



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Pseudotsuga menziesii*

PAULINA MONTIEL CASTELÁN

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018

Carta de consentimiento de uso de los derechos de autor y de las regalías comerciales de productos de investigación

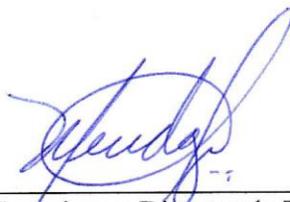
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Paulina Montiel Castelán, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Ma. del Carmen Mendoza Castillo, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Análisis de diversidad genética de Pseudotsuga menziesii

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 25 de Septiembre de 2018



Firma del
Alumno (a)



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

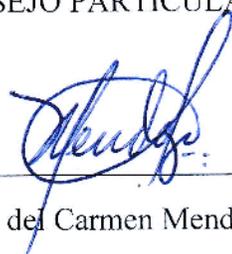
La presente tesis titulada **Análisis de diversidad genética en poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco mediante marcadores SSR** realizada por la alumna **Paulina Montiel Castelán**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



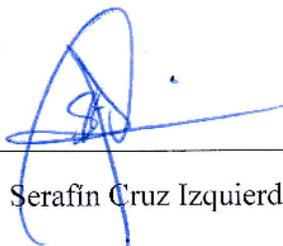
Dra. Ma. del Carmen Mendoza Castillo

DIRECTOR



Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz

ASESOR



Dr. Serafín Cruz Izquierdo

ASESOR



Dr. Javier López Upton

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2018

ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES de *Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO MEDIANTE MARCADORES SSR

Paulina Montiel Castelán, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

Pseudotsuga menziesii es una conífera altamente valorada en el mundo por su importancia económica y ecológica. Se distribuye de manera natural en Norteamérica, pero se le puede encontrar como una especie exótica en Europa y Sudamérica. Las poblaciones naturales en México están en riesgo de desaparecer debido a que son pequeñas, fragmentadas y con manejo inadecuado. La diversidad y estructura genética en las poblaciones mexicanas ha sido estudiada de manera escasa ya que la mayoría de los reportes existentes, se centran en las de Estados Unidos y Canadá.

En el presente estudio se analizaron 13 poblaciones de *P. menziesii* de la región centro de México con 12 pares de marcadores microsatélites con el objetivo de determinar los niveles de diversidad genética y de inferir su estructura genética. Se detectaron niveles de diversidad genética moderados, se identificaron 73 alelos diferentes, el número promedio de alelos por locus fue de $N_a=6$ heterocigosidad observada de $H_o=0.226$ y heterocigosidad esperada de $H_t=0.417$. El coeficiente de diferenciación fue de $\theta=0.270$ y el coeficiente de estructuración de $\Phi_{st}=0.270$, sugiriendo una alta diferenciación genética en las poblaciones analizadas. Estos resultados concuerdan con el análisis de varianza molecular que indica que la mayor variación se encuentra dentro de las poblaciones (73.05 %).

La prueba de Mantel correlacionó las distancias genéticas con las distancias geográficas, aunque esta correlación no fue significativa. Este resultado sugiere que el aislamiento por distancia no ha impactado en la estructura genética de las poblaciones, aunque existen otros factores ambientales que pueden tener impacto en la misma.

Las poblaciones mexicanas mostraron menor diversidad genética en comparación con las reportadas para EE. UU. y Canadá, lo que puede ser resultado de la fragmentación poblacional que limita el flujo génico. El análisis bayesiano de asignación de individuos indicó que el número de grupos genéticos más probable es 2 en las 13 poblaciones. Estos resultados son congruentes con los valores de diversidad genética moderados que deben tomarse en cuenta para el manejo sustentable y conservación de esta conífera.

Palabras clave: aislamiento, diferenciación genética, microsatélites, conservación.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN POPULATIONS of *Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO USING SSR MARKERS

Paulina Montiel Castelán, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Pseudotsuga menziesii is a conifer highly valued in the world for its economic and ecological importance. It is distributed naturally in North America, but it can be found as an exotic species in Europe and South America. Natural populations in Mexico are at risk of disappearing because they are small, fragmented and with inadequate management. The diversity and genetic structure in Mexican populations have been studied sparingly, with the majority of the existing reports focusing on those populations of the United States and Canada.

In the present study, 13 populations of *P. menziesii* from the central region of Mexico were analyzed with 12 pairs of microsatellite markers in order to determine the levels of genetic diversity and infer their genetic structure. Moderate levels of genetic diversity were detected, 73 different alleles were identified, the average number of alleles per locus was $N_a = 6$ observed heterozygosity of $H_o = 0.229$ and expected heterozygosity of $H_t = 0.417$. The differentiation coefficient was $\theta = 0.270$ and the structuring coefficient of $\Phi_{st} = 0.270$, suggesting a high genetic differentiation in the analyzed populations. These results agree with the analysis of molecular variance that indicates that the greatest variation is within the populations (73.05%).

The Mantel test did correlate the genetic distances with the geographic distances. Albeit, this correlation was not significant, suggesting that isolation by distance has not affected the genetic structure of populations. However, other environmental factors could affect the genetic structure.

Mexican populations showed lower genetic diversity values in comparison to those of USA and Canada, which could be the outcome of the limited gene flow among the fragmented populations. The Bayesian analysis of allocation of individuals indicated that the number of genetic groups most likely is two in the 13 analyzed populations. These results are consistent with the values of moderate genetic diversity that should be taken into account for the sustainable management and conservation of this conifer.

Keywords: isolation, genetic differentiation, microsatellites, conservation.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por Comisión Nacional Forestal (**CONAFOR**) a través del proyecto “**Fomento y Operación del Subsistema de Recursos Genéticos Forestales dentro del Centro Nacional de Recursos Genéticos**”.

Laboratorio de ADN y Genómicas del Centro Nacional de Recursos Genéticos (Tepatitlán, Jalisco). Al Dr. Moisés Cortés Cruz por recibirme en el laboratorio y la confianza para culminar el proyecto. Al personal técnico y compañeros del laboratorio, de manera particular al Biol. Isaac Sandoval por la asesoría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por la beca otorgada (CONACYT 714166) dentro del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) durante la realización de mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo**, por ser la institución que me abrió sus puertas para continuar mi formación académica, especialmente al posgrado de Recursos Genéticos y Productividad.

A los miembros del **Consejo Particular**: Dr. Moisés Cortés Cruz, Dra. Ma. del Carmen Mendoza Castillo, Dr. Serafín Cruz Izquierdo, Dr. Javier López Upton, por su tiempo y sus valiosas sugerencias.

Al Dr. **Vidal Guerra de la Cruz** del Campo Experimental Tlaxcala, del INIFAP, por proporcionar el material vegetal analizado en el presente estudio.

DEDICATORIA

A dios por darme vida y fortaleza para culminar.

A mi hija Yunuen, por ser la fuente de motivación para superarme cada día.

A mi esposo Nicolás, por su apoyo incondicional.

A mis Padres Francisco y Feliciano, sin ustedes no lo habría logrado.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVOS	7
1.1.1. Objetivo general	7
1.1.2. Objetivos particulares.....	7
1.2. HIPÓTESIS	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
2.1 Recolección de material vegetal	9
2.2 Aislamiento del material genético	11
2.3 Cuantificación de ADN	12
2.4 Análisis molecular	13
2.5 Análisis de datos	19
2.5.1 Diversidad genética.....	19
2.5.2 Estructura genética	21
III. RESULTADOS	25
3.1 Calidad del ADN	25
3.2 Criba genética	26
3.3 Diversidad genética.....	31
3.4 Diversidad genética, flujo de genes y contenido de información polimórfica por locus.....	33
3.5 Identidad y distancia genética entre las poblaciones	34
3.6 Análisis de Coordenadas Principales	37
3.7 Diferenciación Genética	39
3.8 Análisis de Agrupamiento por el Método UPGMA	41
3.9 Prueba de Mantel	42

3.10 Análisis Bayesiano de Asignación de Individuos.....	42
V CONCLUSIONES.....	53
VI. LITERATURA CITADA.....	54
ANEXOS.....	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ubicación geográfica de las poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* donde se realizaron las recolectas de material de material vegetal. 9
- Figura 2.** Diagrama de flujo de trabajo para la realización de los análisis moleculares. 15
- Figura 3.** Verificación de la integridad del ADN extraído de muestras de individuos de *Pseudotsuga menziesii*..... 25
- Figura 4.** Criba genética inicial para la selección de cebadores a utilizarse en el análisis de diversidad en geles de agarosa 3 %.. 27
- Figura 5.** Perfil de amplificación utilizado para las muestras de ADN de *Pseudotsuga menziesii*. 30
- Figura 6.** Análisis de Coordenadas Principales PCoA. Representación visual de la variabilidad genética de las dos primeras coordenadas, a partir de las distancias genéticas de Nei (1972). 38
- Figura 7.** Dendrograma basado en distancias genéticas (Nei, 1972) entre las poblaciones evaluadas de *Pseudotsuga menziesii*. 41
- Figura 8.** A) Tasa de cambio de segundo orden con respecto a K (ΔK); B) distribución de la probabilidad calculado como $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$ 44
- Figura 9.** Representación gráfica de la estructura genética generada con el software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). 45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Datos geográficos de los sitios de las poblaciones de estudio.	10
Cuadro 2. Lista de los marcadores empleados en la criba genética	16
Cuadro 3. Marcadores seleccionados para el análisis molecular de las poblaciones de estudio.....	29
Cuadro 4. Parámetros de diversidad genética en 13 poblaciones naturales de <i>Pseudotsuga menziesii</i> en estudio.	32
Cuadro 5. Parámetros de diversidad genética, índice de contenido polimórfico e índices de fijación, basados en 12 locus polimórficos de 13 poblaciones de <i>P. menziesii</i>	35
Cuadro 6. Matriz de distancias e identidades genéticas (Nei, 1972) entre las poblaciones de <i>Pseudotsuga menziesii</i>	36
Cuadro 7. Autovalores, varianza explicada y porcentaje acumulado en el análisis de coordenadas principales.....	37
Cuadro 8. Análisis de varianza molecular y estimadores de diferenciación genética...	40
Cuadro 9. Matriz de distancias geográficas entre las poblaciones de <i>Pseudotsuga menziesii</i>	43
Cuadro 10. Proporción de ancestría estimada (Q) para las 13 poblaciones analizadas de <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Pritchard <i>et al.</i> , 2000).....	46

I. INTRODUCCIÓN

El género *Pseudotsuga* Carriere (Pinaceae) se distribuye en el oeste de Norteamérica y el sureste asiático (Farjon, 1990). *Pseudotsuga menziesii* es la especie característica de este género que se distribuye de manera natural en Norteamérica. En México, *P. menziesii* se encuentra en la Sierra Madre Occidental, desde Sonora y Chihuahua hasta Zacatecas; en diferentes localidades montañosas de Coahuila y Nuevo León; en la parte alta de la Sierra de Hidalgo, (Rzedowski y Huerta, 1978), en Guanajuato (Villagómez y Bello, 2015) y Oaxaca (Debreczy y Racz, 1995).

Pseudotsuga menziesii se desarrolla en un intervalo amplio de ambientes. Se reportan plantaciones en gran parte del mundo como una especie exótica, en Europa en el Sur de Alemania (Fussi *et al.*, 2013), Nueva Zelanda y Sudamérica en Argentina y Chile (Hermann y Lavender, 1999; Bastien *et al.*, 2013; van Loo *et al.*, 2015).

El género *Pseudotsuga* es apreciado internacionalmente, por su alta calidad de madera dada por sus propiedades físicas, con durabilidad moderada del duramen y alta uniformidad dimensional, lo que facilita su manejo. La densidad y la rigidez de su madera la hacen apta para uso estructural (Sanchez *et al.*, 2008). Es una de las tres principales especies maderables en América del Norte, pero ha sido fuertemente explotada (Farjon y Filer, 2013).

En México, *P. menziesii* se caracteriza por ser un árbol mediano de 12 a 20 m, que puede llegar a medir hasta 40 m, y presenta gran parecido con individuos del género *Abies*, principalmente *A. religiosa* y *A. duranguensis* (Martínez, 1994). La corteza de los individuos jóvenes es de color marrón y con erupciones de resina, cuando éstos maduran la corteza se vuelve más espesa, rojiza y se divide por fisuras irregulares (USDA, 2002).

Los conos se desarrollan de manera independiente y tienen una bráctea saliente y trífida en cada escama persistente (Martínez, 1994), miden de 7.6 a 10 cm de largo. Las acículas son persistentes hasta por 8 años y están dispersas de forma separada en las ramas, presentan yemas ovoides y agudas. Poseen un haz vascular y tejido lagunoso en el cual se observan cuerpos irregulares de sustancias esclerificadas llamados idioblastos (Martínez, 1994). En promedio, la cosecha de semillas se hace cada 5 ó 7 años (USDA, 2002).

Pseudotsuga menziesii es una conífera perenne y monoica (Pauchard *et al.*, 2008). El ciclo reproductivo, que comienza desde el brote de las yemas hasta la liberación de la semilla, comprende un periodo de 17 meses (Gernandt y Pérez de la Rosa, 2014).

El cariotipo de *P. menziesii* es $2n = 26$ y junto con *Pseudolarix amabilis*, con $2n = 44$, tienen un número diferente al resto de las especies de la familia *Pinaceae* (Neale *et al.*, 2017) ya que éstas tienen 12 pares ($2n = 24$) (Krutovsky *et al.*, 2004). *P. menziesii* contiene dos cromosomas telocéntricos aparentemente diferentes a los 11 restantes, que miden la mitad de los cromosomas metacéntricos, por lo que se sugiere se originaron de la fisión centromérica de unos de los cromosomas metacéntricos (Hermann, 1985).

El pleistoceno fue el momento probable en que evolucionó la actual especie de *P. menziesii* con número cromosómico de $n = 13$. Las pseudotsugas asiáticas y *P. macrocarpa* pueden ser las formas más antiguas ($n = 12$). Los cambios climáticos cíclicos durante el pleistoceno y las migraciones posteriores deben haber resultado en una considerable presión de selección, favoreciendo la evolución de nuevas especies (Hermann, 1985).

En México, las poblaciones de *P. menziesii* se distribuyen de manera reducida, en sitios sombríos y húmedos, preferentemente en laderas de cañadas y barrancas o valles protegidos (Rzedowski y Huerta, 1978), de exposición norte y suelos ácidos con textura franco-arenosa. Forman bosques mezclados principalmente con especies del género *Abies*, *Quercus* y *Pinus* (Ventura *et al.*, 2010), donde *P. menziesii* se presenta como una especie secundaria.

Fases repetidas de expansión y contracción, asociadas con cambios climáticos, ocasionó el asilamiento a largo plazo de las poblaciones de *P. menziesii* (Gugger *et al.*, 2011). La última glaciación, a mediados del pleistoceno, hizo que esta especie migrara hacia el sur, donde los sistemas montañosos en México funcionaron como refugio por su altitud, condiciones frías y húmedas más favorables (Gugger *et al.*, 2011; Gavin *et al.*, 2014).

Las poblaciones de *P. menziesii* se encuentran amenazadas por factores ecológicos, antropogénicos y genéticos. La distribución discontinua y reducida conduce a un alto grado de endogamia, ocasionando la aparición de individuos similares entre sí y reduciendo la variación genética. Cuando los individuos comparten alelos idénticos por descendencia,

pueden presentarse efectos indeseables en algún carácter de rendimiento y expresarse genes recesivos que pueden ser letales en estado homocigótico (Pathania *et al.*, 2017)

Estudios realizados en semillas, particularmente sobre la capacidad de repoblación de las poblaciones, indican la presencia de características perjudiciales, principalmente en las poblaciones del centro del país (Juárez *et al.*, 2006; Mápula *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2008).

La pérdida de diversidad genética se puede dar de manera gradual y pasar desapercibida o darse de manera drástica por alguna catástrofe. Existe reducción de la diversidad cuando se pierden poblaciones genéticamente diferenciadas, cuando hay cambios en la frecuencia de los alelos dentro de la población, o de combinaciones alélicas en la especie (Ahuja y Jain, 2016). Existen cuatro fuerzas principales que pueden afectar la diversidad genética: mutación, migración, selección y deriva génica (Porth y El-Kassaby, 2014). La reducción de la diversidad genética puede aumentar el riesgo en poblaciones naturales que ya están por extinguirse, al disminuir la aptitud individual y la posibilidad de que se adapten a las condiciones de un ambiente cambiante (Frith y Hoelzel, 2016).

La deriva génica ocasiona cambios en la frecuencia de los alelos a través de las generaciones, lo cual puede derivar en la fijación o extinción de alelos, además de que representa una fuente de diferenciación dentro de las poblaciones. La selección puede influir en la diversidad dentro de la población, pero estos efectos dependen de si la población se encuentra en equilibrio o no. La mutación puede contrarrestar la pérdida de diversidad alélica; sin embargo, las mutaciones son raras, y en el caso de que las mutaciones resultaran perjudiciales, la variación producida será eliminada para mantener un valor óptimo estable y eliminar lo inadecuado, a la vez que se ignoran los cambios neutros (Porth y El-Kassaby, 2014; Loewe, 2008). La migración aumenta la heterocigosidad y la riqueza alélica de las nuevas poblaciones, que dependerán del potencial de adaptación (Gustafson, 2017). El flujo génico da forma a la organización de la diversidad genética dentro de las poblaciones (Wright, 1931; Petit *et al.*, 2005).

La diversidad genética juega un papel importante en la conservación y manejo de los recursos genéticos, sobre todo ante los cambios ambientales que puedan presentarse. Se

predice que el cambio climático generará veranos más cálidos y secos e inviernos más cálidos y húmedos, con disminución de la capa de nieve al norte de América para mediados del siglo XXI (Mote y Salathé, 2010; Beedlow *et al.*, 2017). Proyecciones bajo el modelo del cambio climático HAD CM3, sugieren que para el año 2050 las poblaciones mexicanas de *P. menziesii* se reducirán y para 2080, se perderán casi en su totalidad (Gugger *et al.*, 2011). Por lo cual, es necesario establecer estrategias de conservación que permitan mantener la diversidad genética. Las poblaciones mexicanas representan fuente importante de germoplasma para el manejo de la especie, ya que la diversidad de condiciones ambientales en las cuales se encuentran les ha permitido desarrollar mecanismos de supervivencia (Gugger *et al.*, 2011).

Estudiar la biología molecular de las plantas permite conocer la estructura, propiedades y funciones de los componentes moleculares básicos de las células individuales y cómo actúan en la conducción y regulación de procesos, como lo es la transmisión de información genética (Vitale, 2017). La aplicación de técnicas moleculares en el análisis de la diversidad genética puede contribuir a la conservación de especies en peligro de extinción, ya que, en la actualidad, es posible analizar un alto número de loci polimórficos y de individuos al mismo tiempo (Bruford *et al.*, 2017) cuyo resultado, da un panorama de la estructura genética de la población y de su historia evolutiva (Selkoe y Toonen, 2006; Guichoux *et al.*, 2011).

La utilización de las técnicas moleculares para análisis de diversidad en especies forestales, hasta la década de los 90's era muy restringida; sin embargo, con el avance de la tecnología y la reducción de costos, la utilización de estas técnicas se ha hecho más frecuente. De acuerdo con Neale *et al.* (2013) alrededor de 25 especies, en su mayor parte de las familias *Pinaceae*, *Salicaceae*, *Myrtaceae* y *Fagaceae*, están siendo secuenciadas. Sin embargo, la secuenciación del genoma en las coníferas es complicada, debido a su gran tamaño en la mayoría de sus especies, que oscila entre 18 y 35 Gpb (Krutovsky *et al.*, 2004; Holliday *et al.*, 2017). Cinco especies de coníferas de tres géneros han servido de referencia como secuencias genómicas: *Picea abies* 19.6 Gpb (Nystedt *et al.*, 2013; Neale *et al.*, 2017), *Picea glauca* 20.8 Gpb (Birol *et al.*, 2013; Warren *et al.*, 2015; Neale *et al.*, 2017), *Pinus taeda* 20.1 Gpb (Neale *et al.*, 2014; Zimin *et al.*, 2014; Neale, *et al.*, 2017), *Pinus lambertiana*

Dougl. 34.1 Gbp (Stevens *et al.*, 2016; Neale, *et al.*, 2017) y recientemente *Pseudotsuga menziesii* 16.2 Gpb (Neale *et al.*, 2017).

El uso de marcadores moleculares permite estimar parámetros básicos de diversidad genética, cuya información puede ser utilizada con fines de conservación, determinar el tamaño efectivo de la población, identificar cuellos de botella ocasionados por causas naturales o antropogénicas, conocer el origen poblacional, nivel de endogamia y el flujo génico (Hedrick, 2004).

Los marcadores moleculares se pueden clasificar en tres clases: los basados en hibridación, por ejemplo los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); los basados en PCR (Polymerase Chain Reaction) como los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y los SSR (Simple Sequence Repeat); y marcadores basados en secuenciación como son los SNP (Single Nucleotide Polymorphism) que son capaces de detectar variación en la secuencia de ADN en un solo nucleótido (Jiang, 2017).

Los marcadores SSR (o microsatélites) representan una parte del ADN con una, dos, tres o cuatro unidades de nucleótidos, comúnmente de 1 a 5 pares de bases, que se repiten en tándem. Son marcadores genéticos muy útiles, debido a su distribución abundante en el genoma y a su herencia codominante (Marwal *et al.*, 2014; Borem y Fritsche-Neto, 2014). Los marcadores SSR son a menudo derivados de regiones genómicas no codificadoras (Jiang, 2017).

Los motivos de microsatélites más abundantes en *Pseudotsuga* son AG, AC, y ATG (Amarashinge y Carlson, 2002). Cincuenta marcadores microsatélites (10 de repeticiones CA y 40 de repeticiones AG) fueron desarrollados y su transferibilidad fue comprobada en otras especies de coníferas (*Pinus radiata*, *P. contorta*, *Thuja plicata*, *Tsuga heterophylla*, *Picea glauca*, *P. sitchensis*, y *P. engelmannii*) (Amarashinge y Carlson, 2002).

Slavov *et al.* (2004) desarrollaron 22 marcadores SSR altamente polimórficos para *P. menziesii*, 15 de los cuales son útiles para el análisis de huella genética de ADN y análisis de parentesco. Krutovsky *et al.* (2009) infirieron la estructura genética poblacional de 1300

individuos de *Pseudotsuga* en la costa del Pacífico de los estados de Washington y Oregón, a partir de marcadores isoenzimáticos y microsatélites, encontrando un nivel alto de diversidad dentro de las poblaciones y una diferenciación genética baja. Van Loo *et al.* (2015) evaluaron la estructura genética e historia evolutiva de *Pseudotsuga* en 38 poblaciones de Estados Unidos y Canadá; identificando ocho grupos genéticos, al emplear los marcadores diseñados por Slavov *et al.* (2004).

Con los análisis de QTL (loci de caracteres cuantitativos, por sus siglas en inglés) fue posible caracterizar rasgos cuantitativos en *P. menziessi*, como la resistencia al frío. Eckert *et al.* (2009) encontraron 19 genes relacionados a este carácter. Neophytou *et al.* (2016) evaluaron otras características de interés como el crecimiento en altura, a través del uso de marcadores SNP. Wheeler *et al.* (2005), empleando marcadores SNP, reportaron 30 asociaciones genéticas altamente significativas en 12 genes candidatos para 10 caracteres relacionados con la resistencia al frío.

Aunque *P. menziesii* ha sido ampliamente estudiada por su importancia económica y ecológica, en México los estudios son escasos, pues la mayor parte de las investigaciones se han centrado en poblaciones nativas de Estados Unidos y Canadá. Cruz *et al.* (2011) estimaron la diversidad genética en ocho poblaciones del centro y tres poblaciones del norte de México mediante marcadores isoenzimáticos, reportando bajos valores de diversidad genética $H_t = 0.077$ y una diferenciación genética alta $F_{st} = 0.298$. Por su parte, Gugger *et al.* (2011), estudiaron 11 poblaciones de México, dos de éstas ubicadas en el centro de México a partir de ADN de cloroplasto (cpSSR) y ADN mitocondrial (mtDNA); sus resultados sugieren que las poblaciones mexicanas son distintas genéticamente de *P. menziesii* var. *menziesii* nativa de Canadá y Estados Unidos y más afines a la variedad de las Montañas Rocallosas en EE.UU. *P. menziesii* var. *Glauca*.

El presente estudio es pionero en emplear marcadores microsatélites para estimar los parámetros de diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Pseudotsuga* en el centro de México, incluyendo poblaciones de los estados de Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Querétaro.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Estimar los niveles de diversidad y estructura genética en 13 poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (*Pinaceae*) del centro de México, mediante marcadores microsatélites.

1.1.2. Objetivos particulares

- Evaluar la utilidad de los marcadores microsatélites, desarrollados en poblaciones naturales de *P. menziesii* en Estados Unidos, sobre poblaciones mexicanas.
- Estandarizar las condiciones de amplificación de los marcadores microsatélites.
- Realizar análisis moleculares con los marcadores polimórficos identificados.
- Estimar los parámetros de diversidad genética de las poblaciones mexicanas de *P. menziesii* del centro del país.
- Determinar la estructura genética de las poblaciones mexicanas de *P. menziesii*.

1.2. HIPÓTESIS

La distribución natural fragmentada de *P. menziesii* en el centro de México sugiere un alto grado de diferenciación genética, a consecuencia del tamaño reducido de las poblaciones y su bajo flujo génico, resultando en bajos niveles de diversidad genética de las poblaciones estudiadas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de material vegetal

Las muestras de material vegetal fueron recolectadas de 13 poblaciones naturales de *P. menziesii*, localizadas en el centro de México (Figura 1), en los estados de Tlaxcala, Puebla, Querétaro y Veracruz (Cuadro 1). Se recolectaron acículas jóvenes de los individuos de cada población; cada muestra fue identificada y conservada en fresco para su traslado al Laboratorio de ADN y Genómicas del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP, ubicado en Tepatitlán de Morelos, Jalisco. Al momento de su recepción, el material vegetal fue almacenado a -80 °C hasta el momento de su liofilización.

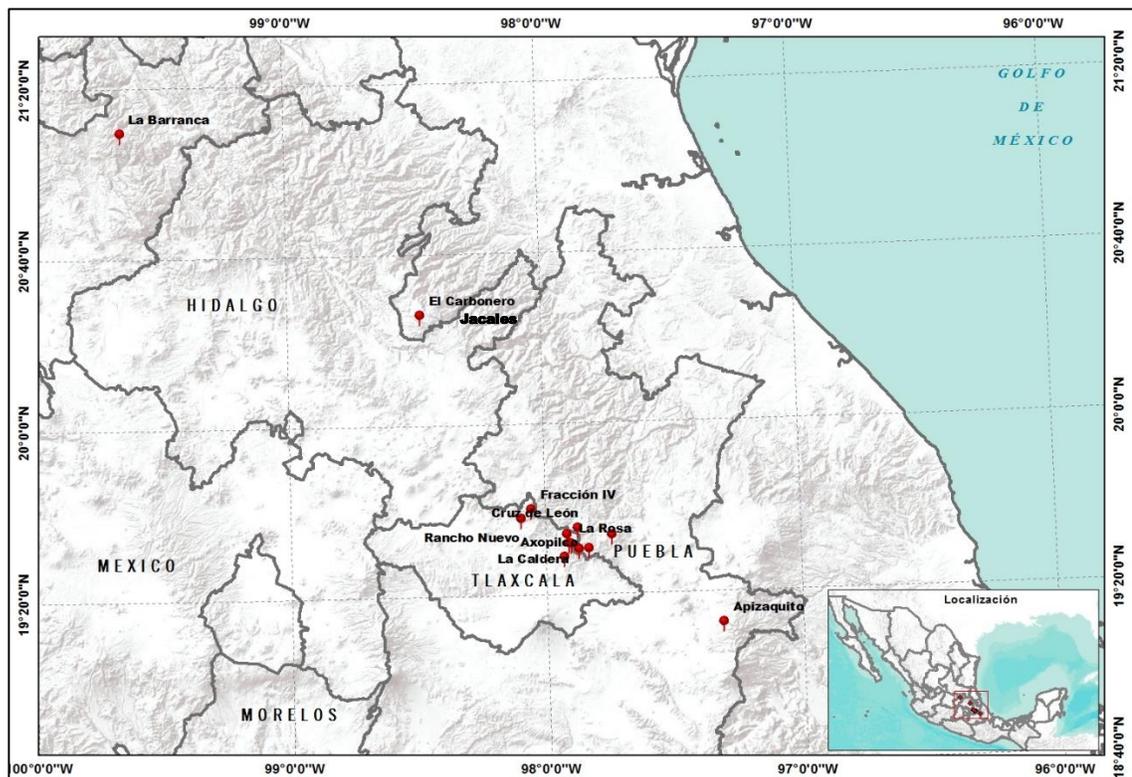


Figura 1. Ubicación geográfica de las poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* donde se realizaron las recolectas de material de material vegetal.

Cuadro 1. Datos geográficos de los sitios de las poblaciones de estudio.

Localidad	Municipio	Entidad	Número de muestras	m.s.n.m.	Longitud	Latitud
La Barranca	Pinal de Amoles	Querétaro	16	2187	99° 38' 44"	21° 08' 59"
Carbonero Jacales	Huayacocotla	Veracruz	20	2589	98° 28' 15"	20° 25' 16"
Rancho Nuevo	Tlaxco	Tlaxcala	7	2698	98° 05' 42"	19° 37' 21"
Fracción IV	Tlaxco	Tlaxcala	13	2553	98° 03' 19"	19° 39' 32"
Axopilco	Alzayanca	Tlaxcala	18	2880	97° 55' 37"	19° 28' 10"
Emiliano Zapata	Emiliano Zapata	Tlaxcala	20	2884	97° 55' 00"	19° 33' 31"
La Rosa	Terrenate	Tlaxcala	20	2863	97° 54' 32"	19° 31' 23"
Villarreal	Tlaxcala	Tlaxcala	20	2976	97° 53' 53"	19° 31' 11"
Cruz de León	Ixtacamatlán	Puebla	20	2825	97° 52' 19"	19° 34' 52"
La caldera	Ixtacamatlán	Puebla	20	2866	97° 52' 15"	19° 29' 58"
Cuatxmola	Ixtacamatlán	Puebla	20	3125	97° 49' 46"	19° 30' 01"
Tlalmotolo	Ixtacamatlán	Puebla	20	2739	97° 44' 18"	19° 33' 05"
Apizaquito	La Fragua	Puebla	20	3100	97° 18' 41"	19° 12' 11"

m.s.n.m. = metros sobre el nivel del mar; muestra = individuo

Las muestras de tejido vegetal se liofilizaron a una presión de 0.035 Bar y una temperatura de -80 °C en un equipo FreeZone Plus 12 (LABCONCO, Kansas City, MO, USA) durante 7 días. Transcurrido este tiempo, las muestras se inspeccionaron para asegurarse de que estuvieran completamente secas; posteriormente las muestras fueron colocadas en los Jar Set de teflón (2 × 10 mL) del equipo Tissue Lyser II (QIAGEN) y se pulverizaron a una velocidad de 30 Hz (30 oscilaciones por segundo) durante un minuto o hasta que estuvieran completamente pulverizadas.

2.2 Aislamiento del material genético

Para la extracción de ADN genómico se empleó el método CTAB (Saghai-Marooof *et al.*, 1984) con modificaciones. Se colocaron 50 mg de tejido liofilizado y pulverizado de cada muestra en tubos eppendorf de 2 mL para iniciar el proceso de extracción. A cada tubo se le adicionó 1 mL de solución amortiguadora CTAB (100 mM de Tris-HCl, 700 mM NaCl, 50 mM de EDTA, 1 % CTAB, 140 mM de 2-mercapto-etanol y 1 % PVP). Se homogenizó la mezcla y se incubó durante 90 min a 65 °C en agitación constante.

Después de este tiempo, se sacaron los tubos de la incubadora y se dejaron a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se adicionaron 700 µl de cloroformo: octanol (24:1), se mezcló por inversión 10 minutos y se centrifugó a 14 000 × g por 10 min. Después, la fase acuosa superior, que contenía el ADN, fue transferida a tubos nuevos de 2 mL que contenían 700 µl de cloroformo: octanol (24:1) y se repitió el proceso. Después de la segunda centrifugación, la fase acuosa superior fue transferida a tubos nuevos de 1.5 ml, a los que previamente se les adicionó 10 µl de RNasa (10 mg/ml), dejándose incubar las muestras a 37 °C durante 30 min. El ADN fue precipitado agregando 1 mL de etanol absoluto y mezclando suavemente. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 14 000 × g, después la solución fue decantada, teniendo cuidado de que la pastilla de ADN no se desprendiera del fondo del tubo.

Posteriormente, se realizaron dos lavados de etanol a 75 y 95 % (1 mL), mezclando por inversión durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a $14\ 000 \times g$ durante 10 min. El alcohol se decantó y la pastilla de ADN se dejó secar en oscuridad durante toda la noche, a temperatura ambiente. Finalmente, las pastillas de ADN fueron disueltas en 200 μ l de amortiguador TE [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0)].

2.3 Cuantificación de ADN

La concentración y pureza del ADN de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) a longitudes de onda de 260/280 nm. La concentración de ácidos nucleicos en las muestras fue calculada aplicando la Ley de Beer-Lambert que establece que la proporción de luz absorbida está relacionada con las moléculas que interactúan, y se calculó a partir de $c = (A * e)/b$, donde c es la concentración de ADN de la muestra, A es la absorbancia molar, e es la extinción, dependiente de la longitud de onda, coeficiente expresado en $\text{ng-cm}/\mu\text{l}$ y b es la longitud de la trayectoria en cm. La pureza del ADN fue determinada con base en la absorbancia de los ácidos nucleicos a 260 nm debido a la composición del mismo: Purinas (Timina y Citocina) y Pirimidinas (Adenina y Guanina). Las proteínas y compuestos fenólicos presentan absorbancia a 280 nm y para los compuestos orgánicos su absorbancia se da a una longitud de 230 nm. Las relaciones 260/280 y 260/230 determinan el nivel de pureza en la muestra. El valor del rango 260/280 de 1.8 a 2.0 se considera como resultado de la absorción de los ácidos nucleicos (Thermo Fisher Scientific, 2017).

La calidad del ADN se evaluó de manera visual en geles de agarosa 1 %, contra una referencia de 50 ng de marcador lambda sin cortar (PROMEGA, Madison, WI, USA). Con base en los resultados de las lecturas de las concentraciones, las muestras de ADN fueron ajustadas a una concentración de 25 $\text{ng}/\mu\text{l}$ y conservadas a 4° C hasta el momento de realizar los análisis moleculares.

2.4 Análisis molecular

Para realizar los análisis moleculares fue necesario la amplificación exponencial de ADN. Esto fue realizado mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés), desarrollada en 1980 por el Dr. Kary Mullis (Jalali *et al.*, 2017), con la que se pueden generar millones de moléculas en solo unos minutos (Dorado *et al.*, 2017).

La PCR consiste en tres pasos principales: el primer paso es la desnaturalización del ADN y se necesita una temperatura de 90 °C para poder desenrollar la doble hélice y romper los puentes de hidrógeno de la molécula. En el segundo paso, la temperatura desciende de 45 a 65 °C, para que los cebadores directos e inversos se hibriden a las cadenas opuestas del ADN molde en la parte de su secuencia complementaria. El último paso es la extensión, la cual requiere una temperatura de 72 °C, a la cual la enzima ADN polimerasa alcanza su mayor actividad y copia la secuencia que se ubica entre los cebadores directo e indirecto. Después de este último paso, la reacción inicia nuevamente y la PCR continúa de 30 a 35 veces normalmente, dando lugar a un aumento exponencial en el número de copias de la secuencia de ADN blanco. Durante la fase exponencial los componentes de reacción se encuentran en exceso, durante la etapa lineal los componentes de la reacción empiezan a agotarse y, en consecuencia, la reacción se vuelve más lenta; en la fase de meseta, la reacción se detiene y no se genera más producto (Jalali *et al.*, 2017).

Las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 10 µl cada una. Cada reacción inició con 50 ng de ADN, 0.8 X de RedTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), 0.5 µM de cada cebador (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) y agua bidestilada estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos con un paso de desnaturalización a 95 °C durante 40 seg, un paso de alineamiento a la temperatura adecuada de cada cebador (Cuadro 2) durante 40 seg y un paso de extensión de 72 °C durante 2 min. Finalmente, un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min, para después mantener las muestras a 10 °C. La amplificación de los marcadores microsatélites se realizó en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para la selección de los marcadores microsátélites se realizó una criba molecular con 42 pares de microsátélites diseñados para *P. menziesii* por Amarasinghe y Carlson (2002) y Slavov *et al.* (2004). Se realizaron las combinaciones de dos individuos por población con cada uno de los 42 marcadores, seleccionándose finalmente 12 pares de marcadores microsátélites, con base en su polimorfismo, facilidad de amplificación y lectura de los amplicones (Cuadro 2).

Los productos amplificados por PCR fueron separados en cámaras verticales (C.B S. Scientific SG-160, Del Mar, CA, USA) en geles de poliacrilamida 8 % con dimensiones de 14 × 14.5 cm. Se colocaron 3 µl del producto de PCR en cada carril de la cámara de electroforesis y un marcador de 100 pb (PROMEGA, Madison, WI, USA). El ADN migró a través del gel, de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica (del polo negativo hacia el polo positivo), utilizando amortiguador de corrimiento TBE 1X por 2.5 horas, a una alimentación de energía eléctrica constante de 250 Volts.

Los fragmentos de PCR fueron visualizados mediante tinción de plata, de acuerdo con la metodología descrita por Sanguinetti *et al.* (1994). Los tamaños de los fragmentos fueron determinados mediante el programa GelQuest (<http://www.sequentix.de/gelquest/>) y con base en los valores obtenidos, se construyó la matriz de datos codominantes. El proceso completo de los análisis moleculares, desde la extracción hasta la visualización de las bandas se indica en la Figura 2.

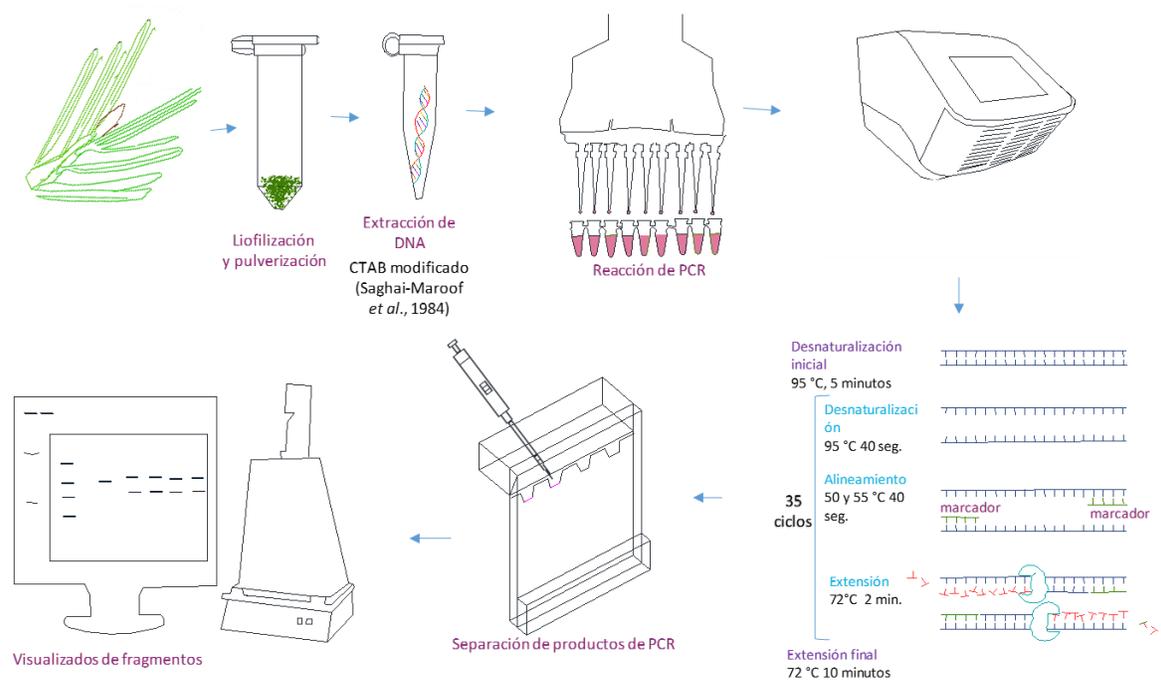


Figura 2. Diagrama de flujo de trabajo para la realización de los análisis moleculares.

Cuadro 2. Lista de los marcadores empleados en la criba genética.

Nombre	<i>Secuencia For (5'-3')</i>	<i>Secuencia Rev (5'-3')</i>	Tm (°C) recomendada	Tamaño esperado (pb)
PmOSU_3B9	TGTGTA AAAATGTCTAATCC	ACTACTATTCGAGGTTTTCT	47	119–223
PmOSU_3E3	TGCTTCAATTT CATATCTA	TAACATTTCAATCTATTCAC	48	126–266
PmOSU_4A7	TTGTAAAAATCCCATGTAT	AAGTGGGGGAGTGTGTAAT	48	196–340
PmOSU_4G2	ATTTTTTGTATTGTGCTTG	TGGATATATTTGCATTTTAC	48	138–168
PmOSU_2B6	TTGTTGGGTATAATTTTCA	TAATAAAATAGCTCTAACCC	49	134–346
PmOSU_3B2	CTTTGGAGTTCTTAATATAG	GATAATAGCACCCCACCATA	49	88–176
PmOSU_2C3	AAAGACAACATTATGAAAGG	GTAATGGTTCGAAAAATAATG	50	163–251
PmOSU_2D4	TTATTGCACATGAGTATTATGA	CAGATGTTGTTTTTTATACCAC	50	108–194
PmOSU_3D5	GGCATCCTATTTTTTCATTTT	GTGATTACCTAACTTGTGC	50	125–193
PmOSU_3F1	GACTAGATCATCGCAACTT	GGTATTCTTATGGTTTTTTAT	50	144–246
PmOSU_2G12	CAAGGACTCATATGGGAAA	AACATCAGTAATAACCTTTT	51	244–310
PmOSU_2G4	ATGCATTCTTGAAAGTAAA	ATAATATGCAAGTGAATCCC	51	180–272
PmOSU_3G9	ATTCCTTTTTGAGACCTACTT	CTTCAAAAATTCCTACAACA	51	110–192
PmOSU_2D6	GGAAAATATACATCTCACGAC	AAGCATGCGTACTAGGTG	54	162–264
PmOSU_4E9	GTTGGTTGTGTATATTCAGTTT	GCCTCTTCTTGGTTTGGT	54	120–218

Cuadro 2. Continuación.

Nombre	<i>Secuencia For (5'-3')</i>	<i>Secuencia Rev (5'-3')</i>	T _m (°C)	Tamaño (pb) Esperado
PmOSU_5A8	CATTTTTGGATTCTGGTTTTG	ATGCCTCAAGCTATGTAATC	54	166–190
PmOSU_3H4	TTTGCCGTCACATTTTTATTG	GCATCTTTCAGGCATAGTCT	55	170-256
PmOSU_1F9	CCTCATGCATTGGACTC	GGATTCTTGAGCAGGTAGG	55	201–319
PmOSU_2D9	TCGATTTACGCTTTTTTCTC	TGTTTATCCCCAGTCTCAAG	57	125–181
PmOSU_783	GAGCTGATGCCTTGAAGACT	CAAGTCAGTTCACAATTCCT	57	205–303
PmOSU_1C3	CTCCCCTCCAGATTTTACTC	TGGCGTAACAAATAAGAGAAA	57	166–232
PmOSU_2C2	TAAATCCGCAGCTCATAGAATC	GGGTGGTGGCTAGGGAAAC	60	142–200
BCPsmAC3	GACAAAGGCACGCAAACC	CAACAACCTACCATGAACCACA	53	165
BCPsmAC7	CGGCCAGCTTCATATCCAAG	TCCGTCTTCCCAGCTAAATC	53	139
BCPsmAG11	GAGAGATTTGAGGTTAAGGGTTG	TCCATCCTTCACCCCCAA	53	114
BCPsmAG16	AGATGGTTTCAAAGACAGAGGG	CCCTCCCTATCCATGCTTC	53	88
BCPsmAG17	TGAGTGAGAAAGATTGATATGGG	CATCAGTGGTCTTGAGCATG	53	272
BCPsmAG18	CAGAATGGGAGAACACGATG	TTGTCTCGTGTACAAACTCAGC	53	144
BCPsmAG19	AGGTGATGAGAAAGGGTTGG	CTTCCTCTCCACTTTCCACC	53	166
BCPsmAG20	CATAGAGAGGGGGCATATCAA	ACCCCCGAACCGTTACTAC	53	128
BCPsmAG22	TCGAGTGGGTTTTAGTGGTTT	TATCACTATAAATCCCCAATCCTAA	53	115

Cuadro 2. Continuación.

Nombre	Secuencia For (5'-3')	Secuencia Rev (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño (pb) esperado
BCPsmAG23	GTTAGAGATTAGGGGGAAGTATCG	TCACTCTAAACCACTAACACCCA	53	151
BCPsmAG25	TGGGAATTAGGGGTTAGAGAAA	ATGTACACCCCAAGCCCATA	53	133
BCPsmAC1	TTGTGAGGGAGTTGGACAAG	TGCAGCCCGATCTAACAATA	56	162
BCPsmAC6	GCGGCCAGCTTCATATCC	TGCGTGTTCCGTTCTCTTC	56	123
BCPsmAC9	TCCGTACCAACGCCAAAG	GATCCGTTCTGAGTGCCG	56	135
BCPsmAG24	CCTTGAATCTTTCTCTCTAAAAC	CTCTCTGAACTCCTAACCTCCAA	56	159
BCPsmAG27	ACGGGGAGGGAGGGTAAC	CCTTCCTCTCCACTTTCAACC	56	104
BCPsmAG28	CATTGCTGGCTGAATTGACA	TCAGATATATAAACTAAGAGAATGGGG	53	162
BCPsmAG3	GGGGAGAGATAAATGAGAAAGGG	ATGTATCTCTCCCCCTGCA	56	175
BCPsmAG8	TAGAGGGAGGGACGAAGGG	ACATGCTCATTCCCATTCTCC	56	113
BCPsmAC2	GTCGGAGATTGGCACGAGG	GATCAGGACGGCACACGC	60	127

2.5 Análisis de datos

2.5.1 Diversidad genética

La diversidad genética representa la variedad de alelos y genotipos que se encuentran en una población, se estimó con base en el porcentaje de loci polimórficos ($\%P$), número promedio de alelos por locus (Na), número efectivo de alelos (Ne), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad total (Ht), estos valores fueron obtenidos mediante el análisis de datos con el programa PopGene (Yeh *et al.*, 1999). El número de alelos privados N^p , heterocigosidad esperada (He) por locus, fueron estimados con el software GenALEx 6.5 (Peakall *et al.*, 2012).

El *porcentaje de loci polimórficos* ($\%P$) expresa el porcentaje de loci variables en una población. Se calculó como:

$$\%P = n_{pj}/n_{total}$$

Donde $\%P$ es el porcentaje de loci polimórficos, n_{pj} número de loci polimórficos y n_{total} el número total de loci.

El *número de alelos por locus* (Na) se refiere al número promedio de alelos detectados por locus. Se calculó como:

$$Na = (1/K) \sum_{i=1}^K n_i$$

Donde K es el número de loci y n_i el número de alelos detectados por locus.

El *número efectivo de alelos* (Ne) es la cantidad de alelos que pueden estar presentes en una población (Kimura y Crow, 1964), se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Ne = 1/(1 - h) = 1/\sum p_i^2$$
$$h = 1 - \sum p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia del i^{th} alelo en un locus y h la heterocigosidad en cada locus.

La *heterocigosidad observada* (H_o) se refiere a la proporción observada de loci heterocigotos por individuo (Levene, 1949) y se calculó como:

$$H_o = \text{No. Genotipos heterocigotos} / \text{No. Genotipos analizados}$$

La *heterocigosidad esperada* (H_e) se refiere a la probabilidad de que dos alelos al azar en una población sean diferentes entre sí.

Tres cálculos son posibles:

- un locus con dos alelos: $h_j = 1 - p^2 - q^2$
- un locus j con i alelos: $h_j = 1 - \sum p_i^2$
- promedio de varios alelos: $H = \sum_j^L h_j / L$

Donde h_j es la heterocigosidad por locus p y q representan las frecuencias alélicas, H la heterocigosidad promedio para varios loci y L el número total de loci.

El promedio heterocigosidad esperada H_e de todos los loci es una estimación de la diversidad genética en la población. Se determinó mediante el método descrito por Nei (1973), se calculó el valor de H_e y se restó 1 a las frecuencias esperadas de homocigotos en cada locus. El mismo procedimiento se repite para todos los loci.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^{\#alelos} p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia del i^{th} alelo

El *contenido de información polimórfica* (PIC , Polymorphic Information Content) fue calculado usando el método de Botstein *et al.* (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2q_i^i q_j^2$$

Donde n es el número de alelos, q_i es la frecuencia del alelo i^{th} y q_j es la frecuencia del j^{th} alelo, en el programa Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007).

2.5.2 Estructura genética

La estructura genética se refiere a la cantidad y distribución de la variación genética presente dentro y entre las poblaciones, expresada en términos de frecuencias génicas. Para inferir la estructura genética de las poblaciones se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), se calculó el coeficiente F_{st} de Wright (1951) mediante el software Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010), se determinó el coeficiente de diferenciación poblacional (θ) de Weir y Cockerham (1984), coeficiente de diferenciación Δ mediante el programa Differ Int (Gillet y Gregorius, 2008), la representación gráfica de las distancias genéticas de Nei (1972) empleando la metodología de Pares No Ponderados Utilizando Media Aritmética UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) con el programa TFPGA v. 1.3. (Miller, 2000), mientras que con el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) se determinó la estructuración poblacional.

El AMOVA estima la variación molecular dentro de una especie, y es un método basado en un modelo jerárquico o anidado. Derivado de una matriz de distancias cuadradas en todos los pares de haplotipos, se producen estimaciones de componentes de varianza y análogos estadísticos de F , que reflejan la correlación de la diversidad haplotípica.

Los índices de fijación F permiten estimar la distribución de la variación genética dentro y entre subpoblaciones. Estos estadísticos fueron descritos por Wright (1951). F_{is} representa la deficiencia o exceso de heterocigotos promedio en cada población, F_{st} el grado de diferenciación de genes entre poblaciones en términos de frecuencias alélicas y F_{it} la deficiencia o exceso de heterocigotos promedio en todas las poblaciones.

En función de los valores de heterosis (Nei, 1977), los índices de fijación se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$Fit = \frac{Ht - Hi}{Ht} \quad Fis = \frac{Hs - Hi}{Hs} \quad Fst = \frac{Ht - Hs}{Ht}$$

Donde Ht representa la heterocigosidad esperada en la población total, Hi la heterocigosidad observada promedio en las poblaciones y Hs la heterocigosidad esperada promedio por población.

El número de migrantes se calculó a partir del Fst con el software PopGene (Yeh *et al.*, 1999), empleando la metodología de Hamillton y Miller (2002) para SSR nucleares:

$$Nm = 0.25 * (1 - Fst) / Fst$$

El grado de diferenciación de las poblaciones se estimó a partir del coeficiente de diferenciación θ de Weir y Cockerham (1984) análogo al coeficiente de diferenciación F_{ST} de Wright (1951), estimador casi imparcial en poblaciones de 15, 20 y 25 individuos y loci $K = 10$, ya que considera valores negativos de diferenciación que pueden compensar la sobreestimación en niveles más bajos de diferenciación. Fue calculado de la siguiente forma:

$$\widehat{F}_{St}^{[K]} = \frac{\widehat{N}^{[K]}}{\widehat{D}^{[K]}}$$

$$\widehat{N}^{[K]} = s^2 - \frac{1}{2n - 1} [\bar{p} (1 - \bar{p}) - \frac{r - 1}{r} s^2 - \frac{\bar{h}}{4}]$$

$$\widehat{D}^{[K]} = \bar{p} (1 - \bar{p}) + \frac{s^2}{r}$$

Donde S^2 es la varianza observada de frecuencias alélicas, n es el número de individuos por población, \bar{p} es la frecuencia media de alelos en todas las poblaciones, r es el número de poblaciones analizadas y \bar{h} es la heterocigosidad media observada.

El coeficiente de θ Weir y Cockerham (1984) es el más utilizado para describir la diferenciación genética en las poblaciones; sin embargo, en la actualidad diferentes autores han puesto en tela de juicio este estimador. Willing *et al.* (2012) realizaron diferentes ensayos en los que muestran una sobreestimación de la diferenciación con θ para tamaños de muestra desiguales. Los programas diseñados para calcular este coeficiente toman en cuenta una tasa

mutacional constante, lo cual podría llevar a sobrestimar el coeficiente de diferenciación; ya que los alelos con mayor frecuencia pueden tener una tasa de mutación mayor (Putman y Carbone, 2014).

Por lo anterior, y adicionalmente al coeficiente de diferenciación θ (Weir y Cockerham, 1984) se calculó el coeficiente de diferenciación Δ mediante el programa Differ Int (Gillet y Gregorius, 2008), donde más allá de la diferenciación al azar, se analiza la diferenciación mediante métodos de aleatorización (permutación), generando todas las reasignaciones posibles de individuos a poblaciones y calculando para cada reasignación, la diferenciación entre las poblaciones. En el presente estudio, el programa realizó 10 000 permutaciones para cada individuo y calculó la distancia genética en cada ocasión.

Las distancias geográficas se determinaron a partir del software ArcGIS® y ArcMap™, shapefile de la división política estatal 1:250 000, del Catálogo de metadatos geográficos de la CONABIO (Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad) y las coordenadas geográficas de las poblaciones. Se utilizó la herramienta *measure* para determinar la distancia de cada población, con respecto a las demás y construir una matriz de distancias geográficas (Cuadro 3).

Mediante el software Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) se realizó la prueba de Mantel (1967), la cual permitió correlacionar las matrices de distancias genéticas y geográficas mediante el coeficiente de correlación de Pearson r_{xy} cuyos valores oscilan entre 0 y 1, a partir de la siguiente fórmula:

$$r_{xy} = \frac{\sum Z_X Z_Y}{N}$$

Z_X = Distancias genéticas estandarizadas.

Z_Y = Distancias geográficas estandarizadas

N = Número de poblaciones

Valores cercanos a 1 indican una correlación perfecta positiva, sugiriendo que a medida que aumentan los valores de las distancias geográficas entre las poblaciones también aumentan las distancias genéticas entre las mismas. Valores cercanos a -1 indican el patrón opuesto y, valores cercanos a cero indican que no hay relación entre las dos matrices.

Se realizó la representación gráfica de las distancias de Nei (1972) mediante el método UPGMA.

La diversidad genética entre las poblaciones se calculó a partir de la distancia genética (D) y la identidad (I). La distancia genética parte de 0 para poblaciones con frecuencias de alelos idénticos y hasta el infinito, para poblaciones que no comparten ningún alelo; la identidad va desde 0 para las poblaciones sin alelos en común a 1 para poblaciones con frecuencias de alelos idénticos (Nei, 1972).

Para inferir la presencia de poblaciones diferentes se determinó la estructuración poblacional con el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), utilizando un enfoque sistemático de agrupamiento bayesiano, aplicando la estimación de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). El proceso MCMC se inició asignando aleatoriamente individuos a un número determinado de grupos $K = 1$ hasta $K = 13$ (número total de poblaciones en el presente estudio), luego se estimaron las frecuencias variantes en cada grupo y los individuos se fueron asignando con base en estimaciones de frecuencia. Para este proceso se realizaron diez réplicas independientes, cada una con 50 000 pasos de MCMC, tras analizarlos 250 000 veces. El valor más probable de K fue determinado de la comparación de probabilidades, según el método de Evanno *et al.* (2005), implementado en el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y von Holdt, 2012).

La probabilidad de registro para cada K se determinó a partir del logaritmo de likelihood:

$$\ln P(D) = L(K)$$

La K verdadera mostró el valor de $L(K)$ más alto o continuo, aumentando ligeramente. Este valor representa la mejor bondad en el ajuste estadístico. $\Delta K = m[L(K)]/s[L(K)]$

III. RESULTADOS

3.1 Calidad del ADN

La calidad y concentración de las moléculas de ADN correspondiente a 234 individuos de 13 poblaciones de *P. menziesii* fue verificada previo a la realización de los análisis moleculares. La concentración en las muestras presentó variabilidad desde 24.40 ng/ μ l hasta 1016 ng/ μ l (Anexo 1). La calidad de las muestras fue buena, utilizando como indicador la relación de absorbancia registrada a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, evaluada con Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), donde la relación 260/280 en general fluctuó entre 1.80 y 2.00.

El perfil electroforético en gel de agarosa 1 % mostró una banda discreta, sin arrastre de contaminantes y no se observó formación de estela a lo largo del gel, lo cual indicó que el ADN no fue degradado (Figura 3).



Figura 3. Verificación de la integridad del ADN extraído de muestras de individuos de *Pseudotsuga menziesii*. Mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %. Los carriles indicados con los números 1 a 29 contienen 50 ng de ADN de cada muestra y 50 ng de Lambda sin cortar (PROMEGA, Madison, WI, USA), en el carril de referencia indicado λ .

3.2 Criba genética

Para hacer la selección de marcadores polimórficos que serían empleados en el estudio de diversidad, se realizó una criba inicial en geles de agarosa al 3 % (Figura 4) empleando ocho individuos de cuatro poblaciones tomadas al azar y 42 pares de cebadores desarrollados por Amarashinge y Carlson (2002) y Slavov *et al.* (2004). La segunda parte de la criba consistió en realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida 8 %, con la finalidad de obtener una mejor separación de bandas.

Los marcadores seleccionados por su polimorfismo y con base en los resultados de estandarización fueron PmOSU_2D4, PmOSU_2D6, PmOSU_2D9, PmOSU_3B9, PmOSU_3G9, PmOSU_3H4, PmOSU_4E9, PmOSU_783, BCPsmAG20, BCPsmAG27, BCPsmG12, PmOSU_2B6 (Cuadro 3). El resto de los marcadores (30 pares de cebadores) mostraron un patrón de bandas monomórficas para los individuos analizados; por lo tanto, fueron descartados del estudio.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos, que consistieron en un paso de desnaturalización a 95 °C durante 40 seg; un paso de alineamiento, donde la temperatura (T_m °C) para cada cebador fue diferente por 40 seg y un paso de extensión de 72 °C durante 2 min; después de estos ciclos se realizó un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min (Figura 5).

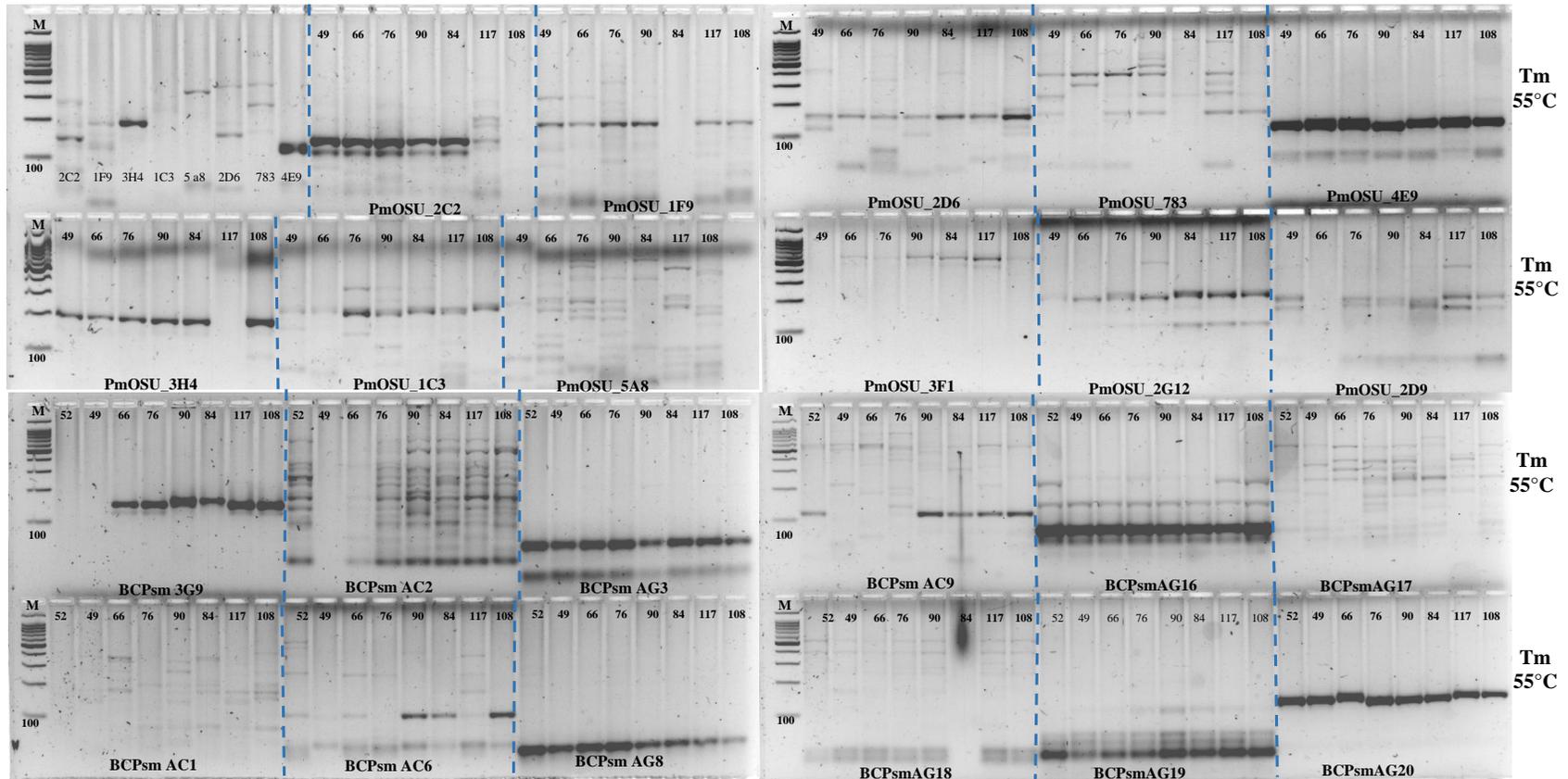
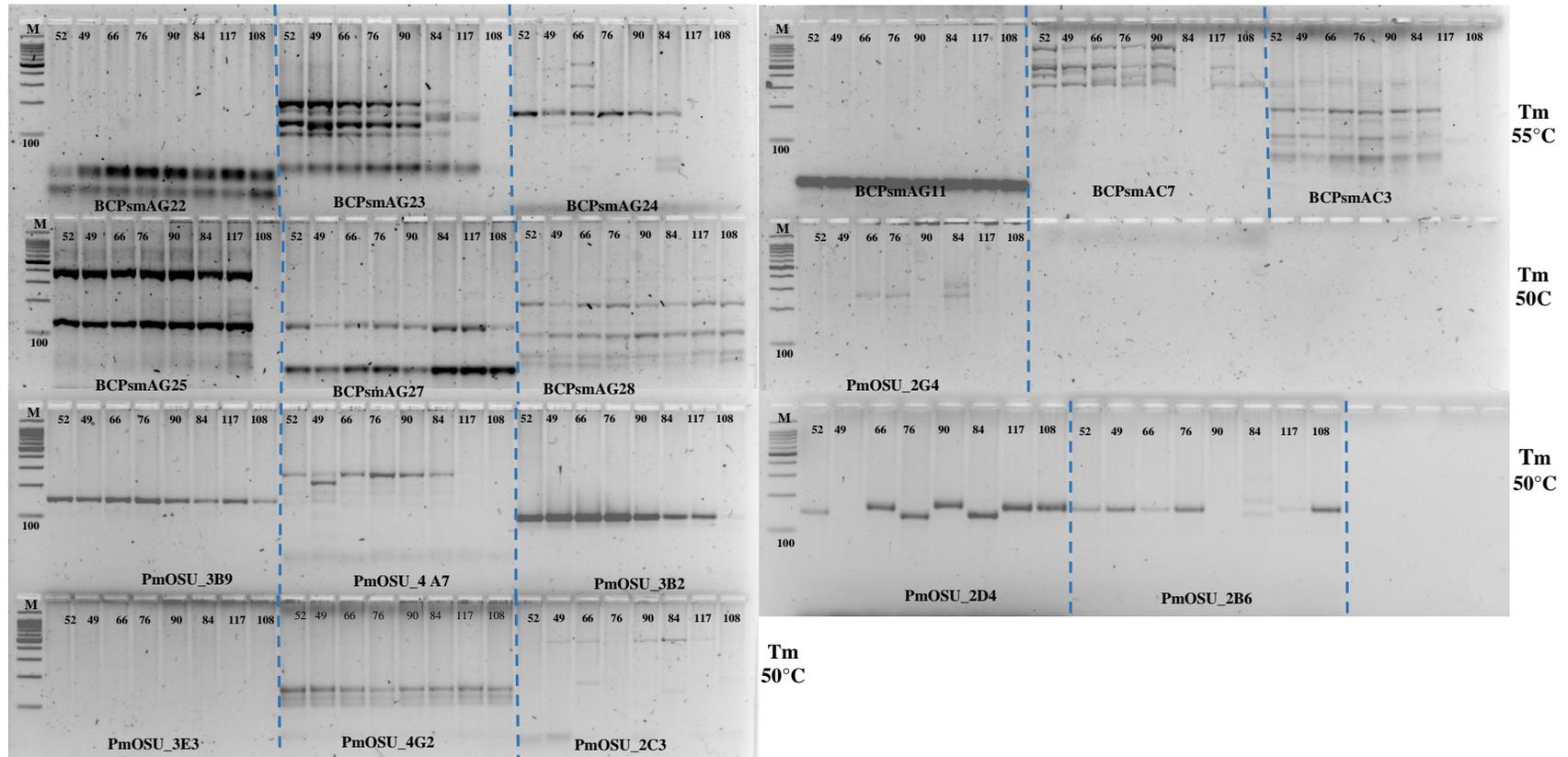


Figura 4. Criba genética inicial para la selección de cebadores a utilizarse en el análisis de diversidad en geles de agarosa 3 %. En el primer carril se encuentra el marcador de 100 pb (PROMEGA, Madison, WI, USA) y en los siguientes ocho carriles, el producto de PCR de cada muestra, indicada con el número de individuo de *Pseudotsuga menziesii* (, 49, 66, 76, 90, 84, 117 y 108).



Continuación **Figura 4.**

Cuadro 3. Marcadores seleccionados para el análisis molecular de las poblaciones de estudio. Temperatura de alineamiento (T_m C°) empleada para los marcadores seleccionados, y tamaño de fragmentos (esperado y observado).

Locus	Número de alelos observados	Tamaño (pb) esperado	Tamaño (pb) obtenido	T_m (°C) empleada
PmOSU_3B9	3	119-223	152-164	50
PmOSU_2B6	6	134-346	150-180	47
PmOSU_2D4	9	108-194	150-190	50
PmOSU_G12	8	244-310	240-254	50
PmOSU_3G9	5	110-192	150-158	50
BCPsmAG20	8	128	126-146	55
PmOSU_2D6	8	162-264	164-176	55
PmOSU_4E9	4	120-218	116-122	55
PmOSU_3H4	3	170-256	198-202	55
BCPsmAG27	3	104	120-124	55
PmOSU_2D9	7	125-181	162-176	55
PmOSU-783	10	205-303	250-270	55

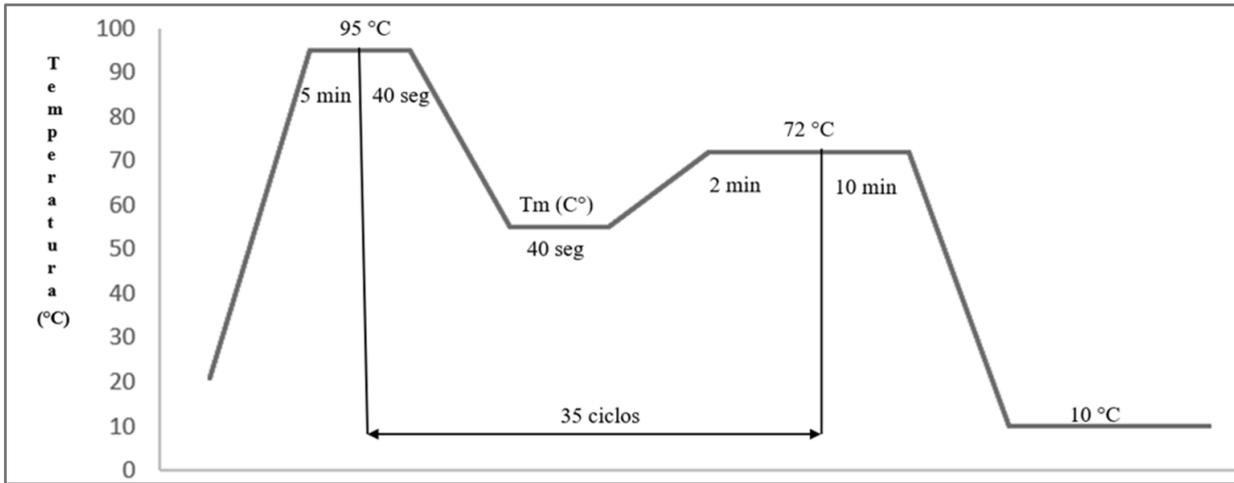


Figura 5. Perfil de amplificación utilizado para las muestras de ADN de *Pseudotsuga menziesii*. Se señalan los tiempos y cambios de temperatura en cada paso.

3.3 Diversidad genética

El porcentaje de loci polimórficos ($%P$) para el acervo total fue de 100 % y por población fluctuó de 50 % a 100 %. El número promedio de alelos por locus (N_a) fue de 6.083 para el acervo total. La población de Rancho Nuevo presentó el valor de N_a más bajo (1.750) mientras que la población de La Rosa tuvo el valor más alto (3.000). La heterocigosidad observada (H_o) fue de 0.229 y por población varió de 0.142 a 0.304. La heterocigosidad esperada para el acervo total (H_t) fue de 0.417 y por población fue variable, con valores de 0.197 a 0.383. Las localidades Rancho Nuevo y Fracción IV del Municipio de Tlaxco, Tlaxcala, presentaron los valores más bajos de diversidad genética $H_e = 0.197$ y 0.226, respectivamente, mientras que las poblaciones que presentaron mayor diversidad genética fueron; Tlalmotolo en el estado de Puebla, La Barranca en el estado de Querétaro y Carbonero Jacales en el estado de Veracruz, con valores de $H_e = 0.365$, 0.371 y 0.383, respectivamente (Cuadro 4).

Las poblaciones de Carbonero Jacales y La Barranca presentaron el mayor número de alelos privados, $N^P = 9$ y 7 respectivamente. estas poblaciones presentaron también diversidad genética alta.

Cuadro 4. Parámetros de diversidad genética en 13 poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* en estudio.

Población	<i>N</i>	<i>%P</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>N^P</i>
La Barranca	16	83.83	2.750	1.796	0.301	0.371	6
Carbonero Jacales	20	83.33	3.166	2.067	0.238	0.383	7
Fracción IV	13	66.67	2.166	1.405	0.173	0.226	0
Rancho Nuevo	7	50.00	1.750	1.415	0.142	0.197	0
Cruz de León	20	66.67	2.167	1.509	0.191	0.257	1
Emiliano Zapata	20	75.00	2.666	1.518	0.200	0.246	3
Tlamotolo	20	83.33	2.666	1.752	0.304	0.365	3
La Rosa	20	100.00	3.000	1.809	0.225	0.364	3
Villareal	20	83.33	2.500	1.550	0.231	0.286	2
Cuatexmola	20	83.33	2.916	1.693	0.270	0.320	2
La Caldera	20	66.67	2.750	1.615	0.220	0.267	2
Axopilco	18	75.00	2.833	1.635	0.231	0.287	0
Apizaquito	20	58.33	2.333	1.519	0.187	0.251	0
Media		75.03	2.589	1.637	0.224	0.293	
*Acervo total		100.00	6.083	2.039	0.229	0.417	29

N=Número de individuos; *%P*= Porcentaje de polimorfismo; *Na*=Número de alelos promedio por locus, *Ne*= Número de alelos efectivos, *Ho*= Heterocigosidad observada, *He*= Heterocigosidad esperada, *N^P*= Número de alelos privados.

*Para los valores del acervo total, se asume que no existe estructura poblacional y que existe una sola población panmíctica.

3.4 Diversidad genética, flujo de genes y contenido de información polimórfica por locus.

Se identificaron 73 alelos diferentes con los 12 locus analizados. Tres alelos para los locus PmOSU_3H4, BCPsmAG27 y PmOSU_3B9, cuatro para PmOSU_4E9, cinco para PmOSU_3G9, siete para PmOSU_2D9, ocho para PmOSU_2D6, BCPsmAG20 y BCPsmG12, PmOSU_2B6, nueve para PmOSU_2D4 y diez para PmOSU_783 (Anexo I) El tamaño de los fragmentos obtenidos fluctuó de 150 a 270 pb (Cuadro 3).

El número de alelos promedio por locus (N_a) para el acervo total fue de 6.08, los loci PmOSU_3B9, PmOSU_3H4 y BCPsmAG27 presentaron los valores inferiores ($N_a = 3$) mientras que el locus PmOSU_783 presentó el valor superior ($N_a = 10$). El número de alelos efectivos (N_e) fue de 2.03 (Cuadro 3). Los valores de diversidad genética detectados por los diferentes loci, fueron variables. Los valores de H_o identificados fluctuaron desde 0.000 para el locus PmOSU_3H4 hasta 0.777 para PmOSU_2D9, con un valor promedio de 0.229. De igual manera, los valores de H_t fluctuaron desde 0.021 para PmOSU_3B9 hasta 0.716 para PmOSU_2B6, con un valor promedio de 0.417.

El valor promedio del índice de fijación F_{is} fue de 0.234. Este valor indica que el grado de endogamia en las poblaciones fue alto. El valor de $F_{it} = 0.452$, valor positivo, sugiere una deficiencia de heterocigotos dentro de todas las poblaciones (Cuadro 5).

Los loci PmOSU_2D6, PmOSU_2D9 y BCPsmAG27 fueron los únicos que presentaron valores negativos de F_{it} y F_{is} , lo que sugiere que el grado de endogamia detectado por estos loci fue bajo.

El número de migrantes (N_m) por generación inferido a partir de los datos de los 12 locus analizados fue de 0.62.

El contenido de información polimórfica (PIC) promedio fue de 0.38. Por marcador PIC varió de 0.02 para PmOSU_3B9 hasta 0.67 para PmOSU_2B6. Los marcadores que mostraron un valor alto de PIC fueron PmOSU_2D4, PmOSU_2D9 y PmOSU_2B6. Los

valores sugieren que estos marcadores fueron los más informativos, ya que el valor de PIC está relacionado con la distribución de las frecuencias alélicas, por lo que son más informativos en este estudio de diversidad genética.

3.5 Identidad y distancia genética entre las poblaciones

El valor de identidad genética más alto se presentó entre las poblaciones de Fracción IV y Rancho Nuevo ($I = 0.97$) las cuales también presentaron el valor de distancia genética más bajo ($D = 0.03$). Estos resultados sugieren que ambas poblaciones comparten más alelos en común y son genéticamente más similares. Estas poblaciones se encuentran cercanas geográficamente y pertenecen al municipio de Tlaxco, Talxcala por lo cual es probable que exista flujo génico entre ellas. De igual manera, las poblaciones Emiliano Zapata, Cruz de León, La Caldera y Cuatexmola presentaron valores de identidad y distancia genética con valores cercanos entre sí, lo que indica que comparten más alelos en común (Cuadro 6).

Del conjunto de las poblaciones analizadas, la población Emiliano Zapata y Apizaquito ($I = 0.66$, $D = 0.42$) fueron las que difirieron en mayor grado genéticamente y compartieron menos alelos en común. Estas poblaciones se encuentran separadas geográficamente de manera considerable; aunque existen otras poblaciones, que están alejadas en mayor grado con respecto a la población de Apizaquito, que mostraron más alelos en común. Ejemplos de esta situación, son las poblaciones de La Rosa y Apizaquito, las cuales, de acuerdo con los resultados del presente estudio, genéticamente son más similares, a pesar de la distancia geográfica que las separa ($I = 0.93$, $D = 0.07$).

Cuadro 5. Parámetros de diversidad genética, índice de contenido polimórfico e índices de fijación, basados en 12 locus polimórficos de 13 poblaciones de *P. menziesii*.

Locus	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>Fit</i>	<i>Fst</i>	<i>Nm</i>	<i>PIC</i>
PmOSU_2D4	9	2.864	0.026	0.651	0.945	0.964	0.358	0.448	0.6
PmOSU_2D6	7	1.163	0.141	0.14	-0.047	-0.016	0.03	8.166	0.13
PmOSU_2D9	7	2.995	0.778	0.666	-0.296	-0.186	0.085	2.695	0.61
PmOSU_3B9	3	1.022	0.004	0.021	0.764	0.781	0.071	3.292	0.02
PmOSU_3G9	5	2.078	0.12	0.519	0.078	0.754	0.734	0.091	0.4
PmOSU_3H4f	3	1.044	0	0.042	1	1	0.077	3.018	0.04
PmOSU_4E9f	4	1.893	0.205	0.472	0.451	0.559	0.197	1.017	0.44
PmOSU_783f	10	1.193	0.15	0.162	0.029	0.082	0.055	4.303	0.16
BCPsmAG20	8	2.772	0.239	0.639	0.554	0.636	0.184	1.113	0.6
BCPsmAG27	3	1.951	0.664	0.488	-0.6	-0.318	0.176	1.17	0.4
BCPsmG12	8	1.98	0.318	0.495	0.228	0.359	0.171	1.216	0.46
PmOSU_2B6f	6	3.525	0.107	0.716	0.702	0.853	0.507	0.243	0.67
Mean	6	2.04	0.229	0.418	0.234	0.453	0.286	0.625	0.38

Na=Número de alelos promedio por locus, *Ne*= Número de alelos efectivos, *Ho*= Heterocigosidad observada, *He*= Heterocigosidad esperada, asume que no existe estructura poblacional, *Fis*=Coeficiente de endogamia dentro de las poblaciones, *Fit*=Coeficiente de endogamia total, *Fst*= Coeficiente de diferenciación. *Nm*=Número de migrantes, *PIC*= Índice de contenido polimórfico.

*Los valores resaltados en negrita muestran valores negativos de *Fis* y *Fit*, lo que indica deficiencia de homocigotos en los locus.

Cuadro 6. Matriz de distancias e identidades genéticas (Nei, 1972) entre las poblaciones de *Pseudotsuga menziesii*.

Población	E. Zapata	Cruz de León	La Caldera	Cuatxmola	Tlalmotolo	Apizaquito	La Rosa	Axopilco	Fracción IV	Rancho Nvo.	Villarreal	Carbonero Jacales	La Barranca
E. Zapata	***	0.06	0.08	0.11	0.22	0.42	0.27	0.24	0.22	0.21	0.15	0.17	0.21
Cruz de León	0.94	***	0.10	0.08	0.20	0.40	0.32	0.25	0.24	0.24	0.16	0.16	0.24
La Caldera	0.92	0.90	***	0.06	0.24	0.39	0.32	0.22	0.33	0.29	0.15	0.18	0.26
Cuatxmola	0.89	0.92	0.94	***	0.15	0.33	0.30	0.22	0.28	0.26	0.15	0.15	0.23
Tlalmotolo	0.80	0.82	0.79	0.86	***	0.25	0.27	0.22	0.26	0.26	0.27	0.22	0.17
Apizaquito	0.66	0.67	0.68	0.72	0.78	***	0.07	0.16	0.16	0.16	0.24	0.19	0.24
La Rosa	0.76	0.73	0.73	0.74	0.76	0.93	***	0.11	0.10	0.12	0.15	0.14	0.24
Axopilco	0.79	0.78	0.80	0.80	0.80	0.85	0.90	***	0.15	0.22	0.08	0.14	0.35
Fracción IV	0.80	0.79	0.72	0.76	0.77	0.85	0.90	0.86	***	0.03	0.14	0.13	0.27
Rancho Nvo.	0.81	0.78	0.75	0.77	0.77	0.85	0.88	0.80	0.97	***	0.17	0.12	0.22
Villarreal	0.86	0.85	0.86	0.86	0.77	0.79	0.86	0.93	0.87	0.84	***	0.077	0.29
Carbonero Jacales	0.85	0.85	0.83	0.86	0.80	0.83	0.87	0.87	0.88	0.88	0.93	***	0.16
La Barranca	0.81	0.79	0.77	0.80	0.85	0.79	0.79	0.71	0.76	0.80	0.75	0.85	***

Por arriba de la diagonal se presentan los valores de diferenciación genética (D) y por debajo, los valores de identidad genética (I).

3.6 Análisis de Coordenadas Principales

La matriz cuadrada de distancias genéticas entre las poblaciones de *P. menziesii*, basada en la metodología de Nei (1972), fue representada en un gráfico de dos dimensiones para medir la similitud o disimilitud genética entre las poblaciones. El autovector que maximizó la dispersión y que minimizó la distancia de todos los puntos estuvo asociado con el valor propio o eigen value, el cual da idea de la magnitud o largo del autovector. Los tres primeros ejes fueron los que presentaron autovalores más altos y en los que se detectó el mayor porcentaje de variación, explicando 72.99 % de la varianza (Cuadro 7).

El análisis con las dos primeras coordenadas marcó la distribución de las poblaciones de *P. menziesii*. La distancia entre los puntos reflejó la distancia genética entre las poblaciones. Cuatexmola, Emiliano Zapata, Cruz de León y La Caldera que se encuentran menos distantes y parecen ser menos diferentes genéticamente y cercanas a las poblaciones La Barranca y Tlalmotolo, distribuidas en el eje 1 positivo. Las poblaciones Villarreal, Carbonero Jacales y Axopilco se encuentran en la parte negativa de los ejes junto con Rancho nuevo, Fracción IV y La Rosa; parecen ser diferentes genéticamente del primer grupo. Apizaquito se encontró relacionado genéticamente con el segundo grupo, en mayor grado con la población de La Rosa (Figura 6).

Cuadro 7. Autovalores, varianza explicada y porcentaje acumulado en el análisis de coordenadas principales.

Eje	1	2	3
Autovalor	0.139	0.068	0.050
Porcentaje de varianza explicada	39.51	19.35	14.14
Porcentaje acumulado	39.51	58.85	72.99

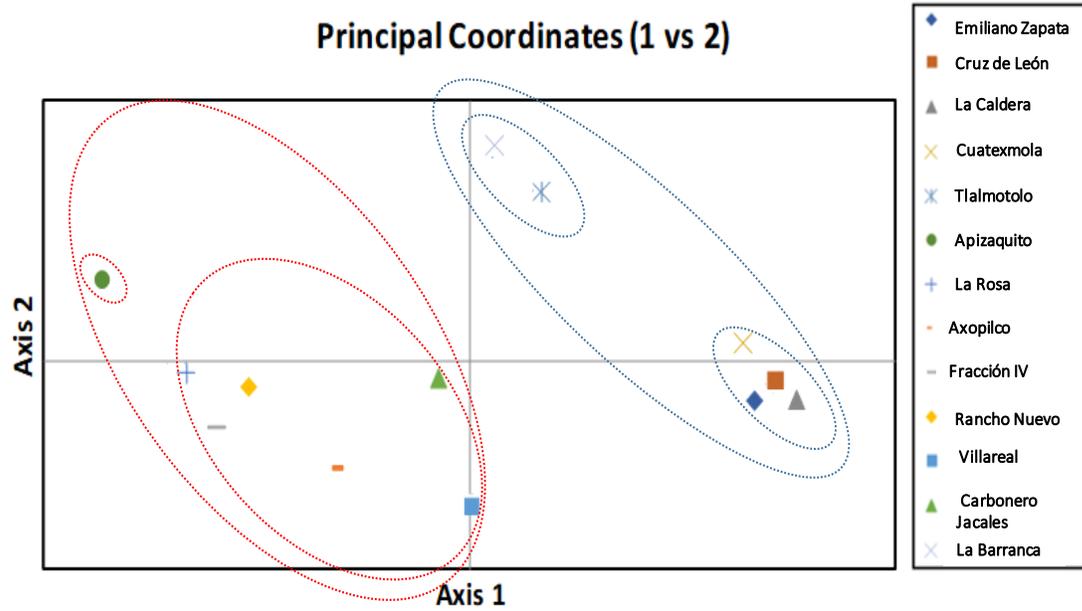


Figura 6. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Representación visual de la variabilidad genética de las dos primeras coordenadas, a partir de las distancias genéticas de Nei (1972).

3.7 Diferenciación Genética

El coeficiente de diferenciación (θ) Weir y Cockerham (1984), el cual es análogo al coeficiente de F_{st} de Wright (1951) tuvo valor de $\theta = 0.27$ en las trece poblaciones de *P. menziesii*. El coeficiente de estructuración genética también fue de $\Phi_{st} = 0.27$. El coeficiente de diferenciación Δ de Gillet y Gregorius (2013), estimado con base en métodos de aleatorización permutación, fue de $\Delta = 0.24$.

Los valores de diferenciación genética $\theta = 0.27$, $\Phi_{st} = 0.27$ y $\Delta = 0.24$ son los más utilizados para describir la estructura de las poblaciones. Los tres coeficientes presentan una base estadística sólida, con una diferencia mínima entre ellos (los valores más cercanos fueron $\theta = 0.27$ y $\Phi_{st} = 0.27$). Sin embargo, el valor de Δ fue menor que el resto de los estimadores, ya que para su cálculo no se sobreestima la diferenciación genética por el tamaño de muestra variable; por lo que fue el que se tomó en consideración en este análisis.

El coeficiente de diferenciación genética $\Delta = 0.24$, comparado con el valor característico para especies perennes de vida larga $F_{st} = 0.19$ (Nybom 2004), sugiere una diferenciación genética grande entre las poblaciones en estudio, lo cual indica que existe una estructura genética marcada entre poblaciones, atribuible a la discontinuidad de las mismas, lo que afecta a la variación dentro de la población y a la diferenciación de las poblaciones.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), se llevó a cabo considerando las 13 poblaciones de *P. menziesii* estudiadas, calculando la variación molecular atribuible a la diferenciación entre las poblaciones y dentro de las poblaciones. La partición de la variación (Cuadro 8) muestra que la mayor parte de la variación fue atribuible a las diferencias dentro de las poblaciones (%V = 73.05) y en menor proporción, entre poblaciones (%V = 26.95).

Cuadro 8. Análisis de varianza molecular y estimadores de diferenciación genética.

	AMOVA (Excoffier <i>et al.</i> , 1992)			Coficiente de estructuración genética	Coficientes de diferenciación genética		
	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de variación	Φ_{st}	F_{st}	θ	Δ
Entre poblaciones	317.56	0.68	26.95				
Dentro de poblaciones	846.21	1.86	73.05				
Acervo total	1163.78	2.54	100	0.27	0.27	0.27	0.24

AMOVA = Análisis de varianza molecular Excoffier *et al.* (1992). θ = Coeficiente de diferenciación genética de Weir y Cockerham (1984), Φ_{st} = Coeficiente de estructuración genética, F_{st} = Coeficiente de diferenciación genética Wright (1951), Δ = Delta Coeficiente de diferenciación genética (Gillet y Gregorius, 2008).

3.8 Análisis de Agrupamiento por el Método UPGMA

El dendrograma generado a partir de las distancias genéticas de Nei 1972, representadas gráficamente mediante el método UPGMA reflejó dos grupos a una distancia de corte de 0.250 (Figura 2). El grupo I incluye las poblaciones de Emiliano Zapata, Cruz de León, La Caldera, Cuatexmola, Tlalmotolo y La Barranca a una distancia de corte de 0.218. El cual a su vez se subdivide en tres subgrupos, el subgrupo IA constituido por las poblaciones de Emiliano Zapata y Cruz de León a una distancia de corte de 0.058, el subgrupo IB a las poblaciones de La Caldera y Cuatexmola a una distancia de corte de 0.093 y el subgrupo IC formado por las poblaciones de la Barranca y Tlalmotolo a una distancia de corte de 0.168. El grupo II incluye las poblaciones restantes, a una distancia de corte de 0.161 conformado por las poblaciones de Apizaquito, La Rosa, Fracción IV, Villarreal, Axopilco, Rancho Nuevo y Carbonero Jacales. Este grupo se subdivide en tres subgrupos, el primero IIA conformado por las poblaciones de Apizaquito y La Rosa a una distancia de corte de 0.072, el subgrupo IIB incluye las poblaciones de Fracción IV y Rancho Nuevo a una distancia de corte de 0.029 y el subgrupo IIC conformado por las poblaciones de Villarreal, Carbonero Jacales y Axopilco a una distancia de corte de 0.110.

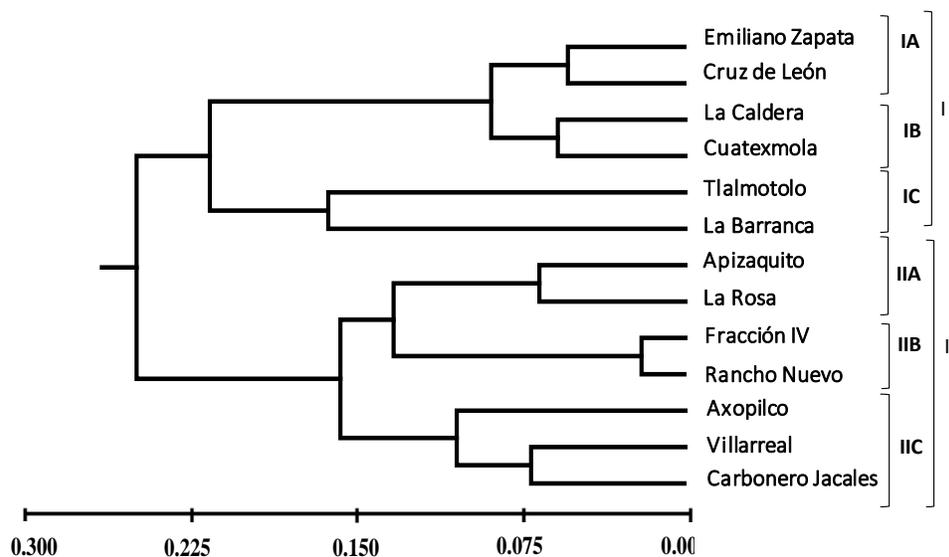


Figura 7. Dendrograma basado en distancias genéticas (Nei, 1972) entre las poblaciones evaluadas de *Pseudotsuga menziesii*.

3.9 Prueba de Mantel

La prueba de mantel permitió correlacionar la matriz de distancias genéticas con la matriz de distancias geográficas, realizándose 1000 permutaciones. La correlación fue positiva ($r = 0.24$; $p = 0.102$) pero no significativa, lo que indica que la diferenciación genética parece no deberse al flujo de genes producido por un modelo de aislamiento por distancia (Cuadro 9). Sin embargo, pudieran existir barreras o características del paisaje que estén impidiendo o reduciendo el flujo genético.

3.10 Análisis Bayesiano de Asignación de Individuos

La estructura genética poblacional fue inferida a partir del análisis de asignación de individuos de manera aleatoria utilizando un enfoque sistemático de agrupamiento bayesiano, con base en la estimación de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), y del método propuesto por Evanno *et al.* (2005), basado en la tasa de cambio de la función de máxima verosimilitud de ΔK [$\Delta K = \text{mean}(|L''(K)|) / \text{sd}(L(K))$]. Este análisis mostró un punto de inflexión en $K = 2$, el cual representa la mejor bondad en el ajuste estadístico (Figura 8).

En el análisis de estructura se consideró que estas poblaciones provenían de un ancestro común y en modelo de mezcla. Cada individuo de cada población fue asignado a uno de los grupos definidos previamente por K , donde cada color (Figura 9) indica la fracción de pertenencia a un grupo determinado. En esta figura se aprecian dos grupos genéticos, indicados en color verde y rojo. La proporción de color en cada población representa la fracción de ancestría con respecto a cada grupo.

Cuadro 9. Matriz de distancias geográficas entre las poblaciones de *Pseudotsuga menziesii*.

Población	E. Zapata	Cruz de León	La Caldera	Cuatexmola	Tlalmotolo	Apizaquito	La Rosa	Axopilco	Fracción IV	Rancho Nvo.	Villarreal	Carbonero Jacales	La Barranca
E. Zapata	0												
Cruz de León	5.25	0											
La Caldera	8.16	9.04	0										
Cuatexmola	11.2	10.1	4.49	0									
Tlalmotolo	18.7	14.1	15.1	11.1	0								
Apizaquito	74.8	72.5	67.4	63.8	59.1	0							
La Rosa	4.0	7.53	4.75	8.62	18.1	72.0	0						
Axopilco	9.8	13.6	6.73	10.8	21.7	71.2	6.15	0					
Fracción IV	18.2	21.0	26.2	29.5	35.2	92.9	21.5	24.8	0				
Rancho Nvo.	20.0	23.9	27.1	31.0	38.2	94.4	22.4	24.5	5.89	0			
Villarreal	4.6	7.32	3.64	7.45	17.0	70.8	1.18	6.29	22.7	23.7	0		
Carbonero Jacales	112.1	112.8	119.8	112.2	123.6	181.6	115.7	119.7	94.9	96.9	116.7	0	
La Barranca	252.3	254.3	260.3	263.3	266.4	327.6	255.5	258.6	234.6	234.5	255.3	149.2	0

Distancia geográfica entre las poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* analizadas. Estimada en kilómetros, mediante el software ArcGIS® y ArcMap™.

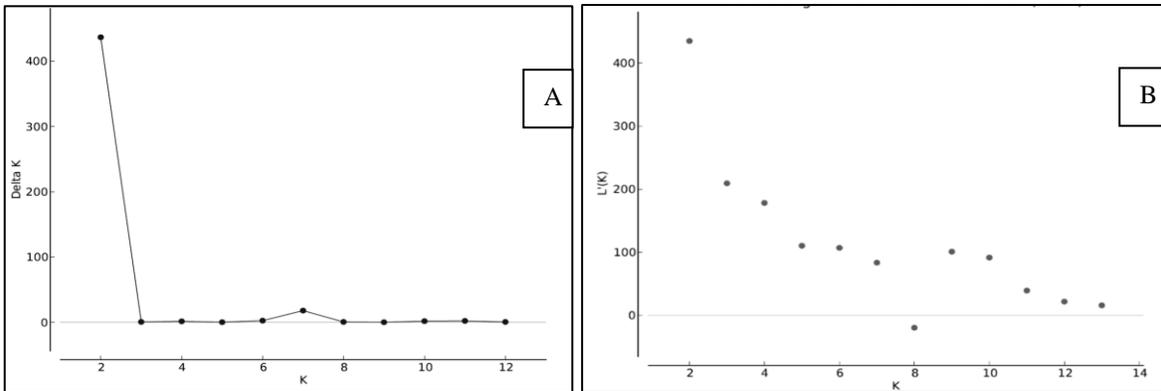


Figura 8. A) Tasa de cambio de segundo orden con respecto a K (ΔK); muestra un pico claro en $K = 2$. B) distribución de la probabilidad calculado como $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$.

Las poblaciones Emiliano Zapata, Cruz de León y La Caldera presentaron coeficientes de ancestría cercanos a la unidad, lo que indica que estas poblaciones pertenecen en mayor proporción al grupo I (representado en color verde en la Figura 9). Mientras que las poblaciones de Apizaquito y La Rosa tienen valor de $Q = 0.978$ y 0.951 , respectivamente, y se encuentran ubicadas en el grupo II (representado en color rojo en la Figura 9). El resto de las poblaciones se distribuyeron de acuerdo con sus valores de coeficiente de ancestría en los grupos I y II. La población Carbonero Jacales presentó un coeficiente de ancestría $Q = 0.561$ y se ubicó en el grupo I. Sin embargo, este valor fue muy bajo e indica que comparte ancestría reciente con las poblaciones indicadas en el grupo II identificado en rojo (Cuadro 10).

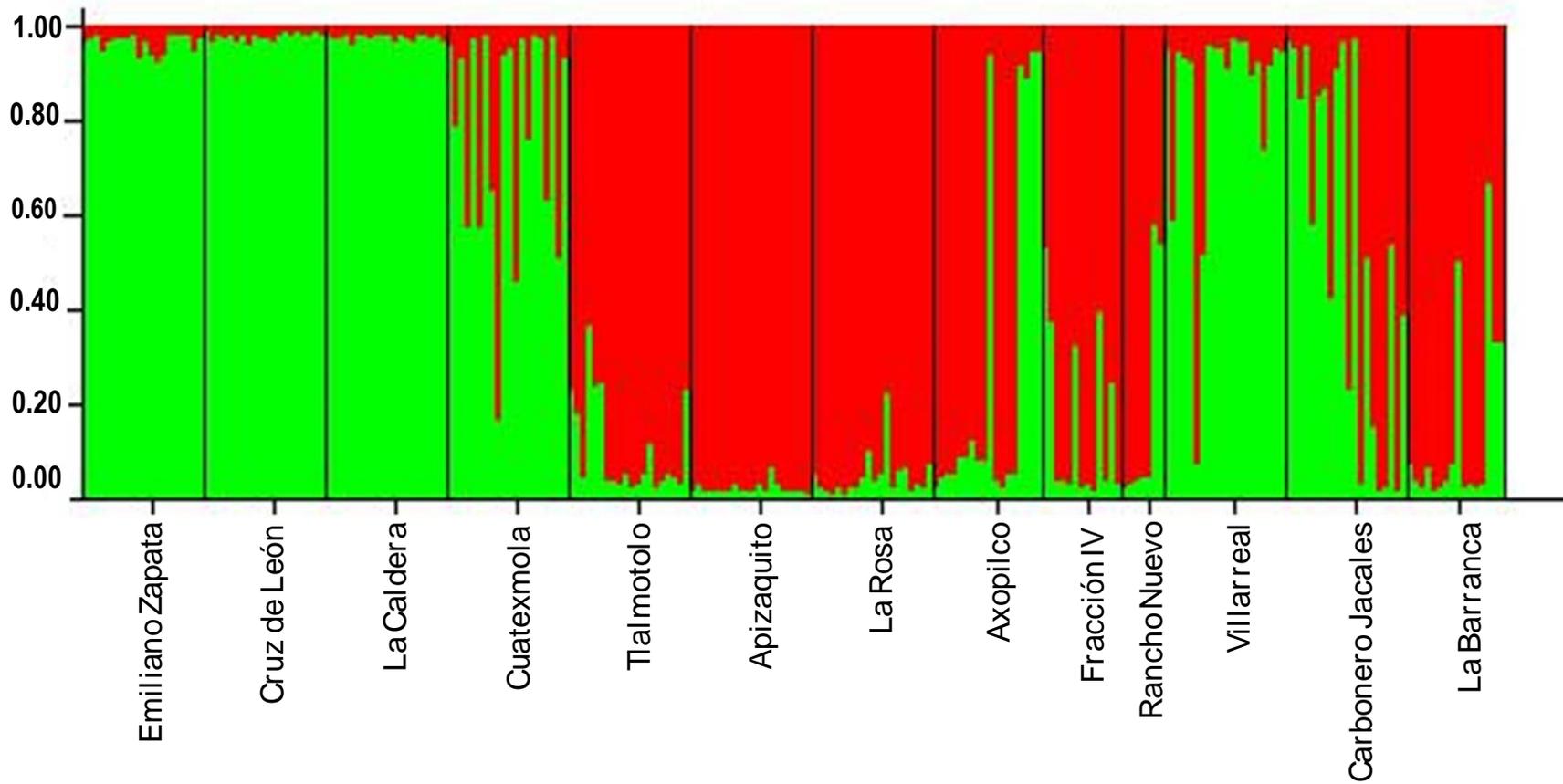


Figura 9. Representación gráfica de la estructura genética generada con el software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Cada columna representa a cada una de las poblaciones, las agrupaciones K están indicadas por colores.

Cuadro 10. Proporción de ancestría estimada (Q) para las 13 poblaciones analizadas de *Pseudotsuga menziesii* (Pritchard *et al.*, 2000).

Población	Grupo Genético	
	I	II
Emiliano Zapata	0.965	0.035
Cruz de León	0.979	0.021
La Caldera	0.978	0.022
Cuatexmola	0.787	0.213
Tlalmotolo	0.106	0.894
Apizaquito	0.022	0.978
La Rosa	0.049	0.951
Axopilco	0.303	0.697
Fracción IV	0.164	0.836
Rancho Nuevo	0.187	0.813
Villarreal	0.848	0.152
Carbonero	0.561	0.439
Jacales		
La Barranca	0.145	0.855

*Los coeficientes de ancestría en conjunto suman la unidad. Se resalta en negrita el grupo genético más probable para cada población.

IV. DISCUSIÓN

La diversidad genética encontrada en este estudio fue de $Ht = 0.417$. Este valor fue superior al esperado para la especie, de acuerdo con su forma de vida (de ciclo largo y de polinización anemófila), y con lo reportado por Hamrick *et al.* (1992), quienes señalaron que para especies de polinización libre se esperan valores de diversidad de $Ht = 0.279$. La diversidad genética inferida en este estudio resulta contrastante (en magnitud de casi seis veces mayor), con los resultados reportados por Cruz *et al.* (2011), quienes realizaron estudios de diversidad genética en *P. menziesii* empleando marcadores isoenzimáticos ($Ht = 0.077$) en poblaciones del centro y norte del país. Sin embargo, en comparación con estudios reportados para poblaciones de Canadá y Estados Unidos, los valores de diversidad genética para las poblaciones mexicanas fueron menores.

Las diferencias encontradas podrían ser explicadas por tres razones, principalmente: la biología e historia evolutiva de la especie, la naturaleza de los marcadores usados en cada estudio y a la influencia del rango de distribución geográfica en la diversidad genética. La biología e historia evolutiva de cada especie influye en los niveles de diversidad genética. El valor de $Ht = 0.417$ es superior al característico para especies leñosas que presentan su mismo sistema de reproducción y mecanismo de dispersión de polen con $Ht = 0.279$ estimada con marcadores aloenzimáticos (Hamrick, *et al.*, 1992) y $Ht = 0.250$ con marcadores nucleares RAPD (Nybom, 2004).

Los marcadores microsatélites usados para el presente estudio son marcadores considerados altamente polimórficos, a diferencia de los marcadores isoenzimáticos usados por Cruz *et al.* (2011) y Hamrick *et al.* (1992), lo cuales detectan pocos alelos por locus, especialmente en poblaciones pequeñas y, considerando que las proteínas son producto del ADN, éstas pueden ser afectadas cuantitativa y cualitativamente por el ambiente (Becerra, 2000). Valores similares a los reportados por Cruz *et al.* (2011) se han señalado en estudios realizados con isoenzimas en poblaciones de distribución reducida en México como *Picea mexicana* $Ht = 0.125$ (Ledig *et al.*, 2002) y en diferentes especies de *Abies* que se distribuyen de manera aislada como *A. flinckii* ($He = 0.064$ a 0.158), *A. guatemalensis* ($He = 0.044$ a

0.094), *A. hickeli* ($He = 0.073$ a 0.135) y *A. religiosa* ($He = 0.008$ a 0.235) (Aguirre-Planter *et al.*, 2000).

La diversidad genética también se ve afectada por la ubicación geográfica de la especie (Hamrick *et al.*, 1992). Valores superiores de diversidad genética se han reportado en poblaciones de *P. menziesii* que se distribuyen al norte de México, en Estados Unidos y Canadá, donde las poblaciones son grandes y de distribución continua (Slavov *et al.*, 2004). La diferencia en los valores de diversidad detectados en el presente estudio, en comparación con los valores reportados en Estados Unidos y Canadá, puede ser el resultado del proceso de fragmentación poblacional que ha afectado a la especie. Estudios paleoclimáticos en las poblaciones de *P. menziesii* indican que las poblaciones que se distribuyen en México surgieron durante el evento de glaciación. Durante este periodo, las poblaciones ubicadas al Norte de México migraron hacia el sur refugiándose en los sistemas montañosos. En los eventos interglaciares, las poblaciones se expandían hacia condiciones más favorables, formándose las poblaciones actuales. Estos cambios climáticos pudieron ocasionar cuellos de botella para la especie, que redujeron la variación genética y condujeron a la diferenciación interpoblacional, mientras que las poblaciones que se distribuyen en Estados Unidos y Canadá fueron puntos secundarios de convergencia en periodos interglaciares, resultando en una mayor diversidad genética (Hermann, 1985; Gugger *et al.*, 2011).

En poblaciones de coníferas con distribución fragmentada se han reportado niveles de diversidad genética altos, comparados con la diversidad genética inferida en este estudio $Ht = 0.413$. Mehes *et al.* (2009), estimaron la diversidad genética con marcadores microsatélites en poblaciones de Canadá en *Pinus monticola* ($He = 0.810$) y *P. strobus* ($He = 0.800$), las cuales presentan intervalos de distribución restringida; sin embargo, presentan valores de diversidad altos. Este resultado puede atribuirse a que fueron poblaciones previamente contiguas y después de un período de glaciación, sus poblaciones se fragmentaron. A diferencia de las poblaciones de *Pseudotsuga* presentes en México y que fueron producto del proceso de glaciación.

Las poblaciones de La Rosa, Tlalmotolo, La Barranca y Carbonero Jacales, presentan niveles de diversidad genética superiores ($He = 0.364, 0.365, 0.371$ y 0.383 respectivamente) comparados con el resto de las poblaciones. Ante el escenario del cambio climático, las poblaciones con menor diversidad genética tendrían menor capacidad de adaptarse. Sin embargo, es necesario considerar otros factores que pueden influir en la permanencia de la población. Con base en el estudio realizado por López *et al.* (2015), las poblaciones Tlalmotolo y La Rosa están calificadas como poblaciones en alto riesgo de extinción, considerando no solo los parámetros genéticos sino también los parámetros ecológicos y antropogénicos. El coeficiente de ancestría $Q = 0.95$ en la población La Rosa, es cercano a uno, este valor sugiere que los individuos que la conforman comparten información genética similar. Los individuos de esta población se localizan a lo largo de una barranca, la cual pudo actuar como barrera física que aisló a la población e impidió el flujo de genes. El número de alelos privados en la población La Rosa es alto. Las barreras físicas como barrancas o sistemas montañosos pueden impedir que los organismos intercambien información genética (intercambio de polen), de tal manera que el flujo de genes puede modelar la estructura genética de una población y además estar directamente relacionado con el coeficiente de diferenciación genética.

Tlalmotolo presenta uno de los valores más altos de diversidad genética, sin embargo, es considerada una población en riesgo alto de desaparecer (López *et al.*, 2015; Guerra de la Cruz *et al.*, 2012). El coeficiente de ancestría fue de $Q = 0.894$, lo que indica mayor probabilidad de pertenecer al grupo II y existe flujo genético reciente con poblaciones del grupo I, esta población está conformada de 565 árboles maduros a jóvenes (López *et al.*, 2015) la estructura diamétrica indica reciente establecimiento, dominan los árboles menores a 15 cm de diámetro (Guerra de la Cruz *et al.*, 2012).

Las poblaciones La Barranca en Querétaro y Carbonero Jacales en Huayacocotla, Veracruz, son poblaciones jóvenes las cuales están caracterizadas por la presencia de árboles de diámetro pequeño, con baja densidad de individuos y con problemas de regeneración, principalmente por pastoreo (Domínguez *et al.*, 2004). Estas poblaciones presentaron los niveles de diversidad más altos en este estudio. Carbonero Jacales presenta un coeficiente de

ancestría $Q = 0.561$ indicando que comparte ancestros comunes con los dos grupos genéticos identificados. Esta población es importante, particularmente en la conservación y mejoramiento de la especie con fines comerciales. Es necesario el establecimiento de huertos semilleros, limitar el pastoreo y buscar alternativas de regeneración del bosque.

Los niveles de diversidad genética más bajos se detectaron en las poblaciones de Rancho Nuevo ($He = 0.197$) y Fracción IV ($He = 0.226$) de Tlaxco, Tlaxcala. Los niveles de heterocigosidad reducidos se pueden contrarrestar propiciando el flujo genético entre poblaciones que compartan características ambientales en común, a partir del intercambio de germoplasma. La población de Axopilco ($He = 0.29$) comparte características similares de suelo y clima (Ventura *et al.*, 2010). Las poblaciones de Emiliano Zapata, Cruz de León, La Caldera y Cuatexmola presentan un coeficiente de ancestría cercano a la unidad con respecto al grupo I, por lo que sería adecuado introducir germoplasma de estas poblaciones a Rancho Nuevo y Fracción IV que presentan ancestría reciente con el grupo II para propiciar la introducción de nuevas variantes alélicas. El intercambio genético debe considerar características ambientales, ya que el aislamiento de las poblaciones de *P. menziesii* ha propiciado la adaptación local (Reyes *et al.*, 2005).

A nivel de loci se detectaron deficiencias de heterocigotos, como lo indican los valores de los índices de fijación de Wright $Fis = 0.234$ y $Fit = 0.452$ en todas las poblaciones analizadas. Adicionalmente, los valores de Ho fueron menores a He (Cuadro 5). Aunado a esto, la fragmentación de las poblaciones es otro factor que impacta los niveles de heterocigosidad de manera negativa, contribuyendo a los valores altos de diferenciación genética.

El flujo de genes modela la estructura genética de las poblaciones. El coeficiente de diferenciación genética $\Delta = 0.24$, basado en métodos de permutación, fue el valor empleado para estimar la diferenciación genética entre las poblaciones ya que estima de manera imparcial este parámetro. El estimador de diferenciación genética θ , análogo a Fst , puede llegar a sobreestimar este valor, por el tamaño de muestra variable en las poblaciones. El valor de $\theta = 0.27$ fue ligeramente mayor al estimado con Δ . La comparación de estos valores con el calculado por Nybom (2004), $Fst = 0.19$, para especies con biología de vida similar,

fueron superiores (en cualquiera de los tres modelos), sugiriendo la presencia de diferenciación genética en las poblaciones analizadas, probablemente como resultado del proceso de fragmentación de la especie.

Estudios previos realizados con isoenzimas en poblaciones de *P. menziesii* en el Centro y Norte de México, reportaron un coeficiente de diferenciación $F_{st} = 0.29$ (Cruz *et al.*, 2011). Este valor fue ligeramente superior al detectado en el presente estudio, lo cual puede deberse a que se emplearon poblaciones exclusivamente del centro de México. El valor de diferenciación genética fue alto, comparado también con las poblaciones que se encuentran en Estados Unidos y Canadá, como es de esperarse, al tratarse de poblaciones continuas y puras (presentando mayor flujo de genes). Hedrick (1999) señala que las poblaciones con altos niveles de heterocigosidad en loci microsatélites, pueden presentar niveles de diferenciación muy baja, como es el caso de los estudios reportados para Canadá y Estados Unidos, mientras que, en México, las poblaciones analizadas presentaron deficiencias de heterocigotos y valores altos de diferenciación.

La distribución de la variación genética se estimó a partir de un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Los resultados indican que la mayor parte de la variación se encuentra dentro de las poblaciones (73.05 %) y una proporción menor (26.95 %) entre las poblaciones. Este resultado puede explicarse debido a la biología de la especie. En general, las poblaciones de vida larga, panmíticas, polinizadas por el viento y de sucesión tardía, experimentan niveles de variación más altos dentro de las poblaciones (Hamrick y Godt, 1996; Ledig, 1998 y Nybom, 2004). El coeficiente de estructuración genética fue de $\Phi_{st} = 0.27$ ($p < 0.05$) valor mayor al característico para plantas perennes $\Phi_{st} = 0.25$ (Nybom, 2004). Este valor sugiere la existencia de estructura genética, como consecuencia del flujo genético reducido y evolución independiente de las poblaciones.

Los valores de distancia e identidad genética son variables. El intervalo de identidad genética es de $I = 0.66 - 0.97$ mientras que los valores de distancia genética fueron de $0.03 - 0.42$. Los resultados de los análisis de estructura identificaron dos grupos principales. El primer grupo (I) está indicado en verde. Las poblaciones de este grupo se encuentran

distribuidas en el mismo cuadrante en el análisis de PCoA (Figura 6). Las poblaciones Cruz de León, La Caldera y Emiliano Zapata presentan los valores más altos de Q (0.979, 0.978 y 0.965, respectivamente). Estas poblaciones se caracterizan por poseer árboles maduros con diámetros superiores a 80 cm. (Ventura *et al.*, 2010). Lo que indica que estas poblaciones han sufrido una reducida ancestría reciente, con respecto a las demás poblaciones.

Las poblaciones Apizaquito, La Rosa y Tlamotolo ($Q = 0.978, 0.951$ y 0.894 , respectivamente) presentan los coeficientes de ancestría más altos dentro del grupo II. Estas poblaciones se caracterizan por tener árboles de diferentes edades. Las poblaciones con valores intermedios de ancestría indican poblaciones mixtas que muestran ancestría reciente con respecto a las demás poblaciones (Carbonero Jcales, $Q = 0.566$).

La prueba de mantel permitió corroborar si la distancia geográfica tuvo algún efecto en los valores de distancias genéticas calculadas en las poblaciones analizadas. Los resultados indican que aunque existe una correlación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética ($r = 0.24, p = 0.102$), ésta no fue significativa. Este resultado indica que el aislamiento por distancia no ha jugado un papel significativo en la diferenciación genética.

V CONCLUSIONES

La diversidad genética detectada en este estudio se considera moderada, a pesar de la fragmentación que han sufrido las poblaciones mexicanas de *P. menziesii*. El nivel de diversidad genética detectado en las poblaciones es considerablemente superior al reportado con otro tipo de marcadores en poblaciones mexicanas del centro de México e inferior al reportado para poblaciones de Estados Unidos y Canadá.

Existe diferenciación genética entre las poblaciones lo que sugiere un limitado flujo génico entre ellas, la distancia geográfica, no influye en que tan distantes genéticamente sean las poblaciones, aunque existen otros factores que puedan influir.

Se detectó una alta estructura genética. Dos grupos genéticos se conformaron en el análisis bayesiano de asignación de individuos.

Se comprobó la utilidad de los marcadores SSR en el análisis de diversidad y estructura genética en poblaciones mexicanas de *P. menziesii*.

VI. LITERATURA CITADA

Aguirre-Planter, E., G. R. Furnier, and L.E. Eguiarte. 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany* 87(3): 362–371.

Ahuja, M. R., and S. M. Jain (eds.) 2016. Genetic Diversity and Erosion in Plants. Botany Department, Sustainable Development and Biodiversity 8, Volume 2. pp: 1-409.

Amarasinghe, V., and J. E. Carlson. 2002. The development of microsatellite DNA markers for genetic analysis in Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* 32 (11): 1904-1915.

Bastien, J. Ch., L. Sanchez, and D. Michau. 2013. Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *In*: Pâques L.E. (ed.): Forest Tree Breeding in Europe, Current State-of-the-Art and Perspectives. *Managing Forest Ecosystems* 25: 325–369.

Becerra, V., y C. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura técnica* 60(3): 270-281.

Beedlow, P.A., S. R. Waschmann, E. H. Lee, and D. T. Tingey. 2017. Seasonal patterns of bole water content in old growth Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) *Agricultural and Forest Meteorology* 242: 209-219.

Birol, I., A. Raymond, S. D. Jackman, S. Pleasance, R. Coope, G. A. Taylor, M. M. Yuen, C. I. Keeling, D. marca, B. P. Vandervalk, H. Kirk, P. Pandoh, R. A. Moore, Y. Zhao, A. J. Mungall, B. Jaquish, A. Yanchuk, C. Ritlant, B. Boyle, J. Bousquet, K. Ritland, J. Mackay, J. Bohlmann, and S. J. Jones. 2013. Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. *Bioinformatics (Oxford: England)* 29: 1492-1497.

Borem, A., and R. Fritsche-Neto. 2014. Biotechnology and Plant Breeding. *Biotechnology Applied to Plant Breeding. Cedrus, Pseudolarix, Keteeleria, Nothotsuga, Tsuga, Cathaya,*

Pseudotsuga, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books Königstein, Federal Republic of Germany. pp: 171-191.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* 32: 314–331.

Bruford, M.W., N. Davies, M. E. Dulloo, D. P. Faith and M. Walters. 2017. Monitoring changes in genetic diversity. *In: Walters M, and R.J. Scholes (eds.). The GEO Handbook on Biodiversity Observation Networks. Springer International Publishing pp: 107-128.*

Cruz N., J., J. J. Vargas H., P. Ramírez V. y J. López U. 2011. Diversidad genética y diferenciación de poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en México. *Revista Fitotecnica Mexicana* 34: 233-240.

Cruz N., J., J. J. Vargas H., P. Ramírez V. y J. López U. 2008. Patrón de cruzamiento en poblaciones naturales de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en México. *Agrociencia* 42: 367-378.

Da Ronch, F., G. Caudullo, and D. de Rigo. 2016. *Pseudotsuga menziesii* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *In: San-Miguel-Ayanz, J., D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, and A. Mauri. (eds.). European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg. pp: 146-147.*

Debreczy, Z. and I. Racz. 1995. New species and varieties of conifers from Mexico. *Phytologias* 78: 217-243.

Dorado, G., G. Besnard, T. Unver, and P. Hernandez. 2017. Polymerase chain Reaction (PCR). Reference Module in Biomedical Science. <https://www.sciencedirect.com/science/module/topic/9780128012383/Concept000474? si=1& ct=25>

Domínguez A., F. A., J. J. Vargas H., J. López U., E. Ramírez V., and E. Guízar N. 2004. Aspectos ecológicos de *Pseudotsuga menziesii* en el ejido La Barranca, Pinal de Amoles, Querétaro. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 75(2): 191-203.

Earl, D. A. and B. M. von Holdt. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.

Eckert, J. A., A. D. Bower, J. L. Wegrzyn, B. Pande, K. D. Jermstad, K. V. Krutovsky, J. B. St. Clair, and D. B. Neale. 2009. Association genetics of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*, *Pinaceae*). I. Cold-hardiness related traits. *Genetics* 182: 1289-1302.

El-Kassaby, Y. A., and K. Ritland. 1996. Genetic variation in low elevation Douglas-fir of British Columbia and its relevance to gene conservation. *Biodiversity & Conservation* 5(6): 779-794.

Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.

Excoffier, L., P. Smouse, and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Excoffier, L. and H. E. L. Lisher. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Farjon, A. 1990. *Pinaceae*: Drawings and descriptions of the Genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nhothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* y *Picea*. Koeltz Scientific Books Königstein, Federal Republic of Germany. pp: 171-191.

Farjon, A. and D. Filer. 2013. An Atlas of the World's Conifers: An Analysis of their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status. 524 p.

Frith, K. E. and A. R. Hoelzel. 2016. Conservation Genetics. Durham University, Durham, UK, Volume 2. 263-277.

Fussi, B., A. Dounavi, and M. Konnert. 2013. Identification of varieties and gene flow in Douglas-fir exemplified in artificially established stands in Germany. *Annals of Forest Reserch* 56 (2): 249-268.

Gavin, D. G., M. C. Fitzpatrick, P. F. Gugger, K. D. Healh, F. Rodríguez-Sánchez, S. Z. Dobrowski, A. Hampe, F. S. Hu, M. B. Ashcroft, P. J. Bartlein, J. L. Blois, B. C. Carstens, E. B. Davis, G. de Lafontaine, M.E. Edwards, M. Fernández, P. D. Henne, E. M. Herring, Z. A. Holden, W. S. Kong, J. Liu, D. Magri, N. J. Matzke, M. S. McGlone, F. Saltré, A. L. Stigall, Y. H. Tsai and J. W. Williams. 2014. Climate refugia: joint interference from fossil records, species distribution models and phylogeography. *New Phytologist* 204: 37-54.

Gernandt, D. S., y J. A. Pérez-de la Rosa. 2014. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 123-133.

Gillet, E. M., and H. R. Gregorius. 2008. Measuring differentiation among populations at different levels of genetic integration. *BMC Genetics* 9: 1-16.

Guerra de la Cruz, V., J. C. López-Domínguez, J. López-UPTON, C. Bautista-Sampayo y L. Hernández-García. 2012 Estructura silvícola de poblaciones de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en Tlaxcala y Puebla. *Revista Mexicana de Ciencias forestales*, 73-88.

Gugger, P. F., A. González- Rodríguez., H. Rodríguez-Correa, S. Sugita, and J. Cavender-Bares. 2011. Southward Pleistocene migration of Douglas-fir into Mexico: phylogeography, ecological niche modeling, and conservation of ‘rear edge’ populations. *New Phytologist* 189: 1185-1199.

Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais, C. Lepoittevin, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin and R. J. Petit. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11(4): 591-611.

Gillet, E. M. and H. R. Gregorius. 2013. Measuring differentiation among populations at different levels of genetic integration. *BCM Genetics* 9: 1-16.

Gustafson, K. D., T. W. Vickers, W. M. Boyce and H. B. Ernest. 2017. A single migrant enhances the genetic diversity of an inbred puma population. *Royal Society Open Science*. 4(5): 170115.

Hamilton, M. B. and J. R. Miller. 2002. Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics* 162: 1897-1909.

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.

Hamrick, J. L., and M. J. W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical transactions of The Royal Society B. B* 351: 1291–1298.

Hedrick, P. W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313–318.

Hedrick, P. W. 2004. Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management* 197: 3–19.

Hermann, R. K. 1985. The genus *Pseudotsuga*: Ancestral history and past distribution. Spec. Publ. 2b. Forest Research Laboratory, II Oregon State University. Corvallis, OR. 25 p.

Hermann, R. K., and D. P. Lavender. 1999. Douglas-fir planted forests. *New Forest* 17: 53–70.

Holliday, J. A., S. N. Aitken; J. E. Cooke; B. Fady, S. C. González-Martínez, M. Heuertz, J.P. Jaramillo-Correa, C. Lexer, M. Staton, R. W. Whetten, and C. Plomion. 2017. Advances in ecological genomics in forest trees and applications to genetic resources conservation and breeding. *Molecular Ecology* 26: 706-717.

Jalali, M., J. Zaborowska, and M. Jalali. 2017. The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR y RT-PCR. *In*: Jalali, M., F. Y. L. Saldanha, and M. Jalali. (eds.). *Basic Science Methods for Clinical Researchers* University of Liverpool, University of Oxford. pp:1-18.

Jiang, G. 2017. Molecular Markers. *Plant Breeding and Genetic. Reference Module in Life Sciences. Encyclopedia of Applied Plant*. 2nd edition. pp: 207-214.

Juárez A., A., J. López U., J.J. Vargas H., C. Sáenz R. 2006. Variación geográfica en la germinación y crecimiento inicial de Plántulas de *Pseudotsuga menziesii* en México. *Agrociencia* 40: 783-792.

Kalinowski, S.T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.

Kimura, M. and J. F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725–738.

Krutovsky K. V., M. Troggo, G. R. Brown, K. D. Jermstad, and D. B. Neale. 2004. Jermstad. Comparative Mapping in the Pinaceae. *Genetics* 168(1):447-461.

Krutovsky, K.V., J. B. S. Clair, R. Saich, V. D. Hipkins, and D. B. Neale. 2009. Estimation of population structure in coastal Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*] using allozyme and microsatellite markers. *Tree Genetics and Genomes* 5(4): 641-658.

Ledig, F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: D. M Richardson (ed.). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge. pp: 251-280.

Ledig, F. T., P. D. Hodgskiss, and V. Jacob-Cervantes. 2002. Genetic diversity mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martinez. *Conservation Genetics* 3(2): 113-122.

Levene, H. 1949. On a matching problem in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics* 20: 91-94.

Loewe, L. 2008. Negative selection. *Nature Education* 1(1):59. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/negative-selection-1136>

López U., J., R. Valdez L., A. Ventura R., J. J. Vargas H. and V. Guerra de la C. 2015. Extinction risk of *Pseudotsuga menziesii* populations in the central region of Mexico: An AHP analysis. *Forest* 6:1598-1612.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.

Mápula L., M., J. López U., J. J Vargas H., and A. Hernández L. 2008. Germinación y vigor de semillas en *Pseudotsuga menziesii* de México. *Ra Ximhai* 4: 119-134.

Martínez, M. 1994. Las Pseudotsugas de México. Boletín de la Sociedad Botánica de México 8: 21-24.

Marwal, A., and K. A. Sahu. 2014. Molecular markers: Tool for genetic analysis. *In*: Verma, A. S., and A. Singh. (eds.). Animal Biotechnology. Waltham, EE. UU. pp: 289-305.

Mehes, M., K. K. Nkongolo, and P. Michael. 2009. Assessing genetic diversity and structure of fragmented populations of eastern white pine (*Pinus strobus*) and western white pine (*P. monticola*) for conservation management. *Journal of Plant Ecology* 2(3): 143–151.

Miller, M. P. 2000. Tools for population genetic analysis (TFPGA). Ver 1.3. Northern Arizona University. Arizona, E. U. A. 29 p.

Mote, P. W. and E. P. Salathé. 2010. Future climate in the Pacific Northwest. *Climatic Change* 102: 29–50.

Neale, D. B, C. H. Langley, S. L. Salzberg, and J. L. Wegrzyn. 2013. Open access to tree genomes: the path to a better forest. *Genome Biology* 14: 120.

Neale D. B., P.E. McGuire, N.C. Wheeler, K.A. Stevens, M. W. Crepeau, C. Cardeno, A. V. Zimin D. Puiu, G.M. Perlea, U. U. Sezen, C. Casola, T. E. Koralewski, R. Paul, D. Gonzalez-Ibeas, S. Zaman, R. Cronn, M. Yandell, C. Holt, C. H. Langley, J. A. Yorke, S. L. Salzberg, and J. L. Wegrzyn. 2017. The Douglas-fir genome sequence reveals specialization of the photosynthetic apparatus in Pinaceae. *G3 (Bethesda)* 7(9): 3157-3167.

Neale, D. B., J. L. Wegrzyn, K. A. Stevens, A. V. Zimin, D. Puiu, M. W. Crepeau, C. Cardeno, M. Koriabine, A.E. Holtz-Morris, J.D. Liechty, P. J. Martínez-García, H.A. Vasquez-Gross, B. Y. Lin, J.J. Zieve, W. M. Dougherty, S. Fuentes-Soriano, L. S. Wu, D. Gilbert, G. Marçais, M. Roberts, C. Holt, M. Yandell, J. M. Davis, K. E. Smith, J. F. Dean,

W.W. Lorenz, R. W. Whetten, R. Sederoff, N. Wheeler, P. E. McGuire, D. Main, C. A. Loopstra, K. Mockaitis, P. J. deJong, J. A. Yorke, S. L. Salzberg and Langley. 2014. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome Biology* 15(3): R59.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.

Nei, M. 1977. F-statistics and the analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41: 225-233.

Neophytou, C., A. M. Weisser, D. Landwehr, M. Šeho, U. Kohnle, I. Ensminger, and H. Wildhagen. 2016. Assessing the relationship between height growth and molecular genetic variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) provenances. *European Journal of Forest Research* 135(3):465.

Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143–1155.

Nystedt B, N. R. Street, A. Wetterbom, A. Zuccolo, L. Yao-Cheng, D. G. Scofield, F. Vezzi, N. Delhomme, S. Giacomello, A. Alexeyenko, R. Vicedomini, K. Sahlin, E. Sherwood, M. Elfstrand, L. Gramzow, K. Holmberg, J. Hällman, O. Keech, L. Klasson, M. Koriabine, M. Kucukoglu, M. Käller, J. Luthman, F. Lysholm, T. Niittylä, Å. Olson, N. Rilakovic, C. Ritland, J. A. Rosselló, J. Sena, T. Svensson, C. Talavera-López, G. Theißen, H. Tuominen, K. Vanneste, Zhi-Qiang Wu, B. Zhang, P. Zerbe, L. Arvestad, R. Bhalerao, J. Bohlmann, J. Bousquet, R. Garcia Gil, T. R. Hvidsten, P. de Jong, J. MacKay, M. Morgante, K. Ritland, B. Sundberg, S. L. Thompson, Y. V. de Peer, B. Andersson, O. Nilsson, P. K. Ingvarsson, J. Lundeberg and S. Jansson. 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* 497: 579–584.

Pathania, A., N. Rialch, and P. N. Sharma. 2017. Marker Assisted Selection in Disease Resistance Breeding: A Boon to Enhance Agricultural Production. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, United States. Dubey, S. K., Pandey, A., Sangwan, R. S. (ed.). pp: 187-213.

Pauchard, A., B. Langdon, and E. Peña. 2008. Potencial invasivo de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en bosques nativos del centro-sur de Chile: Patrones y recomendaciones. *In*: R. Mujica, H. Grosse & B. Muller-Using (eds.). Bosques seminaturales: Una opción para la rehabilitación de bosques nativos degradados. INFOR, Santiago, Chile. pp: 89-114.

Peakall, R.; Smouse, P.E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.

Petit, J. R., J. Duminil, S. Fineschi, A. Hampe, D. Salvani, and G. G. Vendramin. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689–701.

Porth, I. and Y. A. El-Kassaby. 2014. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers. *Diversity* 6: 283:295

Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945–959.

Putman, I. and I. Carbone. 2014. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution* 4(22): 4399-4428.

Reyes H., V. J., J. J. Vargas H., J. Lopez U. y H. Vaquera H. 2005. Variación morfológica y anatómica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Acta Botánica Mexicana* 70: 47-67.

Rzedowski, J. y L. Huerta. 1978. Vegetación de México. México, Limusa. pp: 323-324

Saghai-Maroof, M.A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 8014-8018.

Sanguinetti, C. J., E. D. Neto, and A. J. G Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-918.

Sánchez, E. M., R. Z. Arregui, G. P. Veigas y F. P. Saavedra. 2008. Variabilidad de parámetros de calidad de madera entre y dentro de procedencias de *Pseudotsuga menziesii*. *Cuadernos de Sociedad Española de Ciencias Forestales* 24:75-80.

Selkoe, K. A., and R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9(5): 615-629.

Slavov, G. T., G.T. Howe, I. Yakovlev, K. J. Edwards, K. V. Krutovskii, G. A. Tuskan, J.E. Carlson, S. H. Strauss, and W. T. Edwards. 2004. Highly variable SSR markers in Douglas-fir: Mendelian inheritance and map locations. *Theoretical and Applied Genetics* 108 (5): 873-880.

Stevens, K. A., J. L. Wegrzyn, A. Zimin, D. Puiu and M. Crepeau. 2016. Sequence of the sugar pine megagenome. *Genetics* 204: 1613–1626.

ThermoFisher Scientific. 2017. NanoDrop One User Guide. Wilmington DE, USA. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-User-Guide-EN.pdf>, consultado 16 de Octubre de 2017.

(USDA). United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service. 2002. DOUGLAS FIR *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. USDA NRCS Plant

Materials Program. Disponible en: https://plants.usda.gov/factsheet/pdf/fs_psme.pdf consultado 17 de Diciembre de 2017.

van Loo, M., W. Hintsteiner, E. Pötzelsberger, S. Schöler, and H. Hasenauer. 2015. Intervarietal and intravarietal genetic structure in Douglas-fir: nuclear SSRs bring novel insights into past population demographic processes, phylogeography, and intervarietal hybridization. *Ecology and Evolution* 5: 1802-1817.

Velasco G., M. V., J. López U., G. Ángeles P., J. J. Vargas H. y V. Guerra de la C. 2007. Dispersión de semillas de *Pseudotsuga menziesii* en poblaciones del centro de México. *Agrociencia* 41: 121-131.

Ventura R., A., J. López U., J. J. Vargas H., y V. Guerra de la C. 2010. Caracterización de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco en el centro de México; Implicaciones para su conservación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33: 107-116.

Villagómez L., M. A., y M. A Bello G. 2015. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *glauca* (Beissn.) Franco: nuevo registro para Guanajuato. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 6 (30): 66-73.

Vitale, I. 2017. *Molecular Biology*. University of Rome Tor Vergata, Rome Italy. Reference Module in Life Sciences pp:1-2.

Warren, R. L., C. I. Keeling, M. M. Yuen, A. Raymond, G. A. Taylor, B. P. Vandervalk, H. Mohamadi, D. Paulino, R. Chiu, S. D. Jackman, G. Robertson, C. Yang, B. Boyle, M. Hoffmann, D. Weigel, D. R. Nelson, C. Ritland, N. Isabel, B. Jaquish, A. Yanchuk, J. Bousquet, S. J. Jones, J. MacKay, I. Birol and J. Bohlmann. 2015. Improved white spruce (*Picea glauca*) genome assemblies and annotation of large gene families of conifer terpenoid and phenolic defense metabolism. *The Plant Journal* 83: 189–212.

Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Wheeler, N. C., K. D. Jermstad, K. Krutovsky, S. N. Aitken, G. T. Howe, J. Krakowski, and D. B. Neale. 2005. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-fir. IV. Cold-hardiness QTL verification and candidate gene mapping. *Molecular Breeding* 15 (2): 145-156.

Willing, E-M., C. Dreyer, and C. van Oosterhout. 2012. Estimates of genetic differentiation measured by F_{ST} do not necessarily require large sample sizes when using many SNP markers. *Plos One* 7(8): e42649.

Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97–159.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.

Yeh, F., R. C. Yang, and J.T. Boyle. 1999. PopGene version 1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmonton, Canada. 28 p.

Zimin, A., K. A. Stevens, M. W. Crepeau, A. Holtz-Morris, and M. Koriabine. 2014. Sequencing and assembly of the 22-Gb loblolly pine genome. *Genetics* 196: 875–890.

ANEXOS

Anexo 1. Concentración de ADN obtenido y relación 260/280 por individuo de cada población.

No. de accesión	Población	Muestra	Concentración ADN	260/280
3675	Emiliano Zapata	1	454.60	1.84
3676	Emiliano Zapata	2	301.70	1.80
3677	Emiliano Zapata	3	308.70	1.94
3678	Emiliano Zapata	4	255.20	1.84
3679	Emiliano Zapata	5	200.10	1.80
3680	Emiliano Zapata	6	655.80	1.86
3681	Emiliano Zapata	7	292.50	1.84
3682	Emiliano Zapata	8	649.50	1.87
3683	Emiliano Zapata	9	486.20	1.89
3684	Emiliano Zapata	10	1016.30	1.84
3685	Emiliano Zapata	11	291.80	1.80
3686	Emiliano Zapata	12	463.60	1.81
3687	Emiliano Zapata	13	451.60	1.84
3688	Emiliano Zapata	14	277.50	1.84
3689	Emiliano Zapata	15	493.90	1.92
3690	Emiliano Zapata	16	352.20	1.92
3691	Emiliano Zapata	17	526.80	1.83
3692	Emiliano Zapata	18	576.60	1.89

3693	Emiliano Zapata	19	502.20	1.88
3694	Emiliano Zapata	20	396.80	1.80
3695	Cruz de León	21	326.80	1.87
3696	Cruz de León	22	609.10	1.94
3697	Cruz de León	23	326.30	1.81
3698	Cruz de León	24	361.00	1.86
3699	Cruz de León	25	708.30	1.99
3700	Cruz de León	26	281.80	1.89
3701	Cruz de León	27	202.90	1.83
3702	Cruz de León	28	156.80	1.96
3703	Cruz de León	29	688.10	1.89
3704	Cruz de León	30	450.40	2.00
3705	Cruz de León	31	145.20	1.82
3706	Cruz de León	32	289.34	1.85
3707	Cruz de León	33	126.20	2.00
3708	Cruz de León	34	358.70	1.87
3709	Cruz de León	35	255.90	1.86
3710	Cruz de León	36	502.40	2.03
3711	Cruz de León	37	389.40	1.97
3712	Cruz de León	38	446.20	1.94
3713	Cruz de León	39	256.9	1.84
3714	Cruz de León	40	242.50	1.80
3715	La Caldera	41	358.10	1.92
3716	La Caldera	42	330.00	1.89
3717	La Caldera	43	493.20	1.96
3718	La Caldera	44	441.50	1.90
3719	La Caldera	45	386.30	1.90
3720	La Caldera	46	252.60	1.83
3721	La Caldera	47	310.40	1.90
3722	La Caldera	48	204.30	1.85
3723	La Caldera	50	99.40	1.80
3724	La Caldera	51	950.40	1.82
3725	La Caldera	52	163.70	1.80
3726	La Caldera	53	305.80	1.81
3727	La Caldera	53	311.60	1.80
3728	La Caldera	54	347.40	1.84
3729	La Caldera	55	268.80	1.79
3730	La Caldera	56	258.90	1.81
3731	La Caldera	57	165.89	1.90
3732	La Caldera	58	237.90	1.87

3733	La Caldera	59	178.00	1.90
3734	La Caldera	60	328.50	1.89
3735	Cuatexmola	61	441.40	1.92
3736	Cuatexmola	62	291.60	1.83
3737	Cuatexmola	63	128.80	1.66
3738	Cuatexmola	64	431.60	1.82
3739	Cuatexmola	65	180.00	1.84
3740	Cuatexmola	66	283.00	1.89
3741	Cuatexmola	67	359.50	1.89
3742	Cuatexmola	68	262.50	1.81
3743	Cuatexmola	69	252.20	1.80
3744	Cuatexmola	70	83.50	1.88
3745	Cuatexmola	71	333.80	1.87
3746	Cuatexmola	72	230.90	1.81
3747	Cuatexmola	73	265.10	1.82
3748	Cuatexmola	74	313.30	1.88
3749	Cuatexmola	75	312.90	1.84
3750	Cuatexmola	76	410.50	1.90
3751	Cuatexmola	77	275.40	1.83
3752	Cuatexmola	78	351.50	1.96
3753	Cuatexmola	79	256.00	1.84
3754	Cuatexmola	80	348.00	1.92
3755	Tlalmotolo	81	261.80	1.92
3756	Tlalmotolo	82	252.50	1.90
3757	Tlalmotolo	83	232.20	1.88
3758	Tlalmotolo	84	361.20	1.93
3759	Tlalmotolo	85	319.60	1.92
3760	Tlalmotolo	86	387.20	1.88
3761	Tlalmotolo	87	442.00	1.86
3762	Tlalmotolo	88	373.40	1.85
3763	Tlalmotolo	89	255.90	1.84
3764	Tlalmotolo	90	393.70	1.90
3765	Tlalmotolo	91	219.30	1.87
3766	Tlalmotolo	92	146.70	1.82
3767	Tlalmotolo	93	124.10	1.81
3768	Tlalmotolo	94	205.40	1.92
3769	Tlalmotolo	95	284.40	1.84
3770	Tlalmotolo	96	256.70	1.89
3771	Tlalmotolo	97	390.20	1.85
3772	Tlalmotolo	98	270.70	1.85
3773	Tlalmotolo	99	392.30	1.89

3774	Tlalmotolo	100	311.80	1.85
3775	Apizaquito	101	384.40	1.89
3776	Apizaquito	102	323.30	1.84
3777	Apizaquito	103	225.70	1.98
3778	Apizaquito	104	336.60	1.91
3779	Apizaquito	105	403.70	1.88
3780	Apizaquito	106	283.00	1.76
3781	Apizaquito	107	253.50	1.97
3782	Apizaquito	108	24.40	1.90
3783	Apizaquito	109	204.60	1.81
3784	Apizaquito	110	301.50	1.83
3785	Apizaquito	111	239.10	1.83
3786	Apizaquito	112	186.70	1.86
3787	Apizaquito	113	642.90	1.87
3788	Apizaquito	114	255.50	1.91
3789	Apizaquito	115	166.90	1.84
3790	Apizaquito	116	211.90	1.78
3791	Apizaquito	117	249.30	1.81
3792	Apizaquito	118	414.80	1.85
3793	Apizaquito	119	258.40	1.94
3794	Apizaquito	120	611.60	1.82
3801	La Rosa	121	400.00	1.90
3802	La Rosa	122	375.60	1.86
3803	La Rosa	123	148.00	1.85
3804	La Rosa	124	236.90	1.82
3805	La Rosa	125	283.30	1.80
3806	La Rosa	126	261.10	1.85
3807	La Rosa	127	252.20	1.83
3808	La Rosa	128	284.50	1.78
3809	La Rosa	129	948.80	1.86
3810	La Rosa	130	241.80	1.79
3811	La Rosa	131	232.00	1.83
3812	La Rosa	132	168.30	1.92
3813	La Rosa	133	263.90	1.85
3814	La Rosa	134	204.20	1.90
3815	La Rosa	135	317.60	1.74
3816	La Rosa	136	415.50	1.81
3817	La Rosa	137	401.30	1.81
3818	La Rosa	138	398.20	1.80
3819	La Rosa	139	172.80	1.87
3820	La Rosa	140	335.60	1.81

3821	Axopilco	141	30.70	1.90
3822	Axopilco	142	141.50	1.91
3823	Axopilco	143	243.90	1.84
3824	Axopilco	144	264.80	1.82
3825	Axopilco	145	212.40	1.86
3826	Axopilco	146	240.10	1.86
3827	Axopilco	147	141.90	1.90
3828	Axopilco	148	205.60	1.82
3829	Axopilco	149	335.10	1.81
3830	Axopilco	150	159.40	1.80
3831	Axopilco	151	175.20	1.85
3832	Axopilco	152	195.60	1.82
3833	Axopilco	153	187.90	1.80
3834	Axopilco	154	255.20	1.80
3835	Axopilco	155	192.40	1.93
3836	Axopilco	156	217.80	1.90
3837	Axopilco	157	242.10	1.88
3838	Axopilco	158	252.60	1.80
3839	Axopilco	159	340.00	1.84
3840	Fracción IV	160	185.80	1.80
3841	Fracción IV	161	220.10	1.90
3842	Fracción IV	162	172.70	1.79
3843	Fracción IV	163	172.20	1.80
3844	Fracción IV	164	60.00	1.85
3845	Fracción IV	165	189.40	1.87
3846	Fracción IV	166	267.80	1.83
3847	Fracción IV	167	315.20	1.88
3848	Fracción IV	168	170.40	1.85
3849	Fracción IV	169	262.20	1.83
3850	Fracción IV	170	228.60	1.85
3851	Fracción IV	171	304.80	1.84
3852	Rancho Nuevo	172	467.90	1.78
3853	Rancho Nuevo	173	339.50	1.86
3854	Rancho Nuevo	174	275.10	1.85
3855	Rancho Nuevo	175	304.10	1.82
3856	Rancho Nuevo	176	297.00	1.73
3857	Rancho Nuevo	177	363.10	1.88
3858	Rancho Nuevo	178	414.40	1.86
3864	Villarreal	179	303.20	1.90
3865	Villarreal	180	333.00	1.87
3866	Villarreal	181	135.50	1.90

3867	Villarreal	181	296.50	1.84
3868	Villarreal	182	380.30	1.84
3869	Villarreal	183	327.40	1.85
3870	Villarreal	184	333.90	1.80
3871	Villarreal	185	251.70	1.86
3872	Villarreal	186	185.70	1.92
3873	Villarreal	187	194.30	1.84
3874	Villarreal	188	252.40	1.80
3875	Villarreal	190	368.90	1.90
3876	Villarreal	191	232.20	1.85
3877	Villarreal	192	278.60	1.81
3878	Villarreal	193	441.50	1.84
3879	Villarreal	194	327.60	1.78
3880	Villarreal	195	540.10	1.81
3881	Villarreal	196	333.80	1.80
3882	Villarreal	197	421.80	1.81
3883	Villarreal	198	207.60	2.00
3884	Carbonero	199	116.90	1.83
	Jacales			
3885	Carbonero	200	231.70	1.80
	Jacales			
3886	Carbonero	201	66.30	1.94
	Jacales			
3887	Carbonero	202	148.70	1.90
	Jacales			
3888	Carbonero	203	110.70	1.87
	Jacales			
3889	Carbonero	204	180.00	1.81
	Jacales			
3890	Carbonero	205	182.80	1.92
	Jacales			
3891	Carbonero	206	247.30	1.82
	Jacales			
3892	Carbonero	207	120.00	1.74
	Jacales			
3893	Carbonero	208	247.20	1.79
	Jacales			
3894	Carbonero	209	143.20	1.80
	Jacales			
3895	Carbonero	210	196.00	1.80
	Jacales			
3896	Carbonero	211	485.60	1.84
	Jacales			

3897	Carbonero Jacales	214	318.30	1.82
3898	Carbonero Jacales	215	284.60	1.81
3899	Carbonero Jacales	215	113.20	1.86
3900	Carbonero Jacales	216	310.60	1.69
3901	Carbonero Jacales	217	141.00	1.90
3902	Carbonero Jacales	218	477.40	1.78
3903	Carbonero Jacales	219	505.30	1.87
3904	La Barranca	220	752.20	1.84
3905	La Barranca	221	718.60	1.84
3906	La Barranca	222	825.90	1.84
3907	La Barranca	223	674.90	1.83
3908	La Barranca	224	190.00	1.86
3910	La Barranca	225	751.00	1.83
3911	La Barranca	226	200.60	1.84
3912	La Barranca	227	214.50	1.80
3913	La Barranca	228	272.10	1.90
3914	La Barranca	229	594.20	1.83
3915	La Barranca	230	301.40	1.82
3916	La Barranca	231	162.20	1.89
3917	La Barranca	232	244.70	1.85
3918	La Barranca	233	41.90	2.00
3919	La Barranca	234	115.20	1.80

Anexo 2. Frecuencias alélicas por población

Locus	Alelo	Población												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PmOSU_2D4	150	0.85	0.53	0.85	0.50	0.30	0.13	0.50	0.94	0.23	0.00	0.73	0.33	0.00
	160	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00
	162	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.05	0.25
	164	0.00	0.00	0.00	0.30	0.55	0.76	0.45	0.00	0.69	1.00	0.03	0.40	0.63
	166	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.11	0.05	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
	168	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	170	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.10	0.06
	180	0.10	0.03	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06
	190	0.05	0.45	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PmOSU_2D6	164	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
	166	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
	168	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
	170	0.93	0.95	0.95	0.93	0.93	1.00	0.90	0.97	0.85	0.93	0.85	0.95	0.88
	172	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
	174	0.08	0.05	0.00	0.08	0.08	0.00	0.10	0.03	0.15	0.07	0.10	0.00	0.09
	175	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	176	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
PmOSU_2D9	162	0.00	0.00	0.08	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	164	0.33	0.28	0.60	0.48	0.38	0.80	0.45	0.47	0.38	0.50	0.43	0.38	0.47
	166	0.10	0.20	0.15	0.05	0.15	0.03	0.10	0.08	0.04	0.14	0.15	0.10	0.03
	168	0.45	0.53	0.18	0.48	0.45	0.08	0.15	0.22	0.46	0.29	0.35	0.18	0.50
	170	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.30	0.22	0.12	0.07	0.08	0.35	0.00
	172	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	176	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PmOSU_3B9	152	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09
	160	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.91
	164	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PmOSU_3G9	150	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00
	152	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	154	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	1.00	0.95	1.00	1.00	0.86	0.90	0.63	0.22
	156	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	158	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.10	0.28	0.78
PmOSU_3H4	198	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00
	200	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	0.85	1.00
	202	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00
PmOSU_4E9	116	0.03	0.00	0.50	0.20	0.23	0.30	0.00	0.33	0.19	0.21	0.00	0.00	0.03
	118	0.00	0.00	0.00	0.05	0.10	0.20	0.08	0.03	0.04	0.00	0.05	0.00	0.16
	120	0.98	1.00	0.50	0.50	0.63	0.43	0.40	0.58	0.77	0.79	0.90	0.95	0.81

	122	0.00	0.00	0.00	0.25	0.05	0.08	0.53	0.06	0.00	0.00	0.05	0.05	0.00	
PmOSU_783	250	0.03	0.00	0.00	0.00	0.05	0.08	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	254	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	256	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.05	0.06	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	
	258	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	260	0.83	0.95	1.00	0.83	0.88	0.88	0.88	0.83	1.00	1.00	0.93	1.00	1.00	
	262	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	264	0.03	0.03	0.00	0.13	0.08	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	266	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	268	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	
270	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
BCPsmAG20	126	0.00	0.00	0.03	0.05	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	128	0.10	0.23	0.05	0.10	0.45	0.25	0.10	0.03	0.12	0.14	0.00	0.08	0.00	
	130	0.38	0.73	0.40	0.80	0.55	0.65	0.48	0.89	0.77	0.50	0.68	0.33	0.00	
	132	0.48	0.00	0.38	0.03	0.00	0.00	0.23	0.06	0.04	0.36	0.33	0.18	0.47	
	134	0.05	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.08	0.00	0.00	0.10	0.41	
	136	0.00	0.00	0.03	0.03	0.00	0.00	0.08	0.03	0.00	0.00	0.00	0.23	0.13	
	140	0.00	0.05	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	146	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	
BCPsmAG27	120	0.08	0.05	0.18	0.43	0.50	0.48	0.30	0.42	0.12	0.00	0.32	0.62	0.57	
	122	0.03	0.38	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
BCPsmG12	240	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	
	242	0.00	0.00	0.05	0.05	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	
	244	0.10	0.13	0.08	0.30	0.75	0.13	0.03	0.14	0.00	0.00	0.23	0.05	0.22	
	246	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.15	0.14	0.12	0.00	0.15	0.00	0.03	
	248	0.88	0.78	0.58	0.60	0.25	0.78	0.83	0.72	0.88	1.00	0.63	0.71	0.53	
	250	0.03	0.10	0.03	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	
	252	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	
	254	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	
PmOSU_2B6	150	0.55	0.34	0.05	0.05	0.10	0.00	0.30	0.00	0.88	0.71	0.10	0.30	0.06	
	156	0.45	0.66	0.95	0.95	0.00	0.00	0.00	0.28	0.12	0.29	0.90	0.65	0.00	
	168	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	
	170	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	1.00	0.65	0.17	0.00	0.00	0.00	0.05	0.41	
	176	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47	
	180	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70	0.00	0.05	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	