

PATRÓN DE CRUZAMIENTO EN POBLACIONES NATURALES DE *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco EN MÉXICO

MATING PATTERN IN NATURAL POPULATIONS OF *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco IN MÉXICO

Jorge Cruz-Nicolás¹, J. Jesús Vargas-Hernández¹, Porfirio Ramírez-Vallejo² y Javier López-Upton¹

¹Forestal y ²Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (cnjorge@colpos.mx) (vargashj@colpos.mx)

RESUMEN

Las poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco tienen una distribución natural restringida y fragmentada, sobre todo en la región centro; por tanto, hay riesgo de que éstas se pierdan por efectos del cambio climático. Con el propósito de sugerir medidas adecuadas para su conservación, se evaluó el patrón de cruzamiento y su efecto sobre el nivel de endogamia en tres poblaciones naturales de *P. menziesii*, dos del norte y una del centro de México, con base en el porcentaje de polinización cruzada. Con la información de cinco loci polimórficos se estimaron las frecuencias alélicas de polen y óvulos y la proporción de cruzamiento en cada población usando modelos de loci múltiples (\hat{t}_m) y de un solo locus (\hat{t}_s). No se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas de polen y de óvulos, lo que indica que el polen proviene de la misma comunidad que los árboles madre. El valor de \hat{t}_m en las dos poblaciones del norte fue cercano a 90%; en la población del centro fue 49% como resultado de un alto porcentaje de autofecundación. La similitud de las estimaciones del grado de cruzamiento (\hat{t}_m y \hat{t}_s), indica que la autofecundación es la principal forma de endogamia en las poblaciones evaluadas. A pesar del elevado porcentaje de cruzamiento en las poblaciones del norte, el coeficiente de correlación de paternidad en ellas fue mayor a 60%, indicando un número reducido de árboles donadores de polen. Se discuten las implicaciones de estos resultados en la conservación de las poblaciones, sobre todo en la región centro.

Palabras clave: Abeto Douglas, conservación genética, endogamia, fragmentación, polinización cruzada, tamaño de población.

INTRODUCCIÓN

P*seudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco ha sido un componente importante de los ecosistemas forestales en Norteamérica desde el Pleistoceno (Hermann y Lavender, 1990). Diferentes registros palinológicos (Clisby y Sears, 1955; Lozano *et al.*, 1993) indican que en el pasado remoto la distribución

ABSTRACT

The Mexican populations of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco have a restricted and fragmented natural distribution, especially in the central region, therefore there is a risk that these populations will be lost due to the effects of climatic change. With the purpose of suggesting adequate measures for their conservation, an evaluation was made of the mating pattern and its effect on the inbreeding level in three natural populations of *P. menziesii*, two of the north and one of the central region of México, based on the percentage of cross pollination. With the information of five polymorphic loci, the allelic frequencies of pollen and ovules were estimated, along with the proportion of mating in each population using multilocus (\hat{t}_m) and single locus (\hat{t}_s) models. No differences were found in the allelic frequencies of pollen and ovules, which indicates that the pollen comes from the same community as the mother trees. The value of \hat{t}_m in the two northern populations was close to 90%; in the central population it was 49% as a result of a high percentage of selfing. The similarity of the estimations of the degree of cross breeding (\hat{t}_m and \hat{t}_s), indicates that selfing is the principal form of inbreeding in the populations evaluated. Despite the high percentage of cross breeding in the northern populations, the paternity correlation coefficient in them was over 60%, indicating a reduced number of pollinating trees. The implications of these results in the conservation of the populations are discussed, especially in the central region.

Key words: Douglas fir, genetic conservation, inbreeding, fragmentation, cross pollination, population size.

INTRODUCTION

P*seudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco has been an important component of the forest ecosystems in North America since the Pleistocene (Hermann and Lavender, 1990). Different palynological records (Clisby and Sears, 1955; Lozano *et al.*, 1993) indicate that in the remote past, the natural distribution of this and other coniferous species of boreal origin reached as far as the south of México. However, the climatic change associated with the warming after the glacial

Recibido: Abril, 2007. Aprobado: Enero, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 367-378. 2008.

natural de ésta y otras especies de coníferas de origen boreal llegó hasta el sur de México. Sin embargo, el cambio climático asociado con el calentamiento posterior a las glaciaciones forzó a las coníferas a moverse nuevamente al norte o a mayores elevaciones en las montañas. En este proceso de contracción del área de distribución, algunas poblaciones de *Pseudotsuga* quedaron atrapadas, sin posibilidad de emigrar a otros sitios, lo que ocasionó una alteración importante de la distribución natural de la especie en su extremo sur, que ahora está fragmentada y discontinua, en forma de manchones o rodales pequeños aislados entre sí en el centro de México (Farjón, 1990).

El aislamiento genético, junto con otros procesos evolutivos como la selección natural, generalmente conduce a la diferenciación genética de las poblaciones (Savolainen y Kuittinen, 2000). En poblaciones mexicanas de *P. menziesii* (Mirb.) Franco, estudios con base en características morfológicas (Reyes *et al.*, 2006) y fenológicas (Acevedo *et al.*, 2006), indican una notoria diferenciación entre las poblaciones de la región norte y las del centro-sur del país, que representan el límite sur de la distribución natural del género *Pseudotsuga* en el mundo. El alto grado de diferenciación poblacional ($F_{st}=0.298$) ha sido confirmado con base en marcadores isoenzimáticos en un grupo de poblaciones mexicanas de esta especie, así como el reducido nivel de flujo genético entre ellas (Cruz, comunicación personal¹).

Los efectos del aislamiento reproductivo son notorios en poblaciones pequeñas, ya que da lugar a un proceso de deriva genética (Falconer y Mackay, 1996), fenómeno que, además de aumentar la diferenciación entre las poblaciones, ocasiona un aumento en la homocigosis y la endogamia dentro de ellas (Savolainen y Kuittinen, 2000). Debido a que las especies de coníferas tienen un sistema reproductivo principalmente alógamo, el aumento de endogamia tiene consecuencias negativas sobre características de valor adaptativo de los individuos (Sorensen y Campbell, 1997). En *P. menziesii*, las poblaciones de la región central de México tienen una elevada producción de semillas vanas, y las semillas viables son de menor tamaño en comparación con las poblaciones del norte del país (Mápula-Larreta *et al.*, 2007). Además, el germoplasma de la región norte tiene mayor vigor y capacidad de germinación, y las plántulas resultantes tienen mayor supervivencia y vigor que las de la región central (Juárez *et al.*, 2006).

Los efectos característicos de la depresión endogámica observados en las poblaciones mexicanas

periods forced the conifers to move north once more or to higher elevations in the mountains. In this process of contraction of the area of distribution, some populations of *Pseudotsuga* were trapped, with no possibility of emigrating to other sites, which caused an important alteration of the natural distribution of the species in the southern extreme, which is presently fragmented and discontinuous, in the form of small patches or stands that are isolated from one another in central México (Farjón, 1990).

Genetic isolation, along with other evolutionary processes such as natural selection, generally leads to the genetic differentiation of the populations (Savolainen and Kuittinen, 2000). In Mexican populations of *P. menziesii* (Mirb.) Franco, studies based on morphological (Reyes *et al.*, 2006) and phenological characteristics (Acevedo *et al.*, 2006), indicate an outstanding differentiation between the populations of the northern region and those of the south-central region of the country, which represent the southern limit of the natural distribution of the genus *Pseudotsuga* in the world. The high degree of population differentiation ($F_{st}=0.298$) has been confirmed based on isoenzymatic markers in a group of Mexican populations of this species, as well as the reduced level of genetic flow between them (Cruz, personal communication¹).

The effects of reproductive isolation are notorious in small populations, as it leads to a process of genetic drift (Falconer and Mackay, 1996), a phenomenon which in addition to increasing differentiation among populations, causes an increase in homozygosity and inbreeding within them (Savolainen and Kuittinen, 2000). Because the coniferous species have a reproductive system that is mainly allogamous, the increase of inbreeding has negative consequences on traits of adaptive value for individuals (Sorensen and Campbell, 1997). In *P. menziesii*, the populations of the central region of Mexico have a high production of empty seeds, and the viable seeds are smaller in size with respect to the populations of the northern region of the country (Mápula *et al.*, 2007). Furthermore, the germ plasm from the northern region has greater vigor and germination capacity, and the resulting seedlings have greater survival and vigor than those of the central region (Juárez *et al.*, 2006).

The characteristic effects of the inbreeding depression observed in the Mexican populations of *P. menziesii* make it possible to assume that the process of genetic drift is associated with a high rate of selfing, especially in the populations from central México, which

¹Cruz N., J. 2007. Diversidad genética y patrón de cruzamiento en poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Méx. 60 p.

de *P. menziesii* permiten suponer que el proceso de deriva genética está asociado con una elevada tasa de autofecundación, especialmente en las poblaciones del centro de México que son más pequeñas y tienen una menor densidad de arbolado adulto (Juárez *et al.*, 2006; Mápula-Larreta *et al.*, 2007). En forma similar a lo observado en *Picea martinezii* T. F. Pattersson (Ledig *et al.*, 2000) y *Picea mexicana* Martínez (Ledig *et al.*, 2002), especies de coníferas relictuales endémicas de México que tienen poblaciones pequeñas y aisladas donde se han encontrado altos niveles de autofecundación, en *P. chihuahuana* Martínez (Ledig *et al.*, 1997) se encontró que el aumento de endogamia asociado a la autofecundación ocasiona una mayor producción de semillas vanas en las poblaciones.

A pesar de la distribución natural restringida y fragmentada que actualmente presenta *P. menziesii* en México, estas poblaciones tienen una elevada importancia ecológica y económica. Ecológicamente, *P. menziesii* es un elemento florístico clave en las comunidades naturales de los climas templado-fríos donde se encuentra; por el microambiente que genera, existe una gran diversidad de flora y fauna característica asociada con esta especie leñosa (Domínguez, 1994). Económicamente la especie tiene un alto valor maderable en el mundo (Hermann y Lavender, 1990), por lo que los recursos genéticos en estas poblaciones tienen una importancia estratégica en el proceso de domesticación de la especie. Sin embargo, los pronósticos de cambio climático (Iverson y Prasad, 2002) sugieren que los rodales ubicados en el extremo sur de su distribución natural estarán en riesgo de perderse. El riesgo es mayor si en las poblaciones existe una tasa reducida de cruzamiento, debido al efecto de la depresión endogámica con la consecuente reducción de la diversidad genética.

El presente estudio se realizó con el propósito de estimar el nivel de autofecundación en algunas poblaciones mexicanas de *P. menziesii* que permita sugerir medidas adecuadas para conservar estos recursos genéticos con base en las implicaciones derivadas del sistema de cruzamiento. Los objetivos específicos del trabajo fueron: a) determinar el patrón de cruzamiento en poblaciones mexicanas de *P. menziesii* y su efecto sobre el nivel de endogamia en ellas; b) comparar el porcentaje de polinización cruzada en poblaciones de diferente tamaño en el norte y centro de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones muestreadas y análisis isoenzimático

Con el fin de comparar el patrón de cruzamiento se estudiaron tres poblaciones de *P. menziesii*, una del noroeste, una del noreste y una del centro de México (Cuadro 1). La población de Mohinora, en

are smaller and have a lower density of adult trees (Juárez *et al.*, 2006; Mápula *et al.*, 2007). Similar to what was observed in *Picea martinezii* T. F. Pattersson (Ledig *et al.*, 2000) and *Picea Mexicana* Martínez (Ledig *et al.*, 2002), relict coniferous species endemic to México with small and isolated populations in which high levels of selfing have been found, in *P. chihuahuana* Martínez (Ledig *et al.*, 1997) it was found that the increase of inbreeding associated with self fertilization caused a higher proportion of empty seeds in the populations.

Despite the restricted and fragmented natural distribution that is now evident in *P. menziesii* in México, these populations have a high level of ecological and economic importance. Ecologically, *P. menziesii* is a key floristic element in the natural communities of the cold-temperate climates where it is found; because of the microenvironment it generates, there is a great diversity of characteristic flora and fauna associated with this woody species (Domínguez, 1994). Economically, the species has a high lumber value in the world (Hermann and Lavender, 1990), therefore the genetic resources in these populations have a strategic importance in the process of domestication of the species. However, the forecasts of climatic change (Iverson and Prasad, 2002) suggest that the stands located in the extreme south of its natural distribution will be at risk of being lost. The risk is greater if there is a reduced rate of cross pollination, due to the effect of inbreeding depression with the resulting reduction of genetic diversity.

The present study was made with the purpose of estimating the level of selfing in some Mexican populations of *P. menziesii* that will make it possible to suggest adequate measures for conserving these genetic resources based on the implications derived from the mating system. The specific objectives of the work were as follows: a) to determine the mating pattern in Mexican populations of *P. menziesii* and its effect on the inbreeding levels within them; b) to compare the percentage of cross pollination in populations of different size in the northern and central regions of México.

MATERIALS AND METHODS

Sampled populations and isozyme analysis

To compare the mating pattern, three populations of *P. menziesii* were studied, one from the northwest, one from the northeast and one from the central region of México (Table 1). The population of Mohinora, in Chihuahua, is a forest community mixed with *Picea Mexicana* Martínez, *Pinus arizonica* Engelm, *Populus tremuloides* Michx. and *Abies* sp. The stand where *P. menziesii* is found has an

Chihuahua, es una comunidad forestal mezclada con *Picea mexicana*, *Pinus arizonica* Engelm., *Populus tremuloides* Michx. y *Abies* sp. El rodal donde se encuentra *P. menziesii* tiene una extensión aproximada de 69 ha, con una densidad promedio de 85 árboles adultos ha⁻¹ de esta especie y más de 150 árboles adultos ha⁻¹ de las otras especies. La población de Puerto Palomo, en Nuevo León, es un rodal puro y compacto de *P. menziesii*, con una extensión cercana a las 5 ha y una densidad promedio de 25 árboles adultos ha⁻¹; a su alrededor hay otros rodales de la misma especie cercanos entre sí. En la población de La Rosa, en Tlaxcala, *P. menziesii* está asociada con varias especies de *Quercus*, *Abies religiosa* (H. B. K.) Schl. et Cham., *Pinus teocote* Schl. et Cham. y *P. rudis* Endl. Este rodal tiene una superficie aproximada de 5 ha, a lo largo de una cañada de 2 km, con una densidad promedio de 35 árboles adultos ha⁻¹ de la especie y más de 500 árboles ha⁻¹ de las otras especies, con una dominancia notoria de encinos.

De cada población se usó una muestra variable de árboles madre dependiendo de la disponibilidad de semilla (Cuadro 1) y de cada árbol madre se usaron siete semillas. Se hizo la imbibición de la semilla en H₂O₂ al 1% por 24 h y se estratificó a 4 °C por 50 d (Jarvis *et al.*, 1997; Juárez *et al.*, 2006). Las semillas germinaron en cajas Petri con papel filtro húmedo, a 24 °C en una cámara de germinación, hasta cuando la radícula alcanzó una longitud aproximada de 5 mm. Al momento de la extracción se separó el tejido del megagametofito (haploide) y del embrión (diploide) de cada semilla. Ambos tejidos se analizaron simultáneamente porque el megagametofito representa la contribución materna y, por tanto, tiene la misma constitución genética del óvulo que da origen al embrión de la semilla; esto permite deducir la contribución paterna (polen) por las diferencias con el genotipo del embrión. Este procedimiento permite conocer sin ambigüedad la contribución de los dos padres en el embrión (Mitton, 1983; Cheliak *et al.*, 1985). Las muestras de cada tejido (megagametofito y embrión) fueron maceradas con un taladro eléctrico con punta de plástico, usando 100 µL de una solución de extracción (USDA Forest Service, 2003).

Los extractos obtenidos se almacenaron en un congelador a -81 °C hasta realizar el análisis. Los extractos fueron sometidos a electroforesis horizontal en geles de almidón, en el Laboratorio de Marcadores Genéticos del Colegio de Postgraduados, según la metodología descrita por el Laboratorio Nacional de Electroforesis y Genética Forestal del Servicio Forestal de los Estados Unidos (USDA Forest Service, 2003). Los sistemas enzimáticos usados fueron glutamato deshidrogenasa (GDH), fosfoglucoasa isomerasa (PGI),

extension of approximately 69 ha, with an average density of 85 adult trees ha⁻¹ of this species and more than 150 adult trees ha⁻¹ of the other species. The population of Puerto Palomo, in Nuevo León, is a pure and compact stand of *P. menziesii*, with an extension of nearly 5 ha and an average density of 25 adult trees ha⁻¹; it is surrounded by other stands of the same species that are close to one another. In the population of La Rosa, in Tlaxcala, *P. menziesii* is associated with various species of *Quercus*, *Abies religiosa* (H. B. K.) Schl. et Cham., *Pinus teocote* Schl. et Cham. and *P. rudis* Endl. This stand has an approximate size of 5 ha, along a ravine of 2 km, with an average density of 35 adult trees ha⁻¹ of the species and over 500 trees ha⁻¹ of the other species, with a notable dominance of evergreen oaks.

From each population, a variable sample of mother trees was used depending on the availability of seed (Table 1), and from each mother tree seven seeds were used. The seeds were imbibed in H₂O₂ at 1% for 24 h, and stratified at 4 °C for 50 d (Jarvis *et al.*, 1997; Juárez *et al.*, 2006). The seeds were germinated in Petri dishes with wet filter paper, at 24 °C in a germination chamber, until the radicle reached a length of approximately 5 mm. At the moment of extraction, the tissue was separated from the megagametophyte (haploid) and from the embryo (diploid) of each seed. Both tissues were analyzed simultaneously because the megagametophyte represents the maternal contribution, and therefore, has the same genetic constitution of the ovule that gives origin to the seed embryo; this makes it possible to deduce the paternal contribution (pollen) from the differences with the genotype of the embryo. This procedure makes it possible to know with certainty the contribution of both parents in the embryo (Mitton, 1983; Cheliak *et al.*, 1985). The samples of each tissue (megagametophyte and embryo) were macerated with an electric drill with a plastic tip, using 100 µL of an extraction solution (USDA Forest Service, 2003).

The extracts obtained were stored in a freezer at -81 °C until the analysis was made. The extracts were subjected to horizontal electrophoresis in starch gels, in the Genetic Marker Laboratories of the Colegio de Postgraduados, according to the methodology described by the National Laboratory of Electrophoresis and Forest Genetics of the United States Forest Service (USDA Forest Service, 2003). The enzymatic systems used were glutamate dehydrogenase (GDH), phosphoglucose isomerase (PGI), phosphoglucomutase (PGM) and glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), which in a previous study (Cruz, personal communication¹) showed the highest levels of polymorphism within the referred populations. In some cases it was

Cuadro 1. Ubicación geográfica, número de árboles muestreados y número promedio de progenies de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, de tres poblaciones estudiadas.

Table 1. Geographic location, number of trees sampled and average number of progenies of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, from the three populations studied.

Región	Localidad	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (m)	N	p
Noroeste	Mohinora, Chihuahua	25° 57' 42"	107° 02' 21"	3185	15	105
Noreste	Puerto Palomo, Nuevo León	24° 56' 40"	100° 16' 12"	2647	24	168
Centro	La Rosa, Tlaxcala	19° 31' 57"	97° 54' 00"	2785	26	182

n = número de árboles madre muestreados; p = tamaño de muestra estudiada en cada población.

fosfoglucomutasa (PGM) y glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), que en un estudio previo (Cruz, comunicación personal¹) mostraron los mayores niveles de polimorfismo dentro de las poblaciones referidas. En algunos casos fue necesario ajustar los métodos de análisis para obtener un revelado adecuado de las variantes electroforéticas. Para las enzimas GOT y PGI se usó la metodología descrita por Stuber *et al.* (1988), ajustada y adecuada en el Laboratorio de Marcadores Genéticos.

La identificación de los alelos en cada *locus* se efectuó con base en la migración relativa de las enzimas a partir del punto de origen dentro de los geles. Para facilitar la interpretación de los *loci* y sus alelos correspondientes, en cada gel se incluyeron muestras del megagametofito de *P. resinosa* Ait., una especie completamente fija para estos *loci*. Cuando se identificaron varias zonas de actividad para una misma enzima, los *loci* se identificaron con numerales sucesivos a partir del cátodo. Para inferir la contribución paterna en cada embrión se analizó en forma paralela el megagametofito y el embrión de cada semilla. Al evaluar cada gel se determinó por diferencia la contribución paterna comparando las bandas electroforéticas del megagametofito (genotipo materno) con las del embrión.

Estimación de los parámetros de cruzamiento y análisis estadístico

A partir de la contribución paterna y materna en los embriones se calcularon las frecuencias alélicas en el polen y los óvulos muestreados, para determinar si ambas representan el mismo tamaño de comunidad en la población (vecindario). La proporción de entrecruzamiento (t) se calculó con base en el modelo de genotipos de un *locus* génico (\hat{i}_s) y en el de genotipos de varios *loci* simultáneos (\hat{i}_m) de la progenie de cada árbol muestreado. Las estimaciones de \hat{i}_s y \hat{i}_m se hicieron separadamente para cada población usando el método de máxima verosimilitud del programa MLTR (Ritland, 1994). Con el mismo programa se calculó la correlación de paternidad (r_p) entre la progenie resultante del cruzamiento, que permite inferir sobre las estimaciones de \hat{i}_s y \hat{i}_m con base en el modelo de apareamiento mixto con autofecundación y polinización cruzada (Shaw y Allard, 1982). Este modelo supone que cada progenie viable (embrión) es el resultado de polinización cruzada aleatoria, con probabilidad “ t ”, o de autofecundación, con probabilidad “ s ”, de tal manera que $s+t=1$.

En el caso de la estimación de \hat{i}_m se supone que existe independencia entre los *loci* utilizados para estimar la proporción de entrecruzamiento (Furnier y Adams, 1986). Si esta condición no se cumple, el valor de \hat{i}_m estará sesgado; este sesgo es relativamente pequeño a menos que los *loci* involucrados estén fuertemente ligados y exista un desequilibrio de ligamento elevado en la población (Shaw *et al.*, 1981). A pesar del posible sesgo, desde el punto de vista estadístico la estimación multilocus (\hat{i}_m) es más eficiente que la estimación basada en un sólo *locus* (\hat{i}_s), ya que la primera toma en cuenta varios *loci* simultáneamente. Además, mientras mayor sea el número de *loci* incluidos para estimar \hat{i}_m es posible detectar más eventos de polinización cruzada, por lo cual este estimador es menos

necesario to adjust the methods of analysis to obtain an adequate development of the electrophoretic variants. For the enzymes GOT and PGI, the methodology described by Stuber *et al.* (1988) was used, adjusted and fit in the Laboratory of Genetic Markers.

The identification of the alleles in each *locus* was made based on the relative migration of the enzymes from the point of origin within the gels. To facilitate the interpretation of the *loci* and their corresponding alleles, in each gel samples were included of the megagametophyte of *P. resinosa* Ait., a species completely fixed for these *loci*. When various zones of activity for the same enzyme were located, the *loci* were identified with successive numbers from the cathode. To infer the paternal contribution in each embryo, a parallel analysis was made of the megagametophyte and the embryo of each seed. When each gel was evaluated, the paternal contribution was determined differentially by comparing the electrophoretic bands of the megagametophyte (maternal genotype) with those of the embryo.

Estimation of mating pattern parameters and statistical analysis

From the paternal and maternal contribution in the embryos, the allelic frequencies in the pollen and the sampled ovules were calculated, to determine whether the two represent the same size of community in the population (neighborhood). The proportion of inbreeding (t) was calculated based on the single *locus* (\hat{i}_s) and multilocus (\hat{i}_m) genotypic models for the progeny of each sampled tree. The estimations of \hat{i}_s and \hat{i}_m were made separately for each population using the method of maximum likelihood of the program MLTR (Ritland, 1994). With the same program, the correlation of paternity (r_p) was calculated among the progeny resulting from cross breeding, which makes it possible to infer about the estimations of \hat{i}_s and \hat{i}_m based on the mixed mating model with selfing and cross pollination (Shaw and Allard, 1982). This model assumes that each viable progeny (embryo) is the result of random cross pollination, with likelihood “ t ”, or from selfing, with likelihood “ s ”, so that $s+t=1$.

In the case of the estimation of \hat{i}_m , it is assumed that there is independence among the *loci* used for estimating the proportion of inbreeding (Furnier and Adams, 1986). If this condition is not satisfied, the value of \hat{i}_m will be biased; this bias is relatively small unless the *loci* involved are strongly linked and there is linkage disequilibrium in the population (Shaw *et al.*, 1981). Despite the possible bias, from the statistical viewpoint the multilocus estimation (\hat{i}_m) is more efficient than the estimation based on a single *locus* (\hat{i}_s), given that the former considers various *loci* simultaneously. Furthermore, the higher the number of *loci* included for estimating \hat{i}_m , it is possible to detect more events of cross pollination, thus this estimator is less sensitive to the violations of the assumptions of the mixed mating model (Shaw *et al.*, 1981). The value of (\hat{i}_s) may vary to a great extent from one *locus* to another, generating greater heterogeneity (standard error) when it is estimated in different populations (Shaw and Allard, 1979).

It is important to estimate both values of inbreeding (\hat{i}_m and \hat{i}_s), because when \hat{i}_s is less than \hat{i}_m , it is inferred that in addition to the

sensible a las violaciones de los supuestos del modelo de apareamiento mixto (Shaw *et al.*, 1981). El valor de (\hat{t}_s) puede variar en gran medida de un *locus* a otro, generando mayor heterogeneidad (error estándar) al estimarlo en diferentes poblaciones (Shaw y Allard, 1979).

Es importante estimar ambos valores de entrecruzamiento (\hat{t}_m y \hat{t}_s), ya que cuando \hat{t}_s es menor que \hat{t}_m se infiere que además de la autofecundación en la población se encuentran otras formas de endogamia, como el apareamiento entre parientes (Buczyk *et al.*, 1997). En este caso, los valores de \hat{t}_m y \hat{t}_s se estimaron para cada población usando el algoritmo EM para calcular las frecuencias alélicas de óvulos y polen (Ritland, 1994). Se usaron 200 muestras con reemplazo (bootstraps) para estimar el error estándar en cada uno de ellos. Para determinar si los valores de cruzamiento difieren entre las poblaciones se calcularon sus respectivos intervalos de confianza, con $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ninguna población hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en las frecuencias alélicas de los dos gametos (Figura 1). Esto sugiere que el acervo genético contenido en el polen representa las frecuencias alélicas locales de los árboles maternos y, por tanto, ambos (polen y óvulos) representan el mismo tamaño de vecindario dentro de cada población. Esto no es común en especies de polinización anemófila, donde generalmente el polen puede viajar grandes distancias y representar a una comunidad (vecindario) de mayor tamaño que la muestra de individuos maternos (Ledig, 1998). Por ejemplo, en *Pinus greggii* Engelm. se ha observado que el acervo de polen generalmente representa una comunidad (vecindario) de mayor tamaño que el acervo de óvulos dentro de la población (Parraguirre *et al.*, 2004). Sin embargo, dado que los rodales de *P. menziesii* estudiados son mucho más pequeños, es posible que ambas muestras (polen y óvulos) representen a toda la población. Aún en la población de Mohinora, más extensa que las otras dos, no se encontraron diferencias entre las frecuencias génicas de ambos gametos.

Sistema de cruzamiento

En ninguna población hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores promedio de polinización cruzada obtenidos con la información de *locus* múltiples (\hat{t}_m) o de *locus* simple (\hat{t}_s) (Cuadro 2). En la mayoría de los estudios de este tipo es común que el valor de \hat{t}_m sea ligeramente mayor al de \hat{t}_s ya que el primer estimador detecta más eficientemente la presencia de polinización cruzada (Shaw y Allard, 1982); sin embargo, en este caso, en ninguna de las poblaciones las diferencias numéricas entre los dos estimadores fueron significativas, por lo que ambos procedimientos son consistentes.

self fertilization in the population, other forms of inbreeding are found, such as mating among relatives (Buczyk *et al.*, 1997). In this case, the values of \hat{t}_m and \hat{t}_s were estimated for each population using the algorithm EM to calculate the allelic frequencies of ovules and pollen (Ritland, 1994). Two hundred samples with replacement (bootstraps) were used to estimate the standard error in each one of them. To determine whether the mating values differ among the populations, their respective confidence levels were calculated, with $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

There were no significant differences in any of the populations ($p > 0.05$) in the allelic frequencies of the two gametes (Figure 1). This suggests that the genetic pool contained in the pollen represents the local allelic frequencies of the maternal trees, and therefore, both (pollen and ovules) represent the same size of neighborhood within each population. This is not common in species of anemophilous pollination, where the pollen generally can travel great distances and represent a larger community than the sample of maternal individuals (Ledig, 1998). For example, in *Pinus greggii* Engelm. it has been observed that the pollen pool generally represents a larger community than the ovules pool within the population (Parraguirre *et al.*, 2004). However, given that the stands of *P. menziesii* studied are much smaller, it is possible that both samples (pollen and ovules) represent the entire population. Even in the population of Mohinora, larger than the other two, no differences were found between the genic frequencies of the two gametes.

Mating system

There were no significant differences ($p > 0.05$) in any of the populations between the average values of cross pollination obtained with the information of multilocus (\hat{t}_m) or single locus (\hat{t}_s) genotypes (Table 2). In most of the studies of this type it is common that the value of \hat{t}_m is slightly higher than that of \hat{t}_s , given that the first estimator detects the presence of cross pollination more efficiently (Shaw and Allard, 1982); however, in this case, the numerical differences between the two estimators were not significant in any of the cases, therefore both procedures are consistent.

The two populations of northern México presented a percentage of cross pollination that was close to or slightly over 90% (Table 2) and without significant differences ($p > 0.05$) between both types of estimation. These values are within the interval estimated for other natural populations of this species of North America (Shaw and Allard, 1982; Neale and Adams, 1985; Yeh and Morgan, 1987), or even in plantations and seed

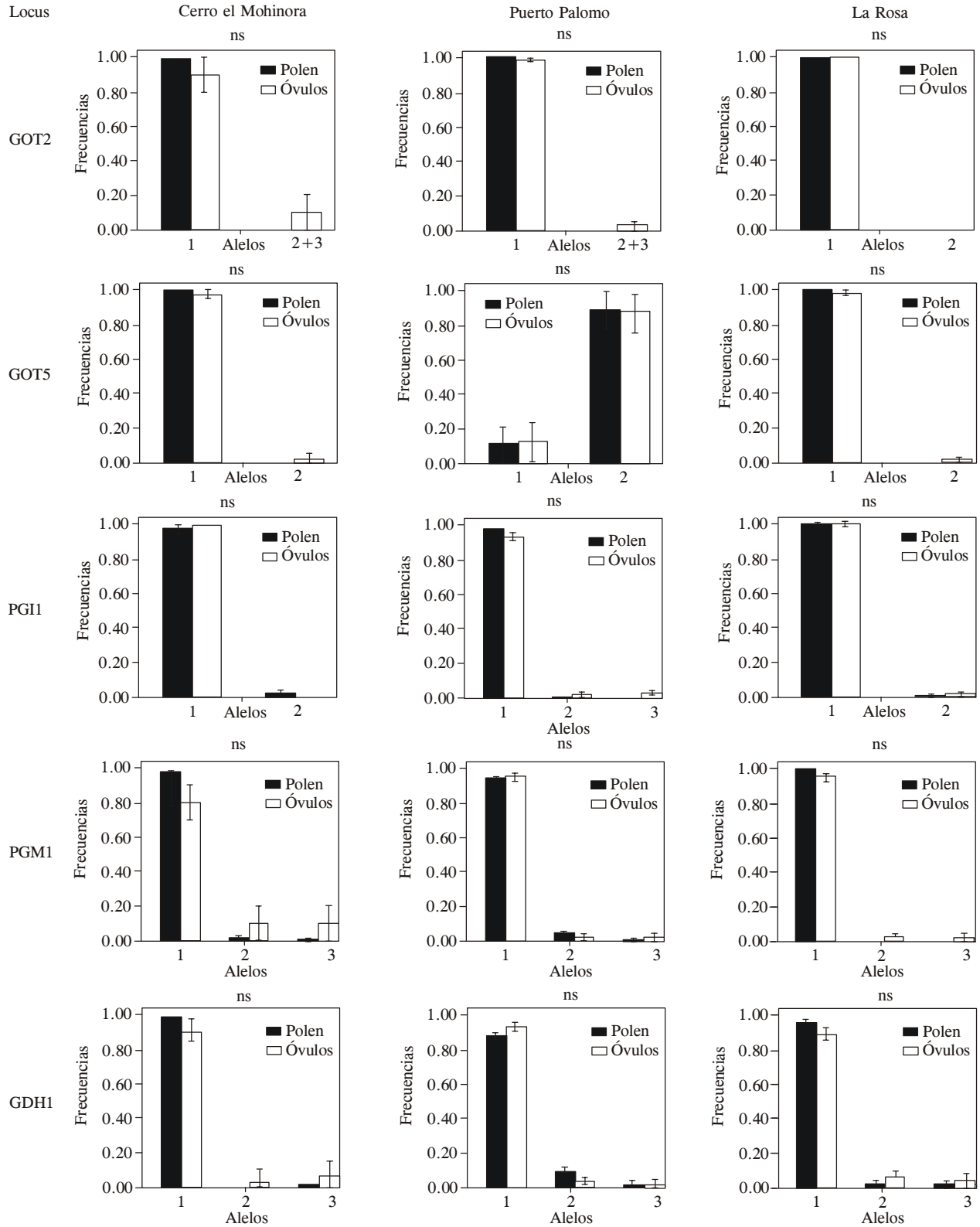


Figura 1. Frecuencias alélicas de polen y óvulos con sus respectivos intervalos de confianza ($p \leq 0.05$) en tres poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. ns=no significativo ($p > 0.05$) entre óvulos y polen.

Figure 1. Allelic frequencies of pollen and ovules with their respective confidence intervals ($p \leq 0.05$) in three natural populations of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. ns=not significant ($p > 0.05$) among ovules and pollen.

Cuadro 2. Tasa de polinización cruzada estimada con base en información de loci múltiples (\hat{t}_m) y locus individuales (\hat{t}_s), con sus intervalos de confianza ($p \leq 0.05$) y valores de correlación de paternidad (r_p), estimada con base en \hat{t}_m (con error estándar entre paréntesis) en tres poblaciones naturales de *P. menziesii* (Mirb.) Franco de México.

Table 2. Rate of cross pollination estimated from the information of multilocus (\hat{t}_m) and single locus (\hat{t}_s) genotypes, with their confidence intervals ($p \leq 0.05$) and values of paternity correlation (r_p), estimated from \hat{t}_m (with standard error in parenthesis) in three natural populations of *P. menziesii* (Mirb.) Franco of México.

Población	\hat{t}_m^\dagger	\hat{t}_s	$(\hat{t}_m - \hat{t}_s)$	r_p
Mohinora, Chihuahua	0.863 ± 0.163	0.845 ± 0.149	0.018 ns	0.607 (0.339)
Puerto Palomo, Nuevo León	0.929 ± 0.304	0.870 ± 0.269	0.059 ns	0.970 (0.359)
La Rosa, Tlaxcala	0.498 ± 0.459	0.527 ± 0.584	-0.029 ns	0.115 (0.503)

[†]Obtenido con base en cinco *loci* individuales; ns=no significativo ($p > 0.05$).

Las dos poblaciones del norte de México presentaron un porcentaje de polinización cruzada cercano o ligeramente superior a 90% (Cuadro 2) y sin diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos tipos de estimación. Estos valores están dentro del intervalo estimado para otras poblaciones naturales de esta especie en Norteamérica (Shaw y Allard, 1982; Neale y Adams, 1985; Yeh y Morgan, 1987), o incluso en plantaciones y huertos semilleros (Ritland y El-Kassaby, 1985). Este grado de polinización cruzada es común en la mayoría de las especies de coníferas en poblaciones relativamente grandes y refleja la capacidad de dispersión del polen a grandes distancias. Ledig (1998) señala que en especies con polinización anemófila, como en el género *Pinus* y otras coníferas, el porcentaje de polinización cruzada es cercano a 1.0 cuando no existen otros factores que interfieran en el fenómeno.

En contraste, el valor estimado de polinización cruzada en la población de La Rosa, Tlaxcala, casi 50%, es menor con respecto al de ambas poblaciones del norte del país y es muy inferior al encontrado para esta especie en su hábitat natural. En poblaciones naturales de otras especies de coníferas mexicanas que comparten similitudes en tamaño y aislamiento geográfico, también se han encontrado valores reducidos de polinización cruzada; por ejemplo, 0.399 y 0.589 para dos poblaciones de *Picea martinezii* (Ledig *et al.*, 2000). En *P. mexicana*, el valor promedio en tres poblaciones varió de 0.590 a 0.807 (Ledig *et al.*, 2002) y en algunas poblaciones de *P. chihuahuana* el valor fue incluso cercano a cero (Ledig *et al.*, 1997).

Aunque en la población de *P. menziesii* de La Rosa no se encontró un valor tan bajo de polinización cruzada como en *P. chihuahuana*, sí refleja la presencia de un nivel importante de endogamia que podría estar asociado a la frecuencia de autofecundación en sus eventos reproductivos. En especies con un sistema reproductivo que favorece la polinización cruzada, la autofecundación generalmente ocasiona depresión endogámica en la progenie, que se refleja en la reducción en la producción de semilla viable, así como en el

orchards (Ritland and El-Kassaby, 1985). This degree of cross pollination is common in most of the conifer species in relatively large populations and reflects the dispersal capacity of the pollen to great distances. Ledig (1998) points out that in species with anemophilous pollination, such as in the genus *Pinus* and other conifers, the percentage of cross pollination is close to 1.0 when there are no other factors that interfere in the phenomenon.

In contrast, the estimated value of cross pollination in the population of La Rosa, Tlaxcala, nearly 50%, is lower with respect to that of both populations of the north and is much lower than that found for this species in its natural habitat. In natural populations of other species of Mexican conifers that share similarities in size and geographic isolation, reduced values of cross pollination have also been found; for example, 0.399 and 0.589 for two populations of *Picea martinezii* (Ledig *et al.*, 2000). In *P. mexicana*, the average value in three populations varied from 0.590 to 0.807 (Ledig *et al.*, 2002), and in some populations of *P. chihuahuana* the value was even close to zero (Ledig *et al.*, 1997).

Although in the *P. menziesii* population of La Rosa a value of cross pollination as low as in *P. chihuahuana* was not found, it does reflect the presence of an important level of inbreeding which could be associated with the frequency of selfing in its reproductive events. In species with a reproductive system that favors cross pollination, self fertilization generally causes inbreeding depression in the progeny, which is reflected in the reduction of the production of viable seed, as well as in the vigor and growth rate of the seedlings (Frankham, 1998; Mápula-Larreta *et al.*, 2007). A similar phenomenon is possible occurring in the natural populations of *P. menziesii* from central México according to Juárez *et al.* (2006) and Mápula-Larreta *et al.* (2007), who documented a high proportion of empty seeds and a lower germination capacity and vigor of the full seeds of this region with respect to seeds of the populations from northern México.

vigor y tasa de crecimiento de las plántulas (Frankham, 1998; Mápula-Larreta *et al.*, 2007). Un fenómeno similar es posible que ocurra en las poblaciones naturales de *P. menziesii* del centro de México, según Juárez *et al.* (2006) y Mápula-Larreta *et al.* (2007), quienes documentaron una alta proporción de semillas vanas y una menor capacidad y vigor germinativo de las semillas llenas de esta región en relación con semillas de las poblaciones del norte de México.

Con base en el porcentaje de autofecundación estimado en la población La Rosa se esperaría encontrar un alto grado de endogamia y una deficiencia notoria de heterocigotos en su progenie; sin embargo, los datos de diversidad genética estimados con base en una muestra de 18 loci izoenzimáticos no corroboran esta situación (Cruz, comunicación personal¹). Una posible explicación a este fenómeno es que en esta población hay una fuerte presión de selección durante las etapas tempranas de desarrollo del cigoto en contra de los embriones homocigóticos producto de la autofecundación, causando una gran cantidad de semillas vanas (Sorensen, 1982). En *Picea glauca* (Moench) Voss., Sproule y Dancik (1996) señalan un fenómeno similar donde, a pesar de existir un elevado porcentaje de autofecundación y endogamia, no se encontró una deficiencia de individuos heterocigotos en la progenie, lo que se atribuye a una fuerte presión de selección sobre los embriones derivados por autofecundación, asociada a la presencia de genes recesivos letales.

Correlación de paternidad

A pesar de que en las poblaciones del norte de México se encontró un bajo porcentaje de autofecundación, la correlación de paternidad entre las progenies de estas poblaciones fue relativamente elevada ($r_p > 0.60$), lo que indica una alta probabilidad de que dos individuos del mismo árbol madre compartan un mismo padre (Cuadro 2). Una alta correlación de paternidad y una elevada tasa de polinización cruzada implica que un número reducido de padres participaron en la polinización de cada uno de los árboles madre muestreados, ya sea por la interferencia en la dispersión del polen causada por la presencia de otras especies, por el reducido número de individuos reproductivos existentes, o por problemas de sincronización fenológica en la dispersión del polen. Dado que Puerto Palomo, N. L., es un rodal puro de *P. menziesii* pero con una baja densidad de arbolado adulto, es posible que los problemas de sincronización fenológica, junto con el reducido número de individuos, hayan contribuido a una elevada correlación de paternidad. La participación de un número reducido de individuos en los eventos reproductivos puede conducir

Based on the percentage of self fertilization estimated in the La Rosa population, the expectation would be to find a high degree of inbreeding and a notable deficiency of heterozygotes in the progeny; however, the data on genetic diversity estimated from a sample of 18 isozyme loci did not confirm this situation (Cruz, personal communication¹). A possible explanation to this phenomenon is that in this population there is a strong selection pressure during the early stages of development of the zygote against the homozygotic embryos that are product of selfing, causing a large amount of empty seeds (Sorensen, 1982). In *Picea glauca* (Moench) Voss., Sproule and Dancik (1996) mention a similar phenomenon, in which despite the existence of a high percentage of selfing and inbreeding, a deficiency of heterozygote individuals in the progeny was not found, which is attributed to a strong selection pressure on the embryos derived from self fertilization, associated to the presence of lethal recessive genes.

Correlation of paternity

Despite the fact that a low percentage of self fertilization was found in the populations of northern México, the correlation of paternity among the progenies of these populations was relatively high ($r_p > 0.60$) which indicates a high probability of two individuals from the same mother tree sharing the same father (Table 2). A high correlation of paternity and a high rate of cross pollination implies that a reduced number of parents participated in the pollination of each one of the mother trees sampled, whether from the interference in the dispersal of the pollen caused by the presence of other species, the reduced number of existing reproductive individuals, or problems of phenological synchronization in the dispersal of the pollen. Given that Puerto Palomo, N.L. is a pure stand of *P. menziesii*, but with a low density of adult trees, it is possible that the problems of phenological synchronization, along with the reduced number of individuals, contributed to a high correlation of paternity. The participation of a reduced number of individuals in the reproductive events may lead to a reduction of genetic diversity in the populations, which puts at risk the persistence of the population if there is no genetic exchange among the individuals that comprise it.

The cross breeding rate and the paternity correlation coefficient indicate that the three sampled populations are exposed to a reduction of genetic diversity. However, the efforts to conserve this species should be focused on the populations of the central region, such as that of La Rosa, because of their low percentage of cross pollination. In these populations it is important to restore genetic exchange and to promote the participation of a larger number of individuals in the

a una disminución de la diversidad genética en las poblaciones, lo cual pone en riesgo la persistencia de la población si no hay intercambio genético entre los individuos que la constituyen.

Las tasas de cruzamiento y de correlación de paternidad indican que las tres poblaciones muestreadas están expuestas a la reducción de la diversidad genética. Sin embargo, los esfuerzos de conservación de esta especie se deben enfocar a las poblaciones de la Región Central, como la de La Rosa, por su bajo porcentaje de polinización cruzada. En estas poblaciones es importante restaurar el intercambio genético y promover la participación de un mayor número de individuos en los eventos reproductivos. Debido a los efectos de depresión endogámica observados en estas poblaciones, se sugiere propiciar el intercambio genético (movimiento de polen) entre las poblaciones del centro. Así, la introducción de plantas producidas en vivero de otras poblaciones del centro puede ser útil para aumentar la diversidad genética y promover la polinización cruzada entre los individuos, ya que la introducción de germoplasma del norte en las poblaciones naturales del centro del país, como un mecanismo para aumentar la diversidad genética y reducir los efectos de la endogamia, no es recomendable debido a la notoria diferencia en las características adaptativas de las poblaciones del centro y del norte de México (Acevedo *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

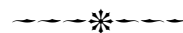
Las frecuencias alélicas del polen y de los óvulos fueron similares en las tres poblaciones estudiadas, lo que implica que las frecuencias alélicas del polen representan a las frecuencias alélicas de los árboles madre. Por tanto, no hay evidencias de participación de polen extraño a la comunidad muestreada en cada población. El porcentaje de polinización cruzada fue cercano al máximo posible en las poblaciones del norte, acorde a lo esperado para especies de coníferas con polinización anemófila. Sin embargo, en la población del centro de México (La Rosa) se encontró una reducción importante en la polinización cruzada, que puede asociarse con el aislamiento geográfico y el tamaño reducido de la población. No se encontraron diferencias significativas entre las estimaciones con locus múltiples (\hat{t}_m) y locus simples (\hat{t}_s) de la polinización cruzada, resultando que la principal forma de endogamia observada en la población de La Rosa es la autofecundación. La alta correlación de paternidad en las poblaciones del norte sugiere que aunque ocurre polinización cruzada, hay una elevada proporción de hermanos completos que resultan de una baja participación de individuos reproductivos en la población.

reproductive events. Because of the effects of inbreeding depression observed in these populations, the promotion of genetic exchange (movement of pollen) among the populations of the central region is suggested. The introduction of plants produced in the nursery from other populations of the central region may be useful for increasing genetic diversity and promoting cross pollination among individuals, given that the introduction germplasm from the north in the natural populations of the central region, as a mechanism for increasing genetic diversity and reducing the effects of inbreeding, is not recommendable due to the notorious difference in the adaptive traits of the central and northern populations of México (Acevedo *et al.*, 2006).

CONCLUSIONS

The allelic frequencies of the pollen and ovules were similar in the three populations studied, which implies that the allelic frequencies of the pollen represent the allelic frequencies of the mother trees. Therefore, there is no evidence of participation of pollen foreign to the sampled community in each one of the populations. The percentage of cross pollination was close to the maximum possible in the northern populations, coinciding to what is expected for conifer species with anemophilous pollination. However, in the population of the central region of México (La Rosa), an important reduction of cross pollination was found, which can be associated to the geographic isolation and the reduced size of the population. No significant differences were found between the estimations of cross pollination using multilocus (\hat{t}_m) and single locus (\hat{t}_s) genotypes, resulting in the fact that the principal form of inbreeding observed in the La Rosa population is selfing. The high paternity correlation in the northern populations suggests that although cross pollination occurs, there is a high proportion of full sibs resulting from a low participation of reproductive individuals in the population. To reduce the negative effects of accumulated inbreeding on the *P. menziesii* populations of central México, it is suggested to mix pollen from these populations and use it to pollinate trees in them, to generate additional genetic variation.

End of the English version—



Para reducir los efectos negativos de la endogamia acumulada en las poblaciones de *P. menziesii* del centro de México, se sugiere mezclar polen de estas poblaciones y

polinizar árboles en la región, para generar variación genética adicional.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó con apoyo de los proyectos “Diversidad Genética y Conservación de *Pseudotsuga* en México”, financiado por el CONACYT (Proyecto 33617-B), y “Conservación y Mejoramiento Genético de *Pseudotsuga spp.*, conifera estratégica del estado de Tlaxcala y la región central del país” financiado por el Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT (Proyecto 2002-C01-6416). Se agradece de manera especial al Laboratorio de Marcadores Genéticos del CP por las facilidades brindadas y en particular al C. Juan Carlos Zaragoza Ramírez por su valiosa colaboración en los análisis de laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Acevedo R., R., J. J. Vargas H., J. López U., y J. Velázquez M. 2006. Efecto de la procedencia geográfica y de la fertilización en la fenología del brote terminal en plántulas de *Pseudotsuga* sp. *Agrociencia* 40: 125-137.
- Burczyk, J., W. T. Adams, and J. Y. Shimizu. 1997. Mating system and genetic diversity in natural populations of Knobcone pine (*Pinus attenuata*). *For. Gen.* 4(4): 223-226.
- Cheliak, W. M., J. A. Pitel, and G. Murray. 1985. Population structure and the mating system of white spruce. *Can. J. For. Res.* 15: 301-308.
- Clisby K., H., and P. B. Sears. 1955. Palynology in southern North America. Part III: Microfossil profiles under Mexico City correlated with the sedimentary profiles. *Bull. Geol. Soc. Am.* 66:511-520.
- Domínguez A., F. A. 1994. Análisis histórico-ecológico de los bosques de *Pseudotsuga* en México. INIFAP-CIR Golfo Centro. Folleto Técnico No. 23. México, 43 p.
- Falconer, D. S., y T. F. C. Mackay. 1996. Introducción a la Genética Cuantitativa. Caballero R., A., C. López-Fanjul, M. A. Toro I. y A. Blasco M. (trads). ACRIBIA S. A., Zaragoza, España. 469 p.
- Farjon, A. 1990. Pinaceae: Drawings and Descriptions of the Genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books. Königstein, Federal Republic of Germany. pp: 171-191.
- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction island populations. *Conservation Biol.* 12: 665-675.
- Furnier, G. R., and W. T. Adams. 1986. Mating system in natural populations of Jeffrey pine. *Am. J. Bot.* 73(7): 1002-1008.
- Hermann, R. K., and D. P. Lavender. 1990. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. In: Burns, R. and B. H. Honkala (eds). *Silvics of North America*, Vol. 1. Conifers. USDA Forest Service. Washington, D. C. pp: 540-557.
- Iverson, L. R., and A. M. Prasad. 2002. Potential redistribution of tree species habitat under five climate change scenarios in the eastern U. S. *For. Ecol. Manag.* 155:205-222.
- Jarvis, S. B., M.A. Taylor, J. Bianco, F. Corbineau, and H.V. Davies. 1997. Dormancy-breakage in seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) support for the hypothesis that LEA gene expression is essential for this process. *J. Plant Physiol.* 151: 457-464.
- Juárez A., A., J. López U., J.J. Vargas H., y C. Sáenz R. 2006. Variación geográfica en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agrociencia* 40: 783-792.
- Ledig, F.T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson, D.M. (ed). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge. pp: 251-280.
- Ledig, F. T., B. Bermejo V., P. D. Hodgkiss, D. R. Johnson, C. Flores L., and V. Jacob C. 2000. The mating system and genetic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of México's Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Can. J. For. Res.* 30:1-9.
- Ledig, F. T., P. D. Hodgkiss, and V. Jacob C. 2002. Genetic diversity, mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martínez. *Conservation Genetics* 3:113-122.
- Ledig, F. T., V. Jacob C., P. D. Hodgkiss, and T. Eguiluz P. 1997. Evolution and divergence among populations of a rare Mexican endemic, Chihuahua spruce, following Holocene warming. *Evolution* 51: 1815- 1827.
- Lozano G., M., S. B. Ortega G., M. Caballero M., and J. Urrutia F. 1993. Late Pleistocene and Holocene paleoenvironments of Chalco Lake, central Mexico. *Quat. Res.* 40:332-342.
- Mápula-Larreta, M., J. López-Upton, J. J. Vargas-Hernández, and A. Hernández-Livera. 2007. Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 16: 727-742.
- Mitton, J. B. 1983. Conifers. In: Tanksley, S. D., and T. J. Orton (eds). *Isozymes in Plant Genetic and Plant Breeding*, part B. Elsevier, Amsterdam. pp: 443-472.
- Neale, D. B., and W. T. Adams. 1985. The mating system in natural shelterwood stands of Douglas-fir. *Theor. Appl. Genet.* 71:201-207.
- Parraguirre, L., C., J. J. Vargas H., P. Ramírez V., y C. Ramírez H. 2004. Sistema de cruzamiento en cuatro poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Agrociencia* 38: 107-119.
- Reyes H., V. J., J. J. Vargas H., J. López U., y H. Vaquera H. 2006. Similitud fenotípica de poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* Carr. *Agrociencia* 40: 545-556.
- Ritland, K. 1994. Multilocus mating system program MLTR, version 0.9 K. Ritland. Department of Botany, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.
- Ritland, K., and Y. A. El-Kassaby. 1985. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. *Theor. Appl. Genet.* 71:375-384
- Savolainen, O., and H. Kuitinen. 2000. Small population processes. In: Young, A., D. Boshier, and T. Boyle (eds). *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. CSIRO Publishing, Australia. pp: 91-100.
- Shaw, D. V., and R. W. Allard. 1979. Analysis of mating system parameters and population structure in Douglas-fir using single-locus and multilocus methods. In: *Proc. Symp. Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects*. Berkeley, Cal. USDA For. Serv., Gen. Tech. Rep. PSW-48. Berkeley, Cal. pp: 18-22.
- Shaw, D. V., and R. W. Allard. 1982. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozymes markers. *Theor. Appl. Genet.* 62: 113-120.
- Shaw, D. V., A. L. Kahler, and R. W. Allard. 1981. A multilocus estimator of mating parameters in plant populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78(2): 1298-1302.
- Sorensen, F. C. 1982. The role of polyembryony and embryo viability in the genetic system of conifers. *Evolution* 36: 725-733.
- Sorensen, F. C., and R. K. Campbell. 1997. Near neighbor pollination and plant vigor in coastal Douglas-fir. *For. Gen.* 4: 149-157.
- Sproule, A. T., and B. P. Dancik. 1996. The mating system of black spruce in North-Central Alberta, Canada. *Silvae Genet.* 45: 159-164.
- Stubber, C.W., J.F. Wendel, M.M. Goodman, and J. S. C. Smith. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). *North*

- Carolina Agricultural Research Service. North Carolina State University. Raleigh, N.C., U.S.A. Technical Bulletin. No. 286. 87 p.
- USDA (United States Department of Agriculture) Forest Service. 2003. The National Forest Genetics Laboratory (NFGEL) Standard Operating Procedures. Pacific Southwest Research Station. Placerville, CA. 90 p.
- Yeh, F. C., and K. Morgan. 1987. Mating system and multilocus associations in a natural population of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Theor. Appl. Genet. 73: 799-808.