

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Pinus johannis*

GENETIC DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE IN *Pinus johannis*

Verónica García-Gómez¹, Carlos Ramírez-Herrera^{1*}, Celestino Flores-López², Javier López-Upton¹

¹Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo, Estado de México. (kmcram@colpos.mx). ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. 25084. Saltillo, Coahuila de Zaragoza.

RESUMEN

Pinus johannis M.-F. Robert-Passini es un pino piñonero endémico de México que crece en poblaciones pequeñas. El objetivo del presente estudio fue estimar el nivel de la diversidad genética y el grado de diferenciación entre poblaciones en la distribución natural de *P. johannis*. Se recolectaron estróbilos maduros de 130 árboles de cuatro poblaciones. El genotipo de cada árbol se determinó en una muestra de seis megagametofitos y se analizaron nueve sistemas enzimáticos con 16 loci. En las cuatro poblaciones el número de alelos varió de 31 a 35. El número promedio de alelos por locus fue 2.1 y el porcentaje promedio de loci polimórficos 88. La heterocigosidad promedio fue 0.231, y la heterocigosidad promedio esperada fue 0.245. Un déficit de individuos heterocigóticos ($F_{IS} = 0.116$ y $F_{IT} = 0.176$) se encontró en las cuatro poblaciones juntas y en cada una de ellas. La diferenciación genética entre poblaciones fue moderada ($F_{ST} = 0.062$). La diversidad genética en *P. johannis* fue alta con un nivel moderado de diferenciación entre poblaciones.

Palabras clave: endémico, loci, heterocigosidad, isoenzimas, distancias genéticas.

INTRODUCCIÓN

En México el número reconocido de especies descritas del género *Pinus* es variable y, por ejemplo, Perry (1991) reportó 54 especies del género *Pinus*, y Farjon *et al.* (1997) reconoció solo 43 especies del mismo género. *Pinus johannis* M.-F. Robert-Passini es una especie endémica de México que crece en poblaciones aisladas en los estados de Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí

ABSTRACT

Pinus johannis M.-F. Robert-Passini is an endemic pinion nut pine of Mexico that grows in small populations. The objective of this study was to estimate the level of genetic diversity and degree of differentiation among populations in the natural distribution of *P. johannis*. Mature strobili were collected from 130 tree of four populations. The genotype of each tree was determined in a sample of six megagametophytes, and nine enzyme systems with 16 loci were analyzed. In the four populations the number of alleles varied from 31 to 35. The average number of alleles per locus was 2.1, and the average percentage of polymorphic loci was 88 %. Average heterozygosity was 0.231, and expected average heterozygosity was 0.245. A deficit of heterozygous individuals ($F_{IS} = 0.116$ and $F_{IT} = 0.176$) was found in the four populations together and in each of them. The genetic differentiation among populations was moderate ($F_{ST} = 0.062$). Genetic diversity of *P. johannis* was high with a moderate level of differentiation among populations.

Key words: endemic, loci, heterozygosity, isoenzymes, genetic distance.

INTRODUCTION

In Mexico, the number of described, recognized species of the genus *Pinus* is variable. For example, Perry (1991) reported 54 species of the genus, and Farjon *et al.* (1997) recognized only 43 species. *Pinus johannis* M.-F. Robert-Passini is endemic to Mexico and grows in isolated populations in the states of Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí and Querétaro at altitudes of 2400 to 2800 m, where average annual precipitation varies from 300 to 400 mm (Perry, 1991; García and Passini, 1993; Romero *et al.*, 2000). Moreover, this species is found listed in the category of special protection in NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2014. Aprobado: noviembre, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 48: 863-873. 2014.

y Querétaro a altitudes entre 2400 y 2800 msnm, donde la precipitación promedio anual varía de 300 a 400 mm (Perry, 1991; García y Passini, 1993; Romero *et al.*, 2000). Además esta especie se encuentra enlistada en la categoría de protección especial en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

Los árboles de *P. johannis* se pueden plantar en las ciudades como árboles ornamentales y en sitios con precipitación baja (Perry, 1991). Los troncos y ramas de este pino se usan en construcciones rurales y como leña. Las semillas, llamadas piñones, se recolectan para consumo humano (Robert, 1978; Perry, 1991). Los bosques formados por *P. johannis* proveen alimento y hábitat a la fauna local; además, las copas de estos árboles proporcionan sombra a especies herbáceas y arbustivas las cuales tienen más probabilidad de sobrevivir por la mayor disponibilidad de humedad (Romero-Manzanares y García-Moya, 2002).

La información sobre la magnitud y distribución de la diversidad genética entre poblaciones de las especies es fundamental para proponer estrategias de conservación y programas de manejo sustentable a largo plazo (Frankham *et al.*, 2002). En estos programas se deben incluir poblaciones con componentes genéticos representativos y únicos para disminuir problemas relacionados con los efectos de endogamia, exogamia, flujo génico reducido y mutaciones deletéreas que influyen en la habilidad de las especies para su evolución (Frankham *et al.*, 2002). Estos efectos pueden conducir a la extinción de especies que crecen en poblaciones pequeñas y aisladas, y en las cuales se esperaría una diversidad genética baja por la acción de la deriva genética y la endogamia, como puede ser el caso de *P. johannis* que además tiene pocas poblaciones. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue estimar el nivel y la distribución de la diversidad genética de cuatro poblaciones *P. johannis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La semilla utilizada en el presente estudio se recolectó de 130 árboles en cuatro poblaciones de *P. johannis* localizadas en los estados de Nuevo León, Coahuila y Zacatecas (Cuadro 1; Figura 1). En cada población la distancia mínima entre árboles muestreados fue 30 m, para disminuir la probabilidad de incluir individuos emparentados. Los estróbilos maduros recolectados de cada árbol

P. johannis trees can be planted in cities as ornamental trees and in sites with low precipitation (Perry, 1991). The trunk and branches of this pine are used in rural constructions and as fire wood. The seeds, called pinion nuts, are collected for human consumption (Robert, 1978; Perry, 1991). The forests formed by *P. johannis* provide food and refuge to local wildlife and their crowns provide shade for herbaceous and bush species which have a better chance of survival because more moisture is available (Romero-Manzanares and García-Moya, 2002).

Information on the magnitude and distribution of genetic diversity among populations of the species is fundamental for proposing long-term conservation strategies and sustainable management programs (Frankham *et al.*, 2002). In these programs populations with representative and unique genetic components should be included to decrease problems related with the effects of endogamy, exogamy, reduced gene flow and deleterious mutations that affect the species' ability to evolve (Frankham *et al.*, 2002). These effects can lead to the extinction of species that live in small isolated populations. In these populations little genetic diversity is expected because of the action of genetic drift and endogamy. This could be the case of *P. johannis* that, in addition, has few populations. For these reasons, the objective of this study was to estimate the level and distribution of genetic diversity of four *P. johannis* populations.

MATERIALS AND METHODS

The seed used in this study was collected from 130 trees of four *P. johannis* populations located in the states of Nuevo León, Coahuila and Zacatecas (Table 1, Figure 1). In each population, the smallest distance between sampled trees was 30 m to decrease the probability of including genetically related individuals. The mature strobili collected from each tree were placed in paper bags labeled for their transport to the seed laboratory of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) where the seed was processed. Filled seeds were separated from empty ones by floatation in water and placed in plastic bags, which were kept in a cold chamber at 7 °C at the laboratory of the graduate program in Forest Science of the Colegio de Postgraduados until electrophoretic analysis.

Six filled seeds of each *P. johannis* tree were spread over paper in 21×27 cm plastic boxes to which 20 mL of potable water was added. The boxes were covered and placed in an oven at

Cuadro 1. Localización geográfica de cuatro poblaciones de *Pinus johannis*.
Table 1. Geographic location of the four *Pinus johannis* populations.

Población	Municipio	N.A. [‡]	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud (msnm)
Laguna de Sánchez	Villa de Santiago, N.L. [†]	30	25° 21' 26"	100° 20' 35"	2223
El Coahuilón	Arteaga, Coah. [†]	30	25° 14' 49"	100° 23' 17"	2720
Salaverna	Mazapil, Zac. [†]	40	24° 37' 02"	101° 27' 59"	2500
La Siberia	General Zaragoza, N.L. [†]	30	23° 52' 02"	99° 48' 16"	2620

[†]N.L.: Nuevo León, Coah.: Coahuila, Zac.: Zacatecas; [‡]Número de árboles v [†]N.L.: Nuevo León, Coah.: Coahuila, Zac.: Zacatecas;
[‡]Number of trees.

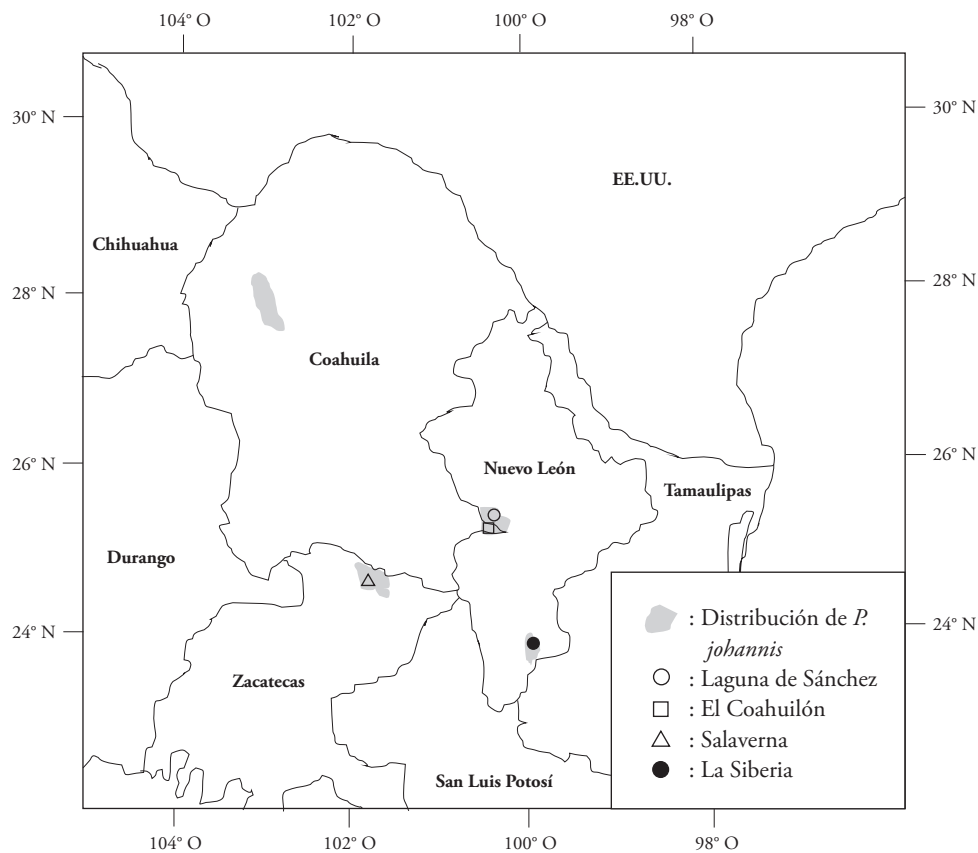


Figura 1. Distribución natural de *Pinus johannis* en el norte de México (Perry, 1992) y localización de las cuatro poblaciones en estudio.

Figure 1. Natural distribution of *Pinus johannis* in northern Mexico (Perry, 1992) and location of the four populations studied.

se colocaron en bolsas de papel identificadas para su transporte al laboratorio de semillas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) donde la semilla se benefició. Las semillas llenas se separaron de las vanas por flotación en agua y se colocaron en bolsas de plástico, las cuales se mantuvieron en una cámara fría a -7°C en el laboratorio del Postgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados hasta el análisis electroforético.

25°C for one week. The testa of each seed was broken before germination to separate the embryo from the megagametophyte. The embryo of conifers is diploid tissue that inherits genes from both mother and father, while the megagametophyte is haploid tissue that contains only the mother's genotype (Singh *et al.*, 2010). When analyzing six megagametophytes from one tree, the probability of error in identifying the genotype of a heterozygous mother as homozygous is equal to 0.03 (Ledig *et al.*, 2000). The

Seis semillas llenas de cada árbol de *P. johannis* se acomodaron sobre papel en el interior de cajas de plástico de 21×27 cm, a las cuales se agregó 200 mL de agua potable. Las cajas se taparon y se colocaron en una estufa a 25 °C durante una semana. La testa de cada semilla se rompió antes de que las semillas germinaran para separar el embrión y megagametofito. El embrión de las coníferas es tejido diploide, que hereda los genes de la madre y del padre; mientras que el megagametofito es tejido haploide que solo contiene el genotipo de la madre (Singh *et al.*, 2010). Al analizar seis megagametofitos de un árbol la probabilidad de error en identificar correctamente el genotipo de una madre heterocigótica como homocigótica es igual a 0.03 (Ledig *et al.*, 2000). El megagametofito de cada una de las seis semillas por árbol se colocó en una gradilla de plástico con 96 pozos, previamente etiquetada, y se molió en 50 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.2 M con pH de 7.0 (NFGEL, 2003). Las gradillas con las muestras se almacenaron en un congelador a -20 °C hasta su uso para electroforesis.

Las muestras se descongelaron y en cada pozo de la gradilla se introdujeron tiras de papel Whatman No. 5 de 12×1 mm. Las tiras de papel empapadas con la muestra se colocaron en un gel de almidón al 10 %. Seis muestras de *Pinus resinosa* Aiton, una especie sin diversidad isoenzimática (Fowler y Morris, 1977), se distribuyeron de manera uniforme a lo largo del gel como testigo.

En el presente estudio se analizaron nueve sistemas enzimáticos: diaforasa (DIA, EC 1.6.99.1), isocitrato deshidrogenasa (IDH, EC.1.1.1.41), malato deshidrogenasa (MDH, EC.1.1.1.37), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD, EC.1.1.44) y shikimato deshidrogenasa (SKD, EC.1.1.1.25) se analizaron con amortiguador para gel y electrodo de ácido cítrico 0.04 M y N-(3-aminopropil)-morfolina 0.068 M, con pH 6.1 (Wendel y Weeden, 1989; NFGEL, 2003). Fosfoglucoisomerasa (PGI, EC.5.3.1.9), enzima málica (ME, EC.1.1.1.40), fosfoglucomutasa (PGM, EC.5.4.2.2) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49) se analizaron con amortiguador para gel de L-histidina 0.005 M, con pH 7.0, y amortiguador para electrodo de ácido cítrico 0.410 M, con pH 7.0 (Wendel y Weeden, 1989; NFGEL, 2003).

Los loci se nombraron con la abreviatura del sistema enzimático. Cuando se identificó más de un locus se enumeraron consecutivamente a partir del que se desplazó a mayor distancia en el gel. La numeración de los alelos dentro de cada locus se realizó de acuerdo con el alelo de mayor frecuencia. Cuando solo un alelo se detectó, el locus se clasificó como monomórfico (Hartl y Clark, 2007). Los alelos se determinaron como raros cuando su frecuencia fue menor a 0.05, y como comunes cuando fue igual o mayor a 0.05 (Marshall y Brown, 1975).

El porcentaje de loci polimórficos (P), el número promedio de alelos por locus (A), la heterocigosidad observada (Ho) y la

megagametophyte of each of the six seeds per tree was placed on a plastic rack with 96 wells previously labeled and ground in 59 mL 0.2 M sodium phosphate buffer with pH of 7.0 (NFGEL, 2003). The racks with the samples were stored in a freezer at -20 °C until use for electrophoresis.

The samples were defrosted and in each well of the rack were placed 12×1 mm Whatman No. 5 paper strips. The paper strips soaked with the sample were placed in a 10 % starch gel. Six samples of *Pinus resinosa* Aiton, a species with no isoenzymatic diversity (Fowler and Morris, 1977), were distributed evenly throughout the gel as a control.

In this study, nine enzyme systems were analyzed: diaphorase (DIA, EC 1.6.99.1), isocitrate dehydrogenase (IDH, EC.1.1.1.41), malate dehydrogenase (MDH, EC.1.1.1.37), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD, EC.1.1.44) and shikimate dehydrogenase (SKD, EC.1.1.1.25). These systems were analyzed with a buffer for gels and an electrode of 0.04 M citric acid and 0.068 M N-(3-Aminopropyl)-morpholine with pH 6.1 (Wendel and Weeden, 1989; NFGEL, 2003). Phosphoglucose isomerase (PGI, EC.5.3.1.9), malic enzyme (ME, EC.1.1.1.40), phosphoglucomutase (PGM, EC.5.4.2.2) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) were analyzed with the gel buffer L-histidine 0.005 M, with pH 7.0 and 0.410 M buffer for citric acid electrode with pH 7.0 (Wendel and Weeden, 1989; NFGEL, 2003).

Abbreviations of the enzyme systems were used to name the loci. When more than one locus was identified, they were enumerated consecutively beginning with the one that moved the greatest distance in the gel. Alleles were numbered within each locus in accordance with the most frequent allele. When only one allele was detected, the locus was classified as monomorphic (Hartl and Clark, 2007). The alleles were deemed rare when their frequency was below 0.05 and common when it was equal to or above 0.05 (Marshall and Brown, 1975).

The percentage of polymorphic loci (P), the average number of alleles per locus (A), observed heterozygosity (Ho) and expected heterozygosity (He), which are parameters that describe genetic diversity, were estimated with the software POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1997). The fixation index (F) was also calculated (Wright, 1951). The genetic structure was analyzed using Wright F statistics $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$ (Wright, 1951), where F_{IT} is the fixation index or coefficient of endogamy considering the four *P. johannis* populations as one population, F_{IS} is the fixation index or coefficient of endogamy between populations (Wright, 1951). The number of migrants per generation (Nm) was calculated with the equation proposed by Wright (1951): $Nm = (1 - F_{ST}) / (4F_{ST})$. Nei genetic distances (Nei, 1972) were calculated among the four studied *P. johannis* populations, and a dendrogram was constructed using the

heterocigosidad esperada (H_e), parámetros que describen la diversidad genética, se estimaron usando el programa POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1997). También se calculó el índice de fijación (F) (Wright, 1951). La estructura genética se analizó a través de los estadísticos F de Wright $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$ (Wright, 1951), donde F_{IT} es el índice de fijación o coeficiente de endogamia considerando las cuatro poblaciones de *P. johannis* como una población, F_{IS} es el índice de fijación o coeficiente de endogamia dentro de cada una de las poblaciones, y F_{ST} es el índice de fijación o coeficiente de endogamia entre poblaciones (Wright, 1951). El número de migrantes por generación (Nm) se calculó con la ecuación propuesta por Wright (1951): $Nm = (1 - F_{ST}) / (4F_{ST})$. Las distancias genéticas de Nei se calcularon entre las cuatro poblaciones estudiadas de *P. johannis* (Nei, 1972), y se construyó un dendrograma utilizando el método de agrupamiento de pares no ponderado con promedios aritméticos (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La totalidad de los loci registrados en la población de Salaverna fueron polimórficos, quince loci polimórficos se identificaron en Laguna de Sánchez, mientras que en El Coahuilón fueron trece loci polimórficos de un total de 16 en ambas poblaciones. El menor número de loci polimórficos (12) se registró en La Siberia. La mayoría de los alelos fueron comunes con una frecuencia mayor a 0.05. El número mayor de alelos totales se encontró en Laguna de Sánchez y Salaverna (Cuadro 2). El número menor de alelos raros se encontró en El Coahuilón.

El número mayor de alelos por locus se encontró en Laguna de Sánchez y Salaverna, mientras que el número menor de alelos por locus se registró en La Siberia (Cuadro 3). Tanto en *P. pinceana* Gordon como en *P. rzedowskii* Madrigal & Caballero, dos pinos piñoneros mexicanos endémicos con distribución geográfica restringida, similar a la de *P. johannis*, se determinó un valor promedio de 1.8 alelos por locus (Delgado *et al.*, 1999; Ledig *et al.*, 2001). Por lo tanto, el número de alelos por locus que se encontró en *P. johannis* en este estudio, fue mayor que el reportado en otras especies del género *Pinus*.

El porcentaje de loci polimórficos de *P. johannis* varió de 75 a 100 %. Estos valores son altos con respecto a otras especies de pinos que crecen en una distribución restringida; por ejemplo, el porcentaje de loci polimórficos fue 0 en *Pinus torreyana* Parry ex Carr., una especie que crece en dos poblaciones en

method Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973).

RESULTS AND DISCUSSION

All of the loci registered in the Salaverna population were polymorphic; of a total of 16 in each of the two populations, 15 polymorphic loci were identified in the Laguna de Sánchez population, while in that of El Coahuilón 13 were polymorphic. The lowest number of polymorphic loci (12) was recorded in the La Siberia population. Most of the alleles were common with a frequency above 0.05. The highest number of total alleles was found in the populations Laguna de Sánchez and Salaverna (Table 2). The smallest number of rare alleles were found in the El Coahuilón population.

The highest number of alleles per locus was found in the Laguna de Sánchez and Salaverna populations, while the lowest number of alleles per locus was registered for the La Siberia population (Table 3). In both *P. pinceana* Gordon and *P. rzedowskii* Madrigal & Caballero, two endemic Mexican pinion pines with limited geographic distribution, similar to that of *P. johannis*, an average value of 1.8 alleles per locus was determined (Delgado *et al.*, 1999; Ledig *et al.*, 2001). Therefore, the number of alleles per locus that was found in *P. johannis* in our study was higher than that reported in other species of the genus *Pinus*.

The percentage of polymorphic loci of *P. johannis* varied from 75 to 100 %. These values are higher than that of other pine species that have limited distribution; for example, the percentage of polymorphic loci was 0 in *Pinus torreyana* Parry ex Carr., a species that grows in two populations in

Cuadro 2. Número y clases de alelos encontrados en las cuatro poblaciones estudiadas de *Pinus johannis*.

Table 2. Number and classes of alleles found in the four *Pinus johannis* populations studied.

Población	Alelos		
	Comunes	Raros	Totales
Laguna de Sánchez, N.L. [†]	29	6	35
El Coahuilón, Coah. [†]	32	1	33
Salaverna, Zac. [†]	29	6	35
La Siberia, N.L. [†]	28	3	31

[†]N.L.: Nuevo León, Coah.: Coahuila, Zac.: Zacatecas.

Cuadro 3. Diversidad genética de cuatro poblaciones de *Pinus johannis*.
Table 3. Genetic diversity of four *Pinus johannis* populations.

Población	A [†]	P	Ho	He	F
Laguna de Sánchez, N.L. [‡]	2.2	94	0.231	0.262	0.165
El Coahuilón, Coah. [‡]	2.1	81	0.255	0.241	0.020
Salaverna, Zac. [‡]	2.2	100	0.289	0.281	0.056
La Siberia, N.L. [‡]	1.9	75	0.150	0.195	0.277
Promedio	2.1	88	0.231	0.245	0.130

[†]A: número promedio de alelos por locus; P: porcentaje de loci polimórficos (%); Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; F: índice de fijación; [‡]N.L.: Nuevo León, Coah.: Coahuila, Zac.: Zacatecas

❖ [†]A: average number of alleles per locus; P: percentage of polymorphic loci (%); Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity; F: fixation index; [‡]N.L.: Nuevo León, Coah.: Coahuila, Zac.: Zacatecas.

California, y 30 % en *P. maximartinezii* Rzedowski que crece en dos poblaciones del norte de México (Ledig y Conkle, 1983; Ledig *et al.*, 1999). *Pinus pinceana*, otra especie endémica de la sierra Madre Oriental y que se encuentra en lista como en peligro de extinción, tuvo 57 % de loci polimórficos (Ledig *et al.*, 2001). También el porcentaje de loci polimórficos en *P. johannis* fue mayor que los encontrados en *P. greggii* Engelm. (32 %) y *P. hartwegii* Lindl. (58 %) (Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010). El porcentaje de loci polimórficos encontrados en *P. johannis* fue mayor al promedio en otras especies de gimnospermas (71 %) (Hamrick *et al.*, 1992).

La heterocigosidad mayor observada (Ho) y heterocigosidad esperada (He) se encontraron en Salaverna, en el estado de Zacatecas, mientras que la menor heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada se observó en La Siberia en el estado de Nuevo León (Cuadro 3). La heterocigosidad esperada en *P. johannis* fue alta comparada con el promedio de la heterocigosidad esperada reportada para varias especies del género *Pinus* (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010); sin embargo, la heterocigosidad esperada en *P. johannis* fue menor que las reportadas para *P. lagunae* M. F. Passani (0.386) y *P. muricata* D. Don (0.346) (Molina-Freaner *et al.*, 2001), aunque debe aclararse que la estimación de la heterocigosidad esperada promedio en estas últimas especies se realizó solamente con base en loci polimórficos. A pesar de que *P. johannis* crece en poblaciones aisladas y reducidas, los niveles de diversidad encontrados en el presente estudio fueron altos. Lo anterior se puede deber a una posible hibridación histórica o iterativa entre *P. johannis* y

California, and 30 % in *P. maximartinezii* Rzedowski, which grows in two population in northern Mexico (Ledig and Conkle, 1983; Ledig *et al.*, 1999). *Pinus pinceana*, another endemic species of the Sierra Madre Oriental and found on the endangered list, had 57 % polymorphic loci (Ledig *et al.*, 2001). The percentage of polymorphic loci in *P. johannis* was also higher than that found in *P. greggii* Engelm. (32 %) and *P. hartwegii* Lindl. (58 %) (Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010). The percentage of polymorphic loci found in *P. johannis* was higher than the average found in other species of gymnosperms (71 %) (Hamrick *et al.*, 1992).

The highest degree of observed heterozygosity (Ho) and expected heterozygosity (He) was found in the Salaverna population in the state of Zacatecas, while the lowest Ho and He were found in La Siberia, in the state of Nuevo León (Table 3). The He in *P. johannis* was high compared with the average He reported for several *Pinus* species (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010), but the *P. johannis* He was lower than that reported for *P. lagunae* M. F. Passani (0.386) and *P. muricata* D. Don (0.346) (Molina-Freaner *et al.*, 2001), although it should be clarified that the average expected heterozygosity of the latter species was calculated only on the basis of polymorphic loci. Although *P. johannis* grows in small isolated populations, the levels of diversity found in this study were high. This may be due to a possible historic or iterative hybridization between *P. johannis* and *P. cembroides*, because an overlapping (or rather, a coincidence) in the seasons in which reproductive structures of the two species mature has been observed in some areas where they coexist (Romero *et al.*, 2000). Moreover,

P. cembroides, porque se ha observado un traslapo (o bien, una coincidencia) en la época de maduración de las estructuras reproductivas de ambas especies en algunas áreas donde coexisten (Romero *et al.*, 2000). Además, *P. johannis* tiene un comportamiento casi dioico donde la mayoría de los estróbilos femeninos y masculinos se producen en individuos diferentes (Flores-Rentería *et al.*, 2011), lo cual puede favorecer un nivel de diversidad alto por el cruzamiento entre árboles diferentes.

El índice de fijación promedio (F) fue positivo en las poblaciones de *P. johannis* con valores entre 0.020 a 0.277 (Cuadro 3), indicando deficiencia de heterocigotos lo cual es común en poblaciones pequeñas (Hart y Clark, 2007). El valor de F en *P. johannis* fue ligeramente superior al de 0.116 reportado para *P. pinceana* (Ledig *et al.*, 2001). El valor de F en *P. johannis* fue inferior al encontrado en *Tsuga canadensis* (L.) Carr. ($F=0.443$), una conífera con amplia distribución en el este de América del Norte (Potter *et al.*, 2008).

En 10 de 16 loci polimórficos el índice de fijación a nivel población (F_{IS}) presentó valores positivos, lo cual indica deficiencia de heterocigotos para estos loci, mientras los otros seis con valor negativo indican exceso de heterocigotos. El índice de fijación total (F_{IT}) obtenido indica una deficiencia de individuos heterocigóticos en 13 de los 16 loci polimórficos (Cuadro 4). En otras especies mexicanas del género *Pinus* los índices de fijación fueron mayores que los encontrados en *P. johannis*. Por ejemplo, los índices F_{IS} y F_{IT} registrados en este pino fueron menores a los de *P. pinceana* ($F_{IS} = 0.140$ y $F_{IT} = 0.271$) (Ledig *et al.*, 2001). El índice de fijación en *P. johannis* indicó una deficiencia de heterocigotos menor a la reportada para *Abies hickeli* Flous *et* Gausen ($F_{IS} = 0.121$), *A. guatemalensis* Rehder ($F_{IS} = 0.235$ y $F_{IT} = 0.122$) y *A. religiosa* (H.B.K.) Schltdl. *et* Cham. ($F_{IS} = 0.216$ y $F_{IT} = 0.250$), especies que crecen en poblaciones aisladas en áreas montañosas de México (Aguirre-Planter *et al.*, 2000).

La mayoría (93.8 %) de la diversidad genética promedio en *P. johannis* se encontró dentro de poblaciones y sólo 6.2 % ($F_{ST} = 0.062$) entre poblaciones (Cuadro 4), por lo cual el nivel de diferenciación fue moderado. La diferenciación entre poblaciones de *P. johannis* fue menor a la reportada entre poblaciones de *P. flexilis* James ($F_{ST} = 0.094$), una especie de amplia distribución en América del Norte (Jørgensen

P. johannis has an almost dioic behavior; most of the feminine and masculine strobili are produced on different individuals (Flores-Rentería *et al.*, 2011), thus favoring a high level of diversity because of cross breeding among different trees.

The average fixation index (F) was positive in the *P. johannis* populations, with values between 0.020 and 0.277 (Table 3), indicating a deficiency of heterozygotes, a common occurrence in small populations (Hart and Clark, 2007). The F value in *P. johannis* was slightly above the 0.116 reported for *P. pinceana* (Ledig *et al.*, 2001), but below that found for *Tsuga canadensis* (L.) Carr. ($F=0.443$), a widely distributed conifer of eastern North America (Potter *et al.*, 2008).

In 10 of 16 polymorphic loci, the fixation index at the population level (F_{IS}) had positive values, indicating deficiency of heterozygotes for these loci, while the other six, with negative values, indicate an excess of heterozygotes. The total fixation index (F_{IT}) obtained indicates a deficiency of heterozygous individuals in 12 of the 16 polymorphic loci (Table 4). In other Mexican pine species, the

Cuadro 4. Valores de los F-estadísticos de Wright para 16 loci en cuatro poblaciones de *Pinus johannis*.

Table 4. Wright F statistic values for 16 loci in four *Pinus johannis* populations.

Locus	$F_{IS}^{\dagger}$	F_{IT}	F_{ST}
MDH1	-0.034	0.119	0.148
MDH2	0.419	0.437	0.031
MDH3	-0.024	-0.016	0.008
MDH4	0.124	0.200	0.087
6PGD1	0.329	0.372	0.064
6PGD2	0.619	0.638	0.051
DIA1	0.314	0.425	0.161
G6PDH1	-0.374	-0.155	0.159
PGI1	0.114	0.118	0.005
PGI2	-0.030	0.010	0.039
ME1	-0.513	-0.370	0.095
PGM1	0.211	0.241	0.038
PGM2	0.182	0.210	0.033
SKD1	0.252	0.282	0.040
SKD2	0.270	0.288	0.025
IDH1	-0.003	0.012	0.015
Promedio	0.116	0.176	0.062

$^{\dagger}F_{IS}$: coeficiente de fijación a nivel población, F_{IT} : coeficiente de fijación total, F_{ST} : coeficiente de fijación entre poblaciones. $^{\ddagger}F_{IS}$: coefficient of fixation at the population level, F_{IT} : coefficient of total fixation; F_{ST} : coefficient of fixation between populations.

et al., 2002). También, el nivel de diferenciación fue inferior al reportado entre poblaciones de otras especies mexicanas del género *Pinus*, tales como *P. pinceana* ($F_{ST} = 0.152$), *P. greggii* ($F_{ST} = 0.379$) y *P. hartwegii* ($F_{ST} = 0.111$) (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

En promedio, cuatro migrantes por generación (Nm) se registraron en *P. johannis*, cantidad mayor a la determinada en *P. pinceana* ($Nm=1$) y *P. greggii* ($Nm=1$) (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002). Al menos un migrante por generación puede evitar la diferenciación de las poblaciones por el efecto de la deriva genética (Hartl y Clark, 2007). El número elevado de migrantes en *P. johannis* es, con alta probabilidad, una causa del nivel moderado de diferenciación entre las poblaciones de esta especie; sin embargo, el número de migrantes encontrado para esta especie puede reflejar también el flujo génico ocurrido en el pasado y sobreestimar el número de migrantes en la generación presente, como se encontró en *Picea mexicana* Martínez y *Fagus grandifolia* Ehrh. subsp. *mexicana* (Martínez) E. Murray (Ledig *et al.*, 2002; Montiel-Oscura *et al.*, 2013). Probablemente, *P. johannis* cubrió una mayor superficie en el pasado, al igual que otras especies productoras de piñones del género *Pinus* (Malusa, 1992), por lo cual la migración entre poblaciones de *P. johannis* pudo ser mayor que en el presente, lo cual se reflejó en los resultados encontrados en el presente estudio.

La distancia genética promedio entre las cuatro poblaciones de *P. johannis* fue 0.03, lo cual representa una diferenciación moderada entre poblaciones. Las distancias genéticas entre poblaciones variaron de 0.014 entre La Siberia y El Coahuilón a 0.043 entre La Siberia y Salaverna (Cuadro 5; Figura 2). Valores de distancia genéticas entre 0.018 y 0.150 reflejan una diferenciación moderada entre poblaciones de una especie (Nei, 1978). La diferenciación entre poblaciones es influenciada por el flujo génico entre poblaciones (Hartl y Clark, 2007). Las distancias genéticas entre las poblaciones de *P. johannis* fueron menores que las distancias que se reportaron para *P. pinceana* y *P. hartwegii*, que crecen en localidades aisladas (Ledig *et al.*, 2001; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

El porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada indicaron

fixation indexes were higher than those found in *P. johannis*. For example, the F_{IS} and F_{IT} indexes recorded for this pine were lower than those of *P. pinceana* ($F_{IS} = 0.140$ and $F_{IT} = 0.271$) (Ledig *et al.*, 2001). The fixation index of *P. johannis* indicated a lower heterozygote deficiency than that reported for *Abies hickeli* Flous *et* Gausen ($F_{IS} = 0.121$), *A. guatemalensis* Rehder ($F_{IS} = 0.235$ and $F_{IT} = 0.122$) and *A. religiosa* (H.B.K.) Schltdl. *et* Cham ($F_{IS} = 0.216$ and $F_{IT} = 0.250$); these are species that grow in populations isolated in mountainous areas of Mexico (Aguirre-Planter *et al.*, 2000).

Most (93.8 %) of the average genetic diversity of *P. johannis* is found within populations and only 6.2 % ($F_{ST} = 0.062$) among populations (Table 4), and therefore the level of differentiation was moderate. It was lower than that reported among *P. flexilis* James populations ($F_{ST} = 0.094$), a species widely distributed in North America (Jørgensen *et al.*, 2002). The level of differentiation was also lower than that reported among populations of other Mexican species of *Pinus*, such as *P. pinceana* ($F_{ST} = 0.152$), *P. greggii* ($F_{ST} = 0.379$) and *P. hartwegii* ($F_{ST} = 0.111$) (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

On average, four migrants per generation (Nm) were recorded in *P. johannis*. This number is higher than that determined in *P. pinceana* ($Nm=1$) and *P. greggii* ($Nm=1$) (Ledig *et al.*, 2001; Parraguirre *et al.*, 2002). At least one migrant per generation can prevent population differentiation by effect of genetic drift (Hartl and Clark, 2007). The high number of migrants in *P. johannis* is, very likely, one cause of the moderate level of differentiation among its populations. It may also, however, reflect gene flow that occurred in the past and overestimate the number of migrants in the current generation, as was found in *Picea mexicana* Martínez and *Fagus grandifolia* Ehrh. subsp. *mexicana* (Martínez) E. Murray (Ledig *et al.*, 2002; Montiel-Oscura *et al.*, 2013). It is probable that *P. johannis* covered a larger area in the past, like other pinion nut producing pine species (Malusa, 1992) and migration between *P. johannis* populations may have been more frequent than at present. This probability is reflected in the results of our study.

The average genetic distance between the four *P. johannis* populations was 0.03, representing a moderate differentiation among populations. The

Cuadro 5. Distancias genéticas corregidas de Nei entre cuatro poblaciones de *Pinus johannis*.
Table 5. Corrected Nei genetic distances between *Pinus johannis* populations.

Población	El Coahuilón, Coah.	Salaverna, Zac	La Siberia N.L.
Laguna de Sánchez, N.L. [†]	0.034	0.042	0.018
El Coahuilón, Coah. [†]	----	0.027	0.014
Salaverna, Zac. [†]		----	0.043

[†]N.L.: Nuevo León, Coah.: Coahuila, Zac.: Zacatecas.

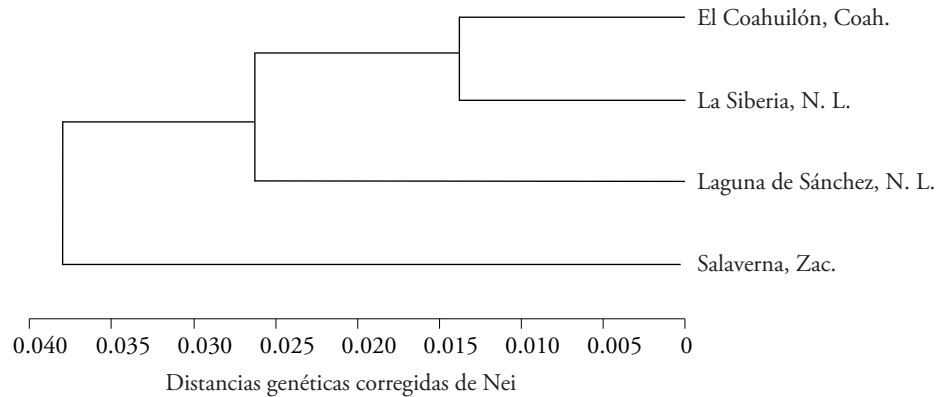


Figura 2. Agrupamiento de cuatro poblaciones de *Pinus johannis* con base en las distancias genéticas corregidas de Nei, mediante el método de agrupamiento UPGMA.

Figure 2. UPGMA grouping of four *Pinus johannis* populations based on corrected Nei genetic distances.

alta diversidad genética en las cuatro poblaciones muestreadas de *Pinus johannis*, por lo cual la especie posee la diversidad necesaria para poder evolucionar. Los índices de fijación (F_{IT} y F_{IS}) mostraron un déficit de individuos heterocigóticos en *P. johannis* indicando que el cruzamiento entre individuos emparentados es común. El F_{ST} indicó una diferenciación moderada por lo que conservar una de las poblaciones sería suficiente para conservar la mayoría de la diversidad genética; sin embargo, es recomendable conservar las cuatro poblaciones de *P. johannis* incluidas en el presente estudio.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Planter, E., G. R. Furnier, and L. E. Eguarte. 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *Am. J. Bot.* 87: 362-371.
- Delgado, P., D. Piñero, A. Chaos, N. Pérez-Nasser, and E. R. Alvarez-Buylla. 1999. High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* 86: 669-676.

genetic distances between populations varied from 0.014 between La Siberia and El Coahuilón to 0.043 between La Siberia and Salaverna (Table 5; Figure 2). Values of genetic distance between 0.018 and 0.150 reflect moderate differentiation between populations of a species (Nei, 1978). Differentiation between populations is affected by gene flow between populations (Hartl and Clark, 2007). The genetic distances between *P. johannis* populations were smaller than the distances reported for *P. pinceana* and *P. hartwegii*, which grow in isolated locations (Ledig *et al.*, 2001; Viveros-Viveros *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS

The high percentage of polymorphic loci, observed heterozygosity and expected heterozygosity indicated wide genetic diversity in the four *Pinus johannis* populations sampled, and therefore the species has the necessary diversity to be able to evolve. The fixation indexes (F_{IT} and F_{IS}) revealed deficit of heterozygous individuals in *P. johannis*, indicating

- Farjon, A., J. A. Pérez de la Rosa, y B. T. Styles. 1997. Guía de Campo de los Pinos de México y América Central. The Royal Botanic Gardens, Kew e Instituto Forestal de Oxford, Universidad de Oxford. Oxford, UK. 151 p.
- Flores-Rentería, L., A. Vázquez-Lobo, A. V. Whipple, D. Piñero, J. Márquez-Guzmán, and C. A. Domínguez. 2011. Functional bisporangiate cones in *Pinus johannis* (Pinaceae): Implications for the evolution of bisexuality in seed plants. *Am. J. Bot.* 98: 130-139.
- Fowler, D. P., and R. W. Morris. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genic heterozygosity. *Can. J. For. Res.* 7: 343-347.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 617 p.
- García A., A., y M.-F. Passini. 1993. Distribución y ecología de *Pinus johannis* M.-F. Robert. *Phytologia* 74: 125-127.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, and S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 2007. Principles of Population Genetics. 4th ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. 651 p.
- Jørgensen, S., J. L. Hamrick, and P. V. Wells. 2002. Regional patterns of genetic diversity in *Pinus flexilis* (Pinaceae) reveal complex species history. *Am. J. Bot.* 89: 792-800.
- Ledig, F. T., and M. T. Conkle. 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution* 37: 79-85.
- Ledig, F. T., M. T. Conkle, B. Bermejo-Velázquez, T. Eguiluz-Piedra, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson, and W. S. Dvorak. 1999. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium, and the mating system in *Pinus maximartinezii*. *Evolution* 53: 91-99.
- Ledig, F. T., B. Bermejo-Velázquez, P. D. Hodgskiss, D. R. Johnson, C. Flores-López, and V. Jacob-Cervantes. 2000. The mating system and genic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of Mexico's Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Can. J. For. Res.* 30: 1156-1164.
- Ledig, F. T., M. A. Capó-Arteaga, P. D. Hodgskiss, H. Sbay, C. Flores-López, M. T. Conkle, and B. Bermejo-Velázquez. 2001. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* 88: 1977-1987.
- Ledig, F. T., P. D. Hodgskiss, and V. Jacob-Cervantes. 2002. Genetic diversity, mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martínez. *Conserv. Genet.* 3: 113-122.
- Marshall, D. R., and A. H. D. Brown. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: Frankel, O. H., and J. G. Hawkes (eds). *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge University Press. London, England. pp: 53-80.
- Malusa, J. 1992. Phylogeny and biogeography of the pinyon pines (*Pinus* subsect. *Cembroides*). *Syst. Botany* 17: 42-66.
- Molina-Freaner, F., P. Delgado, D. Piñero, N. Perez-Nasser, and E. Alvarez-Buylla. 2001. Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Can. J. Bot.* 79: 131-138.
- that crossing between related individuals is common. The F_{ST} indicated moderate differentiation, and thus, conservation of one of the populations would be sufficient to preserve most of the genetic diversity. However, it is recommended that the four *P. johannis* populations included in this study be conserved.
- End of the English version—
- ✱
- Montiel-Oscara, D., C. Ramírez-Herrera, G. Ángeles-Pérez, J. López-Upton, y P. A. López. 2013. Variación aloenzimática y tamaño de poblaciones de Haya mexicana (*Fagus grandifolia* subsp. *mexicana*) en la Sierra Madre Oriental. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 413-420.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NFGEL. 2003. Standard operating procedures for starch gel electrophoresis. Forest Service. United States Department of Agriculture, National Forest Genetics Laboratory. Placerville, California, USA. 90 p.
- Parraguirre L., C., J. J. Vargas H., P. Ramírez V., H. S. Azpíroz R., y J. Jasso M. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Rev. Fitotec. Mex.* 25: 279-287.
- Perry, J. P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 231 p.
- Potter, K. M., W. S. Dvorak, B. S. Crane, V. D. Hipkins, R. M. Jetton, W. A. Whittier, and R. Rhea. 2008. Allozyme variation and recent evolutionary history of eastern hemlock (*Tsuga canadensis*) in the southeastern United States. *New Forests* 35: 131-145.
- Robert, M.-F. 1978. Un nouveau pin pignon mexicain: *Pinus johannis* M. F. Robert. *Adansonia, Série 2*, 18: 365-373.
- Romero, A., M. Luna, E. García, and M. F. Passini. 2000. Phenetic analysis of the Mexican midland pinyon pines, *Pinus cembroides* and *Pinus johannis*. *Bot. J. Linn. Soc.* 133: 181-194.
- Romero-Manzanares, A., y E. García-Moya. 2002. Estabilidad y elasticidad de la composición florística de los piñonares de San Luis Potosí, México. *Agrociencia* 36: 243-254.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. México. 30 de diciembre de 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Segunda sección. México, D.F. 78 p.
- Singh, V., P. C. Pande, and D. K. Jain. 2010. Diversity and Systematics of Seed Plants. Global Media, Rastogi Publications. Meerut, India. 574 p.
- Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification. W. H. Freeman. San Francisco, California, USA. 573 p.

- Viveros-Viveros, H., B. L. Tapia-Olivares, C. Sáenz-Romero, J. J. Vargas-Hernández, J. López-Upton, A. Santacruz-Varela, y G. Ramírez-Valverde. 2010. Variación isoenzimática de *Pinus hartwegii* Lindl. en un gradiente altitudinal en Michoacán, México. *Agrociencia* 44: 723-733.
- Wendel, J. F., and N. F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In: Isozymes in Plant Biology*. D. E. Soltis and P. S. Soltis (eds.). Dioscorides Press. Portland, Oregon, USA. pp: 5-45.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354.
- Yeh, F., R. Yang, and T. Boyle. 1997. Popgene. Versión 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Alberta, Canada. 28 p.