

DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Pinus hartwegii* LINDL EN EL EJE NEOVOLCÁNICO TRANSVERSAL Y SIERRA MADRE ORIENTAL EN MÉXICO

GENETIC DIVERSITY IN *Pinus hartwegii* IN THE TRANS-MEXICAN VOLCANIC BELT AND EASTERN SIERRA MADRE IN MEXICO

Karem A. Andrade-Gómez¹, Carlos Ramírez-Herrera^{1*}, Martha Hernández-Rodríguez², Patricia Hernández-de la Rosa¹, Víctor M. Cetina-Alcalá¹ y María E. Cruz-Maya³

¹Colegio de Postgraduados (CP), Posgrado en Ciencias Forestales, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ²CP, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ³Bachillerato Tecnológico de la SEP, Texcoco, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia (kmcramcolpos@gmail.com)

RESUMEN

Las poblaciones de *Pinus hartwegii* se localizan en altitudes aproximadas entre 3000 y 4200 msnm en las montañas de México y Centro América, donde la temperatura es baja en invierno y los cambios ambientales son comunes debido a la actividad humana. La diversidad genética es importante en la adaptación de especies a cambios ambientales. Los marcadores moleculares de ADN son técnicas eficientes para conocer la magnitud de la diversidad genética en una especie. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la diversidad genética de *Pinus hartwegii* en poblaciones y niveles altitudinales en el Eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental usando microsatélites. El ácido desoxirribonucleico se extrajo de follaje que se recolectó de 84 árboles en siete poblaciones en el Eje Neovolcánico Transversal y Sierra Madre Oriental de México. Los árboles de las poblaciones se agruparon en tres niveles altitudinales (<3700, 3700-3900 y >3900 msnm). Se usaron 10 microsatélites del núcleo para estimar el porcentaje de loci polimórficos, número promedio de alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada. El porcentaje promedio de loci polimórficos fue de 77 %. El número promedio de alelos por locus varió de 3.8 a 5.0 entre poblaciones y de 5.2 a 7.8 entre niveles altitudinales. La heterocigosidad observada fluctuó entre 0.250 y 0.400 en poblaciones y de 0.267 a 0.354 entre niveles altitudinales. La heterocigosidad esperada fue de 0.369 a 0.462 entre poblaciones y de 0.448 a 0.482 entre estratos altitudinales. La diversidad genética de *Pinus hartwegii* es suficiente para un potencial evolutivo que permita una mayor probabilidad de adaptación de esta especie a cambios ambientales en las poblaciones estudiadas en el Eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental de México.

Palabras clave: *Pinus hartwegii*, alelo, heterocigosidad, loci, locus, microsatélite.

SUMMARY

Population of *Pinus hartwegii* are located at approximate altitudes between 3000 and 4200 masl in the mountains of Mexico and Central America, where Winter temperatures are low and environmental changes are common due to human activity. Genetic diversity is important in the adaptation of species to environmental changes. DNA molecular markers are efficient techniques for knowing the magnitude of genetic diversity in a species. Thus, the objective of this study was to estimate the genetic diversity in *Pinus hartwegii* in population and altitudinal levels in the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Eastern Sierra Madre using microsatellites. Deoxyribonucleic acid was extracted from foliage collected from 84 trees in seven populations from the Trans-Mexican Volcanic Belt and Eastern Sierra Madre of Mexico. Trees were

grouped into three altitudinal levels (<3700, 370-3900 and >3900 masl). Ten nuclear microsatellites were used to estimate the percentage of polymorphic loci, mean number of alleles per locus, observed and expected heterozygosity. The mean percentage of polymorphic loci was 77 %. The average number of alleles per locus varied from 3.8 to 5.0 between populations and from 5.2 to 7.8 between altitudinal levels. The observed heterozygosity ranged between 0.250 and 0.400 between populations and from 0.267 to 0.354 between altitudinal levels. The expected heterozygosity was from 0.369 to 0.462 among populations and from 0.448 to 0.482 among altitudinal strata. Genetic diversity in *Pinus hartwegii* is sufficient for an evolutionary potential that allows a greater probability of adaptation of this species to environmental changes in the populations studied in the Trans-Mexican Volcanic Belt and Eastern Sierra Madre of Mexico.

Index words: *Pinus hartwegii*, allele, heterozygosity, loci, locus, microsatellite.

INTRODUCCIÓN

Los bosques son ecosistemas de importancia ecológica, económica y social (Pérez-Suárez *et al.*, 2022); sin embargo, la extracción de madera, hongos y musgo para el bienestar humano, aunado a perturbaciones como los incendios y la proliferación de plagas influyen en la fragmentación y degradación del hábitat, junto con la pérdida de biodiversidad (Olokeogun, 2022). Ante el escenario de cambio climático presente y futuro, estos factores ponen en riesgo la resiliencia, y por tanto, la permanencia de *Pinus hartwegii* Lindl. (Astudillo-Sánchez *et al.*, 2017), una especie dominante en los ecosistemas de montaña alta, aproximadamente entre los 3000 y 4200 msnm, tolerante a temperaturas bajas en invierno, así como a la presencia de heladas, donde se espera un aumento de temperatura debido al cambio climático (Endara-Agramont *et al.*, 2013). A lo anterior se suma la distribución discontinua que provoca el aislamiento poblacional de esta especie (Alfaro-Ramírez *et al.*, 2020), por lo que la continuidad en el ecosistema podría estar sujeta a la adaptabilidad de esta a cambios ambientales que podrían llevar a la extinción de

algunas poblaciones de la especie (Alfaro-Ramírez *et al.*, 2020; Chávez-Aguilar *et al.*, 2022).

Los genes (secuencias de ADN) contienen la información hereditaria requerida para el desarrollo y metabolismo de los organismos (Krebs *et al.*, 2018). Comúnmente, el número de genes es el mismo en todos los individuos de una especie (Krebs *et al.*, 2018); sin embargo, un gen tiene diferentes formas conocidas como alelos, que son responsables de la diversidad genética de los individuos en poblaciones de la misma especie (Neale y Wheeler, 2019). La diversidad genética se estima identificando los alelos diferentes en cada organismo de una especie por población para posteriormente calcular diferentes estimadores de diversidad como porcentaje de loci polimórficos, número de alelos por locus y heterocigosidad (Neale y Wheeler, 2019). La diversidad de alelos confiere características que permiten que los individuos puedan adaptarse a condiciones ambientales diferentes (Potter *et al.*, 2017), por lo que una diversidad genética mayor implica una mayor posibilidad para que una especie pueda evolucionar en un periodo largo.

Varios tipos de marcadores moleculares se usan para estimar la diversidad genética en organismos (White *et al.*, 2007), siendo los marcadores de ADN útiles para valorar el polimorfismo genético a través del registro de las diferencias en el ADN de los individuos (Neale y Wheeler, 2019). El uso de microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs) es común debido a que se pueden encontrar a lo largo del genoma de un organismo y son codominantes y neutros a la selección (Vignes y Rivallan, 2021). Estos marcadores son manipulables, veraces y reproducibles (Vieira *et al.*, 2016). Consecuentemente, los iniciadores de los microsatélites desarrollados para una especie se pueden usar en otra especie del mismo género o géneros cercanos (Neale y Wheeler, 2019); por ejemplo, iniciadores de SSR desarrollados para *Pinus radiata* D. Don y *P. taeda* L. se han usado en diversas especies como *P. oocarpa* Schiede ex Schltdl., *P. tecunumanii* Eguluz et Perry y *P. patula* Schltdl. et Cham. (Dvorak *et al.*, 2009; Méndez-Neri *et al.*, 2020).

Existe información limitada sobre la diversidad genética de *Pinus hartwegii* estimada a través de marcadores morfológicos y moleculares (Andrade-Gómez *et al.*, 2021; Viveros-Viveros *et al.*, 2010), y esta es nula con marcadores moleculares del núcleo (SSRn); además, información sobre diversidad genética es importante para diseñar estrategias de conservación (Frankham, 2010). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad genética de *Pinus hartwegii* en poblaciones y estratos altitudinales en el Eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental de México usando microsatélites. La hipótesis

es que se espera una diversidad genética alta en todas las poblaciones y estratos altitudinales debido a que los árboles de esta especie se reproducen sexualmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y recolecta de muestras

Una de las poblaciones de *Pinus hartwegii* bajo estudio se ubicó en la Sierra Madre Oriental y seis en el Eje Neovolcánico Transversal de México, donde se muestrearon poblaciones en el centro y en los extremos de este macizo montañoso (Cuadro 1, Figura 1). El número de poblaciones de esta especie es desconocido a lo largo de la distribución natural en la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Eje Neovolcánico, Sierra Madre del Sur en México, y en las montañas de mayor altitud en Guatemala, El Salvador y Honduras (Perry, 1991). Las coordenadas y altitud se registraron por población y para cada árbol donde se recolectó follaje. Los árboles de todas las poblaciones se agruparon en tres estratos para el análisis altitudinal. El primero se formó con los árboles que se localizan a una altitud menor de 3700 msnm, este formó un grupo que presentó 35 individuos, de los cuales tres corresponden a la población de Nauhcampatépetl, uno a Citlaltépetl, siete a Tlalotépetl, 11 al Cerro del Potosí, dos al Zapotépetl y 11 de Chichinauhtzin. El segundo grupo se integró con 34 árboles que se ubicaron entre 3700 y 3900 msnm, correspondientes a Nauhcampatépetl, con cinco individuos, cuatro de Citlaltépetl, seis de Tlalotépetl, uno del Cerro del Potosí, seis de Zapotépetl y 12 de Xocotépetl, mientras que el tercer grupo se estableció con 15 árboles localizados en una altitud mayor de 3900 msnm, cuatro de Nauhcampatépetl, siete de Citlaltépetl y cuatro de Zapotépetl.

Se incluyeron muestras de follaje joven de 12 árboles en promedio por población (Cuadro 1). Se seleccionaron árboles separados por al menos 50 m en distancia vertical para minimizar el parentesco. Las acículas se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas con un número consecutivo y el nombre de la población para el transporte sobre hielo en cajas de plástico. El follaje se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio de marcadores moleculares del Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados.

Extracción de ADN, amplificación por PCR y electroforesis

El ácido desoxirribonucleico (ADN) se extrajo de una muestra de 200 mg de tejido joven por individuo, utilizando el método del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)

Cuadro 1. Ubicación geográfica y estrato altitudinal de siete poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental de México.

Montaña	Estado	No. de árboles	Coordenada de referencia		Estrato altitudinal (msnm)
			Longitud	Latitud	
Nauhcampatépetl (Na)	Veracruz	12	-97.1615	19.5068	3590 - 3940
Citlaltépetl (Ci)	Veracruz	12	-97.2940	18.9885	3640 - 4140
Tlalotépetl (TI)	México	13	-98.7273	19.4071	3500 - 4000
Chichinautzin (Ch)	Ciudad de México	11	-99.0834	19.0772	3000 -3050
Xocotépetl (Xo)	México	12	-99.7667	19.7412	3700 - 3800
Zapotépetl (Za)	Jalisco	12	-103.6173	19.5782	3620 - 4000
Cerro El Potosí (Pot)	Nuevo León	12	-100.2266	24.8810	2980 - 3720

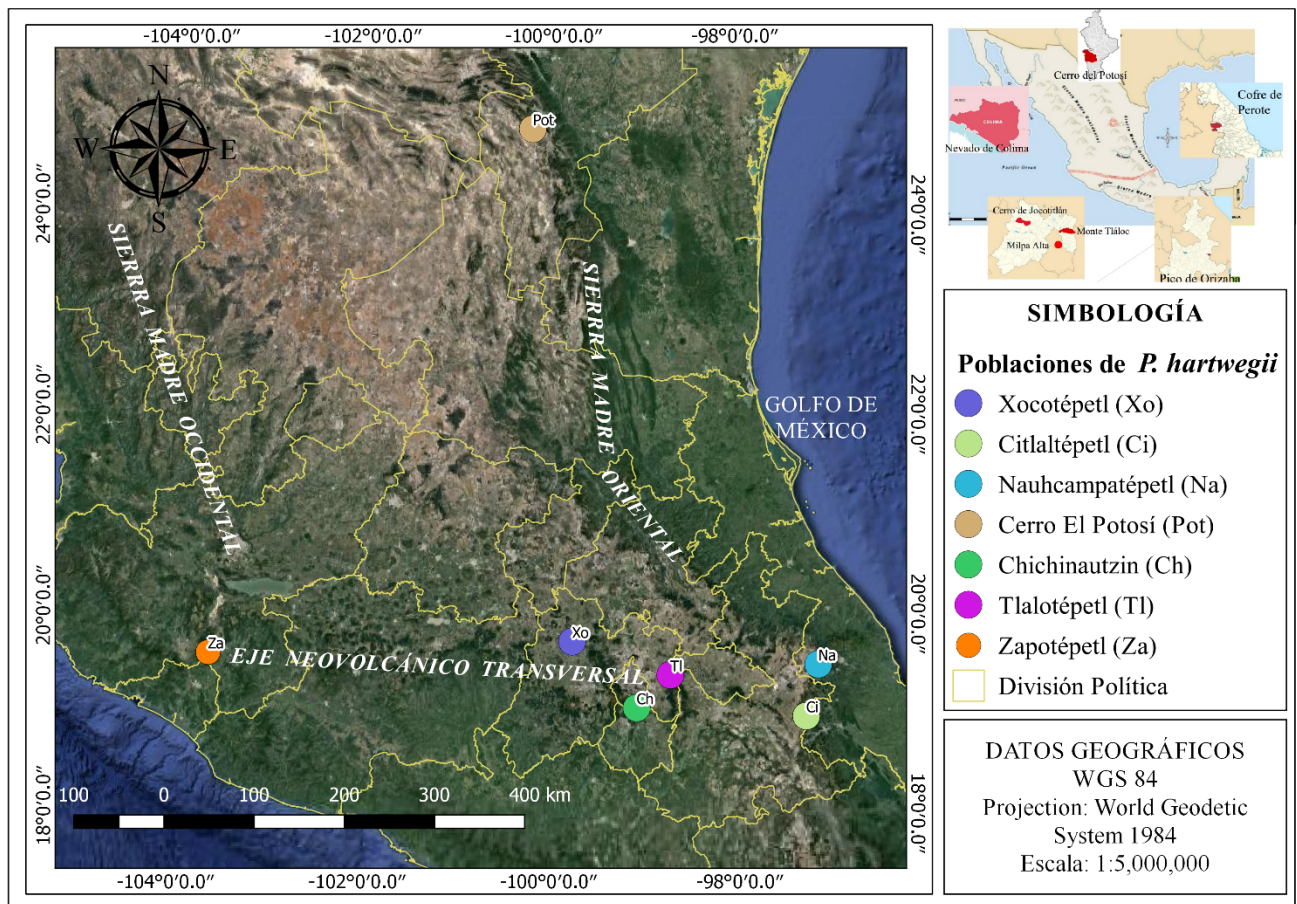


Figura 1. Ubicación geográfica de siete poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental de México.

(Doyle y Doyle, 1990). El tejido fresco fue macerado en morteros de porcelana (Mod. PW-35, CHE Scientific®, Hong Kong), agregando nitrógeno líquido, 10 mg de polivinilpirrolidona (PVP40) (Sigma-Aldrich®) y 10 mg de ácido cítrico (Sigma®) hasta obtener un polvo fino que se colocó en tubos Eppendorf de 2.0 mL (Axygen™), previamente identificados con el nombre de la población y número de muestra. Se añadió a cada muestra 1 mL de la solución de lisis [EDTA 0.025 M pH 8.0, Trizma-HCL 0.15 M pH 7.5, NaCl 1.5 % (w/v) y bromuro de cetiltrimetilamonio 3.5 % (w/v)]. Las muestras fueron incubadas en baño maría a 60 °C por 1 h con inversión lenta de los tubos Eppendorf cada 15 min; posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 min. Se agregaron 500 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), y se mezcló por inversión constante de los tubos Eppendorf por 10 min. Las muestras se centrifugaron a 11,500 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL (Axygen™), donde se agregó isopropanol (0.5 volúmenes) para precipitar el ADN. Las muestras se almacenaron a -20 °C entre 48 y 72 h; después, se centrifugaron a 11,500 rpm por 10 min. La parte acuosa se decantó cuidadosamente para evitar perder la pastilla y después se agregó 1 mL de etanol 70 %. Los tubos Eppendorf se invirtieron suavemente para posteriormente centrifugar a 8000 rpm por 5 min para el lavado del pellet de ADN. Se decantó la solución y se dejó secar la pastilla por 2 h; luego, se resuspendió el pellet en 30 µL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM, pH 8.0). Se cuantificó el ADN con un espectrofotómetro ultravioleta (UV) visible completo (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA). La pureza se determinó con la relación de absorbancias (A260/A280). Se diluyó el ADN en TE 1X hasta alcanzar una concentración de 20 ng µL⁻¹ y se almacenó a -20 °C. La integridad del ADN se corroboró en geles de agarosa 1 %.

Se utilizaron 10 iniciadores de microsatélites (SSR) que se desarrollaron para *Pinus radiata* y *P. taeda* (Elsik *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 1998). La amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador PCR System 9700 (GeneAmp®, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). La PCR se realizó en 15 µL de volumen de reacción que contenía 40 ng de ADN genómico, 0.4 µM de iniciadores hacia adelante y reversible, 0.2 mM dNTPs, 1X Taq buffer, 2 mM MgCl₂ y 1 unidad de Taq ADN polimerasa. El termociclador PCR System 9700 se programó para la ejecución de la reacción con el siguiente protocolo: 15 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización), 1 min de 55 a 64.3 °C en función del iniciador (hibridación), 1 min a 72 °C (extensión), seguido por 15 min de extensión final a 72 °C, finalizando con 8 °C por tiempo indefinido. Los productos de la PCR se analizaron en geles verticales de poliacrilamida. Los alelos

se analizaron con el programa PowerMarker V3.25 (Liu y Muse, 2005).

Análisis de datos

Tanto para poblaciones como para estratos altitudinales, se estimaron el porcentaje de loci polimórficos (P), número promedio de alelos por locus (A), alelos privados (A_p), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y el índice de fijación o índice de endogamia (F) con el programa GenAEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Un locus se consideró polimórfico cuando se detectaron al menos dos alelos. Si un alelo se encontró únicamente en una población se consideró como alelo privado de esa población (Neale y Wheeler, 2019). El porcentaje de loci polimórficos puede variar de 0 a 100 %; derivado de esto, valores del estimador de 0 a 33 % se consideraron bajos, mientras que valores entre 33 y 66 % como intermedios, y valores superiores a 66 % se interpretaron como polimorfismos altos. Los valores de heterocigosidad observada pueden variar entre 0 y 1, por lo que se consideró una heterocigosidad baja cuando el valor de esta fue menor o igual a 0.333, mientras que, cuando el valor de heterocigosidad observada varió entre 0.333 y 0.666 se consideró como heterocigosidad observada intermedia. Valores mayores de 0.666 de este indicador de diversidad genética fueron considerados como heterocigosidad observada alta. El valor máximo de heterocigosidad esperada se determina con base en el número de alelos en el locus y que las frecuencias de éstos sean las mismas; es decir, el valor de heterocigosidad esperada está influenciado por la diferencia en la frecuencia de los alelos en cada loci. Por lo anterior, una heterocigosidad baja se consideró cuando el valor de heterocigosidad esperada fue menor o igual a un tercio del valor máximo de esta; una heterocigosidad esperada intermedia cuando el valor fue mayor de un tercio, pero menor o igual a dos tercios del valor máximo, mientras que una heterocigosidad alta fue cuando el valor de esta fue mayor de dos tercios del valor máximo que puede alcanzar este indicador. El índice de fijación puede variar entre -1 y 1, valores entre -1 y 0 indican un exceso de heterocigotos, mientras de valores de 0 a 1 muestran un déficit de heterocigotos (Hartl y Clark, 2007).

RESULTADOS

Diversidad genética en poblaciones

Los porcentajes mayores de loci polimórficos en *Pinus hartwegii* se encontraron en las poblaciones en Nauhcampatépetl, Citlaltépetl, Tlalotépetl, Chichinautzin y Xocotépetl, mientras que los porcentajes menores de loci polimórficos se hallaron en Zapotépetl y Cerro El Potosí

(Cuadro 2). El número promedio mayor de alelos por locus se encontró en la población de *P. hartwegii* en el Tlalotépetl; en contraste, el número promedio menor de alelos por locus se registró en la población de Nauhcampatépetl. También, el número mayor de alelos privados se halló en la población del Tlalotépetl; por otro lado, el número promedio menor se registró en las poblaciones de *P. hartwegii* en el Nauhcampatépetl y Citlaltépetl (Cuadro 2).

Entre las poblaciones, la mayor y menor heterocigosidad observada se hallaron en el Tlalotépetl y Nauhcampatépetl, respectivamente. La mayor heterocigosidad esperada se encontró en las poblaciones de esta especie en Chichinautzin y Cerro El Potosí, mientras que la menor heterocigosidad se halló en la población en el Nauhcampatépetl. El mayor índice de fijación, o índice de endogamia, se presentó en la población en el Citlaltépetl y el menor en la población en el Tlalotépetl. Un déficit de heterocigotos se encontró en todas las poblaciones.

Diversidad genética en estratos altitudinales

El porcentaje mayor de loci polimórficos se presentó en los árboles en los estratos altitudinales menores de 3700 y entre 3700 y 3900 msnm, mientras que el porcentaje menor se encontró en los árboles que crecen en el estrato altitudinal mayor de los considerados en el presente estudio (Cuadro 3). El número promedio de alelos por locus fue similar en los árboles en los dos estratos altitudinales inferiores de 3900 msnm; además, se encontraron alelos privados en los árboles en los tres estratos altitudinales; sin embargo, el número mayor de este tipo de alelos se

registró en el estrato altitudinal menor de 3700 msnm. La heterocigosidad observada fue mayor en los árboles en el estrato altitudinal menor de los 3700 msnm, mientras que esta fue menor en el estrato altitudinal mayor de 3900 msnm. La heterocigosidad esperada fue mayor en los árboles en el estrato altitudinal entre 3700 y 3900 msnm, y esta fue menor en los individuos en el estrato altitudinal arriba de los 3900 msnm. Los índices de fijación fueron valores positivos en los árboles en los tres estratos altitudinales (Cuadro 3). El índice mayor de fijación se registró en los árboles en el estrato altitudinal sobre 3900 msnm; en contraste, el índice menor de fijación se halló en los árboles en el estrato altitudinal menor de 3700 msnm. Un déficit de heterocigotes se registró en los tres niveles altitudinales.

DISCUSIÓN

El porcentaje de loci polimórficos mostró una diversidad genética alta para las poblaciones y estratos altitudinales en *P. hartwegii*. El máximo porcentaje de loci polimórficos es 100 % para cualquier especie (Neale y Wheeler, 2019). La mayoría de las especies que se reproducen sexualmente y con cruzamiento libre, como es el caso de *P. hartwegii*, tienen niveles altos de diversidad genética debido a la recombinación del ADN que se presenta en la meiosis cuando se forman las células que originan los gametos (Krebs *et al.*, 2018). La información es nula sobre el porcentaje de loci polimórficos como estimador de diversidad genética para esta especie utilizando secuencias simples repetidas en tadem (SSR) o microsatélites del núcleo; sin embargo, también el

Cuadro 2. Estimadores de diversidad genética (± error estándar) para siete poblaciones de *Pinus hartwegii* en el Eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental de México.

Población	P† (%)	Número de alelos		Heterocigosidad		Índice de fijación
		Promedio	Privados	Observada	Esperada	
Nauhcampatépetl	80	3.8 ± 0.7	2	0.250 ± 0.066	0.369 ± 0.085	0.266 ± 0.106
Citlaltépetl	80	4.4 ± 1.2	2	0.258 ± 0.094	0.422 ± 0.097	0.403 ± 0.138
Tlalotépetl	80	5.0 ± 1.3	6	0.400 ± 0.099	0.424 ± 0.096	0.028 ± 0.108
Chichinautzin	80	4.6 ± 0.8	4	0.382 ± 0.092	0.462 ± 0.102	0.141 ± 0.073
Xocotépetl	80	4.1 ± 0.9	3	0.300 ± 0.090	0.398 ± 0.106	0.218 ± 0.127
Zapotépetl	70	4.7 ± 1.0	3	0.367 ± 0.109	0.427 ± 0.111	0.153 ± 0.083
Cerro El Potosí	70	4.6 ± 1.0	4	0.350 ± 0.101	0.462 ± 0.116	0.288 ± 0.076
Promedio	77.14	4.5 ± 0.3	3.4	0.330 ± 0.035	0.423 ± 0.037	0.214 ± 0.040

†P es el porcentaje de loci polimórficos.

Cuadro 3. Diversidad genética (\pm error estándar) en niveles altitudinales de *Pinus hartwegii* en el Eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental de México.

Estrato altitudinal (msnm)	P ⁺ (%)	Número de alelos		Heterocigosidad		Índice de fijación
		Promedio	Privados	Observada	Esperada	
<3700	80	7.8 \pm 1.867	13	0.354 \pm 0.085	0.482 \pm 0.110	0.223 \pm 0.071
3700 - 3900	80	7.6 \pm 1.661	7	0.332 \pm 0.086	0.492 \pm 0.105	0.298 \pm 0.094
>3900	70	5.2 \pm 1.236	3	0.267 \pm 0.084	0.448 \pm 0.104	0.427 \pm 0.101

⁺P es el porcentaje de loci polimórficos.

porcentaje de loci polimórficos en *P. hartwegii* varía entre 86 y 100 % utilizando isoenzimas (Iglesias y Luna, 2008; Solís e Iglesias, 2001; Viveros-Viveros *et al.*, 2010). Las diferencias en los porcentajes de loci polimórficos son comunes y no comparables utilizando diferentes marcadores moleculares debido a que estos pueden evaluar la diversidad en secciones diferentes del genoma de una especie (Neale y Wheeler, 2019); por ejemplo, las isoenzimas solo son útiles para evaluar la diversidad que corresponde a los exones de un gen y constituyen el 1 % del genoma de la mayoría de las especies (Krebs *et al.*, 2018), mientras que los microsatélites se distribuyen a lo largo del genoma del ADN (Neale y Wheeler, 2019).

Un porcentaje de loci polimórficos pequeño (31 %) se reporta para esta especie utilizando microsatélites del cloroplasto (Arzate-Fernández *et al.*, 2016), esto se entiende porque el genoma del cloroplasto es muy pequeño y la recombinación es ausente en relación con el genoma del núcleo (Daniell *et al.*, 2016; Krebs *et al.*, 2018). Por otro lado, el porcentaje de loci polimórficos para *P. hartwegii* es menor que los valores estimados con los mismos microsatélites para *P. oocarpa* (100 %), *P. tecunumanii* (100 %) y *P. patula* (100 %) (Dvorak *et al.*, 2009; Méndez-Neri *et al.*, 2020). El porcentaje menor en *P. hartwegii* se puede deber al tamaño de muestra que se incluyó en la presente investigación, debido a que esta especie, al igual que *P. oocarpa* y *P. patula*, tiene una distribución amplia (Perry, 1991); sin embargo, se incluyeron 84 individuos de siete poblaciones en la distribución natural de *P. hartwegii*, mientras que alrededor de 500 árboles en 51 poblaciones se seleccionaron a lo largo de la distribución natural de *P. oocarpa* (Dvorak *et al.*, 2009). En estudios genéticos de poblaciones el tamaño de muestra es controversial, este puede ser bajo si las poblaciones son pequeñas, o bien, será necesario una muestra mayor si la población es grande y diversa; sin embargo, Hale *et al.* (2012) y Kalinowski (2005) argumentaron que 20-30 individuos son suficientes para determinar la diversidad y diferenciación genética de una población.

También, el número promedio de alelos por locus indican una diversidad genética alta en las poblaciones y diferentes niveles altitudinales de *P. hartwegii* bajo estudio. La mutación es la fuerza evolutiva que genera alelos nuevos, por lo que es la responsable de generar diversidad genética *de novo* (Krebs *et al.*, 2018). Un número alto de alelos por locus es común en microsatélites (Neale y Wheeler, 2019); por ejemplo, con los microsatélites empleados en la presente investigación, en cinco de estos se obtuvieron números promedios de alelos por locus de 3.8 y 3.6 para árboles en áreas semilleras de *P. pseudostrobus* Lindl. y *P. montezumae* Lamb., respectivamente (Delgado *et al.*, 2013), mientras que el número promedio de alelos por locus fue 8.9 considerando siete loci de microsatélites en clones de *P. patula* en dos huertos semilleros (Méndez-Neri *et al.*, 2020); sin embargo, el número promedio de alelos es bajo para otros marcadores moleculares; por ejemplo, los números promedio de alelos por locus fueron 2.8 y 1.9 analizando loci de isoenzimas (Solís e Iglesias, 2001; Viveros-Viveros *et al.*, 2010) en *P. hartwegii*. Regularmente, la diversidad genética de una especie es subestimada cuando se usan las proteínas como indicadores de diversidad debido a que no es posible detectar mutaciones en tripletes que codifican para aminoácidos sinónimos (Krebs *et al.*, 2018).

La presencia de alelos privados indica diferenciación poblacional en *P. hartwegii*, lo que sugiere una opción a futuro sobre el estudio de este tipo de alelos como marcadores genéticos poblacionales (Neale y Wheeler, 2019); además, los alelos privados o exclusivos deben ser considerados cuando se presentan estrategias de conservación de una especie debido a que la pérdida de éstos puede poner en riesgo la adaptación de una especie a cambios ambientales (Schierenbeck, 2017). El número de alelos privados o exclusivos en las poblaciones en El Tlalotépetl de *P. hartwegii* es similar en este tipo de alelos en áreas semilleras de *P. pseudostrobus* (cinco alelos privados) y *P. montezumae* (cuatro alelos privados) donde también se analizaron cinco de los mismos iniciadores del núcleo (Delgado *et al.*, 2013) que se estudiaron en

la presente investigación; sin embargo, se presentan especies con un número reducido de alelos privados de loci de microsatélites en *P. douglasiana* Martínez (tres alelos privados), *P. pseudostrobus* (dos alelos privados) y *P. oocarpa* (dos alelos privados) (Ramírez *et al.*, 2019). El número alto de alelos privados en los árboles de *P. hartwegii* localizados en cada uno de los tres niveles altitudinales se debe considerar y tener presente para evitar el movimiento indiscriminado o migración asistida de plantas que se producen con semillas y que tienen origen en diferentes altitudes, debido a que algunos alelos exclusivos pueden estar sujetos a selección por las condiciones ambientales diferentes en cada altitud, lo que complicaría el establecimiento y desarrollo de plantas que no sean colocadas en el estrato altitudinal de donde fue recolectado el germoplasma (Andrade-Gómez *et al.*, 2021), por lo que la presencia de alelos privados representa para las especies un reservorio de diversidad genética para la adaptación local, resistencia contra plagas y enfermedades, o bien como amortiguador del calentamiento global (Dvorak, 2012). Por tanto, en el manejo forestal no se recomienda mover planta entre niveles altitudinales hasta que se genere la información donde se pruebe que este tipo de alelos no está asociado con adaptación a condiciones ambientales diferentes.

La diversidad genética en *P. hartwegii* es moderada, con base en la heterocigosidad observada; sin embargo, la heterocigosidad observada es mayor que el valor $H_o = 0.08$ que se reporta para esta especie con el uso de isoenzimas (Viveros-Viveros *et al.*, 2010). La diferencia en el valor de heterocigosidad observada es por las limitaciones para detectar la presencia de alelos con el uso de aloenzimas (Neale y Wheeler, 2019). La heterocigosidad observada para *P. hartwegii* en el presente estudio es similar que para *P. montezumae* ($H_o = 0.34$) y *P. pseudostrobus* ($H_o = 0.38$) con el uso de loci de microsatélites (Ramírez *et al.*, 2019). Resultados similares se mencionan en *P. remota* D.K. Bailey & Hawksw ($H_o = 0.37$) con loci de microsatélites (González *et al.*, 2021).

La heterocigosidad esperada es aquella que se espera con base en el principio de Hardy-Weinberg (Hartl y Clark, 2007), e indica una diversidad genética moderada para *P. hartwegii*. Solís e Iglesias (2001) reportaron una heterocigosidad esperada ($H_e = 0.45$), similar a la de isoenzimas que presentó *P. hartwegii* en la presente investigación, aunque los microsatélites e isoenzimas son marcadores que evalúan partes diferentes de un genoma (Neale y Wheeler, 2019). En comparación con otros estudios realizados con el uso de microsatélites de núcleo, la heterocigosidad esperada para *P. hartwegii* es similar al valor que se reporta para *P. remota* ($H_e = 0.56$), especie con poblaciones dispersas y fragmentadas (González *et al.*,

2021), *P. pseudostrobus* ($H_e = 0.52$) y *P. montezumae* ($H_e = 0.51$) (Ramírez *et al.*, 2019). Valores superiores se reportan para *P. oocarpa* ($H_e = 0.70$), *P. tecunumanii* ($H_e = 0.68$) y *P. patula* ($H_e = 0.60$) (Dvorak *et al.*, 2009). Una diversidad genética alta puede ser útil para aumentar la posibilidad de supervivencia y tolerancia a plagas y enfermedades, así como la capacidad de adaptación de la descendencia a cambios ambientales (Neale y Wheeler, 2019).

Los valores de los índices de fijación, o endogamia, reflejan un déficit de heterocigotos en las poblaciones y niveles altitudinales para *P. hartwegii*, por lo que la autofecundación y cruzamiento entre individuos emparentados pueden estar ocurriendo (White *et al.*, 2007). El valor máximo de endogamia es igual a 1.0 cuando solo se presenta la autofecundación en una especie (White *et al.*, 2007). Niveles altos de endogamia son una de las principales causas que pueden llevar a la extinción de poblaciones y especies como consecuencia de la depresión endogámica por la acción de alelos deletéreos en estado homocigótico (Frankham, 2010). En este estudio el índice de fijación indica una endogamia de moderada a baja en las poblaciones y estratos altitudinales. Una densidad baja en el nivel altitudinal mayor puede ser la causa de una autofecundación mayor (Rajora y Mosseler, 2001; White *et al.*, 2007). Aunque, los microsatélites son marcadores neutros, el déficit de heterocigotos indica que la selección disruptiva puede estar favoreciendo a individuos homocigotos diferentes (Frankham *et al.*, 2002), manteniendo una diversidad genética moderada en *P. hartwegii*, con base en la heterocigosidad esperada. El índice de endogamia para *P. hartwegii* es semejante a los valores de 0.304 y 0.361 que se reportaron con el uso de isoenzimas (Viveros-Viveros *et al.*, 2010; Viveros-Viveros *et al.*, 2014). Índices de endogamia similares se han reportado para *P. pseudostrobus* ($F = 0.25$) y *P. montezumae* ($F = 0.34$) con el uso de microsatélites del núcleo (Ramírez *et al.*, 2019). Dvorak *et al.* (2009) y Méndez-Neri *et al.* (2020) mencionaron índices de fijación de 0.15 y 0.05, respectivamente, para *P. patula*.

La diversidad genética es moderada en las poblaciones y estratos altitudinales incluidos en el presente estudio, por lo que el aislamiento poblacional de la especie limita el intercambio genético; por lo tanto, la hipótesis planteada no se cumplió del todo.

CONCLUSIONES

Los individuos en las poblaciones y estratos altitudinales de *P. hartwegii* presentan niveles suficientes de diversidad genética para que los árboles en las poblaciones de esta especie tengan el potencial evolutivo para una mayor probabilidad de adaptación ante los cambios

ambientales. La presencia de alelos privados es común en las poblaciones y niveles altitudinales de esta especie, mientras que los índices de endogamia o fijación fueron bajos tanto en las poblaciones como en los estratos altitudinales, con excepción de El Citlaltépetl y en el estrato altitudinal mayor.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al CONAHCYT (SECIHTI) por el apoyo otorgado por medio de la beca nacional 856459. También se agradece al Colegio de Postgraduados por el financiamiento de la investigación a través del Programa E001, Subprograma 52 proyecto 02; además, se agradece al M. C. Bernabe Colohua Citlaltépetl y al M. C. José Villa Castillo por facilitar el trabajo de recolecta de material vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro-Ramírez F. U., J. E. Ramírez-Albores, J. J. Vargas-Hernández, S. Franco-Maass and M. Pérez-Suárez (2020) Potential reduction of Hartweg's pine (*Pinus hartwegii* Lindl.) geographic distribution. *PLoS ONE* 15:e0229178, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229178>
- Andrade-Gómez K. A., C. Ramírez-Herrera, J. López-Upton, M. Jiménez-Casas y R. Lobato-Ortiz (2021) Indicadores reproductivos en dos poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* Lindl. *Revista Fitotecnia Mexicana* 44:183-189, <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.183>
- Arzate-Fernández A. M., G. Gutiérrez-González y R. L. Heredia-Bobadilla (2016) Diversidad Genética de Dos Especies de Coníferas en el Nevado de Toluca: Una Alternativa de Conservación. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México, México. 136 p.
- Astudillo-Sánchez C. C., J. Villanueva-Díaz, A. R. Endara-Agramont, G. E. Nava-Bernal y M. A. Gómez-Albores (2017) Influencia climática en el reclutamiento de *Pinus hartwegii* Lindl. del ecotono bosque-pastizal alpino en Monte Tláloc, México. *Agrociencia* 51:105-118.
- Chávez-Aguilar G., G. V. Campos-Ángeles y M. Pérez-Suárez (2022) Estructura y composición del bosque de *Pinus hartwegii* Lindl. en su distribución altitudinal en el Nevado de Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 13:54-76, <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i74.1257>
- Daniell H., C. S. Lin, M. Yu and W. J. Chang (2016) Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology* 17:134, <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>
- Delgado V. P., J. Núñez M., M. C. Rocha G. y H. J. Muñoz F. (2013) Variación genética de dos áreas semilleras de pino establecidas en el estado de Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 4:104-115, <https://doi.org/10.29298/rmcf.v4i18.393>
- Doyle J. J. y J. L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Dvorak W. S. (2012) The strategic importance of applied tree conservation programs to the forest industry in South Africa. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* 74:1-6, <https://doi.org/10.2989/20702620.2012.683635>
- Dvorak W. S., K. M. Potter, V. D. Hipkins and G. R. Hodge (2009) Genetic diversity and gene exchange in *Pinus oocarpa*, a Mesoamerican pine with resistance to the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *International Journal of Plant Science* 170:609-626, <https://doi.org/10.1086/597780>
- Endara-Agramont A. R., R. Calderón-Contreras, G. Nava-Bernal y S. Franco-Maass (2013) Analysis of fragmentation processes in high mountain forests of the Centre of Mexico. *American Journal of Plant Sciences* 4:697-704, <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.43A088>
- Elsik C. G., V. T. Minihan, S. E. Hall, A. M. Scarpa and C. G. Williams (2000) Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43:550-555, <https://doi.org/10.1139/g00-002>
- Fisher P. J., T. E. Richardson and R. C. Gardner (1998) Characteristics of single- and multi-copy microsatellites from *Pinus radiata*. *Theoretical and Applied Genetics* 96:969-979, <https://doi.org/10.1007/s001220050828>
- Frankham R. (2010) Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* 143:1919-1927, <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.05.011>
- Frankham R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. New York, USA. 617 p, <https://doi.org/10.1017/CBO9780511808999>
- González J. A., P. Delgado V., A. Molina S., C. Flores L., J. P. Vargas G. y J. J. García M. (2021) Diversidad genética en poblaciones de *Pinus remota* (Pinaceae) del Noreste de México: evidencias de declinamiento demográfico histórico. *Acta Botánica Mexicana* 128:e1890, <https://doi.org/10.21829/abm128.2021.1890>
- Hale M. L., T. M. Burg and T. E. Steeves (2012) Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS ONE* 7:e45170, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045170>
- Hartl D. L. and A. G. Clark (2007) Principles of Population Genetics. 4th edition. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 652 p.
- Iglesias A. L. G. y M. Luna R. (2008) Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México. *Ecosistemas* 17:115-122.
- Kalinowski S. T. (2005) Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity* 94:33-36, <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800548>
- Krebs J. E., E. S. Goldstein and S. T. Kilpatrick (2018) Lewin's Genes XII. Jones & Bartlett Learning. Burlington, Massachusetts, USA. 3194 p.
- Liu K., M. and S. V. Muse (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21:2128-2129, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282>
- Méndez-Neri M., C. Ramírez-Herrera, J. J. Vargas-Hernández, T. Martínez-Trinidad, J. López-Upton y P. A. López (2020) Diversidad genética en dos huertos semilleros de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. *Revista Fitotecnia Mexicana* 43:113-119, <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.1.113>
- Neale D. B. and N. C. Wheeler (2019) The Conifers: Genomes, Variation and Evolution. Springer. Cham, Switzerland. 590 p, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46807-5>
- Olokeogun O. S. (2022) Understanding the drivers of forest degradation. In: Forest Dynamics and Conservation: Science, Innovations and Policies. M. Kumar, S. Dhyani and N. Kalra (eds.). Springer. Singapore. pp:35-51, https://doi.org/10.1007/978-981-19-0071-6_2
- Peakall R. and P. E. Smouse (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539, <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pérez-Suárez M., J. E. Ramírez-Albores, J. J. Vargas-Hernández and F. U. Alfaro-Ramírez (2022) A review of the knowledge of Hartweg's pine (*Pinus hartwegii* Lindl.): current situation and the need for improved future projections. *Trees* 36:25-37, <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02221-9>
- Perry J. P. (1991) The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 231 p.
- Potter K. M., R. M. Jetton, A. Bower, D. F. Jacobs, G. Man, V. D. Hipkins and M. Westwood (2017) Banking on the future: progress, challenges and opportunities for the genetic conservation of forest trees. *New Forest* 48:153-180, <https://doi.org/10.1007/s11056-017-9582-8>
- Ramírez E. E., P. Delgado V., J. J. García M. y A. Molina S. (2019) Diversidad genética y conservación de pinos nativos de la cuenca del río Cupatitzio, en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias*

- Forestales* 10:4-32, <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i52.410>
- Rajora O. P. and A. Mosseler (2001) Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. *Euphytica* 118:197-212, <https://doi.org/10.1023/A:1004150525384>
- Schierenbeck K. A. (2017) Population-level genetic variation and climate change in a biodiversity hotspot. *Annals of Botany* 119:215-228, <https://doi.org/10.1093/aob/mcw214>
- Solís R. L. Y. y L. G. Iglesias A. (2001) Variación en la composición isoenzimática en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Pico de Orizaba, Veracruz. *Cuadernos de Biodiversidad* 8:4-7, <https://doi.org/10.14198/cdbio.2001.08.01>
- Vieira M. L. C., L. Santini, A. L. Diniz and C. F. Munhoz (2016) Microsatellite markers: what they mean and why are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39:312-328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
- Vignes H. and R. Rivallan (2021) Development of microsatellite markers using next-generation sequencing. In: *Molecular Plant Taxonomy. Methods in Molecular Biology*, Vol. 2222. P. Besse (ed.). Humana. New York, USA. pp:179-186, http://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_11
- 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.
- Viveros-Viveros H., C. Sáenz-Romero, J. J. Vargas-Hernández, B. L. Tapia-Olivares, J. López-Upton, A. Santacruz-Varela y J. Beaulieu (2014) Comparación de Q_{st} vs. F_{st} en poblaciones naturales de *Pinus hartwegii* Lindl. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37:117-127, <https://doi.org/10.35196/rfm.2014.2.117>
- White T. L., W. T. Adams and D. B. Neale (2007) *Forest Genetics*. CABI Publishing. Oxfordshire, UK. 682 p.

