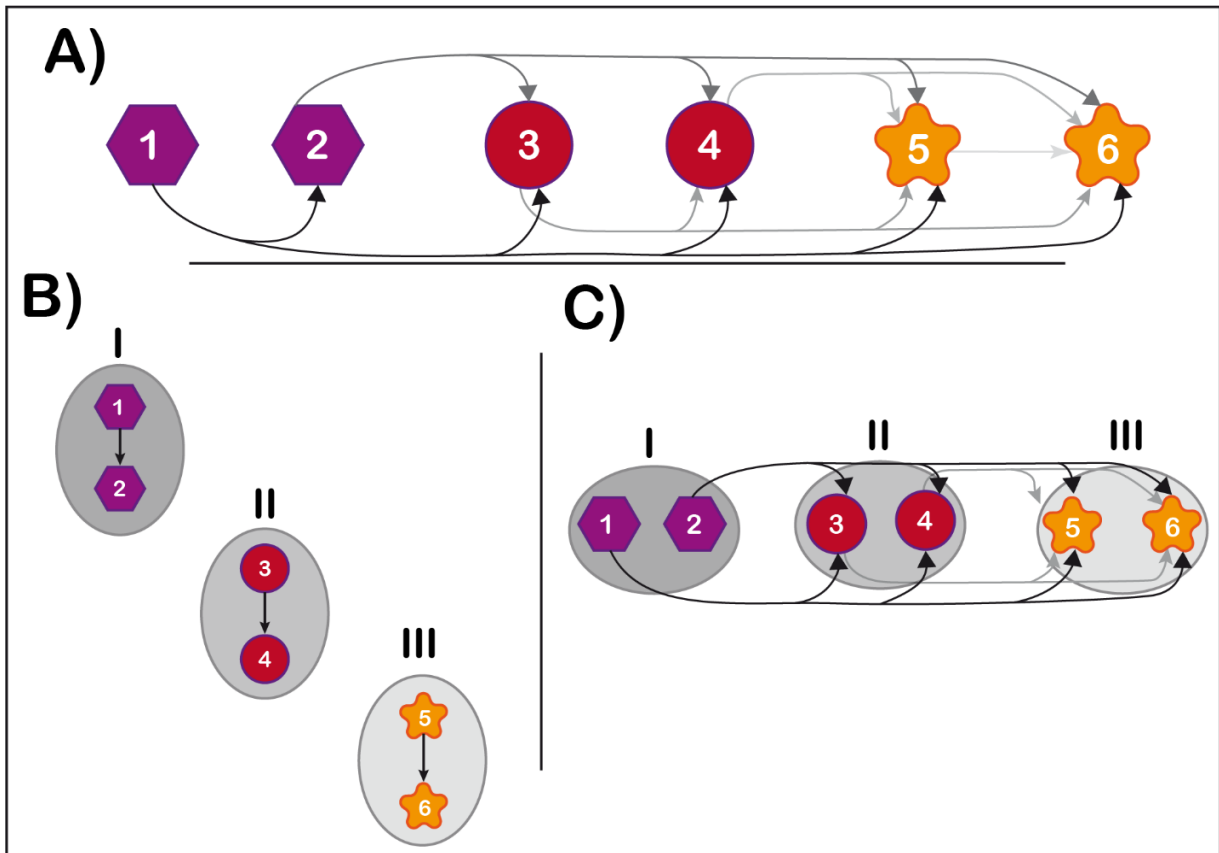


Figura 1. Representación esquemática de los estadísticos F de Wright (Wright 1950) a distintos niveles jerárquicos (Weir y Cockerham 1984). A) Φ_{ST} : estructura entre de las poblaciones; B) Φ_{SC} : estructura entre poblaciones dentro de clases o categorías. C) Φ_{CT} : estructura entre poblaciones de distintas clases o categorías. Los números arábigos representan las poblaciones; los números romanos y colores indican las agrupaciones (categorías); las flechas señalan las comparaciones que se realizan para obtener cada parámetro.

1.1.4. Marcadores moleculares

De todos los genomas celulares (nuclear, mitocondrial y cloroplástico) de plantas, el genoma cloroplástico o plastosoma ha sido ampliamente utilizado para realizar estudios genéticos relacionados con la estructura y diversidad genética. Las principales características que definen al plastosoma es que se hereda uniparentalmente, representa un único cromosoma y se ubica dentro de los cloroplastos. Respecto a los genomas mitocondrial y nuclear, el plastosoma

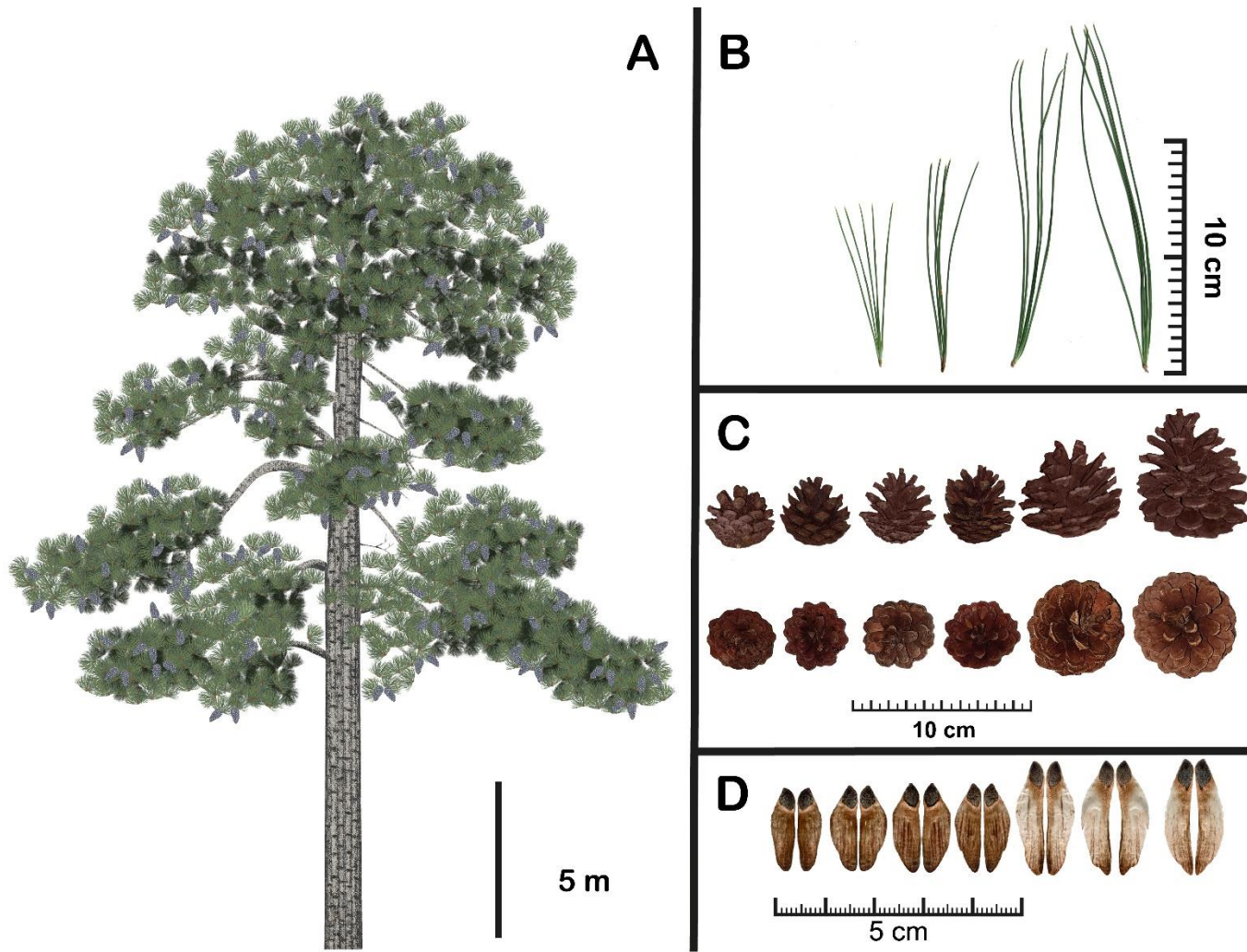
presenta mayor conservación debido a que presenta menos inserciones y deleciones; sin embargo, contiene regiones no codificantes con mayor polimorfismo (Henry 2005; Rentarúa-Alcántara 2007; Asafat y cols. 2017).

Las regiones no codificantes han sido usadas como marcadores moleculares porque poseen la ventaja de ser relativamente fáciles de analizar, pueden acumular mutaciones y no están sujetas a la selección natural. La información que proveen las regiones no codificantes permite inferir sobre los procesos demográficos y evolutivos (e.g. flujo genético, deriva genética) que han acontecido en las especies a una escala espaciotemporal (Parker y cols. 1998; Henry 2005; Rentarúa-Alcántara 2007; Piñero y cols. 2008; Godoy 2009; Kim y cols. 2011; Marwal y cols. 2014; Asafat y cols. 2017; Bilgen y Kaya 2017; Tong y cols. 2019). En específico, los espaciadores intergénicos *trnT-trnL* y *trnL-trnF* son dos regiones no codificantes del plastosoma, con los cuales se han realizado distintos estudios enfocados en estimar la estructura y diversidad genética en distintas especies vegetales (e.g. Taberlet y cols. 1991; Ge y cols. 2015; Kozyrenko y cols. 2017).

1.1.5. *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham.

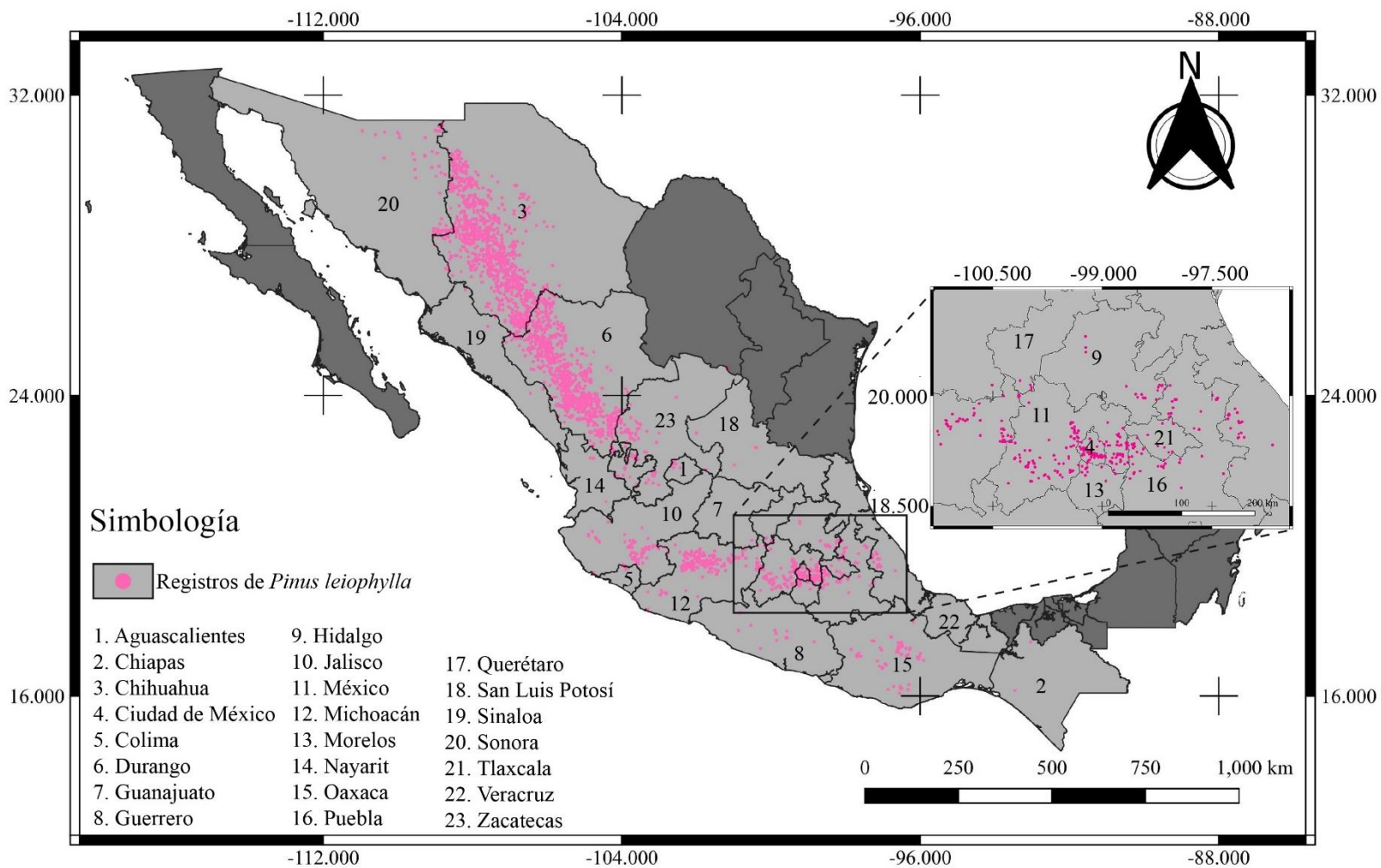
Esta especie, conocida comúnmente como ocote chino, forma parte del bosque de coníferas. Es un árbol de altura mediana (15-30 m) con un diámetro a la altura del pecho de 20 a 85 cm. Su corteza es de textura gruesa y rugosa, presenta fisuras longitudinales y horizontales. En cada fascículo tiene generalmente cinco acículas, en ocasiones excepcionales dos, tres, cuatro o seis y miden de ocho a 15 cm de longitud. *Pinus leiophylla* inicia la formación de estróbilos a partir de los cinco o seis años, con mayor abundancia de marzo a abril. Los estróbilos son simétricos, tienen forma de ovoide a ovocónica, miden de 4 a 8 cm de largo y de 3 a 5.5 cm de ancho, maduran alrededor de los 32 a 33 meses y para la liberación de semillas deben pasar por dos o tres años más. Cada estróbilo produce de 13 a 19 semillas llenas, las cuales dispersa con ayuda del viento, entre diciembre y febrero (Figura 2). El ocote chino es una especie que se distribuye en Estados Unidos de América y México, de este último, se cuentan con registros de la especie en 23 entidades federativas dentro de un rango altitudinal que comprende desde los 1,500 hasta los 3,000 m snm (Figura 3). Como ocurre con otras especies de coníferas, una característica

peculiar de *P. leiophylla* es que el plastosoma es heredado por vía paterna y el ADN mitocondrial por la madre (CONAFOR 2007; Sáenz-Romero y cols. 2015; Kormutak y cols. 2017; Rodríguez-Trejo 2021).



Elaboró: Braulio Ricardo Pérez Alva

Figura 2. *Pinus leiophylla* var. *leiophylla*. A) árbol adulto, B) acículas, C) estróbilos femeninos, D) semillas.



Elaboró: Braulio Ricardo Pérez Alva
 Metadatos INEGI (2022) y GBIF (2023)

Proyección: EPSG: 32614 - WGS84 / UTM zone 14N

Figura 3. Distribución de *Pinus leiophylla* en México. Información recopilada del Sistema Global de Información sobre Biodiversidad (GBIF), incluyendo registros de herbario e inventarios forestales (INEGI 2022; GBIF 2023).

2. ANTECEDENTES

2.1. Estudios genéticos en *Pinus leiophylla* Schiede ex Schldl. & Cham.

Se reconocen dos variedades morfológicas del ocote chino: *P. leiophylla* var. *leiophylla* y *P. leiophylla* var. *Chihuahuana*. Se ha evidenciado por medio de un análisis filogenético con microsatélites del plastosoma (Pt1254, Pt26081, Pt63718, Pt71936, Pt79951 y Pt87268), que hay una gran diferenciación poblacional entre las variedades de esta especie (Rodríguez-Banderas y cols. 2009). A nivel local, sólo se ha realizado un estudio de diferenciación genética en *P. leiophylla* usando polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), en éste no se encontró diferenciación genética entre las poblaciones (Ortiz-Olivas y cols. 2017).

2.2. Cambios de la estructura genética entre generaciones

El cambio de uso de suelo puede disminuir la diversidad e incrementar la estructura genética porque la fijación azarosa de alelos por deriva genética y la interrupción del flujo genético incrementan la diferenciación interpoblacional (F_{st}). Por ello, es fundamental el estudio de la diversidad y estructura genética de las poblaciones, ya que así es posible comprender los mecanismos evolutivos y, al mismo tiempo, proponer acciones para conservar los recursos genéticos eficazmente (Nei 1986; Neigel 2002; Kim y cols. 2011; Bilgen y Kaya 2017; Tong y cols. 2019).

Las consecuencias de cambios ambientales en la estructura genética no siempre son observadas en especies longevas, sus prolongados ciclos de vida (e.g. etapa reproductiva) provocan un efecto tardío, es decir, una relación de la estructura genética de poblaciones establecidas (e.g. adultas) con condiciones ambientales pasadas, en tanto que, poblaciones recientes (e.g. plántulas) se correlacionan con condiciones ambientales actuales (Aavik 2019). Una forma de identificar el efecto de los cambios de uso de suelo en especies de vida larga es mediante el estudio de la genética de poblaciones en distintas cohortes de estados de crecimiento, ya que de esta manera es posible identificar cambios en la diversidad y estructura genética, atribuibles a la variación de los procesos evolutivos como una respuesta a la modificación del ambiente (e.g. fragmentación, cambios de uso de suelo) (Van Geert y cols. 2008; Farwig y cols. 2008).

En poblaciones de dos cohortes (plántulas y adultos), con base en el análisis de microsatélites nucleares (UDP96-001, UDP98-406, UDP97-403, UDP96-018, pchcms5 y PS12A02), Farwig y cols. (2007), determinaron la estructura genética de *Prunus africana*, una especie longeva que mantiene poblaciones fuertemente fragmentadas debido al cambio de uso de suelo. Los resultados identificaron un cambio de estructuración genética según la cohorte: niveles bajos pero significativos en las plántulas (F_{ST} : 0.032), mientras que en adultos la estructura genética no fue significativa (0.026).

3. JUSTIFICACIÓN

Esta investigación es la primera en analizar la estructura genética de *Pinus leiophylla* en dos cohortes (plántulas y adultos) en México, información que permite identificar cambios en el flujo genético a lo largo del tiempo. Los resultados de este proyecto tienen el potencial de detectar poblaciones vulnerables e implementar estrategias de conservación de la especie en poblaciones remanentes, ya que se ha observado disminución poblacional debido a infestaciones por escarabajos descortezadores y por cambio de uso de suelo, condiciones que ponen en serio peligro a las poblaciones sobrevivientes de esta conífera.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo ha cambiado la estructura genética de las poblaciones de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala?

5. HIPÓTESIS

En especies longevas, como *P. leiophylla*, el efecto tardío de los cambios ambientales en la estructura genética se detecta en generaciones recientes.

6. PREDICCIONES

Habrà diferenciación genética entre cohortes, separando a los adultos de las plántulas.

La diferenciación genética dentro de las plántulas será mayor que en adultos.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Determinar el cambio de la estructura genética entre dos cohortes de poblaciones de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala.

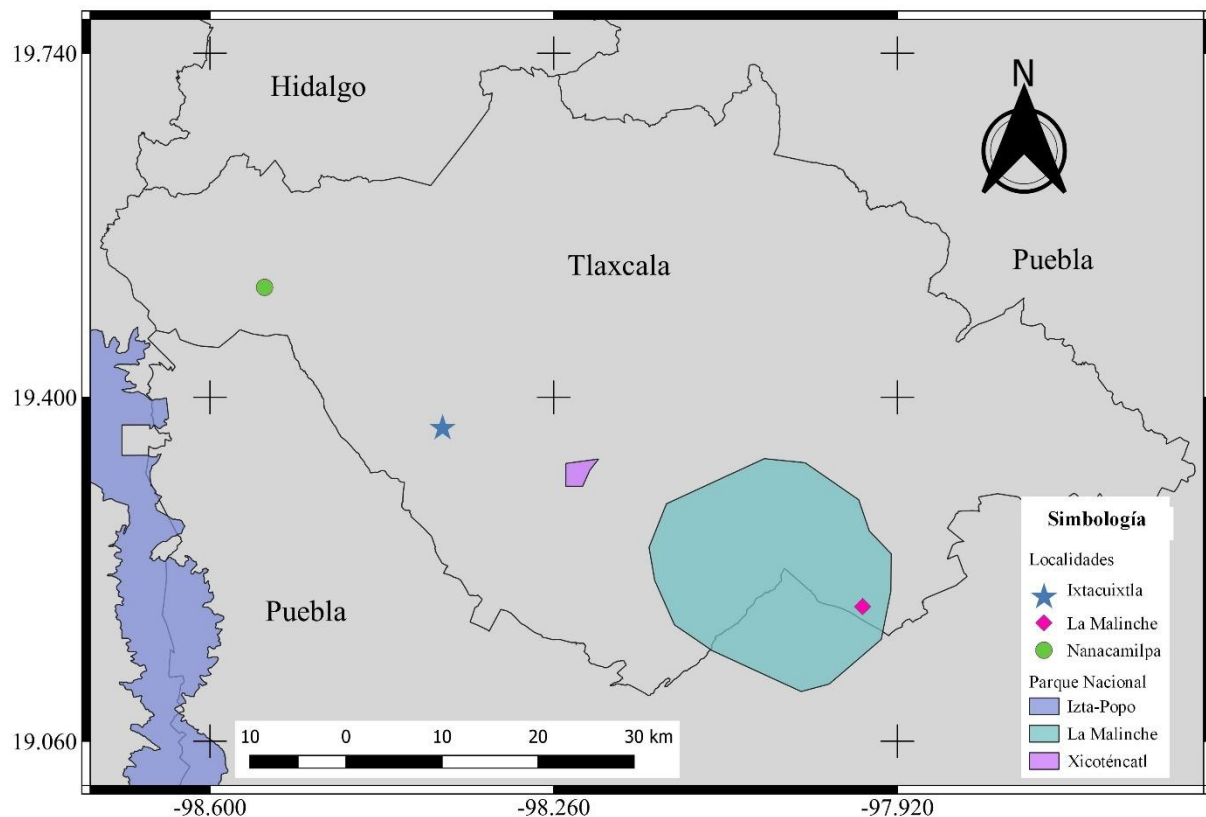
7.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la diversidad genética de poblaciones de plántulas y adultos de *Pinus leiophylla*.
- Comparar la estructura genética de poblaciones de plántulas y adultos de *Pinus leiophylla*.
- Estudiar la diferenciación genética entre plántulas y adultos de *Pinus leiophylla*.

8. METODOLOGÍA

8.1. Zona de estudio

Se realizaron recorridos de campo para buscar poblaciones remanentes de *P. leiophylla* en el estado de Tlaxcala. De esta búsqueda, se encontraron escasamente seis poblaciones en tres localidades situadas a 2,700 y 3,000 m snm: (1) en el Parque Nacional La Malinche (referida posteriormente como La Malinche), (2) Nanacamilpa y (3) Ixtacuixtla (Figura 4) (ver Anexos; Figura 16 - 18). Las poblaciones estuvieron definidas por la localidad (La Malinche, Nanacamilpa o Ixtacuixtla) y la cohorte (plántulas o adultos), dando un total de seis poblaciones.



Elaboró: Braulio Ricardo Pérez Alva
Metadatos: INEGI (2022, 2023)

Proyección: EPSG: 32614 - WGS84 / UTM zone 14N

Figura 4. Sitios de muestreo (localidades) para la colecta de tejido vegetativo de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala, México.

8.1.1. Parque Nacional La Malinche

El Parque Nacional La Malinche es un Área Natural Protegida (ANP) que se localiza entre los estados de Tlaxcala y Puebla, con un rango altitudinal que va de 2,300 a 4,461 m snm entre las coordenadas geográficas 19° 06' 30'' - 19° 20' 19'' N y los 97° 55' 32'' - 98° 09' 55'' O. Su clima es templado subhúmedo, resultado de su ubicación en la Faja Volcánica Transmexicana. El sitio es conocido por su gran diversidad en especies y en él se han registrado al menos 127 especies de mixomicetos, 226 hongos, 405 plantas, 7 anfibios, 14 reptiles, 114 aves, 37 mamíferos y 11 pulgas, dando un total de 941 especies. A pesar de ser un ANP, no está exenta de actividades antropogénicas que provocan la fragmentación y pérdida del hábitat, tales como incendios forestales, cambio de uso de suelo y tala ilegal (Fernández y López-Domínguez 2005).

8.1.2. Nanacamilpa

El municipio de Nanacamilpa se encuentra a 2,720 m snm, entre las coordenadas geográficas 19° 29' N y 98° 32' O. Colinda al norte y poniente con el municipio de Calpulalpan, al oriente con el municipio de Lázaro Cárdenas y al sur con el municipio de Tlahuapan, estado de Puebla.

El municipio de Nanacamilpa comprende una superficie de 109.29 km², presenta un clima templado subhúmedo con lluvias en verano. Durante el año la temperatura oscila desde los 0.5 °C como mínima, hasta los 24.6 °C como máxima. La precipitación mínima es de 8.4 mm y la máxima de 131.8 mm. La vegetación en este municipio está compuesta principalmente por bosques de pino (*Pinus* spp.) y oyamel (*Abies religiosa*), con especies representativas como: *Pinus montezumae*, *P. pseudostrobus*, *P. teocote*, *Abies religiosa*, *Quercus crassipes*, *Q. laurina*, *Q. rugosa*, *Alnus jorullensis*, *Salix paradoxa* y *Arbutus xalapensis*. La principal causa de la pérdida de biodiversidad en esta zona es debido al cambio de uso de suelo forestal a tierras de cultivo (INAFED 2010; Reyes-Sánchez 2020).

8.1.3. Ixtacuixtla

Ixtacuixtla de Mariano Matamoros se eleva a 2,720 m snm, dentro de las coordenadas geográficas 19° 20' N y 98° 23' O, colinda con los municipios de Españita, Hueyotlipan, Tepetitla de Lardizábal, Santa Ana Nopalucan, Panotla y con el estado de Puebla.

Ixtacuixtla comprende una superficie de 175.86 km², presenta un clima templado subhúmedo con lluvias de mayo a septiembre. Durante el año la temperatura oscila desde los 6.1 °C como mínima, hasta los 24.6 °C como máxima. La precipitación mínima es de 7.9 mm y la máxima de 131.6 mm. La vegetación en este municipio está compuesta principalmente por bosque de sabino, cuyas especies representativas son: *Schinus molle*, *Buddleia cordata*, *Mimosa biuncifera*, *Argemone platyceras*, *Reseda luteola*, *Agave salmiana*, *Opuntia* spp., *Brickelia veronicifolia*, *Adolphia infesta*, *Prunus serotina*, *Lycurus pleoides*, *Alnus acuminata*, *Salix bonplandiana*, *Fraxinus uhdei* y *Populus alba*. Se ha reportado que la agricultura es la principal amenaza de la biodiversidad en este municipio (INAFED 2010).

8.2 Colecta de tejido vegetativo

De enero a marzo del 2022, en cada localidad se colectó de 20 a 200 mg de acículas jóvenes de ≈20 plántulas (< 0.5 m) y 20 adultos separados entre sí cada 20 m. En donde no se detectaron plántulas se colectaron estróbilos para su germinación (ver siguiente sección; Cuadro 1). Las muestras se colocaron en bolsas transparentes resellables con silica gel para su almacenamiento (Figura 5 A), y se mantuvieron alejados del sol, humedad y en refrigeración a 2 °C hasta su procesamiento. De todas las colectas se registró su georreferenciación con un GPS (latitud, longitud y altitud) (Heredia-Bobadilla y cols. 2012).

8.2.1 Colecta de semillas

Se recolectaron estróbilos maduros (cerrados) de árboles sanos (sin organismos fitopatógenos), para germinar las semillas y con ello obtener el tejido necesario para el análisis genético. De estos, por árbol se seleccionaron 80, considerando todos los estróbilos de un mismo árbol como una muestra, los cuales fueron etiquetados y transportados en bolsas de malla. Los estróbilos se secaron en un invernadero en contenedores individuales hasta que maduraron y liberaron las semillas (Figura 5 B y C).

Una vez removidas las alas de las semillas, estas se almacenaron por 15 días a 4 °C en frascos de cristal. Posteriormente, se realizaron disecciones de las semillas para comprobar la presencia de embriones (Figura 5 D y E). Para la germinación de las semillas, estas se sometieron a un tratamiento de desinfección y escarificación con una solución de H₂O₂ 30% v/v por 1 h, H₂O

por 24 h, Benomyl 0.05% v/v por 24 h, H₂O por 24 h, Cloranfenicol 60 mg/l por 1 h, hipoclorito de sodio 15 % v/v (fórmula comercial Cloralex®) por 1 h y H₂O₂ 30% v/v por 1 h. Entre cada procedimiento las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Después de la desinfección, las semillas fueron sembradas en recipientes de polipropileno con una mezcla estéril de turba-vermiculita 1:3 (García-Campusano y cols. 2019).

Para agilizar la germinación de semillas, en cada recipiente se aplicaron 15 ml de medio nutritivo SH con 3 mg/l de ácido giberélico y una solución antimicótica al 0.5 % v/v (Sigma™), ajustando el pH de toda la solución a 5.75 (Schenk y Hildebrandt, 1972). Las semillas se incubaron en una cámara de crecimiento Forma Scientific modelo 3740 (Forma Scientific, USA) en oscuridad a 21±2 °C hasta su germinación. Posterior al brote de cotiledones, las plántulas se mantuvieron en un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad con la misma temperatura. Pasado un mes de germinación, se sacrificó una plántula por cada árbol de procedencia, la cual se consideró como una muestra para el análisis genético (Figura 5 F).

Cuadro 1. Tipo, procedencia y número de muestras de acículas de poblaciones de *Pinus leiophylla* en Tlaxcala, México.

Estado y método de obtención	Localidades			Total
	Ixtacuixtla	PNLM	Nanacamilpa	
Adultos, colecta directa (<i>in situ</i>)	20	20	20	60
Plántulas, colecta directa (<i>in situ</i>)	0	23	13	36
Plántulas, germinadas en laboratorio (<i>ex situ</i>)	20	7	5	32
Total	40	50	38	128

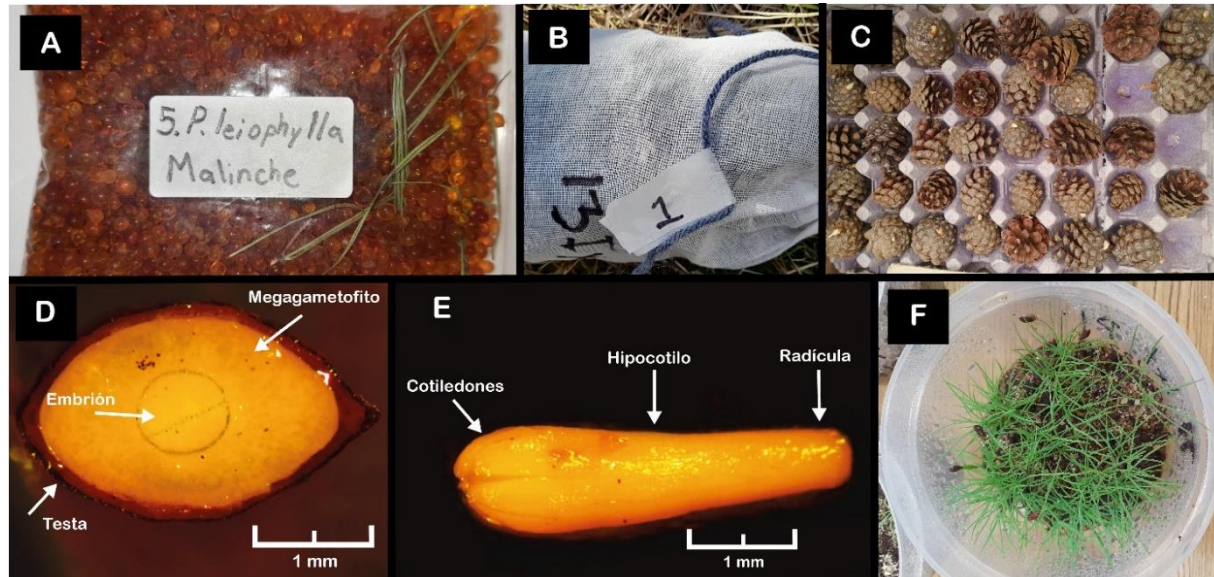


Figura 5. Obtención de muestras de *Pinus leiophylla*. A. Almacenamiento de acículas en silica gel, B. Transporte de estróbilos femeninos, C. Proceso de secado, D y E. discción de semilla y embrión, F. Germinación de plántulas.

8.3. Extracción, cuantificación y amplificación del ADN

El ADN genómico se extrajo de las acículas deshidratadas y frescas (en el caso de las plántulas germinadas) usando el protocolo CTAB modificado por Doyle y Doyle (1987) (ver en Anexos). Para determinar la integridad y rendimiento del ADN extraído, este se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, y se reveló mediante la tinción con SYBR Gold® (Zipper y cols. 2004) y luz azul. El ADN se cuantificó con PicoGreen (Quanti-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kits and dsDNA Reagents) en un Fluorespectrómetro NanoDrop™ 3300 (Ahn y cols. 1996).

Se amplificaron las regiones intergénicas *trnT-trnL* y *trnL-trnF* del plastosoma con los cebadores universales de cada región, diseñados por Taberlet y cols. (1991). La reacción se realizó con < 10 ng de ADN genómico, en un volumen total de 25 μ l, que contuvo 8 μ l de Kit Taq PCR Master Mix (© QIAGEN), 1.5 μ l de cada cebador (10 μ M) y el resto de volumen con agua libre de nucleasas. Las condiciones de la PCR fueron: 94 °C \times 1 min para la desnaturalización inicial, 50-55 °C \times 1 min para el alineamiento, y 72 °C \times 2 min para la extensión final, por 35 ciclos (Taberlet y cols. 1991). Para comprobar los productos de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con SYBR Gold®. El producto de la PCR también se cuantificó con el método de cuantificación descrito anteriormente (Zipper y cols. 2004). Por último, los productos

de PCR se enviaron a MacroGen Inc (Seúl, Corea del Sur) para su purificación y secuenciación en un ABI Prism 3730XL (Applied Biosystems).

8.4.1 Diversidad genética

Todos los análisis de diversidad y estructura genética se realizaron con las regiones intergénicas *trnT-trnL* y *trnL-trnF* de forma individual y concatenada. Las secuencias fueron editadas en el programa Chromas Pro v. 1.5 (McCarthy 1996) y se alinearon con el programa Clustal X v. 2.1 (Thompson y cols. 1997). Se omitió el uso de secuencias que aparentemente no amplificaron, es decir, aquellas que mostraron un solapamiento completo o parcial en los picos de absorbancia de los nucleótidos en el electroferograma. Además, se eliminaron ≈ 30 pares de bases (pb) de la parte inicial y 30 pb de final de las secuencias, y en el caso de nucleótidos incorrectos del electroferograma, estos se modificaron para que coincidieran con los picos máximos de absorbancia. La diversidad genética fue descrita por medio de cuatro parámetros que se estimaron con el programa DnaSP v. 5 (Librado y Rozas 2009): sitios segregativos (s), diversidad nucleotídica (π), número de haplotipos (h) y diversidad haplotípica (Hd) (Cruz-Salazar y cols. 2018; 2019).

8.4.2 Estructura genética

La estructura genética se analizó a través de cuatro métodos: (1) un análisis de varianza molecular (AMOVA) y el índice de fijación Φ_{ST} por pares de poblaciones con 1,000 permutaciones, realizados con el software Arlequin v. 3.5 (Weir y Cockerham 1984; Excoffier y Lischer 2010). La diferenciación por pares de poblaciones se visualizó mediante un mapa de calor con el paquete “pheatmap” (Kolde 2019) del programa R v. 4.2.2 (R Core Team 2022). (2) Una red de haplotipos construida con el programa PopART v. 1. (Leigh y Bryant 2015). (3) Un análisis bayesiano (Bayesian Analysis of Population Structure; BAPS por sus siglas en inglés) realizado con el algoritmo de R “rhierBAPS” (Tonkin-Hill y cols. 2018). Y (4) una prueba de Mantel simple para evaluar aislamiento por distancia (Diniz-Filho y cols. 2013) con el paquete “vegan” (Oksanen y cols. 2007) del programa R v. 4.2.2 (R Core Team 2022) con 1,000 permutaciones, con el método de correlación de Pearson.

9. RESULTADOS

9.1 Diversidad genética

De la región intergénica *trnL-trnF* se analizaron 122 secuencias con una extensión de 390 pb, en tanto que, para la región *trnT-trnL* se procesaron 126 secuencias con una longitud de 445 pb. La concatenación de ambas regiones conservó un total de 121 secuencias (ver Anexos; Cuadro 7, Figura 9 - 15).

En la región intergénica *trnL-trnF*, el valor más alto de sitios segregativos (s) y de diversidad nucleotídica (π) fue encontrado en las plántulas de La Malinche (s : 190; π : 0.135), mientras que el más bajo se presentó en los adultos de Nanacamilpa (s : 134; π : 0.093). Además, en las plántulas de La Malinche se encontró el valor mayor de número de haplotipos (h : 29) y el menor se observó en plántulas de Nanacamilpa (h : 16). Todos los individuos secuenciados tuvieron un haplotipo diferente, por lo cual el número de haplotipos correspondió al número de muestras procesadas de cada población y cohorte (Cuadro 2).

La diversidad observada con base en la región *trnT-trnL* fue similar, los adultos de La Malinche tuvieron el valor mayor de s y π (s : 185; π : 0.144), en tanto que el valor menor de s se identificó en las plántulas de La Malinche (s : 108), y para π se encontró en las plántulas de La Malinche y los adultos de Ixtacuixtla (π : 0.056). Respecto al número de haplotipos (h), en las plántulas de La Malinche se encontró el valor mayor (h : 29) y en las plántulas de Nanacamilpa el menor (h : 17) (Cuadro 2).

Con las regiones concatenadas, los adultos de La Malinche tuvieron el valor más alto de s (s : 322), y los adultos de Ixtacuixtla el valor menor (s : 256). La diversidad nucleotídica fue más alta en los adultos de La Malinche (π : 0.132) y más baja en los adultos de Nanacamilpa (π : 0.082). Finalmente, el número de haplotipos (h) fue superior en las plántulas de La Malinche (h : 29), mientras que el menor número se detectó en las plántulas de Nanacamilpa (h : 16) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diversidad genética de *Pinus leiophylla*, mediante la evaluación de las regiones intergénicas *trnL-F* y *trnT-L* de ADN de cloroplasto, analizadas de manera separada y concatenadas.

Región	Parámetro	Localidad					
		Ixtacuixtla		La Malinche		Nanacamilpa	
		Pln	Adu	Pln	Adu	Pln	Adu
<i>trnL-trnF</i> (390 pb)	<i>s</i>	136	139	190	144	140	134
	π	0.115	0.128	0.135	0.112	0.104	0.093
	<i>h</i>	19	20	29	18	16	20
	<i>Hd</i>	1	1	1	1	1	1
<i>trnT-trnL</i> (445 pb)	<i>s</i>	143	117	108	185	149	133
	π	0.079	0.056	0.056	0.144	0.11	0.073
	<i>h</i>	20	19	29	21	17	20
	<i>Hd</i>	1	1	1	1	1	1
Concatenadas (835 pb)	<i>s</i>	279	256	298	322	288	267
	π	0.097	0.09	0.092	0.132	0.108	0.082
	<i>h</i>	19	19	29	18	16	20
	<i>Hd</i>	1	1	1	1	1	1

Pln: plántulas; Adu: adultos; *s*: sitios segregativos; π : diversidad nucleotídica, *h*: número de haplotipos; *Hd*: diversidad haplotípica.

9.2 Estructura genética

9.2.1 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Considerando las secuencias de las regiones intergénicas *trnL-trnF* y *trnT-trnL* de forma individual y concatenadas, la mayor parte de la variación total fue explicada por diferencias dentro de las poblaciones (más del 95% de la variación total) y el resto dentro de las cohortes. Entre cohortes no se encontró variación (Cuadro 3). También, se detectó estructura genética entre las poblaciones dentro de las cohortes (Φ_{SC}) y entre poblaciones (Φ_{ST}) Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de la secuencia nucleotídica de dos regiones intergénicas del ADN de cloroplasto en poblaciones de *Pinus leiophylla* de Tlaxcala. (A) La región intergénica *trnL-trnF*; (B) la región intergénica *trnT-trnL*; (C) regiones intergénicas concatenadas.

Grupos	<i>g.l.</i>	Sum. De cuadrados	Componentes de variación	Porcentaje de variación	Φ -estadístico
(A) <i>trnL-trn-F</i>					
Entre cohortes	1	42.827	-0.13961	-0.53	Φ_{CT} : -0.005 ^{n.s.}
Entre poblaciones dentro de las cohortes	4	200.102	1.25147	4.78	Φ_{SC} : 0.048**
Dentro de las poblaciones	116	2905.354	25.04615	95.75	Φ_{ST} : 0.043*
Total	121	3148.282	26.15801		
(B) <i>trnT-trn-L</i>					
Entre cohortes	1	27.833	-0.34272	-1.59	Φ_{CT} : -0.016 ^{n.s.}
Entre poblaciones dentro de las cohortes	4	193.03	1.33604	6.19	Φ_{SC} : 0.061**
Dentro de las poblaciones	120	2472.786	20.60655	95.4	Φ_{ST} : 0.046***
Total	125	2693.649	21.59987		
(C) Concatenado					
Entre cohortes	1	68.773	-0.59739	-1.27	Φ_{CT} : -0.013 ^{n.s.}
Entre poblaciones dentro de las cohortes	4	407.55	2.89522	6.18	Φ_{SC} : 0.061***
Dentro de las poblaciones	115	5126.03	44.57418	95.1	Φ_{ST} : 0.050***
Total	120	5602.354	46.872		

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ^{n.s.}: $p > 0.05$

9.3.1.1 ΦSC por cohortes

Con la región *trnL-trnF* no se identificó una estructura genética entre pares de poblaciones de plántulas, mientras que en las poblaciones de adultos sí se encontró diferenciación (ΦSC), sin embargo, no se detectó una diferenciación genética significativa entre cohortes (ΦCT). Respecto a la región *trnT-trnL*, se observó diferenciación genética entre pares de poblaciones de plántulas y adultos (ΦSC), no obstante, tampoco se encontraron diferencias genéticas significativas entre cohortes (ΦCT). Cuando se concatenaron las regiones, hubo diferenciación genética significativa entre pares de poblaciones de plántulas y adultos (ΦSC), pero entre cohortes no hubo diferenciación (ΦCT) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estructura genética dentro de cada cohorte (ΦSC) y entre cohortes (ΦCT) de *Pinus leiophylla* con base en dos secuencias intergénicas (*trnL-trnF* y *trnT-L*) de ADN de cloroplasto, de manera independiente y concatenadas. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; n.s.: $P > 0.05$.

Región	ΦSC		ΦCT
	Plántulas	Adultos	
<i>trnL-trnF</i>	0.0091 ^{n.s.}	0.0754 ^{***}	-0.005 ^{n.s.}
<i>trnT-trnL</i>	0.0419 ^{**}	0.0674 [*]	-0.016 ^{n.s.}
Concatenado	0.0341 [*]	0.0874 ^{***}	-0.013 ^{n.s.}

9.2.1.1 ΦST pareada

Se encontró que la población de adultos de la Malinche está diferenciada de las plántulas de Ixtacuixtla, adultos de Ixtacuixtla, plántulas de La Malinche y adultos de Nanacamilpa considerando la región *trnL-trnF* (Figura 6A).

Con la región *trnT-trnL* se identificó una estructura genética entre las plántulas de La Malinche y adultos de Ixtacuixtla. Asimismo, los adultos de La Malinche estuvieron diferenciados de las plántulas de Ixtacuixtla, adultos de Ixtacuixtla y plántulas de La Malinche. En esta misma región se encontró diferenciación genética entre las plántulas de Nanacamilpa respecto a los adultos de Ixtacuixtla y plántulas de La Malinche (Figura 6B).

Cuando se concatenaron las regiones intergénicas, los adultos de La Malinche mostraron diferenciación genética respecto a las plántulas de Ixtacuixtla, adultos de Ixtacuixtla, plántulas de La Malinche y adultos de Nanacamilpa. También, las plántulas de Nanacamilpa estuvieron diferenciadas de los adultos de Ixtacuixtla y plántulas de La Malinche. Por último, los adultos de Nanacamilpa mostraron diferenciación genética significativa con las plántulas de La Malinche y adultos de La Malinche (Figura 6C).

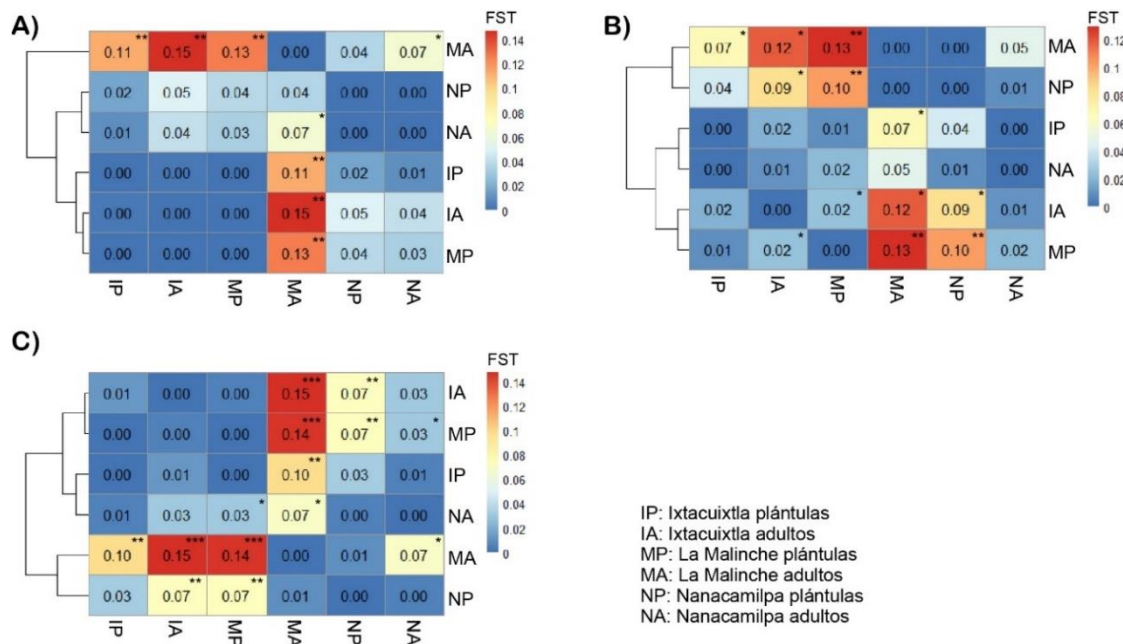


Figura 6. Mapa de calor y dendrograma con base en valores de ΦST por pares de poblaciones de *Pinus leiophylla* de Tlaxcala, México. Análisis de las secuencias de las regiones intergénicas *trnL-trnF* (A), *trnT-trnL* (B) y concatenadas (C) del ADN de cloroplasto. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

9.2.2 Red de haplotipos

La red de haplotipos mostró una separación de las plántulas y adultos de La Malinche. En ambas regiones intergénicas (*trnL-trnF* y *trnT-trnL*) las plántulas se ubicaron cerca del centro de la red haplotípica, mientras que los adultos se distribuyeron principalmente en la rama inferior derecha (Figura 7A, 7B). Cuando se analizó la concatenación, este patrón fue más evidente, ya que la mayoría de las plántulas estuvieron situadas en la parte izquierda de la red, mientras en la derecha se ubicaron los adultos (Figura 7C). También, se observó, tanto en las regiones individuales como concatenadas, que las plántulas de La Malinche estuvieron en el centro y cerca de las plántulas y adultos de Ixtacuixtla (Figura 7).

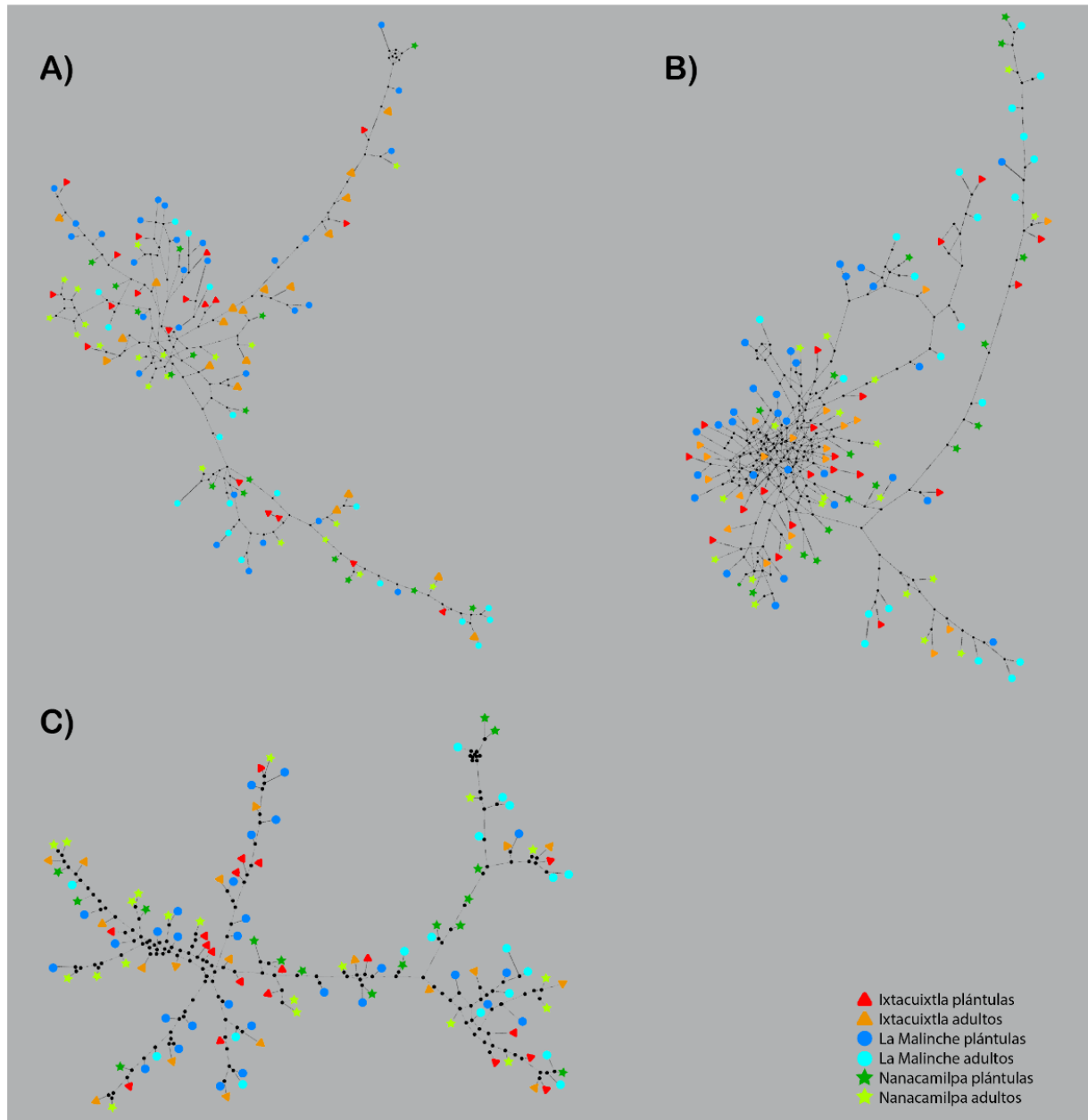


Figura 7. Red de haplotipos de poblaciones de *Pinus leiophylla* de Tlaxcala, México, con base en la región intergénica *trnL-trnF* (A), *trnT-trnL* (B) y regiones concatenadas (C) del ADN de cloroplasto. Los puntos negros representan los haplotipos no muestreados (existentes o posiblemente extintos) que determina el programa para establecer las relaciones entre haplotipos.

9.2.3 Análisis Bayesiano

El análisis de agrupamiento BAPS identificó un grupo genético para todos los individuos, tanto el análisis por región como el de las regiones intergénicas concatenadas (Figura 8).

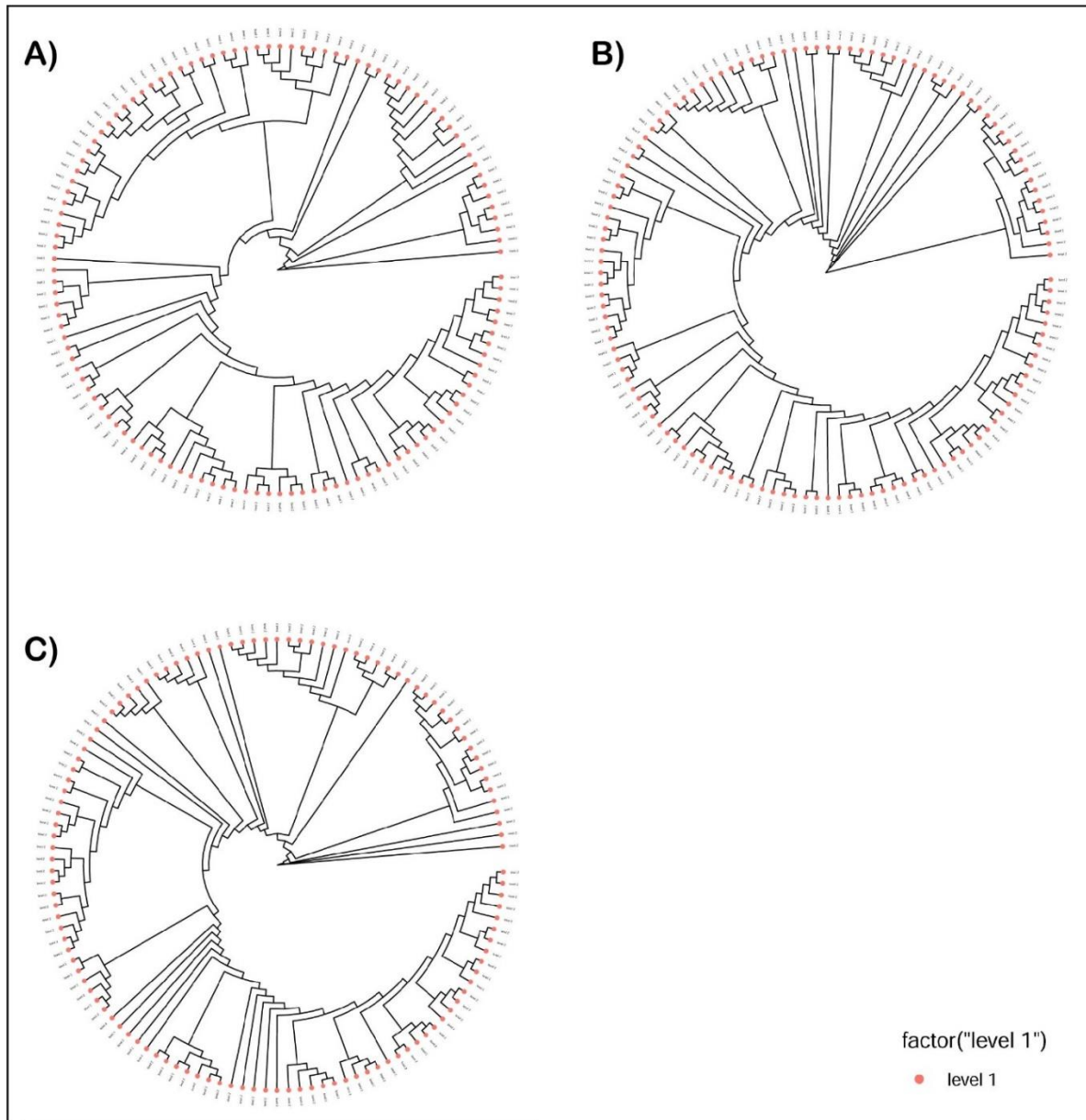


Figura 8. Dendrogramas obtenidos del análisis bayesiano usando el algoritmo “rhierBAPS”, con base en la región intergénica *trnL-trnF* (A), *trnT-trnL* (B) y regiones concatenadas (C) del ADN de cloroplasto; factor (“level 1”) indica los subgrupos genéticos que identifica el algoritmo y el color representa el grupo al que pertenece cada individuo, los cuales están representados como círculos.

9.2.4 Prueba de Mantel simple

No se encontró evidencia significativa que demuestre un aislamiento por distancia en ninguna de las regiones intergénicas ni al concatenarlas (Cuadro 5), esto indica que las distancias genéticas no están asociadas con las distancias geográficas euclidianas (Cuadro 6).

Cuadro 5. Prueba de Mantel simple (r^2) de poblaciones de *Pinus leiophylla* de Tlaxcala, México, con base en dos regiones intergénicas (*trnL-trnF* y *trnT-trnL*) del ADN de cloroplasto.

<i>trnL-trnF</i>		<i>trnT-trnL</i>		Concatenado	
r^2 :	0.115	r^2 :	0.012	r^2 :	0.038
<i>P-valor</i> :	0.275	<i>P-valor</i> :	0.315	<i>P-valor</i> :	0.357

r^2 : estadístico Mantel; *P-valor*: significancia estadística.

Cuadro 6. Matriz de distancias geográficas euclidianas (m) entre poblaciones de *Pinus leiophylla* de Tlaxcala, México.

Distancia geográfica euclidiana (m)						
	Ixt pln	Ixt adu	LM pln	LM adu	Nan pln	Nan adu
Ixt pln	0	173	47903	48350	21153	20124
Ixt adu	173	0	47929	48380	21160	20139
LM pln	47903	47929	0	913	6880	67639
LM adu	48350	48379	913	0	69206	68028
Nan pln	21153	21160	68806	69206	0	1449
Nan adu	20124	20139	67639	68028	1449	0

Ixt = Ixtacuixtla, LM = La Malinche, Nan = Nanacamilpa, pln = plántulas, adu = adultos.

11. DISCUSIÓN

Contrario a las predicciones esperadas, no se identificó una estructura genética por cohortes (ΦCT) en general, pero al separar por localidad, en La Malinche se detectó una clara diferenciación. Por su parte, la ΦST global indicó una diferenciación genética baja pero significativa posiblemente debido a efectos de la deriva genética (Wright 1950; Weir y Cockerham 1984; Excoffier y cols. 1992).

Tanto la AMOVA como el análisis bayesiano sugieren que la estructura genética global de *P. leiophylla* es baja ($\Phi ST = 0.050$) en comparación con otras especies de gimnospermas. Por ejemplo, en *Amentotaxus argotaenia* Ge y cols. (2015) reportaron una $\Phi ST = 0.83$ y $\Phi ST = 0.9$ en *A. yunnanensis*, evaluando las regiones intergénicas de cloroplasto *atpI-atpH* y *rpS16-trnK*. En tanto que, Kozyrenko y cols. (2017) encontraron una $\Phi ST = 0.12$ en *Taxus cuspidata*, analizando también regiones de cloroplasto (*psbA-trnH*, *trnL-trnF* y *trnS-trnM*).

Respecto a la diferenciación genética entre pares de poblaciones y considerando la herencia uniparental (vía paterna) de los marcadores utilizados en esta investigación, la ausencia de estructura entre algunas poblaciones podría deberse a la capacidad de dispersión del polen de la especie. En este sentido, Ortiz-Olivas y cols. (2017) indicaron que el polen de *P. leiophylla* puede propagarse hasta 7 km, no obstante, en otras especies de pinos el flujo de polen puede ser mayor, como en *P. taeda*, *P. engelmannii* y *P. sylvestris*, en las que se ha sugerido que puede dispersarse hasta 24, 40 y 600 km, respectivamente. Con base en los resultados de esta investigación (ΦST pareado y la prueba de Mantel simple), se podría sugerir que el polen de *P. leiophylla* puede propagarse a más de 69 km e incluso fuera del área de estudio, debido a que las poblaciones de los adultos de La Malinche y plántulas de Nanacamilpa son las más distantes (69.2 km) y a pesar de esto no se identificó una estructura genética entre estas.

La red de haplotipos y el ΦST revelaron que los adultos de La Malinche están diferenciados genéticamente de la mayoría de las poblaciones (con la excepción de las plántulas de Nanacamilpa), incluso de las plántulas de la misma localidad. La sincronía y fenología reproductiva son una posible explicación de la estructura genética entre plántulas y adultos de la misma procedencia, ya que ambos factores pueden ocasionar deriva genética en las poblaciones porque reducen la posibilidad del apareamiento aleatorio (Kodak 2021). Es probable que la

sincronía reproductiva sea distinta en algunas localidades de *P. leiophylla*, este mismo fenómeno ha sido observado por Whittet y cols. (2017) en *P. sylvestris*, quienes identificaron una diferencia en la producción de polen de más de 15 días entre localidades distanciadas por 137 km. Además, de acuerdo con Valdivieso y cols. (2017), la fenología de las estructuras reproductivas femeninas y masculinas en pinos puede efectuarse en distintos momentos, ya que los autores identificaron en *P. pinea* que los estróbilos masculinos liberan el polen antes de que los estróbilos femeninos estén aptos para recibir los gametos masculinos, condición que podría ocurrir en las poblaciones genéticamente diferenciadas de *P. leiophylla*. Esta propuesta se soporta con el patrón de la red de haplotipos, ya que la diferencia de sincronía y fenología reproductiva entre localidades se refleja en la distribución de los haplotipos en la red, por ejemplo, los haplotipos de las plántulas de La Malinche están muy cercanos a los adultos de Ixtacuixtla, lo que indicaría que el polen de Ixtacuixtla llegó a La Malinche. Sin embargo, es necesario analizar en estudios futuros estas relaciones a mayor profundidad.

La mayoría de los parámetros de diversidad genética de *P. leiophylla* fueron bajos (s y π), no obstante, superaron a los reportados por otros autores que también usaron marcadores de cloroplasto. Por ejemplo, Ge y cols. (2014) detectaron un $h = 15$ y una $\pi = 0.00094$ en *Amentotaxus argotaenia*, un $h = 8$ y una $\pi = 0.00278$ en *A. formosana*, un $h = 4$ y una $\pi = 0.00071$ en *A. poilanei* y un $h = 16$ y una $\pi = 0.00321$ en *A. yunnanensis*. Por su parte, Kozyrenko y cols. (2017) encontraron un valor de $s = 389$, una $h = 15$, y una $\pi = 0.0227$ en *Taxus cuspidata*. De acuerdo con los resultados del presente estudio, la baja diversidad y estructura genética (Φ_{ST} : 0.050) en *P. leiophylla*, sugiere un alto flujo genético entre poblaciones que homogeniza la variación genética, ocasionando la existencia de muy pocas variantes genéticas distribuidas de manera no aleatoria (Pazouki y cols. 2016).

El elevado número de haplotipos dentro de las poblaciones es algo que se ha notado con anterioridad en *P. leiophylla*, es el caso de Rodríguez-Banderas y cols. (2009) quienes reportaron 94 haplotipos distintos con microsatélites de cloroplasto, de 323 muestras de adultos. En este estudio, los resultados mostraron mayor variación, esto es, 121 haplotipos (un haplotipo por cada muestra), posiblemente debido a la naturaleza del marcador; mientras los microsatélites usan valores relativos a la longitud de un fragmento de ADN, la secuenciación de las regiones intergénicas puede detectar más haplotipos, ya que este marcador en comparación a los

microsatélites determina si hay cambios por inserciones, deleciones, translocaciones y transversiones (Taberlet y cols. 1991).

En las poblaciones estudiadas, las plántulas fueron muy escasas, por ejemplo, en Ixtacuixtla no se encontró ninguna y en Nanacamilpa fueron muy difíciles de encontrar. Como alternativa para determinar el nivel de flujo genético se germinó el germoplasma en condiciones *ex situ*, pero la baja presencia de plántulas muestra el bajo nivel de reclutamiento, lo que podría ser un indicador de la alta vulnerabilidad de la especie para mantenerse en el tiempo (Ribeiro y cols. 2022). Se ha reportado que las plántulas de *P. leiophylla* se desarrollan bien bajo condiciones de alta luminosidad y baja cantidad de materia orgánica en el suelo (Barton 1993). No obstante, a pesar de existir las condiciones necesarias para el desarrollo de las plántulas, es probable que el arado limite el reclutamiento de forma drástica en Ixtacuixtla y en menor medida en Nanacamilpa, por lo que, se sugiere promover la conservación de los bosques en estas localidades.

En específico propongo realizar labores de reforestación con germoplasma nativo en Ixtacuixtla y Nanacamilpa, de preferencia con plántulas de gran tamaño para garantizar el establecimiento y supervivencia. Es preferible que la reforestación lleve un seguimiento a largo plazo y esté acompañada de pláticas de divulgación que enfatizan la importancia de conservar esta especie, así como su propagación y cuidado. Debido a la dependencia económica de los dueños de las propiedades hacia los cultivos en ambas localidades, se recomienda explicar cómo se puede conservar la especie y a su vez mantener la productividad del suelo. Específicamente en algunos predios de Ixtacuixtla, *P. leiophylla* se usa como “cerca viva” y es una buena alternativa que se puede retomar para conservar la especie. La conservación de las poblaciones de ambas localidades es de gran importancia, ya que existe flujo genético entre ellas y la pérdida de esta conectividad haría a esta especie más susceptible a la extinción local. En La Malinche se recomienda promover la regulación y vigilancia del cambio de uso de suelo en el ANP, ya que es la única localidad de este estudio donde aparentemente el reclutamiento de plántulas no se ve obstaculizado, aunque a su vez es la única localidad donde hay diferenciación genética entre cohortes, por lo tanto, la disminución de la estructura genética depende directamente de la supervivencia de las plántulas y esto sólo será posible mediante el control inmediato de la pérdida de cobertura forestal.

De no realizar acciones que promuevan la conservación de esta especie, es probable que en el futuro se repita el escenario de las poblaciones y cohortes de *Prunus africana*, en las cuales

se ha observado que la fragmentación aumentó la estructura genética de las plántulas (Farwig y cols. 2008). Si el aislamiento genético entre cohortes de La Malinche continúa, la estructura genética podría incrementar significativamente en las siguientes generaciones (Farwig y cols. 2008), por ello, la información generada en esta investigación contribuye a definir acciones que ayuden a mantener el tamaño poblacional y la conectividad de los fragmentos de bosque que aún están presentes en el estado.

12. CONCLUSIONES

- La estructura genética de *Pinus leiophylla* no varía entre cohortes (Φ_{CT}), no obstante, al analizar los datos por localidad, se encontró estructura genética entre plántulas y adultos de La Malinche, posiblemente debido a la deriva genética que es generada por la asincronía reproductiva y al aporte del polen proveniente de Ixtacuixtla.
- La estructura genética global fue baja ($\Phi_{ST} = 0.050$) con relación a otras especies de gimnospermas.

13. PERSPECTIVAS

Mis resultados revelan información importante para promover la conservación de las poblaciones de *P. leiophylla*. Aunque se podría inferir que el flujo genético entre las poblaciones es constante, es necesario conservar el tamaño poblacional, la conectividad y el establecimiento de plántulas de esta conífera. Además, se sugiere incluir información que detalle las condiciones del bosque (perturbación, temperatura, humedad y precipitación), con la finalidad de estudiar las relaciones del ambiente con la diversidad y estructura genética. Para determinar si la variación de la sincronía y fenología reproductiva pueden ocasionar deriva genética o endogamia, es importante que se evalúen ambos aspectos en las poblaciones de *P. leiophylla*. Por último, para contar con información genética de origen paterno y materno, que ofrezca información de la historia evolutiva de las poblaciones, se propone incluir marcadores mitocondriales que puedan complementar la información de los genes de cloroplasto, así como analizar datos genómicos para detectar selección.

Con el fin de contribuir a mejorar el procesamiento de muestras de coníferas se proponen las siguientes sugerencias metodológicas:

- Recolectar muestras de acículas maduras (y sin daño aparente), ya que las vainas o acículas jóvenes dificultaron la extracción de ADN.
- Recolectar mínimo 10 fascículos (50 acículas) por cada individuo muestreado, por si es necesario repetir la extracción de ADN.
- Si la muestra procede de plántulas, se sugiere procesarla el mismo día y no deshidratarla porque esto dificulta la extracción de ADN.
- No usar muestras descongeladas más de cinco veces porque el ADN se degrada y evita la amplificación del ADN.
- Hacer alícuotas del ADN genómico para procedimientos posteriores (e.g. amplificación, electroforesis, cuantificación).

14. REFERENCIAS

- Aavik T, Thetloff M, Träger S, Hernández-Agramonte IM, Reinula I, Pärtel, M. 2019. Delayed and immediate effects of habitat loss on the genetic diversity of the grassland plant *Trifolium montanum*. *Biodiversity and Conservation*, 28(12), 3299-3319. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01822-8>
- Ahn S. 1996. PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(13), 2623-2625. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2623>
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH, Gonzalez P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim JH, Allard G, Running SW, Semerci A, Cobb N. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, 259(4), 660-684. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.001>
- Asaf S, Khan AL, Khan MA, Waqas M, Kang S-M, Yun B-W, Lee I-J. 2017. Chloroplast genomes of *Arabidopsis halleri* ssp. Gemmifera and *Arabidopsis lyrata* ssp. Petraea: Structures and comparative analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 7556. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07891-5>
- Baquedano FJ, Castillo FJ. 2006. Comparative ecophysiological effects of drought on seedlings of the Mediterranean water-saver *Pinus halepensis* and water-spenders *Quercus coccifera* and *Quercus ilex*. *Trees*, 20(6), 689-700. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-006-0084-0>
- Barton AM. 1993. Factors Controlling Plant Distributions: Drought, Competition, and Fire in Montane Pines in Arizona. *Ecological Monographs*, 63, 367-397. DOI: <https://doi.org/10.2307/2937151>
- Bilgen, BB, Kaya N. 2017. Genetic diversity among *Pinus sylvestris* L. Populations and its implications for genetic conservation: comparison of nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(11), 6873-6881.

- Blyth C, Christmas, MJ Bickerton DC, Faast R, Packer JG, Lowe AJ, Breed MF. 2020. Increased Genetic Diversity via Gene Flow Provides Hope for *Acacia whibleyana*, an Endangered Wattle Facing Extinction. *Diversity*, 12(8), 299. DOI: <https://doi.org/10.3390/d12080299>
- Bocco G, Mendoza M, Masera OR. 2001. La dinámica del cambio del uso del suelo en Michoacán. Una propuesta metodológica para el estudio de los procesos de deforestación. *Investigaciones Geográficas*, 1(44). DOI: <https://doi.org/10.14350/riig.59133>
- Collin P H. 2004. Dictionary of Environment & Ecology. Bloomsbury.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2007. *Pinus leiophylla* Schl. & Cham. Ficha técnica para la reforestación. Comisión Nacional Forestal pp. 1-7.
- Contreras-Medina R, Luna-Vega I, Ríos-Muñoz C A. 2010. Distribución de *Taxus globosa* (Taxaceae) en México: Modelos ecológicos de nicho, efectos del cambio del uso de suelo y conservación. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83(3). DOI: <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2010000300009>
- Cruz-Salazar B, García-Bautista M, Ruiz-Montoya L. 2019. Genetic Structure Associated with the Ecological Traits of Four Species of Phyllostomid Bats Inhabiting Selva El Ocote Biosphere Reserve, Chiapas, México. *Acta Chiropterologica*, 21(2), 283-298. DOI: <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2019.21.2.004>
- Cruz-Salazar B, Ruiz-Montoya L, Mendoza-Sáenz VH, Riechers-Pérez A, García-Bautista M. 2018. Genetic Diversity of Tropical Bats and Its Relationship With Ecological Role in a Tropical Semievergreen Rain Forest in El Ocote Biosphere Reserve, Chiapas, Mexico. *Tropical Conservation Science*, 11, 1-21. DOI: <https://doi.org/10.1177/1940082917752473>
- de-Jong MA, Wahlberg N, van Eijk M, Brakefield PM, Zwaan BJ. 2011. Mitochondrial DNA Signature for Range-Wide Populations of *Bicyclus anynana* Suggests a Rapid Expansion from Recent Refugia. *PLoS ONE*, 6(6), e21385. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021385>

- Delgado P, Cuenca A, Escalante AE, Molina-Freaner F, Piñero D. 2002. Comparative genetic structure in pines: Evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 27-37.
- del-Val E, Sáenz-Romero C. 2017. Insectos descortezadores (Coleoptera: Curculionidae) y cambio climático: problemática actual y perspectivas en los bosques templados. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 53-60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.006>
- Diniz-Filho JAF, Soares TN, Lima JS, Dobrovolski R, Landeiro VL, Telles MPdeC, Rangel TF, Bini LM. 2013. Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology*, 36(4). <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000400002>
- Doyle JJ y Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Farwig N, Braun C, Böhning-Gaese K. 2008. Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). *Conservation Genetics*, 9(2), 317-326. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9343-x>
- Fernández FJA, JC López-Domínguez. 2005. Biodiversidad del Parque Nacional Malinche. Coordinación General de Ecología del Gobierno del Estado de Tlaxcala. Tlaxcala, México.
- Franco-Maass S, Regil-García HH, González-Esquiveles C, Nava Bernal G. 2012. Cambio de uso del suelo y vegetación en el Parque Nacional Nevado de Toluca, México, en el periodo 1972-2000. *Investigaciones Geográficas*, 61, 38. DOI: <https://doi.org/10.14350/rig.29996>
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Fu YX. 1994. A phylogenetic estimator of effective population size or mutation rate. *Genetics* 136, 685–692
- Galicia L, Gómez-Mendoza, Magaña V. 2015. Climate change impacts and adaptation strategies in temperate forests in Central Mexico: A participatory approach. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 20(1), 21-42. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11027-013-9477-8>
- García-Campusano F, Monjarás-González G, Galindo-Flores G, Ponce-Mendoza A-, Chávez-Ávila VM, Márquez-Guzmán J. 2019. Morfogénesis in vitro de brotes adventicios del pinabete mexicano *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(56), 113-135. DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.545>
- Ge X-J, Hung K-H, Ko Y-Z, Hsu T-W, Gong X, Chiang T-Y, Chiang, Y-C. 2015. Genetic Divergence and Biogeographical Patterns in *Amentotaxus argotaenia* Species Complex. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(2), 264-280. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0742-0>
- Godoy JA. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*, 18(1), 23-33.
- Hansen AJ, DeFries RS, Turner W. 2012. Land Use Change and Biodiversity: A Synthesis of Rates and Consequences during the Period of Satellite Imagery. En Gutman G, Janetos A C, Justice CO, Moran EF, Mustard JF, Rindfuss RR, Skole D, Turner BL, Cochrane MA (Eds.), Editorial. Springer Netherlands. pp. 277-299 DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2562-4_16
- Henry RJ. 2005. Plant diversity and evolution: Genotypic and phenotypic variation in higher plants. Editorial CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851999043.0000>
- Heredia-Bobadilla RL, Gutiérrez-González G, Franco-Maass S, Arzate-Fernández AM. 2012. Genetic variability of sacred fir (*Abies religiosa*) in the Nevado de Toluca National Park. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), 130-136. DOI: <https://doi.org/10.5897/IJBC11.187>

- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). 2010. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, Tlaxcala. México, Tlaxcala: INAFED. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM29tlaxcala/index.html> (visitado el 29 de octubre, 2021).
- Kim M-S, Richardson BA, McDonald GI, Klopfenstein NB. 2011. Genetic diversity and structure of western white pine (*Pinus monticola*) in North America: A baseline study for conservation, restoration, and addressing impacts of climate change. *Tree Genetics & Genomes*, 7(1), 11-21. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0311-0>
- Kodak H. 2021. Estimating Genetically Based Phenotypic Variation and Local Adaptation in the Foundational Plant Species, *Schoenoplectus Americanus*. University of Notre Dame. DOI: <https://doi.org/10.7274/47429883v32>
- Kolde R. 2019. pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0. 12.
- Kormutak A, Galgoci M, Sukenikova D, Bolecek P, Libantova J, Gómóry D. 2017. Maternal inheritance of chloroplast DNA in *Pinus mugo* Turra: A case study of *Pinus mugo* × *Pinus sylvestris* crossing. *Plant Systematics and Evolution*, 304(1), 71-76. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1449-0>
- Kozyrenko MM, Artyukova EV, Chubar EA. 2017. Genetic diversity and population structure of *Taxus cuspidata* Sieb. Et Zucc. Ex Endl. (Taxaceae) in Russia according to data of the nucleotide polymorphism of intergenic spacers of the chloroplast genome. *Russian Journal of Genetics*, 53(8), 865-874. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795417070079>
- Lambin EF, Turner BL, Geist H, Agbola SB, Angelsen A, Bruce JW, Coomes OT, Dirzo R, Fischer G, Folke C, George PS, Homewood K, Imbernon J, Leemans R, Li X, Moran EF, Mortimore M, Ramakrishnan PS, Richards J F, Skåness H, Steffen W, Stone GD, Svedin U, Veldkamp TA, Vogel C, Xu J. 2001. The causes of land-use and land-cover change: Moving beyond the myths. *Global Environmental Change*, 11(4), 261-269. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0959-3780\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0959-3780(01)00007-3)

- Leig JW, Bryant D. 2015. PopArt: Full- feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116. DOI: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Li WH, Sadler LA. 1991. Low nucleotide diversity in man. *Genetics*, 129(2), 513-523. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/129.2.513>
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics applications note*, 25, 1451–1452.
- Marwal A, Sahu A K, Gaur R K. 2014. Molecular Markers. En *Animal Biotechnology* (pp. 289-305). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00016-X>
- Maxwell SL, Fuller RA, Brooks TM, Watson JEM. 2016. Biodiversity: The ravages of guns, nets and bulldozers. *Nature*, 536, 143–145. DOI: <https://doi.org/10.1038/536143a>
- Maya-García R, Arizaga S, Cuevas-Reyes P, Peñaloza-Ramírez JM, Ramírez VR, Oyama K. 2017. Landscape genetics reveals inbreeding and genetic bottlenecks in the extremely rare short-globose cacti *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae) as a result of habitat fragmentation. *Plant Diversity*, 39(1), 13-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.09.005>
- McCarthy C. 1996. Chromas (Version 1.5). Queensland, Australia: School of Health Science, Griffith University.
- Méndez-Encina FM, Méndez-González J, Mendieta-Oviedo R, López-Díaz JÓM, Nájera-Luna J A. 2021. Ecological niches and suitability areas of three host pine species of bark beetle *Dendroctonus mexicanus* Hopkins. *Forests*, 12(4), 385. DOI: <https://doi.org/10.3390/f12040385>
- Nei M. 1986. Definition and estimation of fixation indices. *Evolution*, 40: 643-645. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1986.tb00516.x>
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, USA: Columbia University Press.
- Neigel JE. 2002. Is FST obsolete?. *Conservation Genetics*, 3, 167-173. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1015213626922>

- Newbold T, Bentley LF, Hill SLL, Edgar MJ, Horton M, Su G, Şekercioğlu ÇH, Collen B, Purvis A. 2020. Global effects of land use on biodiversity differ among functional groups. *Functional Ecology*, 34(3), 684-693. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13500>
- Ortiz-Olivas ME, Hernández-Díaz JC, Fladung M, Cañadas-López Á, Prieto-Ruíz JÁ, Wehenkel C. 2017. Spatial Genetic Structure within and among Seed Stands of *Pinus engelmannii* Carr. And *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham, in Durango, Mexico. *Forests*, 8(1). DOI: <https://doi.org/10.3390/f8010022>
- Palacios-Romero A, Rodríguez-Laguna R, Razo-Zárate R, Meza-Rangel J, Prieto-García F, Hernández-Flores Mdelal. 2017. Espuma fenólica de célula abierta hidratada como medio para mitigar estrés hídrico en plántulas de *Pinus leiophylla*. *Madera y Bosques*, 23(2), 43-52. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2017.232512>
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecological Society of America*, 79(2), 22. DOI: [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[0361:WMCTUA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[0361:WMCTUA]2.0.CO;2)
- Pazouki L, Shanjani PS, Fields PD, Martins K, Suhhorutšenko M, Viinalass H, Niinemets Ü. 2016. Large within-population genetic diversity of the widespread conifer *Pinus sylvestris* at its soil fertility limit characterized by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *European Journal of Forest Research*, 135(1), 161-177. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10342-015-0928-5>
- Piñero D, Caballero-Mellado J, Cabrera-Toledo D, Canteros CE, Casas A, Castañeda-Sortíban A, Castillo A, Cerritos R, Chassin-Noria O, Colunga-GarcíaMarín P, Delgado P, Díaz-Jaimes P, Eguiarte LE, Escalante A E, Espinoza B, Fleury A, Martínez E, Martínez F, Martínez-Castillo J, Mastretta Y, Medellín R, Medrano-González L, Molina-Freaner F, Morales-Vela B, Murguía-Vega A, Payró-de-la-Cruz E, Reyes-Montes M R, Robles-Saavedra M R, Rodríguez-Arellanes G, Rojas-Bracho L, Romero-Martínez R, Sagaza-Cardona JH, Salas-Lizana R, Sciutto E, Scott-Baker C, Schramm-Urrutia Y, Silva C, Sousa V, Taylor M L, Urbán-Ramírez J, Uribe-Alcocer M, Vázquez-Cuevas MJ, Vázquez-Domínguez E, Vovides AP, Wegier A, Zaldívar-Riverón A, Zúñiga G. 2008. La diversidad genética como

instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO.

R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

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.

Rentaría-Alcántara M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En Eguiarte-Frums, L.E., Sousa, V. y Aguirre, X. (Comp). *Ecología molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, pp. 541-566.

Reyes-Sánchez MD. 2020. Análisis de relación entre ejidos y áreas naturales protegidas en México: Estudio de Caso del municipio de Nanacamilpa de Mariano Arista Tlaxcala [Tesis de licenciatura]. Universidad Iberoamericana Puebla.

Ribeiro S, Cerveira A, Soares P, Fonseca T. 2022. Natural Regeneration of Maritime Pine: A Review of the Influencing Factors and Proposals for Management. *Forests* 13, 386. <https://doi.org/10.3390/f13030386>

Rodríguez-Banderas A, Vargas-Mendoza CF, Buonamici A, Vendramin GG. 2009. Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of Biogeography*, 36(9), 1807–1820. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02104.x>

Rodríguez-Trejo DA (Coord.). 2021. Semillas de Especies Forestales. División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo.

- Rosenberger DW, Aukema BH, Venette RC. 2017. Cold tolerance of mountain pine beetle among novel eastern pines: A potential for trade-offs in an invaded range? *Forest Ecology and Management*, 400, 28-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.05.031>
- Rzedowski GC de, Rzedowski J. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
- Sáenz-Romero C, Rehfeldt GE, Ortega-Rodríguez JM, Marín-Togo MC, Madrigal-Sánchez X. 2015. *Pinus leiophylla* suitable habitat for 1961-1990 and future climate. *Botanical Sciences*, 93(4), 709-718. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.86>
- Schenk RU, Hildebrandt AC. 2011. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 50(1), 199-204. DOI: <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Servicio Nacional, Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA). 2021. Colabora Agricultura en el rescate del Parque Nacional La Malinche. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/>
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105–1109. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00037152>
- Tong YW, Lewis BJ, Zhou WM, Mao CR, Wang Y, Zhou L, Yu DP, Dai LM, Qi L. 2019. Genetic Diversity and Population Structure of Natural *Pinus koraiensis* Populations. *Forests*, 11(1), 39. <https://doi.org/10.3390/f11010039>
- Tonkin-Hill G, Lees JA, Bentley SD, Frost SD, Corander J. 2018. RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. *Wellcome Open Research*, 3 93. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14694.1>
- Valdivieso T, Pimpão M, Trindade CS, Varela M C. 2017. Reproductive phenology of *Pinus pinea*. *Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes* 122, 63-68.

- Van Geert A, Van Rossum F y Triest L. 2008. Genetic diversity in adult and seedling populations of *Primula vulgaris* in a fragmented agricultural landscape. *Conservation Genetics*, 9(4), 845-853. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9409-9>
- Villaseñor JL. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559-902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Weir BS, Cockerham CC. 1984 Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Whittet R, Cavers S, Cottrel J, Rosique-Esplugas C, Ennos R. 2017. Substantial variation in the timing of pollen production reduces reproductive synchrony between distant populations of *Pinus sylvestris* L. in Scotland. *Ecology and Evolution*, 7(15), 5754-5765. <https://doi.org/10.1002/ece3.3154>
- World Meteorological Organization (WMO) y United Nations Environment Programme (UNEP). 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis Summary for Policymakers. *Energy & Environment*, 18(3-4), 433-440. DOI: <https://doi.org/10.1260/095830507781076194>
- Wright S. 1950. Genetical structure of populations. *Nature* 166: 247–249.
- Zamora-Gutierrez V, Pearson RG, Green RE, Jones KE. 2018. Forecasting the combined effects of climate and land use change on Mexican bats. *Diversity and Distributions*, 24(3), 363-374. DOI: <https://doi.org/10.1111/ddi.12686>
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12), e103-e103. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>

15. ANEXOS

15.1 Descripción de las muestras de *Pinus leiophylla* y visualización de geles de electroforesis

Cuadro 7. Descripción de las muestras obtenidas.

ID	Localidad	Cohorte	Extracción de ADN genómico	Región intergénica		Geles de electroforesis			Observaciones	
				<i>trnL-trnF</i>	<i>trnT-trnL</i>	Ubicación de las muestras en las figuras de geles de electroforesis				
			Concentración (ng/μl)	¿Hubo producto de secuenciación?	Concentración (ng/μl)	ADN GENOMICO	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnT-trnL</i>		
1	Ixtacuixtla	Semilla	2.41	Sí	Sí	11.42	9A	11A	14A	
2	Ixtacuixtla	Semilla	7.69	Sí	Sí	8.68	9A	11B	14B	Todas las muestras marcadas como “Semilla”, fueron consideradas como plántulas.
3	Ixtacuixtla	Semilla	0.69	Sí	Sí	9.24	9A	11B	14A	
4	Ixtacuixtla	Semilla	3.27	Sí	Sí	9.27	9A	12D	14A	
5	Ixtacuixtla	Semilla	9.69	Sí	Sí	10.72	9A	11A	14B	
6	Ixtacuixtla	Semilla	2.65	Sí	Sí	1.52	9B	11B	15E	
7	Ixtacuixtla	Semilla	20.53	Sí	Sí	10.72	9A	11B	14B	
8	Ixtacuixtla	Semilla	2.55	Sí	Sí	1.54	9B	11B	14A	
9	Ixtacuixtla	Semilla	5.75	Sí	Sí	5.41	9A	11B	14A	
10	Ixtacuixtla	Semilla	3.35	Sí	Sí	8.49	9A	11B	14A	
11	Ixtacuixtla	Semilla	3.12	Sí	Sí	7.94	9A	12D	14C	Los productos de PCR de la región <i>trnL-trnF</i> no fueron cuantificados, por lo cual no indica la concentración de los productos.
12	Ixtacuixtla	Semilla	3.19	No	Sí	7.63	9B	11A	14A	
13	Ixtacuixtla	Semilla	3.01	Sí	Sí	4.61	9A	11B	14A	
14	Ixtacuixtla	Semilla	7.57	Sí	Sí	10.21	9B	11B	14B	
15	Ixtacuixtla	Semilla	22.45	Sí	Sí	10.21	9A	11B	14B	
16	Ixtacuixtla	Semilla	3.11	Sí	Sí	7.96	9A	11B	14A	
17	Ixtacuixtla	Semilla	1.63	Sí	Sí	6.84	9A	11B	14A	
18	Ixtacuixtla	Semilla	3.88	Sí	Sí	17.86	9B	11B	14A	
19	Ixtacuixtla	Semilla	2.69	Sí	Sí	8.5	9A	11B	14C	

ID	Localidad	Cohorte	Extracción de ADN genómico Concentración (ng/μl)	Región intergénica		Geles de electroforesis			Observaciones	
				<i>trnL-trnF</i> ¿Hubo producto de secuenciación?	<i>trnT-trnL</i> Concentración (ng/μl)	Ubicación de las muestras en las figuras de geles de electroforesis	ADN GENOMICO	<i>trnL-trnF</i>		<i>trnT-trnL</i>
20	Ixtacuixtla	Semilla	3.93	Sí	Sí	10.66	9A	11B	14A	
21	Ixtacuixtla	Adulto	287.31	Sí	Sí	6.43	9C	11B	14B	Todas las muestras marcadas como "Semilla", fueron consideradas como plántulas. Los productos de PCR de la región <i>trnL-trnF</i> no fueron cuantificados, por lo cual no indica la concentración de los productos.
22	Ixtacuixtla	Adulto	25.71	Sí	Sí	5.74	9C	11B	14B	
23	Ixtacuixtla	Adulto	102.25	Sí	Sí	7.54	9C	11B	14B	
24	Ixtacuixtla	Adulto	33.97	Sí	Sí	4.87	9C	11B	14B	
25	Ixtacuixtla	Adulto	371.03	Sí	Sí	7.82	9C	11B	14B	
26	Ixtacuixtla	Adulto	41.4	Sí	Sí	5	9C	11C	14B	
27	Ixtacuixtla	Adulto	385.51	Sí	Sí	11.61	9C	11C	14B	
28	Ixtacuixtla	Adulto	48.88	Sí	Sí	5.83	9C	11C	14B	
29	Ixtacuixtla	Adulto	480.64	Sí	No	5.07	9C	11B	14B	
30	Ixtacuixtla	Adulto	639.65	Sí	Sí	7.7	9C	11D	14B	
31	Ixtacuixtla	Adulto	240.04	Sí	Sí	10.01	9C	11B	14C	
32	Ixtacuixtla	Adulto	166.39	Sí	Sí	6.87	9C	11E	14C	
33	Ixtacuixtla	Adulto	26.33	Sí	Sí	6.18	9C	11C	14B	
34	Ixtacuixtla	Adulto	56.33	Sí	Sí	5.72	9C	11F	14B	
35	Ixtacuixtla	Adulto	243.48	Sí	Sí	5.81	9C	11F	14B	
36	Ixtacuixtla	Adulto	253.28	Sí	Sí	11.97	9C	11E	14B	
37	Ixtacuixtla	Adulto	100.99	Sí	Sí	10.52	9C	11F	14C	
38	Ixtacuixtla	Adulto	275.36	Sí	Sí	10.24	9C	11E	14D	
39	Ixtacuixtla	Adulto	287.92	Sí	Sí	5.57	9C	11E	14A	
40	Ixtacuixtla	Adulto	273.4	Sí	Sí	9.29	9C	11E	14D	
41	La Malinche	Plántula	101.29	Sí	Sí	5.02	9C	11E	14D	
42	La Malinche	Plántula	63.85	Sí	Sí	2.83	9C	11F	14A	
43	La Malinche	Plántula	289.01	Sí	Sí	11.76	9D	12A	14D	
44	La Malinche	Plántula	227.93	Sí	Sí	8.41	9D	11F	14D	

ID	Localidad	Cohorte	Extracción de ADN genómico Concentración (ng/μl)	Región intergénica		Geles de electroforesis			Observaciones	
				<i>trnL-trnF</i> ¿Hubo producto de secuenciación?	<i>trnT-trnL</i> Concentración (ng/μl)	Ubicación de las muestras en las figuras de geles de electroforesis				
						ADN GENOMICO	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnT-trnL</i>		
45	La Malinche	Plántula	241	Sí	Sí	6.77	9D	11C	14D	
46	La Malinche	Plántula	266.64	Sí	Sí	11.37	9D	11E	14D	Todas las muestras marcadas como “Semilla”, fueron consideradas como plántulas. Los productos de PCR de la región <i>trnL-trnF</i> no fueron cuantificados, por lo cual no indica la concentración de los productos.
47	La Malinche	Plántula	260.47	Sí	Sí	11.01	9D	12D	14D	
48	La Malinche	Plántula	313.69	Sí	Sí	38.27	9D	11E	14D	
49	La Malinche	Plántula	6.36	Sí	Sí	4.86	9D	11E	14A	
50	La Malinche	Plántula	289.13	Sí	Sí	6.59	9D	11E	14D	
51	La Malinche	Plántula	11.99	Sí	Sí	7.76	9D	11E	14D	
52	La Malinche	Plántula	271.99	Sí	Sí	10.24	9D	11C	14D	
53	La Malinche	Plántula	300.77	Sí	Sí	5.18	9D	11E	14D	
54	La Malinche	Plántula	290.77	Sí	Sí	5.19	9D	11E	14D	
55	La Malinche	Plántula	18.36	Sí	Sí	4.91	9D	11C	14D	
56	La Malinche	Plántula	75.97	Sí	Sí	6.6	9D	11E	14D	
57	La Malinche	Plántula	308	Sí	Sí	15.07	9D	11E	14D	
58	La Malinche	Plántula	282.32	Sí	Sí	7.08	9D	11E	14D	
59	La Malinche	Plántula	307.19	Sí	Sí	5.44	9D	11E	14D	
60	La Malinche	Plántula	45.73	Sí	Sí	5.46	9D	11E	14E	
61	La Malinche	Plántula	308.15	Sí	Sí	4.74	9D	11E	14E	
62	La Malinche	Semilla 1	7.04	Sí	Sí	5.14	9B	11F	14A	
63	La Malinche	Semilla 2	3.36	Sí	Sí	12.48	9B	11E	14F	
64	La Malinche	Semilla 3	73.55	Sí	Sí	5.28	9B	11E	14E	
65	La Malinche	Semilla 4	2.11	Sí	Sí	5.8	9B	12B	14C	
66	La Malinche	Semilla 5	3.04	Sí	Sí	10.57	9B	11F	14C	
67	La Malinche	Semilla 6	5.49	Sí	Sí	4.48	9B	12B	14E	
68	La Malinche	Plántula	318.16	Sí	Sí	3.73	9D	12C	14E	
69	La Malinche	Plántula	356.07	Sí	Sí	6.54	9D	12C	14E	

ID	Localidad	Cohorte	Extracción de ADN genómico Concentración (ng/μl)	Región intergénica		Geles de electroforesis			Observaciones	
				<i>trnL-trnF</i> ¿Hubo producto de secuenciación?	<i>trnT-trnL</i> Concentración (ng/μl)	Ubicación de las muestras en las figuras de geles de electroforesis				
						ADN GENOMICO	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnT-trnL</i>		
70	La Malinche	Adulto	14.6	Sí	Sí	5.1	9A	12D	14E	
71	La Malinche	Adulto	9.24	Sí	Sí	5.22	9A	12B	14E	Todas las muestras marcadas como
72	La Malinche	Adulto	84	No	Sí	5.52	9A	12C	14E	
73	La Malinche	Adulto	20.9	Sí	Sí	4.44	9A	12C	14E	“Semilla”, fueron consideradas como plántulas.
74	La Malinche	Adulto	3.32	Sí	Sí	7.59	9A	12C	14F	
75	La Malinche	Adulto	0.5	No	Sí	6.61	9E	NO	14F	
76	La Malinche	Adulto	8.32	Sí	Sí	4.35	9E	12B	14E	
77	La Malinche	Adulto	2.68	Sí	Sí	12.21	9E	12C	14C	
78	La Malinche	Adulto	18.05	Sí	Sí	2.67	9E	12C	14E	
79	La Malinche	Adulto	10.2	Sí	Sí	1.82	9E	12B	14E	
80	La Malinche	Adulto	2.15	No	Sí	10.67	9E	12C	14F	Los productos de PCR de la región <i>trnL-trnF</i> no fueron cuantificados, por lo cual no indica la concentración de los productos.
81	La Malinche	Adulto	0.69	Sí	Sí	9.4	9E	12B	14F	
82	La Malinche	Adulto	26.31	Sí	Sí	1.01	9E	12C	14E	
83	La Malinche	Adulto	18.1	Sí	Sí	2.71	9E	12C	14E	
84	La Malinche	Adulto	4.09	Sí	Sí	8.01	9E	12C	14F	
85	La Malinche	Adulto	36.3	Sí	Sí	2.22	9E	12D	14E	
86	La Malinche	Adulto	30.67	Sí	Sí	4.45	9E	12D	14E	
87	La Malinche	Adulto	40.37	Sí	Sí	1.4	9E	12D	14E	
88	La Malinche	Adulto	55.37	Sí	Sí	2.8	9E	12B	15A	
89	La Malinche	Adulto	165	Sí	Sí	2.68	9F	12D	14E	
90	Nanacamilpa	Plántula	70.36	Sí	Sí	5.27	9F	12C	15B	
91	Nanacamilpa	Plántula	3.48	Sí	Sí	12.04	9F	12E	14F	
92	Nanacamilpa	Plántula	7.48	Sí	Sí	2.91	9F	12E	15B	
93	Nanacamilpa	Plántula	27.99	Sí	Sí	5.58	9F	12E	15B	
94	Nanacamilpa	Plántula	105.48	Sí	Sí	6.13	9F	12F	15B	

ID	Localidad	Cohorte	Extracción de ADN genómico Concentración (ng/μl)	Región intergénica		Geles de electroforesis			Observaciones	
				<i>trnL-trnF</i> ¿Hubo producto de secuenciación?	<i>trnT-trnL</i> Concentración (ng/μl)	Ubicación de las muestras en las figuras de geles de electroforesis	ADN GENOMICO	<i>trnL-trnF</i>		<i>trnT-trnL</i>
95	Nanacamilpa	Plántula	31.01	Sí	Sí	4.8	9F	12F	15B	
96	Nanacamilpa	Plántula	20.84	Sí	Sí	3.69	9F	13A	15B	Todas las muestras marcadas como "Semilla", fueron consideradas como plántulas.
97	Nanacamilpa	Plántula	8.67	Sí	Sí	5.33	9F	13A	15B	
98	Nanacamilpa	Plántula	2.48	No	Sí	9.27	9F	12E	14F	
99	Nanacamilpa	Plántula		No	No					
100	Nanacamilpa	Plántula	3.75	Sí	No		9F	12E		
101	Nanacamilpa	Plántula	2.04	Sí	Sí	7.37	9F	12E	14F	
102	Nanacamilpa	Semilla	2.43	Sí	Sí	9.12	10A	12E	14F	
103	Nanacamilpa	Semilla		No	No					
104	Nanacamilpa	Semilla	7.08	Sí	Sí	8.02	9A	12D	15B	
105	Nanacamilpa	Semilla	4.58	Sí	Sí	11.2	10A	12E	15D	
106	Nanacamilpa	Semilla	2.68	Sí	Sí	11.72	10A	12E	15D	
107	Nanacamilpa	Semilla		No	No		9A			
108	Nanacamilpa	Semilla	4.32	Sí	Sí	9.22	9A	12D	15D	
109	Nanacamilpa	Semilla		No	No					
110	Nanacamilpa	Plántula	21.96	Sí	Sí	4.93	10A	13A	15D	Los productos de PCR de la región <i>trnL-trnF</i> no fueron cuantificados, por lo cual no indica la concentración de los productos.
111	Nanacamilpa	Adulto	14.03	Sí	Sí	3.58	10A	13A	15B	
112	Nanacamilpa	Adulto	159.24	Sí	Sí	6.12	10A	13A	15B	
113	Nanacamilpa	Adulto	64.03	Sí	Sí	3.13	10A	13A	15B	
114	Nanacamilpa	Adulto	18.68	Sí	Sí	1.53	10A	13A	15B	
115	Nanacamilpa	Adulto	14.12	Sí	Sí	3.81	10A	13A	15B	
116	Nanacamilpa	Adulto	11.23	Sí	Sí	2.63	10A	12D	15B	
117	Nanacamilpa	Adulto	12.76	Sí	Sí	7.32	10A	13A	15B	
118	Nanacamilpa	Adulto	16.53	Sí	Sí	7.33	10B	12E	15B	
119	Nanacamilpa	Adulto	20.6	Sí	Sí	2.83	10B	12E	15B	

ID	Localidad	Cohorte	Extracción de ADN genómico Concentración (ng/μl)	Región intergénica		Geles de electroforesis			Observaciones	
				<i>trnL-trnF</i> ¿Hubo producto de secuenciación?	<i>trnT-trnL</i> Concentración (ng/μl)	Ubicación de las muestras en las figuras de geles de electroforesis	ADN GENOMICO	<i>trnL-trnF</i>		<i>trnT-trnL</i>
120	Nanacamilpa	Adulto	29.48	Sí	Sí	3.98	10B	13A	15D	
121	Nanacamilpa	Adulto	26.16	Sí	Sí	5.35	10B	13A	15B	Todas las muestras marcadas como “Semilla”, fueron consideradas como plántulas.
122	Nanacamilpa	Adulto	30.19	Sí	Sí	6.68	10B	13A	15B	
123	Nanacamilpa	Adulto	13.14	Sí	Sí	9	10B	13A	15B	
124	Nanacamilpa	Adulto	58.95	Sí	Sí	4.59	10B	13A	15B	
125	Nanacamilpa	Adulto	32.21	Sí	Sí	6.05	10B	12E	15C	
126	Nanacamilpa	Adulto	29.97	Sí	Sí	2.94	10B	12E	15C	
127	Nanacamilpa	Adulto	11.05	Sí	Sí	3.03	10B	12E	14C	
128	Nanacamilpa	Adulto	14.49	Sí	Sí	4.58	10B	12E	15C	
129	Nanacamilpa	Adulto	9.61	Sí	Sí	2.07	10B	12D	15C	
130	Nanacamilpa	Adulto	170.89	Sí	Sí	4.27	10B	13B	15C	
131	La Malinche	Plántula	5.13	Sí	Sí	5.39	9D	13B	15D	Los productos de PCR de la región <i>trnL-trnF</i> no fueron cuantificados, por lo cual no indica la concentración de los productos.

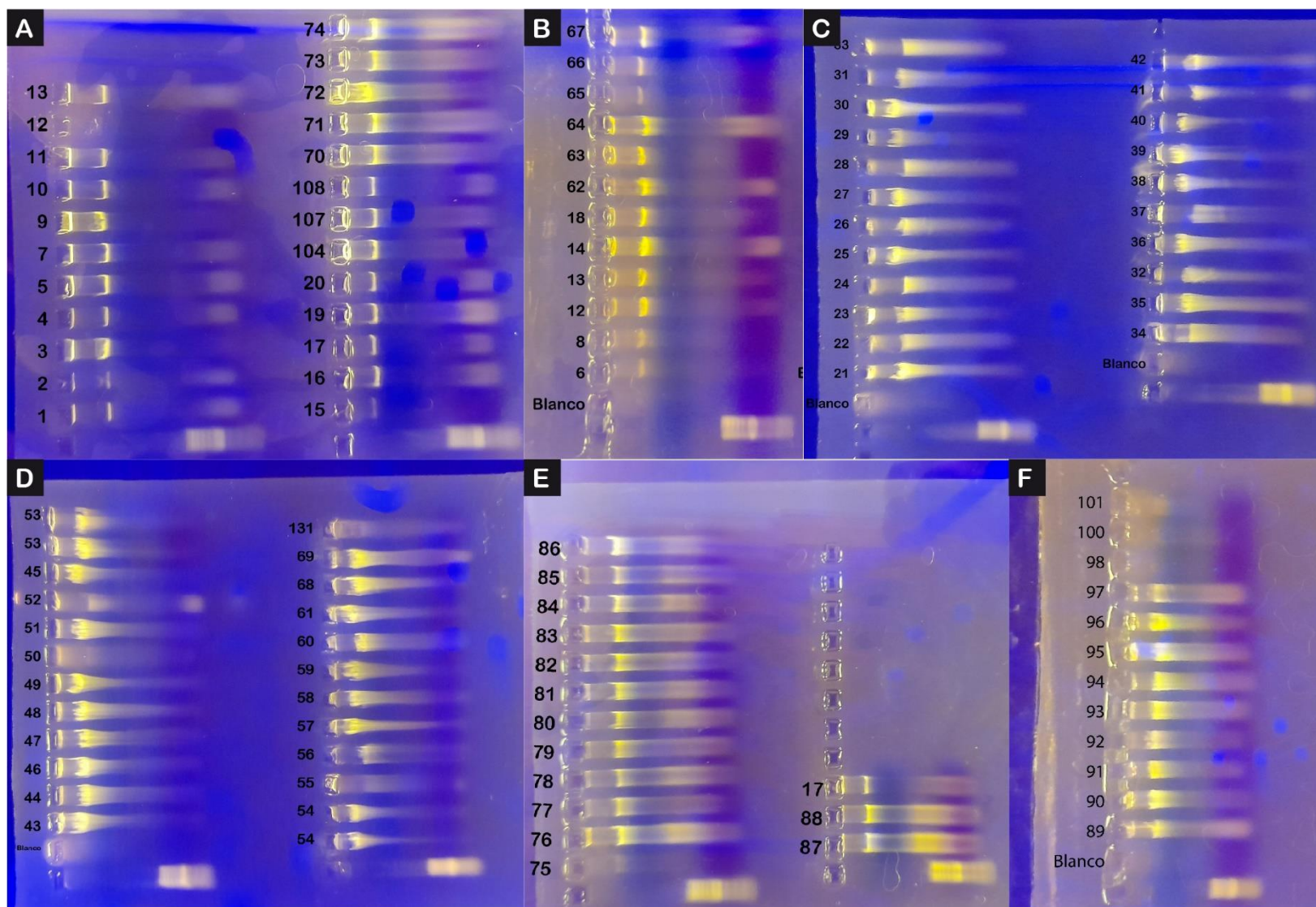


Figura 9. Geles de electroforesis de extracción de ADN genómico.

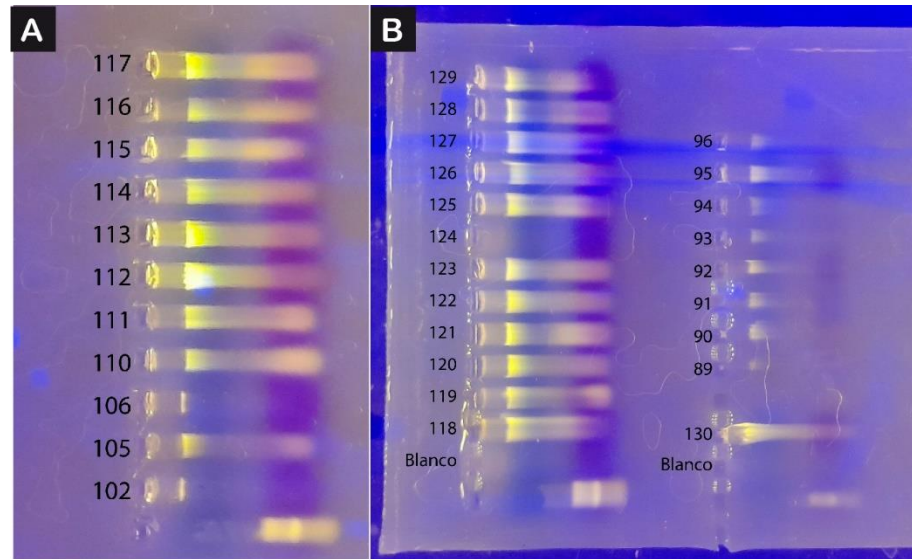


Figura 10. Geles de electroforesis de extracción de ADN genómico.

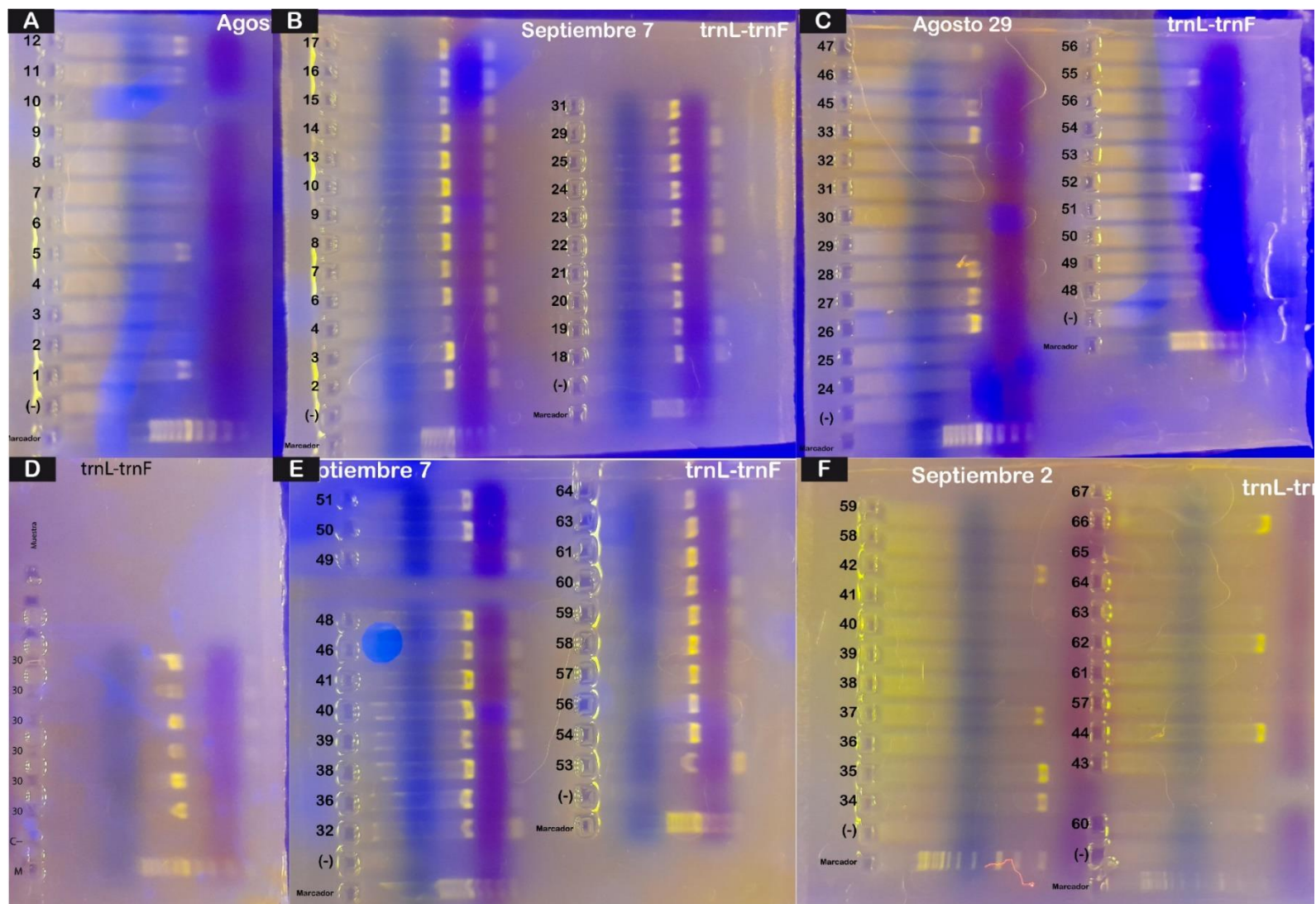


Figura 11. Geles de electroforesis de productos de PCR de la región intergénica *trnL-trnF* del cloroplasto.

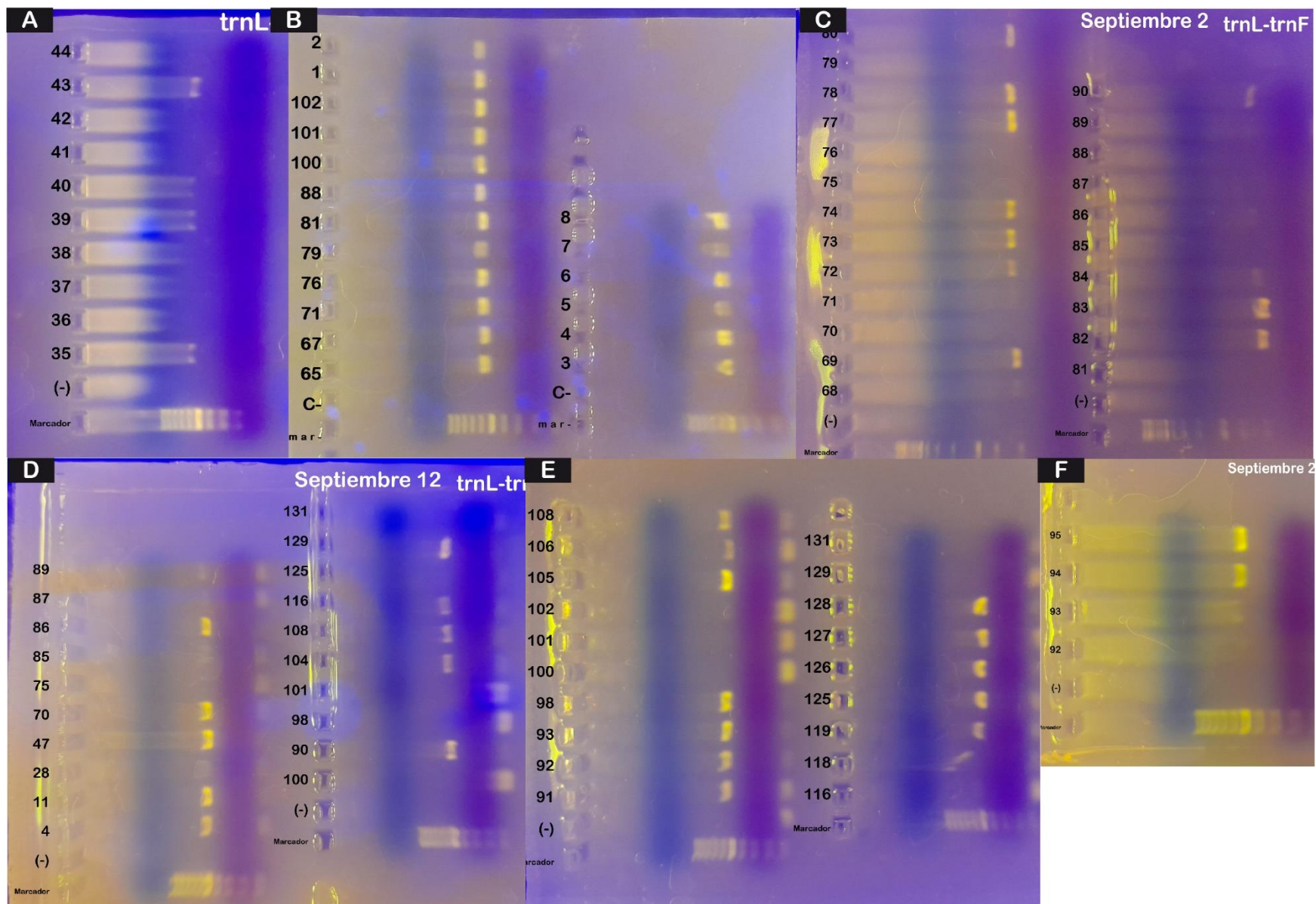


Figura 12. Geles de electroforesis de productos de PCR de la región intergénica *trnL-trnF* del cloroplasto.

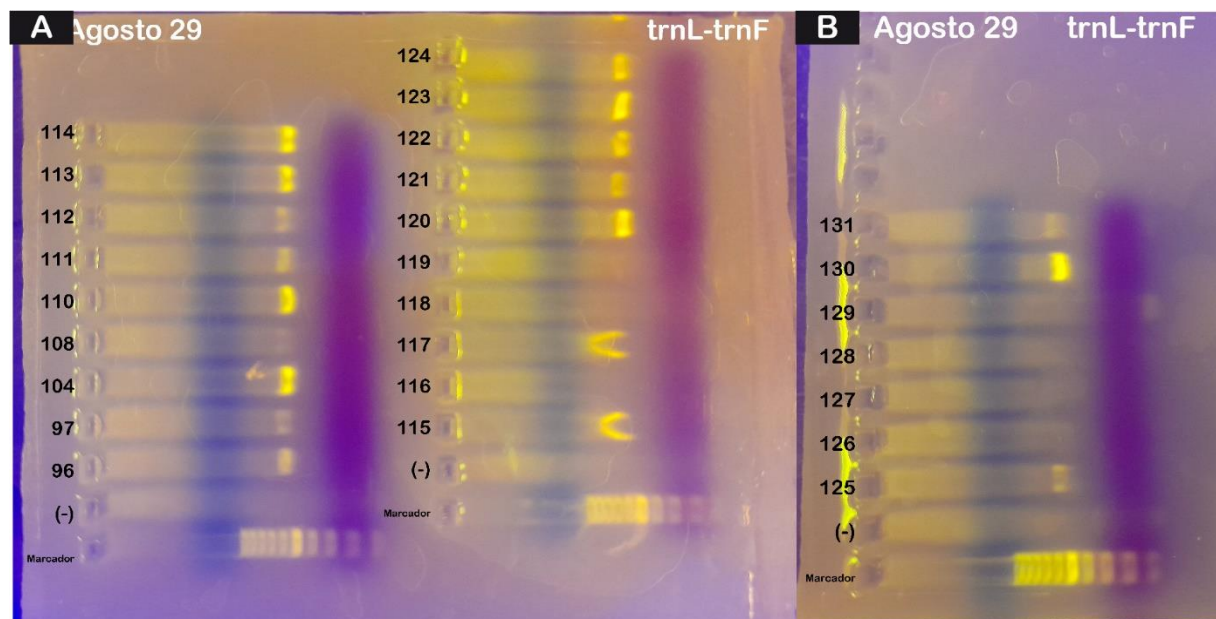


Figura 13. Geles de electroforesis de productos de PCR de la región intergénica *trnL-trnF* del cloroplasto.

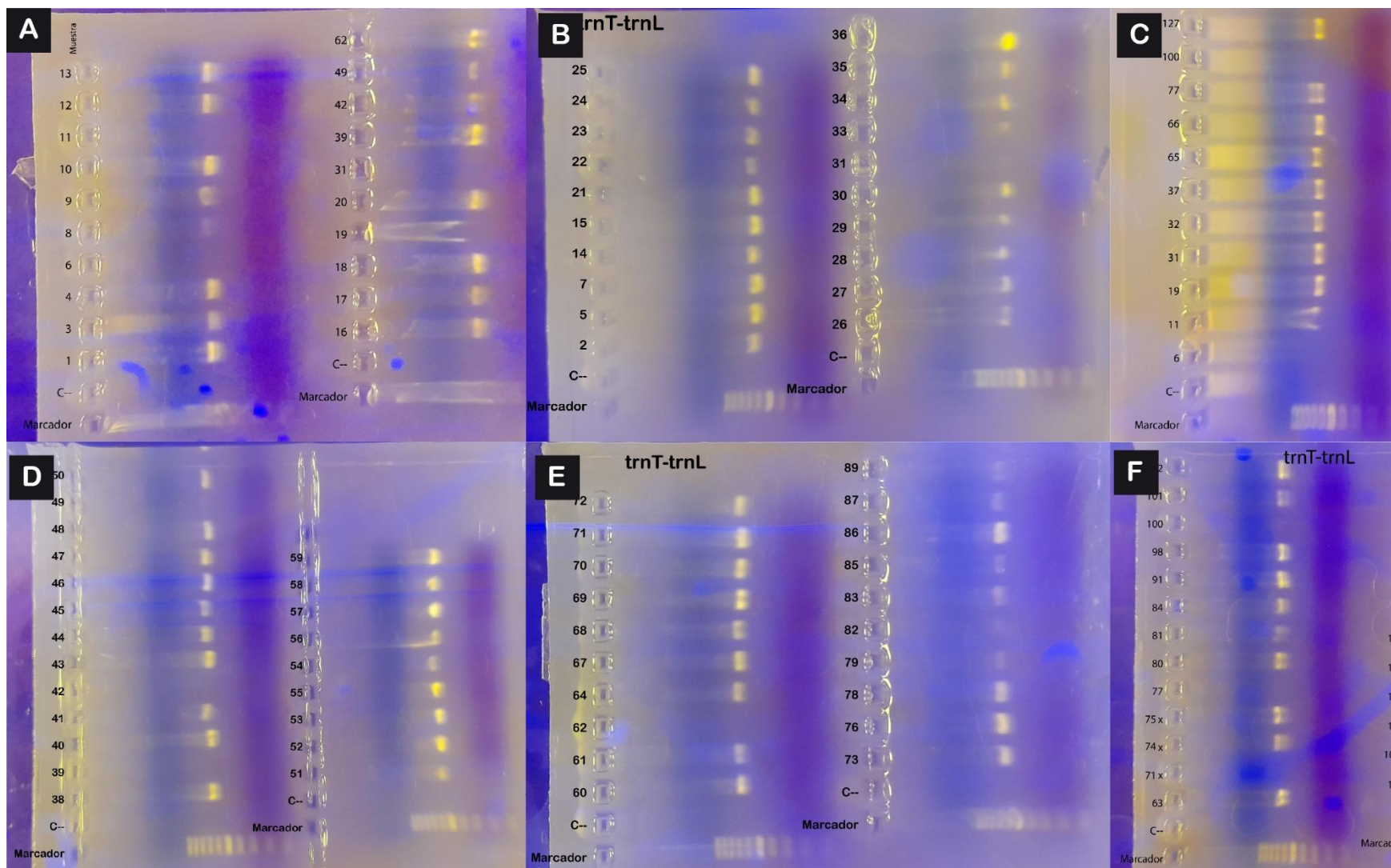


Figura 14. Geles de electroforesis de productos de PCR de la región intergénica *trnT-trnL* del cloroplasto.

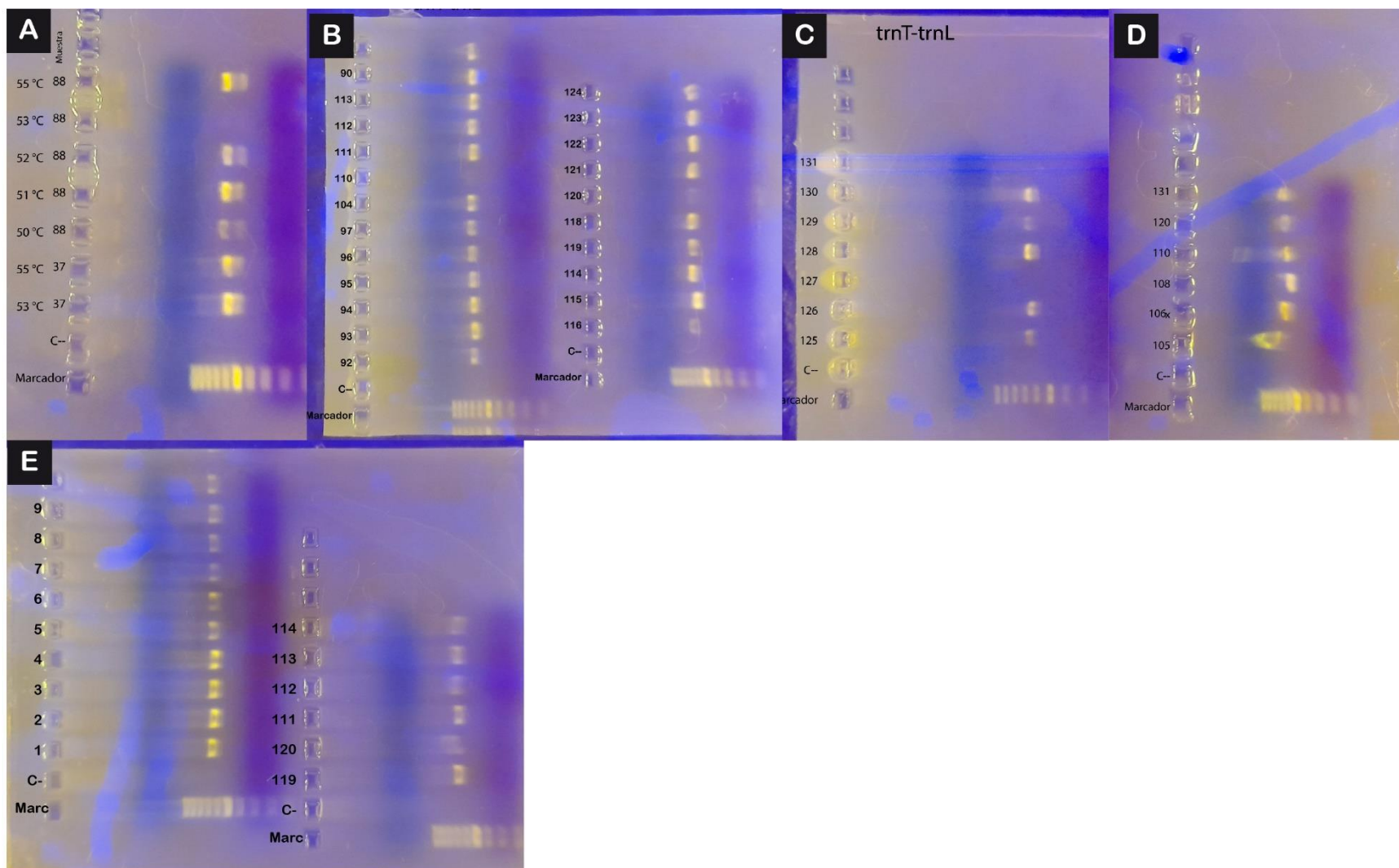


Figura 15. Geles de electroforesis de productos de PCR de la región intergénica *trnT-trnL* del cloroplasto.

15.2 Sitios de estudio



Figura 16. Población de *Pinus leiophylla* en Ixtacuixtla.



Figura 17. Población de *Pinus leiophylla* en La Malinche.



Figura 18. Población de *Pinus leiophylla* en Nanacamilpa

15.3 Protocolo de extracción CTAB 2x (Doyle y Doyle 1987) modificado para tejido foliar seco o fresco

1. Moler aproximadamente de 60 a 200 mg de tejido foliar con nitrógeno líquido.
2. Agregar 0.5 ml de buffer CTAB 2x en el mortero, moler más y pasar todo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Pasar a vortex 20 segundos. Incubar a baño maría a 65°C. Después de la media hora de incubación macerar las muestras de nuevo.
3. Incubar en baño maría a 65 °C (dejar toda la noche). Agitar los tubos cada 3 minutos (mientras se pueda).
4. Retirar las muestras de la incubación y agregar 400 µl de acetato de amonio al 7.5 M y pasar al vortex 20 segundos.
5. Centrifugar a 4 °C a 13000 rpm por 8 minutos y trasladar ~700 µl de sobrenadante a un tubo nuevo.
6. Añadir a cada tubo 700 µl de cloroformo:octanol (24:1) agitar hasta homogeneizar y centrifugar (4 °C) a 10000 rpm durante 10 minutos (después de la centrifugación el sobrenadante debe de observarse transparente, si se observa turbio dar otro lavado con cloroformo).
7. Trasladar ~600 µl de sobrenadante a un tubo nuevo que contenga 600 µl de alcohol isopropilico 96%.
8. Dejar reposar 1 noche a -20 o C.
9. Centrifugar (4 °C) a 13000 rpm durante 8 minutos. Eliminar el sobrenadante.
10. Limpiar el pellet agregando de 300 µl de EtOH 80% frío y centrifugar a 13000 rpm durante 6 minutos.
11. Eliminar el sobrenadante decantándolo y secar el etanol restante.
12. Hidratar el pellet con 50 µl de H₂O ultrapura grado biología molecular.

15.4 Constitución y preparación de reactivos CTAB 2x

A) Buffer de extracción CTAB 2X (1000 ml)

1. 100 ml de Tris-HCl 1M.
2. 280 ml de NaCl 5M.
3. 40 ml de 0.5 M EDTA pH 8.0
4. 20 g de CTAB
5. Aforara a 1000 ml con agua tridestilada esterilizada.

B) Tris-HCl 1M

1. Para 1L, pesar 1 mol de Tris ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) (peso molecular: 121.136).
2. Disolver en 800 ml de agua destilada.
3. Ajustar el pH a 8 con HCl.
4. Aforar.

C) NaCl 5M

1. Para 1L, pesar 5 moles de NaCl (peso molecular: 58.5).
2. Disolver en agua y aforar.

Nota: Añadir lentamente la sal, disminuyendo gradualmente la cantidad. La reacción dura bastantes horas.

D) 0.5 M EDTA pH 8.0

1. Para 1L, pesar 0.5 moles de EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (peso molecular: 372.24).
2. Disolver en 800 ml de agua, ajustar el pH a 8 con NaOH.
3. Aforar.

E) Acetato de amonio 7.5 M

1. Para 1L, pesar 7.5 moles de acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) (peso molecular: 77.08).
2. Depositar el reactivo en un vaso de precipitado, agregar 800 ml de agua, hasta que se disuelva se debe aforar.

15.5 Protocolo de cuantificación de DNA

1. Realizar una solución 1:200 de ADN genómico total o 1:50 para productos de PCR en TE 1x.
2. Preparar una solución 1:200 de PicoGreen en TE 1x.

Nota: esto deberá ser hecho en la mayor oscuridad posible.

3. Hacer una solución 1:1 con las soluciones del punto 1 y 2.

Nota: esto deberá ser hecho en la mayor oscuridad posible.

4. Preparar una solución estándar para posteriormente validar si el procedimiento se ha realizado adecuadamente, en este caso se usó una solución con el reactivo “standar” y TE 1x en una proporción 1:1.

5. Ajustar el software a muestras de ADN, seleccione la opción de PicoGreen como el fluoróforo que se utilizó, cargue las curvas de referencia y coloque el factor de solución total.

- 5.1 Primero coloque 2 μ l de TE 1x en el Fluoroespectrómetro NanoDrop™ 3300, esta muestra será el blanco.

Nota: cada vez que coloque una muestra diferente, deberá limpiar el detector con papel seda.

- 5.2 Cargue el estándar (2 μ l) y verifique que el RFU sea el óptimo para validar sus muestras, en este caso el valor debía situarse entre 500 y 800 RFU.

Nota: Si los valores del estándar son diferentes, deberá repetir todo, de aquí en adelante cuantificar una misma muestra por triplicado.

Al terminar limpie el Fluoroespectrómetro con 2 μ l de agua destilada.