



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE *PINUS* SUBSECCIÓN
PONDEROSAE CON BASE EN SECUENCIAS DEL DNA
DEL CLOROPLASTO (CpDNA)**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

SERGIO HERNÁNDEZ LEÓN

DIRECTOR: DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO 2007

A MI FAMILIA.

Por el apoyo incondicional durante toda la vida, por su amor y confianza.

A MI MAMÁ.

Lucia León López, la persona que mas admiro y amo en este mundo, por su fortaleza, esfuerzo y apoyo incondicional.

A MIS HERMANOS.

Vicente, Yazmín, Julián y Verónica, por el tiempo compartido, por aquellos momentos difíciles y felices, por el apoyo y la amistad de hermanos.

A MIS SOBRINOS.

Fernanda, Carlos, Erick y Maite, que son el mejor regalo de esta vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis Dr. David S. Gernandt, por el apoyo durante la realización de este trabajo de tesis. Por compartir su amplio conocimiento y por su infinita paciencia. Por ser una persona excepcional y digna de admiración. También agradezco a su esposa la Dra. Sol Ortiz García, quien revisó las primeras versiones de este escrito.

Agradezco también a los sinodales, Dra. Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, Dra. María del Carmen Sánchez Hernández. Dr. Atilano Contreras Ramos, M. en C. Manuel González Ledesma, Dr. Juan Márquez Luna y al Dr. Arturo Sánchez Gonzáles, por el tiempo dedicado a la revisión del escrito de tesis y los valiosos comentarios y correcciones al mismo.

A Fernando Cortes Medina mi amigo del alma, por su amistad incondicional, por tantos momentos compartidos y por las locuras vividas, por su apoyo y por la amistad que siempre existirá.

A mi amiga Edith Jiménez Muñoz, por ayudarme a llevar a cabo todas mis ocurrencias y por la amistad de tanto tiempo. A mis amigos Ernesto Lozada y Ricardo Avendaño, por escucharme y por su invaluable amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Biól. Esmeralda Salgado, Biól. Omar Zeron, por las enseñanzas en el trabajo de laboratorio. Agradezco también la amistad de Federico, Jaime, M. en C. Eduardo y Dra. Norma. A la Dra. María del Consuelo Cuevas Cardona y nuevamente a la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark por su amistad y sustento durante la carrera.

También agradezco a los integrantes del grupo de discusión del Instituto de Biología de la UNAM, de quienes he aprendido muchas cosas tanto en el ámbito académico como personal.

A todos los maestros, a mis compañeros de generación y la gente que tuve el honor de conocer durante la carrera. Al Biól. Ulises Iturbe, Mary, Natalia, Lidia y Laura de la coordinación y laboratorios de la carrera por la disponibilidad y ayuda.

A toda la gente que me enseñó el trabajo en equipo a quienes agradezco por su disposición de ayudar de la manera mas desinteresada.

Agradezco al CONACyT por el apoyo en la realización de este trabajo de tesis mediante el proyecto “Sistemática y evolución de Pinus subsección Ponderosae: evidencia de tres genomas” (SEP-2003-C02-45164) y al Programa Anual de Investigación mediante el proyecto “Biogeografía de la Sierra Madre Oriental” (UAEH-DIP-ICBI-AAB-039).

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
El género <i>Pinus</i>	2
Principales características de la subsección <i>Ponderosae</i>	2
ANTECEDENTES	
Registro fósil de la subsección <i>Ponderosae</i>	8
Propuestas de clasificación y filogenia para la subsección <i>Ponderosae</i>	8
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
MATERIAL Y METODOS	
Recolecta de material biológico.....	16
Extracción del DNA.....	18
Condiciones de amplificación del DNA.....	18
Reacción de secuenciación.....	18
Análisis.....	20
RESULTADOS	
Utilidad filogenética de diez regiones del genoma del cloroplasto.....	21
Implicaciones para la sistemática de la subsección <i>Ponderosae</i>	21
a) Análisis individual de las tres regiones con mayor variación.....	21
b) Análisis de las tres regiones combinadas.....	27
Propuesta de clasificación y descripción de las relaciones entre los taxa.....	27
DISCUSIÓN	
Utilidad filogenética de diez regiones del genoma del cloroplasto.....	31
Implicaciones para la sistemática de la subsección <i>Ponderosae</i>	32
Propuesta de clasificación para la subsección <i>Ponderosae</i>	32
a) Grupo <i>Sabinianae</i>	34
b) Grupo <i>Montezumae</i>	35
c) Grupo <i>Ponderosae</i>	36
CONCLUSIONES	37
LITERATURA CITADA	38
ANEXO: ANATOMÍA FOLIAR	41
GLOSARIO	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución general de la subsección <i>Ponderosae</i> . Propuesta de distribución de acuerdo a (Critchfield y Little, 1966) y Little (1971).....	4
Figura 2. Hipótesis filogenética de algunas de las especies mexicanas situadas actualmente dentro de la subsección <i>Ponderosae</i> con base en caracteres morfológicos.....	10
Figura 3. Hipótesis filogenética de algunas de las especies situadas dentro del subgénero <i>Pinus</i> con base en sitios de restricción del cloroplasto.....	11
Figura 4. Hipótesis filogenética de las especies dentro de la subsección <i>Ponderosae</i> a través del análisis de <i>rbcL</i> y <i>matK</i> del DNA del cloroplasto.....	13
Figura 5. Regiones del DNA del cloroplasto empleadas en este estudio, para el análisis filogenético de la subsección <i>Ponderosae</i>	22
Figura 6. Uno de once árboles más parsimoniosos para la matriz de la región Lanner.....	24
Figura 7. Uno de veinte árboles más parsimoniosos para la matriz de la región James.....	25
Figura 8. Único árbol más parsimonioso para la matriz de la región Don.....	26
Figura 9. Uno de seis mil novecientos ocho árboles más parsimoniosos para la matriz combinada de las tres regiones.....	28
Figura 10. Consenso estricto de seis mil novecientos ocho árboles más parsimoniosos para la matriz combinada de las tres regiones.....	29
Figura 11. Cortes foliares de algunas especies de la subsección <i>Ponderosae</i>	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies dentro de la subsección <i>Ponderosae</i> , tomando en cuenta el concepto de especie de Price <i>et al.</i> (1998) y la propuesta de distribución de acuerdo con Farjon y Styles (1997) y Perry (1991).....	5
Cuadro 2. Propuesta de clasificación para las especies de la subsección <i>Ponderosae</i> (Price <i>et al.</i> ,1998).....	12
Cuadro 3. Localidad y datos de recolecta de las diferentes especies analizadas, con base en la propuesta de clasificación de Price <i>et al.</i> (1998).....	16
Cuadro 4. Oligonucleótidos empleados en el presente estudio. Posición que ocupan en el genoma del cloroplasto de <i>Pinus thunbergii</i> , así como la secuencia de cada uno.....	19
Cuadro 5. Regiones del genoma del cloroplasto analizadas para las especies de la subsección <i>Ponderosae</i> , número de caracteres variables, indels, caracteres informativos y longitud de alineación por región.....	23
Cuadro 6. Propuesta de clasificación de tres grupos principales de acuerdo con los resultados obtenidos del análisis a través de secuencias de DNA del cloroplasto comparada con la clasificación de Price <i>et al.</i> (1998).....	33

RESUMEN.

El género *Pinus* de la familia Pinaceae, incluye a la subsección *Ponderosae*, conformada por 17 especies, que se distribuyen desde el oeste de Canadá hasta Nicaragua. A pesar de que existen hipótesis filogenéticas para la mayoría o parte de las especies dentro del grupo, ninguna hasta ahora presenta buena resolución. En este estudio se evaluaron diez regiones del DNA del cloroplasto en una muestra de cinco especies, y aquellas regiones con mayor variación se emplearon en los análisis filogenéticos dentro de la subsección; la primera región más variable es un espaciador entre los genes *chlN* y un *ORF* poco conocido (designado como orf1756 en *P. thunbergii*; Pt95300-95767) y dos regiones más que codifican el mismo ORF (Pt96794-97365 y Pt98647-99121). Los resultados de los análisis por región, así como la combinación de las tres regiones en una sola matriz; dividen a las especies de la subsección en tres grupos principales: *Ponderosae*, *Sabinianae* y *Montezumae*, los cuales son parcialmente congruentes con propuestas anteriores de clasificación; la principal diferencia es que no se puede reconocer al grupo *Pseudostrobus* como distinto del grupo *Montezumae*. Asimismo se encontró que un individuo de *P. ponderosa* tiene el cpDNA de *P. jeffreyi*, probablemente debido a introgresión, además fue posible identificar el donador de polen de un híbrido entre *P. washoensis* y *P. jeffreyi* recolectado en el campo. Se deben explorar nuevas fuentes de variación, tanto morfológica como molecular que permitan corroborar o refutar la hipótesis filogenética, resultado de este estudio, con base en secuencias del genoma del cloroplasto. Un aspecto relevante a considerar es la delimitación de especies dentro de la subsección, lo cual ayudará a la obtención de hipótesis filogenéticas más adecuadas.

INTRODUCCIÓN

El género *Pinus*

El género *Pinus* (Pinaceae) incluye entre 100 y 120 especies (Farjon, 1984; Price *et al.*, 1998; Farjon, 2001) comprendidas en dos subgéneros (*Pinus* y *Strobus*), cuatro secciones y once subsecciones (Gernandt *et al.*, 2005). Dentro de la familia Pinaceae, *Pinus* se diferencia de otros géneros por presentar tallos dimórficos, una a ocho hojas o acículas rodeadas por pequeñas escamas en su base. Los conos de pinos presentan escamas leñosas, con una estructura apical especializada denominada “apófisis”, esta representa la parte expuesta de la escama cuando el cono está maduro pero aún cerrado. En el centro de la apófisis se encuentra una prominencia, “el umbo” que a veces presenta una pequeña púa o espina (Farjon y Styles, 1997; Price *et al.*, 1998).

La distribución natural del género *Pinus* comprende desde las regiones ártica, subártica y templada de Norteamérica y Eurasia, hasta el norte de África y regiones tropicales y subtropicales de América Central y Asia; *P. merkusii* es la única especie dentro del género cuya área de distribución natural se extiende al sur del ecuador, en Sumatra (Price *et al.*, 1998). *Pinus* es el género de coníferas existente con mayor diversidad (Price *et al.*, 1998; Farjon, 2001; Ledig, 1998). Las diferentes especies de pinos son de gran importancia, como componentes de bosques boreales, subalpinos, templados, tropicales y de algunas zonas áridas (Richardson y Rundel, 1998). Por otra parte, los pinos establecen numerosas e importantes interacciones ecológicas con aves, mamíferos, insectos, hongos y otras plantas, ideales para el estudio de procesos de coevolución. Desde el punto de vista económico; son fuente primaria de madera para construcción y combustible, además se emplean en la manufactura de pulpa, papel, resina y para la obtención de semillas como alimento (Le Maitre, 1998).

Principales características de la subsección *Ponderosae*

La subsección *Ponderosae* se encuentra dentro del género *Pinus*, subgénero *Pinus*, sección *Trifoliae* (Gernandt *et al.*, 2005). De acuerdo con la clasificación de Price *et al.* (1998), la subsección *Ponderosae* incluye 17 especies (Cuadro 1). Sus principales características morfológicas son: ramillas uninodales, yemas vegetativas no resinosas, vaina del fascículo persistente, hojas largas y gruesas en fascículos de tres o cinco, conos ovulados asimétricos, oblicuos en la base y que se abren poco después de la madurez, con pedúnculos

cortos (Farjon y Styles, 1997). En la mayoría de las especies, las semillas presentan alas, que emplean para la dispersión por medio de viento, pero en dos especies del occidente de Norteamérica, *Pinus sabiniana* y *P. torreyana*, las alas se encuentran reducidas ya que su forma principal de dispersión es por medio de vertebrados. *Pinus coulteri* presenta menor reducción de las alas en comparación con las dos especies anteriores pero al parecer el viento no es un medio efectivo de dispersión para esta especie debido al gran tamaño de su semilla (Price *et al.*, 1998).

El mayor centro de diversidad de especies de pinos se encuentra en América Central y América del Norte (Price *et al.*, 1998). Las especies dentro de la subsección *Ponderosae* se distribuyen desde el oeste de Canadá, hasta Nicaragua y 14 de ellas incluyen toda o parte de su área de distribución en las regiones montañosas de México (Price *et al.*, 1998). Los estados dentro de la República Mexicana con mayor número de especies de la subsección son Jalisco, Michoacán, Durango, Estado de México, Guerrero y Oaxaca. La distribución detallada de cada una de las especies se muestra en el Cuadro 1 y la distribución general en la Figura 1.

Existen tres especies de la subsección *Ponderosae* que actualmente se encuentran en la Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2002), *Pinus coulteri*, *P. jeffreyi* y *P. martinezii*, dentro de la categoría de especies sujetas a protección especial. Algunos autores no reconocen a *Pinus martinezii* como especie y ha sido manejada como sinónimo de *P. durangensis* (Farjon y Styles, 1997; Price *et al.*, 1998), sin embargo se necesita mayor investigación para saber si se debe o no reconocer a este taxón como especie, ya que en comparación con *P. jeffreyi* y *P. coulteri* que se distribuyen además en los Estados Unidos de América, este taxón es endémico de México.

El número de especies incluidas dentro de la subsección *Ponderosae* ha sido variable, debido a que existe un desacuerdo en el concepto de especie, y además una gran cantidad de sinónimos y variedades, por lo que es importante definir un número constante de especies para la subsección posterior al estudio de características tanto morfológicas como moleculares que ayuden a una delimitación más adecuada de especies dentro del grupo.

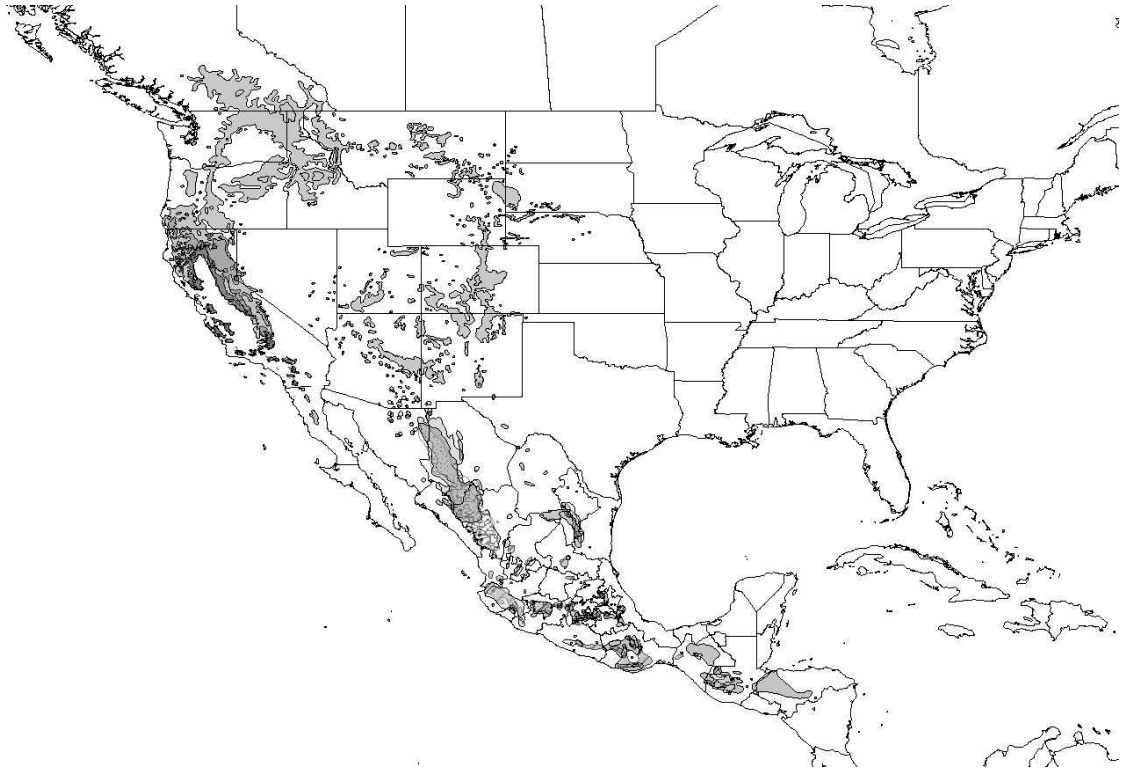


Figura 1. Distribución general de la subsección *Ponderosae* (en color gris). Propuesta de distribución de acuerdo a (Critchfield y Little, 1966) y Little (1971).

Cuadro 1. Especies dentro de la subsección *Ponderosae*, tomando en cuenta el concepto de especie de Price *et al.* (1998), y la propuesta de distribución de acuerdo a Farjon y Styles (1997) y Perry (1991).

Especie / Autoridad	Distribución
<i>P. arizonica</i> Engelman	México: Sierra Madre Occidental, Sur de Durango, Coahuila, Noreste de Zacatecas y Nuevo León. Estados Unidos: Suroeste de Arizona y Nuevo México.
<i>P. cooperi</i> Blanco	México: Durango, y en el límite este de Sinaloa
<i>P. coulteri</i> D. Don	México: Baja California Norte, dispersa en Sierra Juárez y San Pedro Mártir. Ampliamente distribuida en la cordillera de la costa de la alta California. Estados Unidos: Oeste de California.
<i>P. devoniana</i> Lindley	México: Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes, San Luís Potosí, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, Morelos, Tlaxcala, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Chiapas. Guatemala: Departamentos de Totonicapán, Quiché, Quezaltenango, Chimaltenango, Sacatepequez y Guatemala.
<i>P. donnell-smithii</i> Masters	Guatemala: Departamentos de Quezaltenango, Totonicapán, Chimaltenango, Sololá, Sacatepequez, El Quiché y Guatemala. Posiblemente se encuentra en San Marcos en el Volcán Tacana y en Huehuetenango.
<i>P. douglasiana</i> Martínez	México: Jalisco, Michoacán, Estado de México y norte de Morelos. Norte de Nayarit, Sierra Madre Occidental, limítrofe entre Sinaloa y Durango, Guerrero y Oaxaca.
<i>P. durangensis</i> Martínez	México: Sur de la Sierra Madre Occidental, rara vez se encuentra al este de Sonora y Chihuahua, común en Durango, Zacatecas, y Norte de Jalisco, escasa en el sur de Jalisco y norte de Michoacán.

Cuadro 1. Continuación.

<i>P. engelmannii</i> Carrière	México: Sierra Madre Occidental en Sonora, Chihuahua, noreste de Sinaloa, Durango, Zacatecas. Estados Unidos: Sureste de Arizona y Suroeste de Nuevo México.
<i>P. hartwegii</i> Lindley	México: Chihuahua, sur de Coahuila, sur de Nuevo León, Durango, sureste de Tamaulipas, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Morelos, Hidalgo, Distrito Federal, Tlaxcala, Puebla, oeste de Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Chiapas. Guatemala: Departamentos de Huehuetenango, Totonicapán, Quezaltenango, Quiché, Sololá, San Marcos, Chimaltenango, Sacatepequez y Guatemala. Honduras: Cerro Santa Bárbara.
<i>P. jeffreyi</i> Balfour	México: Baja California Norte. Estados Unidos: oeste de California, suroeste de Oregon y oeste de Nevada.
<i>P. maximinoi</i> Moore	México: Sinaloa; Jalisco, Michoacán, Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; Sur de México, a partir de Eje Neovolcánico transversal hasta Guatemala, Honduras, El Salvador, y noreste de Nicaragua.
<i>P. montezumae</i> Lambert	México: Nuevo León, sureste de Tamaulipas, Nayarit, sur de Zacatecas, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, Querétaro, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala, Puebla, Centro de Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Guatemala: Departamentos de Huehuetenango, Quiché, San Marcos, Quezaltenango, Totonicapán, Sololá, Chimaltenango, Guatemala y Jalapa.
<i>P. nubicola</i> Perry	México: Veracruz y Chiapas. Guatemala: Departamentos de Quezaltenango, Sololá y Jalapa. El Salvador: Departamentos de Chalatenango. Honduras: Departamento La Paz.
<i>P. ponderosa</i> Douglas ex P. & C. Lawson	México: Chihuahua, Coahuila. Canadá: British Columbia, Estados Unidos: Oeste de Estados Unidos.

Cuadro 1. Continuación.

<i>P. pseudostrobus</i> Lindley	México: Sinaloa/Durango, sureste de Coahuila/Nuevo León, este de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, México, Distrito Federal, Morelos, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, oeste-centro de Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Chiapas. Guatemala: Totonicapán, Quezaltenango, Sololá, Chimaltenango, Sacatepequez y Guatemala. Honduras y norte de El Salvador.
<i>P. sabiniana</i> Douglas ex D. Don	Estados Unidos: California.
<i>P. torreyana</i> Parry ex Carrière	Estados Unidos: California.
<i>P. washoensis</i> Mason & Stockwell	Estados Unidos: California y Nevada.

ANTECEDENTES

Registro fósil de la subsección *Ponderosae*

El género *Pinus* probablemente surgió durante el Cretácico temprano (Millar, 1998) y la divergencia de los subgéneros *Pinus* y *Strobus* ocurrió entre el Cretácico tardío (Millar, 1998) y el Eoceno Medio (Miller, 1986). Con base en una calibración de 85 m.a. para la divergencia entre los dos subgéneros antes mencionados, Willyard *et al.* (2007) proponen que el ancestro común más reciente de las subsecciones *Australes*, *Ponderosae* y *Contortae*, surgió hace aproximadamente 18 m.a., durante el Mioceno.

La cladogénesis entre las subsecciones *Ponderosae* y *Australes* durante el Mioceno sugiere que los fósiles de *P. driftwoodensis* del Eoceno medio (36 m.a.) y *P. avonensis* del Oligoceno (23.7 m.a.), ambos con afinidad a *Ponderosae* y *Australes*, están más relacionados con la subsección *Ponderosae* (Erwin y Schorn, 2006), que los registros fósiles del Cretácico: *P. cliffwoodensis* del Cretácico tardío de Nueva Jersey (Miller y Malinky, 1986), *P. triphylla* del Cretácico tardío de Massachusetts y Nueva York (Robison, 1977) y *P. spinosa* del Eoceno tardío de Siberia (Millar, 1998).

La retención de caracteres ancestrales y homoplasia entre las especies de pinos es sumamente frecuente, por lo cual es cuestionable y complejo discriminar y proponer afinidades entre secciones y subsecciones, tanto fósiles como existentes, a partir de órganos aislados (Geda López *et al.*, 2002; Gernandt *et al.*, 2005). Adicionalmente, es necesario que se realicen más estudios sobre la gran diversidad de fósiles del género *Pinus*, en los que establezcan puntos de calibración confiables, que permitan la estimación de edades de divergencia más estables y consistentes entre los diferentes grupos (Willyard *et al.*, 2007).

Propuestas de clasificación y filogenia para la subsección *Ponderosae*

Los estudios moleculares han sido útiles en el desarrollo de hipótesis filogenéticas, sin embargo aún quedan muchas preguntas sin resolver en cuanto a la delimitación de especies y relaciones filogenéticas al interior de las distintas subsecciones dentro del género *Pinus* (Gernandt *et al.*, 2005).

Martínez (1948), propuso una clasificación para especies de pinos distribuidos en México basado principalmente en caracteres de las hojas y de los conos, en la presencia o

ausencia de las alas en las semillas, en la caducidad o persistencia de las vainas y en otros caracteres macroscópicos y microscópicos, el estudio incluyó algunas especies actualmente dentro de la subsección *Ponderosae*, para las cuales Martínez (1948) propone un total de tres grupos denominados: sección *Montezumae*, sección *Ponderosae* y sección *Pseudostrobus*, estos grupos no fueron formalmente publicados ni reconocidos. Aunque *Pinus sabiniana*, *P. coulteri* y *P. torreyana* se incluyen actualmente dentro de la subsección *Ponderosae*, Martínez (1948) no las consideró relacionadas con el resto de las especies incluidas en la actualidad dentro de la subsección (Fig.2), muy probablemente debido a las notables diferencias morfológicas entre sus conos.

Krupkin *et al.* (1996) realizaron un análisis detallado del DNA del cloroplasto a través de sitios de restricción para 18 especies del subgénero *Pinus*. Incluyeron cuatro especies que representaron a la subsección *Ponderosae*: *Pinus coulteri*, *P. torreyana*, *P. jeffreyi* y *P. ponderosa* (Fig. 3). Estas cuatro especies formaron un clado con valores altos de soporte de bootstrap (100) e índice de Bremer (> 6), donde *P. coulteri* aparece como grupo hermano de *P. torreyana* y *P. jeffreyi* es el grupo hermano de este clado y no de *P. ponderosa*, a pesar de la mayor similitud morfológica que existe entre estas dos últimas especies.

Price *et al.* (1998) propusieron una clasificación basada en evidencia morfológica, anatómica, citológica, de entrecruzamientos, perfiles de metabolitos secundarios, proteínas, y comparaciones de DNA. En esta propuesta las especies de la subsección *Ponderosae* fueron clasificadas en cuatro grupos informales, “Grupo *Ponderosae*”, “Grupo *Montezumae*”, “Grupo *Pseudostrobus*” y “Grupo *Sabinianae*” (Cuadro 2). Esta propuesta sigue en gran parte la clasificación de Little y Critchfield (1969), a nivel de secciones y subsecciones con diversos cambios en la delimitación de grupos siguiendo los tratados de Van der Burgh (1973), Rushforth (1987) y Klaus (1989), además de las comparaciones de los sitios de restricción del genoma del cloroplasto del trabajo de Krupkin *et al.* (1996).

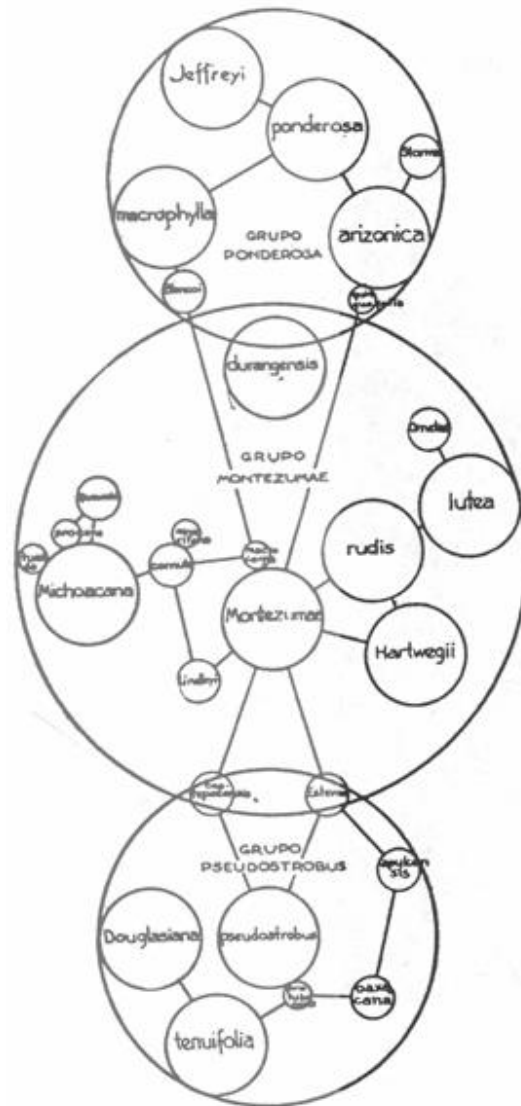


Figura 2. Hipótesis filogenética de algunas de las especies mexicanas situadas actualmente dentro de la subsección *Ponderosae* con base en caracteres morfológicos. Tomado de Martínez (1948).

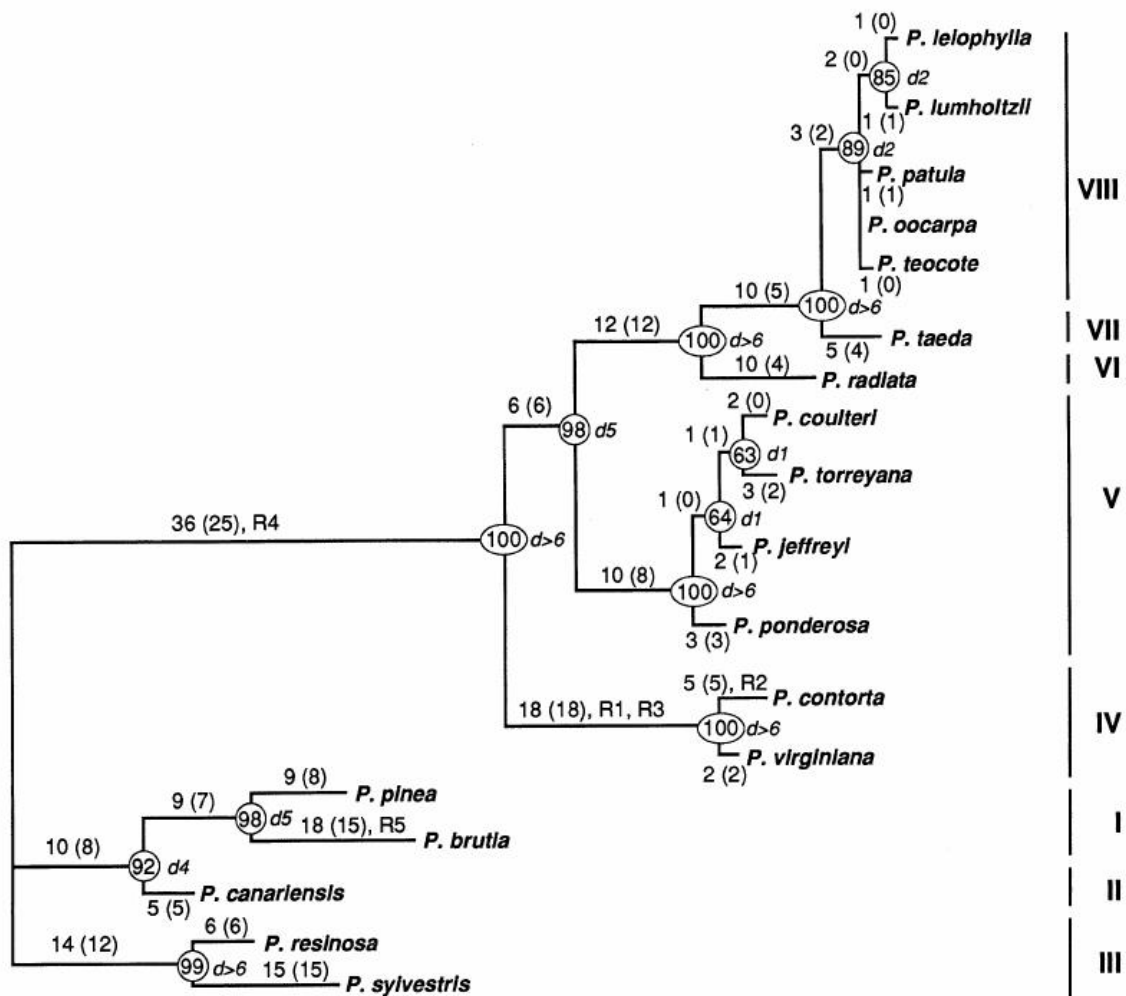


Figura 3. Hipótesis filogenética de algunas de las especies situadas dentro del subgénero *Pinus* con base en sitios de restricción del cloroplasto. Tomado de Krupkin *et al.* (1996).

Finalmente, Gernandt *et al.* (2005) presentaron un árbol obtenido a través del análisis de secuencias de *rbcL* (ribulosa-bisfosfato carboxylasa) y *matK* (maturasa K) del DNA del cloroplasto el cual corrobora que la subsección *Ponderosae sensu* Price *et al.* (1987) es un grupo monofilético, sin embargo, presenta poca resolución entre las especies de la subsección *Ponderosae* (Fig. 4). El estudio de Gernandt *et al.* (2005) se enfocó a la resolución de relaciones filogenéticas a niveles por encima de las subsecciones y empleó un muestreo amplio de las aproximadamente 120 especies reconocidas para el género *Pinus*. Sin embargo, las regiones *rbcL* y *matK* empleadas en este estudio, generalmente no brindan buena resolución a niveles inferiores de subsección.

Cuadro 2. Propuesta de clasificación para las especies de la subsección *Ponderosae* (Price *et al.*, 1998).

1.- *P. cooperi* Blanco [tratado como una variedad de *P. arizonica* por Farjon y Styles (1997)].

2.- *P. durangensis* Martínez [*P. martinezii* Larsen]

3.- *P. engelmannii* Carrière [*P. apecheca* Lemmon]

4.- *P. jeffreyi* Balfour

5.- *P. ponderosa* Douglas ex P. y C. Lawson

var. *arizonica* (Engelmann) Shaw [*P. arizonica* Engelmann; *P. arizonica* f. *stormiae* Martínez]

var. *ponderosa*

var. *scopulorum* Engelmann [subsp. *scopulorum* (Engelmann) Murray]

6.- *P. washoensis* Mason y Stockwell [*P. ponderosa* subsp. *washoensis* (Mason y Stockwell) Murray]

Grupo Montezumae

7.- *P. devoniana* Lindley [incluye *P. michoacana* Martínez, *P. winchesteriana* Gordon]

8.- *P. donnell-smithii* Masters [requiere de más estudios; incluye: *P. hartwegii* por Farjon y Styles (1997)]

9.- *P. hartwegii* Lindley [*P. montezumae* var. *hartwegii* (Lindley) Engelmann; incluyendo *P. rudis* Endlicher; *P. montezumae* var. *rudis* (Endlicher) Shaw; Carvajal y McVaugh (1992); Matos (1995)]

10.- *P. montezumae* Lambert [incluye a *P. montezumae* var. *gordonia* (Hartweg ex Gordon) Silba]

Grupo Pseudostrobus

11.- *P. douglasiana* Martínez

12.- *P. maximinoi* Moore [*P. tenuifolia* Bentham; *P. pseudostrobus* var. *tenuifolia* (Benth.) Shaw]

13.- *P. nubicola* Perry [se requiere de más estudios; incluido en *P. pseudostrobus* por Farjon y Styles (1997)]

14.- *P. pseudostrobus* Lindley

var. *apulcensis* (Lindley) Shaw [*P. apulcensis* Lindley; incluye a *P. oaxacana* Mirov]

var. *estevezii* Martínez [*P. estevezii* (Martínez) Perry]

var. *pseudostrobus*

Grupo Sabinianae [= subsección *Sabinianae* Loudon]

15.- *P. coulteri* D. Don

16.- *P. sabiniana* Douglas ex D. Don

17.- *P. torreyana* Perry ex Carrière

subsp. *insularis* Haller

subsp. *torreyana*

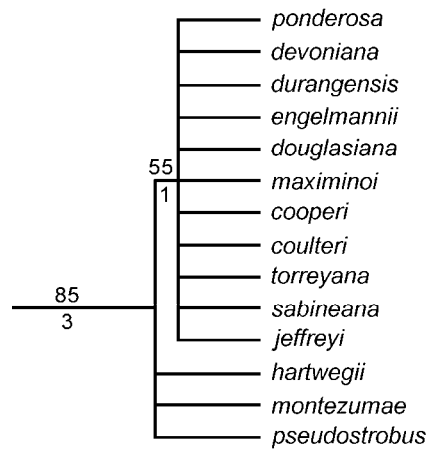


Figura 4. Hipótesis filogenética de las especies dentro de la subsección *Ponderosae* a través del análisis de *rbcL* y *matK* del DNA del cloroplasto. Tomado de Gernandt *et al.* (2005).

JUSTIFICACIÓN

A través del tiempo ha existido un gran interés por el género *Pinus* y su gran diversidad de especies, por parte de morfológicos, anatomistas, paleobotánicos, forestales y otros especialistas (Hart, 1987). Las especies incluidas en la subsección *Ponderosae* son de gran importancia tanto, económica como ecológicamente (Le Maitre, 1998). En México se distribuyen 14 de las 17 especies incluidas en este grupo y aun cuando las características del género *Pinus* han sido ampliamente estudiadas, es necesaria mayor investigación taxonómica y filogenética dentro de las subsecciones, ya que las relaciones de filogenia entre las especies (y el mismo concepto de especie) aún no están claras.

El DNA del cloroplasto representa un recurso primario de información para estudios de sistemática molecular en plantas (Shaw *et al.*, 2005), que no se ha explorado en su totalidad dentro del género *Pinus* (Krupkin *et al.*, 1996; Gernandt *et al.*, 2005; Syring *et al.*, 2007) y ha probado ser útil para proporcionar un marco filogenético inicial a partir del cual se infiere la monofilia de grupos reconocidos en clasificaciones previas, pero debido a que se hereda por vía paterna en coníferas (Mogensen, 1996), su historia puede diferir de aquella de las especies en los casos donde ha ocurrido hibridación (Price *et al.*, 1998).

En este estudio se pretende encontrar regiones variables del DNA del cloroplasto, que proporcionen un buen grado de resolución de las relaciones filogenéticas entre las especies de la subsección *Ponderosae*, así como la comparación de los resultados con las clasificaciones previas de Martínez (1948) y Price *et al.* (1998) para este grupo.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Proponer una hipótesis filogenética de las especies de *Pinus* subsección *Ponderosae* con base en el análisis filogenético de secuencias de DNA del cloroplasto.

Objetivos específicos:

- Evaluar diez regiones del cloroplasto en una muestra inicial de cinco especies y elegir aquellas con mayor utilidad para resolver relaciones de filogenia en la subsección *Ponderosae*.
- A partir de las diez regiones iniciales del cloroplasto seleccionar aquellas más variables y comparar su utilidad para inferir relaciones de filogenia entre las especies de la subsección *Ponderosae*.
- Comparar hipótesis de filogenia basadas en caracteres tanto morfológicos como moleculares.
- Proponer una clasificación de las especies dentro de la subsección *Ponderosae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolecta de material biológico

Se recolectaron ramillas y cuando fue posible, conos en localidades silvestres para las especies de la subsección (Cuadro 3). Los ejemplares fueron depositados en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), en el Herbario Nacional, del Instituto de Biología, UNAM (MEXU) y el herbario de Oregon State University (OSC).

Cuadro 3. Localidad y datos de recolecta de las diferentes especies analizadas, con base en la propuesta de clasificación de Price *et al.* (1998).

Especie	Localidad	Número de colecta
<i>P. arizonica</i>	Arizona, Pima Co., Mt. Lemmon, E.U.A.	DSG784
<i>P. arizonica</i>	Chihuahua, Mpio. Guadalupe y Calvo, Cerro Molinera, MEX.	Kew1232
<i>P. coulteri</i>	California, Riverside Co., Hwy 74, E.U.A.	DSG406
<i>P. coulteri</i>	California, San Bernadino Co., Arrow Bear Lake, E.U.A.	DSG723
<i>P. cooperi</i>	Durango, El Salto, MEX.	AL COOP 01
<i>P. devoniana</i>	Michoacán, cerca de Pátzcuaro, MEX.	DSG06099
<i>P. devoniana</i>	Jalisco, cerca de Bolaños, MEX.	DSG727
<i>P. donnell-smithii</i>	Sur de Quetzaltenango, GTM.	AL DONN 01
<i>P. donnell-smithii</i>	Sur de Quetzaltenango, GTM.	AL DONN 02
<i>P. douglasiana</i>	Estado de México, cerca de Temascaltepec, MEX.	DSG434
<i>P. douglasiana</i>	Estado de México, entre Temascaltepec y Los Fresnos, MEX.	DSG561
<i>P. douglasiana</i>	Estado de México, Pinetum Maximino Martínez, Chapingo, MEX.	DOU39
<i>P. durangensis</i>	Estado de México, Pinetum Maximino Martínez, Chapingo, MEX.	4Dur1
<i>P. durangensis</i>	Jalisco, cerca de Bolaños, MEX.	DSG734
<i>P. engelmannii</i>	Estado de México, Pinetum Maximino Martínez, Chapingo, MEX.	12ENG4
<i>P. engelmannii</i>	Arizona, Cave Creek, E.U.A.	AL ENG 01s1
<i>P. engelmannii</i>	Arizona, Pima Co., Mt. Lemmon, E.U.A.	DSG783
<i>P. hartwegii</i>	Hidalgo, Mpio. Singuilucan, MEX.	DSG616
<i>P. hartwegii</i>	Estado de México, Mpio. Amecameca, Paso de Cortes, MEX.	DSG6199
<i>P. jeffreyi</i>	Oregon, Iron Mt, E.U.A.	DSG301
<i>P. jeffreyi</i>	Oregon, Iron Mt, E.U.A.	DSG656

Cuadro 3. Continuación.

<i>P. maximinoi</i>	Estado de México, Mpio. Valle de Bravo, norte de Temascaltepec, MEX.	DSG446
<i>P. maximinoi</i>	Estado de México, entre Picacho y Santa María, MEX.	DSG769
<i>P. montezumae</i>	Morelos, Lagunas de Zempoala, MEX.	DSG101
<i>P. montezumae</i>	Hidalgo, Real del Monte, MEX.	DSG416
<i>P. montezumae</i>	Tamaulipas, Miquihuana, MEX.	DSG538
<i>P. oaxacana</i>	Oaxaca, Santa Catarina Ixtepeji, MEX.	DSG531
<i>P. oaxacana</i>	Oaxaca, Santa Catarina Ixtepeji, MEX.	Lev Oaxaca
<i>P. ponderosa</i>	California, Trinity Co., Hwy 299, E.U.A.	DSG665
<i>P. ponderosa</i>	California, Butte Co., Hwy 32 NE of Chico, E.U.A.	DSG698
<i>P. ponderosa</i>	Oregon, E.U.A.	RMP0414
<i>P. pseudostrobus</i>	Hidalgo, Metepec, cerca de Apulco, MEX.	DSG411
<i>P. pseudostrobus</i>	Hidalgo, Mpio. Zimapán, Puerto de Piedra, MEX.	DSG615
<i>P. pseudostrobus</i>	Hidalgo, Parque Nacional Los Mármoles, MEX	DSG631
<i>P. pseudostrobus</i>	Michoacán, Dos Aguas, MEX.	DSG643
<i>P. pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i>	Puebla, cerca de Soltepec, MEX.	DSG7499
<i>P. pseudostrobus</i> var. <i>estevezii</i>	California, Institute of Forest Genetics, Placerville, E.U.A.	DSG681
<i>P. sabiniana</i>	California, Redding, E.U.A.	Kew2824
<i>P. sabiniana</i>	California, Butte Co., Hwy 32 noroeste de El Chico, E.U.A.	DSG696
<i>P. scopulorum</i>	Texas, Jeff Davis Co., Mt. Livermore, E.U.A.	DSG601
<i>P. scopulorum</i>	Arizona, Pima Co., Mt. Lemmon, E.U.A.	DSG780
<i>P. torreyana</i>	California, Santa Barbara Co., Santa Rosa Island, E.U.A.	AL TORR 01
<i>P. torreyana</i>	California, San Diego Co., Del Mar, E.U.A.	DSG407
<i>P. washoensis</i>	California, Modoc Co. E.U.A.	AL WASH 01
<i>P. washoensis</i>	Nevada, Institute of Forest Genetics, Placerville, E.U.A.	wash28DSG672
<i>P. washoensis</i>	California, Modoc Co., Warner Mtns., E.U.A.	DSG708
<i>P. washoensis</i> X <i>P. jeffreyi</i>	California, Modoc Co., Warner Mtns., E.U.A.	DSG707
Grupo externo		
<i>P. glabra</i>	Georgia, Pulaski Co., E.U.A.	ALGLAB 02
<i>P. greggii</i>	Hidalgo, Zimapán, cerca de Maguey Verde, MEX.	DSG426
<i>P. herrerae</i>	Michoacán, Dos Aguas, MEX	DSG634
<i>P. muricata</i>	California, Santa Cruz Island, E.U.A.	AL MURI 01
<i>P. oocarpa</i>	Jalisco, El Tuito, MEX.	DSG459
<i>P. virginiana</i>	Tennessee, Monroe Co., E.U.A.	AL VIRG 02

Extracción del DNA

Se utilizó un mortero con pistilo empleando aproximadamente 0.1 g de tejido foliar al cual se le agregó nitrógeno líquido para posteriormente molerlo y de esta manera romper las paredes celulares. La extracción de DNA se realizó por medio de un mini-estuche (Qiagen® Dneasy Plant) empleando el protocolo del fabricante. Los productos de extracción (1.5 µl por muestra) se visualizaron a través de electroforesis en gel de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio, para verificar su calidad. El DNA se almacenó a -20 °C.

Condiciones de amplificación del DNA

La amplificación de DNA del cloroplasto se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) bajo los siguientes parámetros, 94 °C, tres min; 30 X (94 °C, 60 s; 50 °C, 50 s; 72 °C, 80 s); 72 °C, cinco min; 4 °C, 5 min. La PCR tuvo un volumen total de 50 µl y las concentraciones finales de los reactivos fueron 1X Buffer, 1.4 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1 µM de oligonucleótido (*primer*) F y R y 2 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen). Los productos de PCR (1.5 µL por muestra) se visualizaron a través de electroforesis en gel de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio. La purificación de los productos de PCR se llevo a cabo utilizando el kit GeneClean III Kit® de Q-Biogene siguiendo el protocolo del fabricante. Los productos de la purificación (1.5 µL por muestra) fueron visualizados en gel de agarosa (1%).

Reacción de secuenciación

El producto de PCR purificado se combinó con cada oligonucleótido en reacciones separadas de secuenciación bajo los siguientes parámetros 69 X (96 °C, 30 s; 50 °C, 15 s; 60 °C, 4 min); 4 °C, 15 min. Las reacciones se purificaron mediante precipitación con etanol y acetato de sodio, agregando 25 µl de etanol al 95% y 1 µl de acetato de sodio a 3M con un pH de 4.6 por cada 10 µl de reacción de secuenciación. Se agitaron los tubos y se mantuvieron a temperatura ambiente por 25 min para la precipitación de los productos y después fueron centrifugados por 20 min a 12000 rpm. Posteriormente se desechó el líquido con una micropipeta y se agregaron 150 µl de etanol al 70%, luego se centrifugó por 5 min a 12000 rpm, nuevamente se desecho el líquido y se secaron las muestras en un "SpeedVac" por 20 min. Los productos se eluyeron con 25 µl de "Template Supression Reagent" (Applied

Biosystems, Inc.). Cada reacción se analizó en un secuenciador automatizado ABI modelo 310 (Applied Biosystems, Inc.), empleando un capilar de 47 cm x 50 µl por un tiempo de inyección de 48 s y con un tiempo de corrida de 45 min.

Diez oligonucleótidos de un total de 20 diseñados con base en una alineación de los genomas de *Pinus thunbergii* (número de Genbank D17510) y *Pinus koraiensis* (número de GenBank NC_04677; Cuadro 4) fueron empleados tanto en la PCR como en la reacción de secuenciación. Se eligieron regiones altamente variables (D. Gernandt, comunicación personal).

De diez regiones del DNA del cloroplasto analizadas para este estudio en una muestra inicial de cinco especies de la subsección *Ponderosae*, se eligieron aquellas con mayor variación (Cuadro 4), en las cuales se continuó el proceso de amplificación y secuenciación hasta evaluar el total de las especies y algunas variedades de la subsección.

Cuadro 4. Oligonucleótidos empleados en el presente estudio. Posición que ocupan en el genoma del cloroplasto de *Pinus thunbergii*, así como la secuencia de cada uno. Los diez fueron diseñados para amplificar regiones variables en la segunda mitad del genoma del cloroplasto.

Nombre	Posición en el genoma de <i>P. thunbergii</i>	Secuencia (5'-3')
Critchfield	73236	ttg gga aat cgt ttt cat tat t
R	73684	ctg gag cga cta tga tac gg
Lindley	82936	tcg tct tga acc ttc tgc aa
R	83475	tct ggt att gaa att tga tgg aga
Lanner	95300	aga taa ctt gga tcg gac cac
R	95767	gct gca tag atg ggc gaa ta
Lambert	95663	ttg cct ttt ggt ccc tct aa
R	96059	tag aat atg acc gcc caa cc
Engelmann	96499	gga ccg aag tct ctc aat att ttt
R	96867	aaa tcc gaa aga ttc gaa atg
James	96794	ggg gat tct ttt act gaa atg tat ga
R	97365	cgc caa aca ctc gaa aag g
Hartweg	97759	gac gga aaa tta tga tat gga aga
R	98212	caa ggc ttc aaa cga aaa gg
Roezl	98232	ctt ttc gtt tga agc ctt gg
R	98661	cct tcg atc cgg tat gaa tc
Don	98647	gct ctc cta taa ctg gaa tgt ctc
R	99121	tgt ggt ttt tcg tga tcc aa
Balfour	117159	tgc cgg tca att gta tct ttc
R	117723	tga ata gga tag ttg atc tat gga ag

Análisis

Las secuencias obtenidas para cada región de las especies de la subsección *Ponderosae* se analizaron manualmente y se editaron empleando el software BioEdit (Hall, 1999). El grupo externo estuvo conformado por secuencias de *Pinus greggii*, *P. oocarpa*, *P. muricata*, *P. herrerae*, *P. glabra* y *P. thunbergii* especies del subgénero *Pinus*. Se incluyeron secuencias de estas especies para los análisis de las regiones de acuerdo a su disponibilidad.

Los análisis filogenéticos se realizaron a través del software PAUP (Swofford, 2003), mediante una búsqueda heurística con 10,000 réplicas con incorporación de taxa al azar (“random addition sequence”) e intercambio de ramas (“tree-bisection reconnection”). La medida de apoyo de las ramas se determinó con 1000 réplicas de remuestreo (“bootstrap”) con “simple sequence addition” y los índices de decaimiento fueron calculados examinando el consenso estricto de todos los árboles de uno a tres pasos adicionales de los presentes en el árbol más parsimonioso. Además se emplearon los comandos “converse constraints” para ramas con índice de decaimiento superiores a tres. Las condiciones anteriores también fueron empleadas para realizar el análisis combinando las secuencias de las tres regiones en una sola matriz. Las especies incluidas en la matriz general debieron tener secuencias para al menos dos de las tres regiones elegidas del DNA del cloroplasto, ya que debido a complicaciones durante la amplificación algunas especies sólo presentaron secuencias para una sola región.

RESULTADOS

Utilidad filogenética de diez regiones del genoma del cloroplasto

Se analizaron diez regiones del genoma del cloroplasto con una muestra inicial de cinco especies de la subsección *Ponderosae* para evaluar su utilidad filogenética. De cada una de las regiones se registraron los siguientes datos: número de caracteres variables, inserciones o deleciones (indels), número de caracteres informativos y longitud total de alineación (Cuadro 5). El intervalo de sitios variables fue de 0 para la región Lambert (Pt95663-96059; con base en 8 especies) a 11 para la región James (Pt96794-97365; con base en 16 especies).

Las regiones elegidas de acuerdo al número de caracteres, tanto informativos como variables, fueron: Lanner (Pt95300-95767), James (Pt96794-97365) y Don (Pt98647-99121; Fig.5), en las cuales se continuó el muestreo hasta completar 16 especies recolectadas de las 17 incluidas en la propuesta de clasificación de Price *et al.* (1998), así como algunas variedades. Cuando fue posible se incluyó más de una muestra por especie.

Debido a problemas de amplificación algunas muestras que aparecen en la Cuadro 3 no se encuentran representadas en cada una de las tres matrices de secuencias. En la matriz correspondiente a la región Lanner se tiene un total de 15 taxa y 28 secuencias individuales para el grupo interno, la región James cuenta con 16 taxa y un total de 43 secuencias individuales, y finalmente la región Don cuenta con 16 taxa y 36 secuencias individuales.

Implicaciones para la sistemática de la subsección *Ponderosae*

a) Análisis individual de las tres regiones con mayor variación

La región Lanner tuvo una longitud total de alineación de 412 pares de bases (pb) para la subsección *Ponderosae* sin tomar en cuenta los grupos externos (Cuadro 5). La matriz completa de 30 taxa (28 conformaron el grupo interno) tuvo un total de 494 caracteres; 354 fueron constantes, 34 variables no informativos y 6 informativos. Únicamente en esta región se registro la presencia de indels, los cuales fueron codificados en la matriz antes de llevar a cabo los análisis. En la búsqueda heurística, se encontraron 11 árboles más parsimoniosos con una longitud de 41 pasos, un índice de consistencia (IC) de 0.98, un índice de consistencia excluyendo los caracteres no informativos (ICexc) de 0.86, y un índice de retención (IR) de 0.97 (Figura 6).

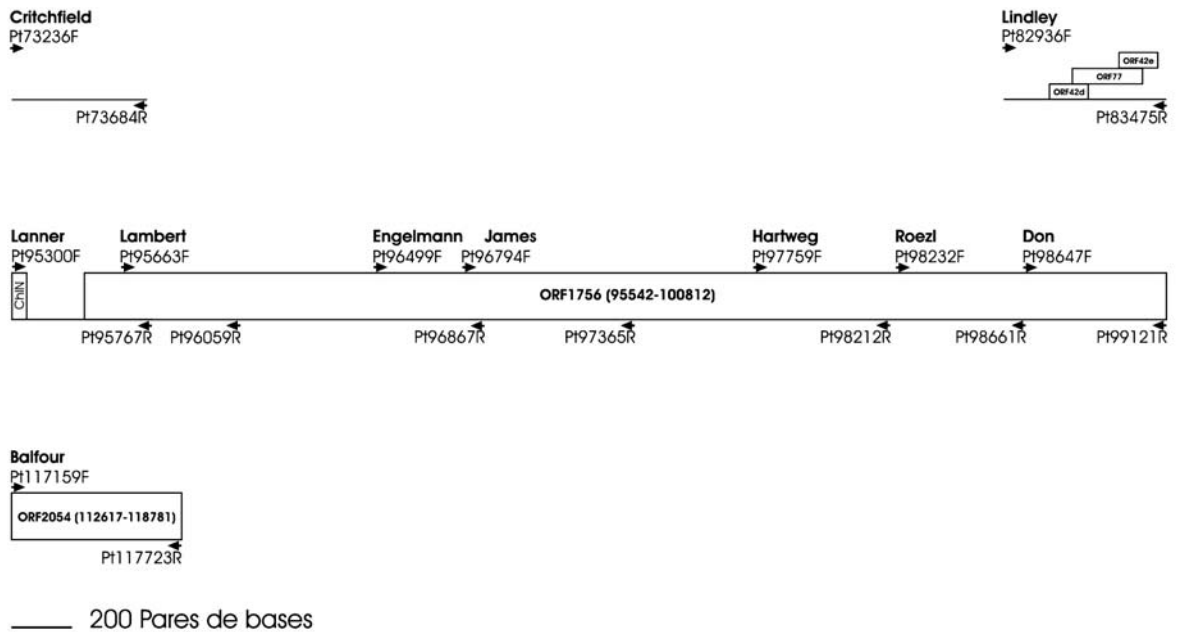


Figura 5. Regiones del DNA del cloroplasto empleadas en este estudio, para el análisis filogenético de la subsección *Ponderosae*.

La región James tuvo una longitud de alineación de 525 pb para la subsección *Ponderosae* (Cuadro 5). La matriz completa de 49 taxa (43 del grupo interno) tuvo un total de 685 caracteres: 564 fueron constantes, 93 variables no informativos y 28 informativos. En la búsqueda heurística se encontraron 20 árboles más parsimoniosos con una longitud de 131 pasos (IC=0.95, ICexc=0.82 IR= 0.94; Figura 7).

La región Don tuvo una longitud total de alineación de 457 pb para la subsección *Ponderosae* (Cuadro 5). La matriz completa de 40 taxa (36 del grupo interno) tuvo un total de 486 caracteres: 469 fueron constantes, 10 variables no informativos y 7 informativos. En la búsqueda heurística se encontró un árbol más parsimonioso con una longitud de 19 pasos (IC=0.95, ICexc=0.89, IR=0.97; Figura 8).

Los árboles que resultaron de los análisis individuales por región (Lanner, James y Don) presentan tres grupos diferenciados, denominados en este estudio: Grupo *Ponderosae*, Grupo *Montezumae* y Grupo *Sabinianae* (Fig. 6-10).

Cuadro 5. Regiones del genoma del cloroplasto analizadas para las especies de la subsección *Ponderosae*. Este cuadro presenta el número de caracteres variables, indels, caracteres informativos, y longitud de alineación por región, en una muestra de mínimo cinco especies secuenciadas.

Región	Porcentaje de G+C	Total de secuencias en la matriz	Número de taxa	Número de caracteres variables	Indels	Número de caracteres informativos	Longitud de alineación
Lindley	35.5%	11	10	4	0	0	502 pb
Lanner	31.4%	28	15	9	2	4	412 pb
Lambert	36.4%	8	8	0	0	0	406 pb
Engelmann	36.8%	16	13	1	0	1	366 pb
James	39.6%	43	16	11	0	7	525 pb
Hartweg	35.2%	7	7	2	0	1	445 pb
Roezl	37.9%	6	6	1	0	0	431 pb
Don	30.9%	36	16	6	0	3	457 pb
Balfour	30.4%	10	10	1	0	0	555 pb
TOTAL				35	2	15	

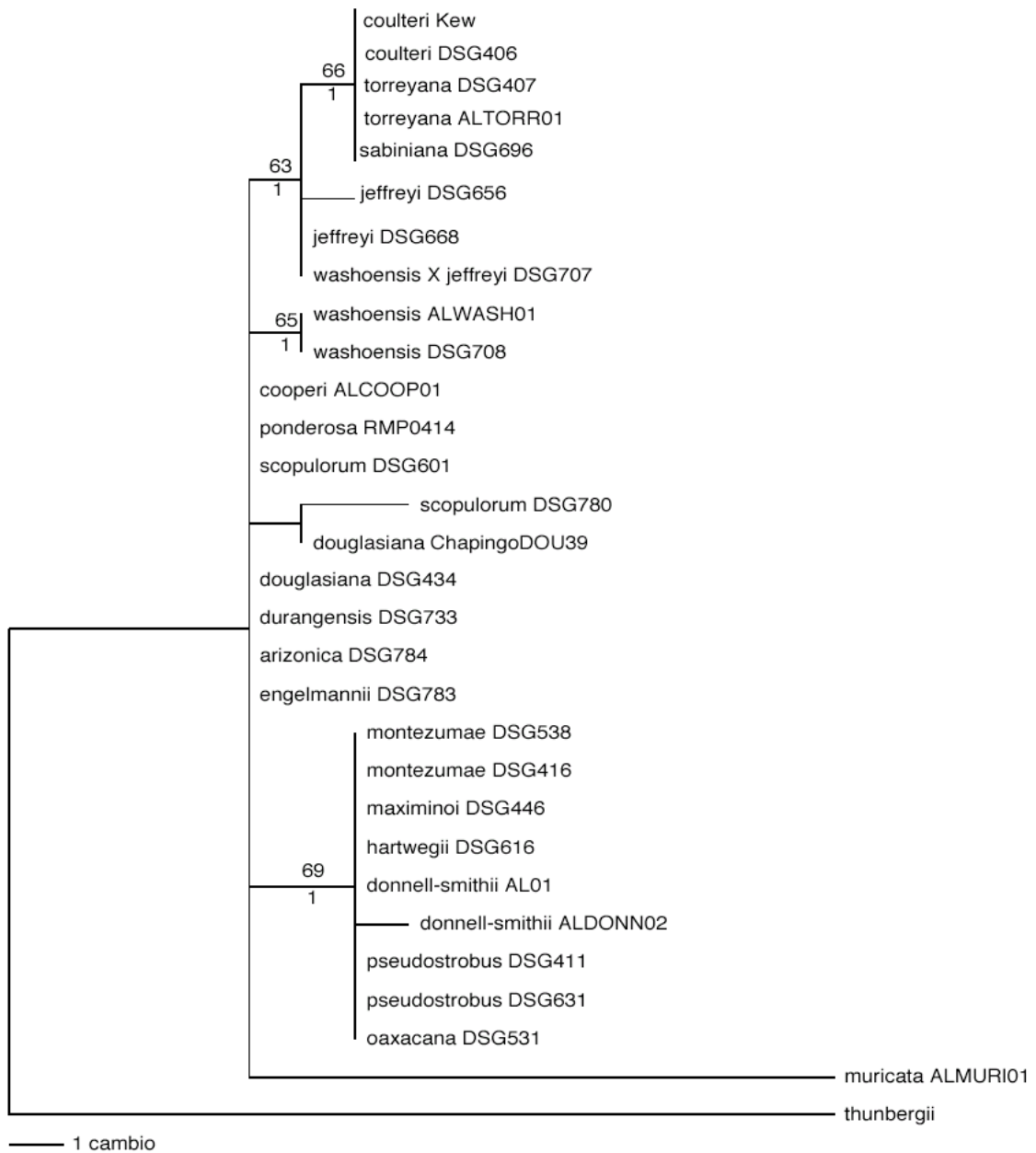


Figura 6. Uno de once árboles más parsimoniosos para la matriz de la región Lanner (412 pb, 6 caracteres informativos, longitud = 41 pasos, IC = 0.98, ICexc = 0.86, IR = 0.97). Los valores de bootstrap mayores a 50% se muestran por encima de las ramas y los índices de decaimiento se muestran en la parte inferior de las ramas.

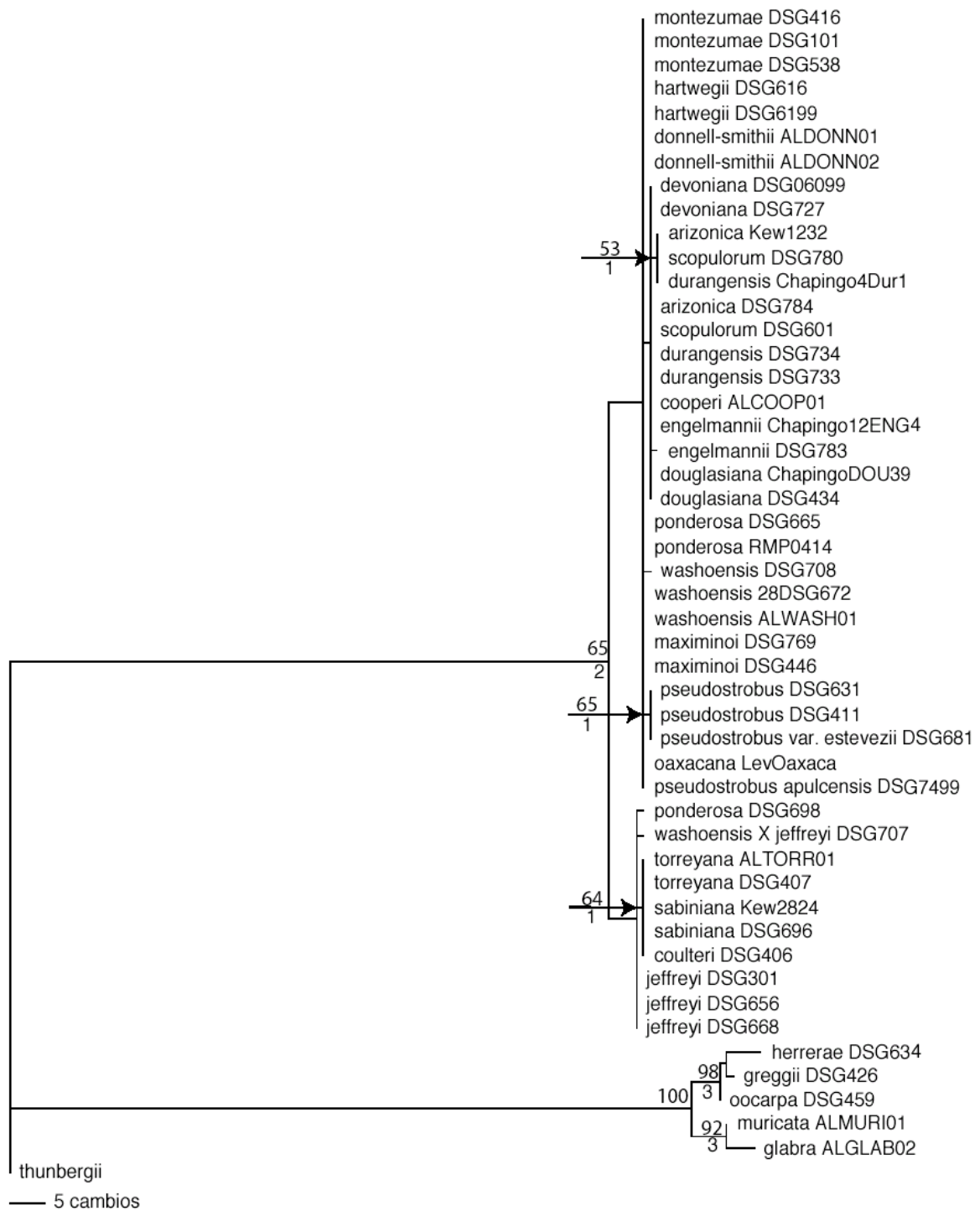


Figura 7. Uno de veinte árboles mas parsimoniosos para la matriz de la región James (525 pb, 28 caracteres informativos, longitud = 131 pasos, IC = 0.95, ICexc = 0.82, IR = 0.94). Los valores de bootstrap mayores a 50% se muestran por encima de las ramas y los índices de decaimiento se muestran en la parte inferior de las ramas.



Figura 8. Único árbol más parsimonioso para la matriz de la región Don Pt98647 (457 pb, 7 caracteres informativos, longitud = 19 pasos, IC = 0.95, ICexc = 0.89, IR = 0.97). Los valores de bootstrap mayores a 50% se muestran por encima de las ramas y los índices de decaimiento se muestran en la parte inferior de las ramas.

b) Análisis de las tres regiones combinadas

Debido a que el genoma del cloroplasto evoluciona como una unidad, no presenta recombinación y los valores de bootstrap para las tres regiones analizadas no soportaron cladogramas contradictorios con valores mayores al 70%, es posible combinar las secuencias de las tres regiones en una sola matriz para su análisis en conjunto.

La matriz de secuencias combinando las tres regiones tuvo una longitud total de 1394 pb (Cuadro 5), de un total 1551 caracteres, 1381 fueron constantes, 135 variables no informativas y 35 informativas. Treinta y siete taxa conformaron el grupo interno; el número de sitios variables en el grupo interno fue 35. En la búsqueda heurística se encontraron 6908 árboles más parsimoniosos con una longitud de 183 pasos (IC = 0.95, ICexc = 0.80 y IR = 0.93; Figura 9).

Propuesta de clasificación y descripción de las relaciones entre los taxa

Los siguientes cladogramas son consistentes a través de los análisis por región así como en el análisis combinado. Un primer clado está formado por *Pinus torreyana*, *P. coulteri*, *P. sabiniana* y *P. jeffreyi* (bootstrap<50%, decaimiento=0). El segundo clado se encuentra formado por *Pinus washoensis*, *P. cooperi*, *P. ponderosa*, *P. scopulorum*, *P. douglasiana*, *P. durangensis*, *P. arizonica*, *P. engelmannii*, *P. devoniana* y un tercer clado formado por *P. montezumae*, *P. hartwegii*, *P. donnell-smithii*, *P. pseudostrobus* y *P. maximinoi*. Los grupos Ponderosae y Montezumae presentan baja resolución en el consenso estricto (Figura 10).

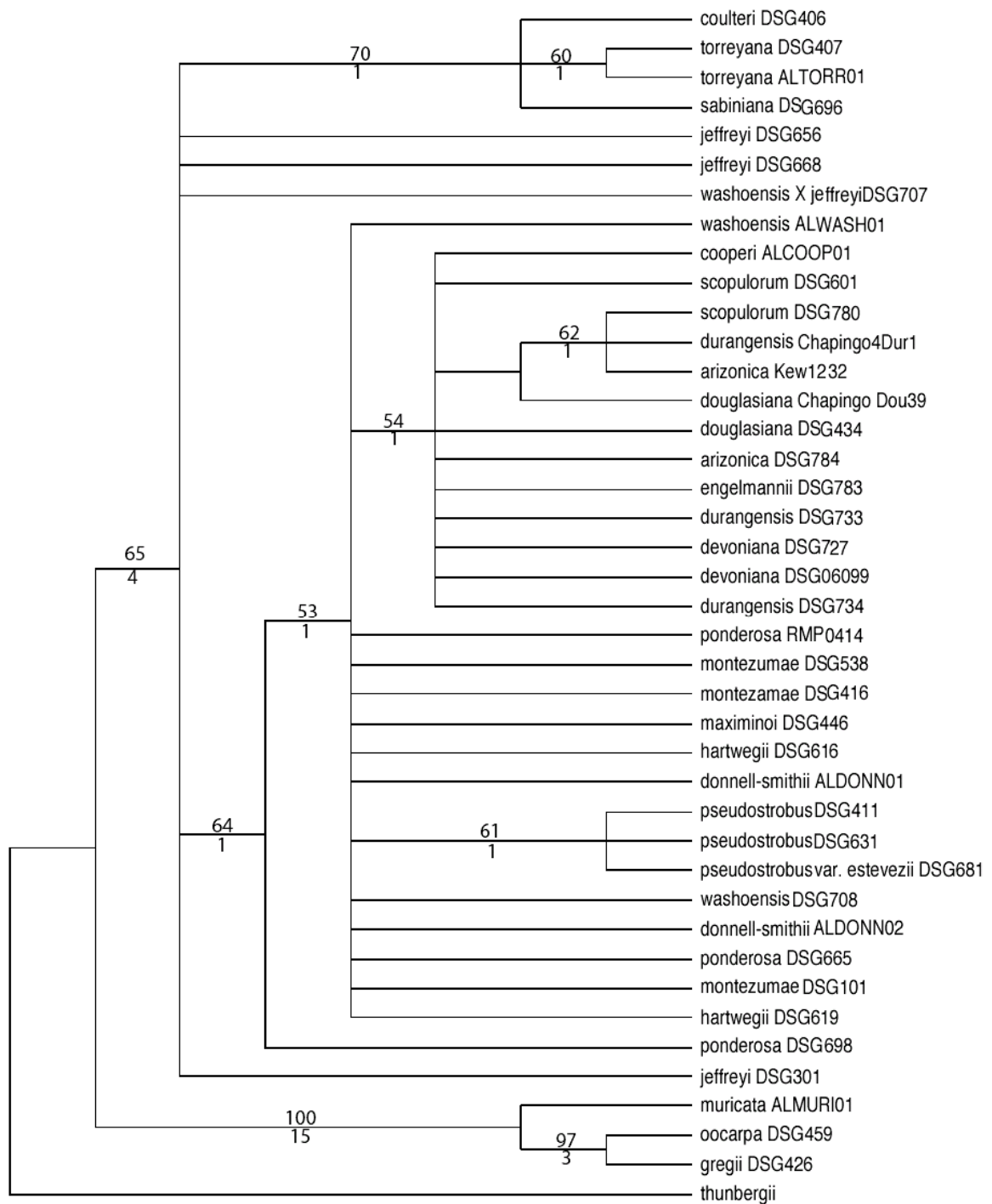


Figura 10. Consenso estricto de seis mil novecientos ocho árboles más parsimoniosos para la matriz combinada de las tres regiones. Los valores de bootstrap mayores a 50% se muestran por encima de las ramas y los índices de decaimiento se muestran en la parte inferior de las ramas.

Cada una de las muestras de *P. coulteri*, *P. sabiniana*, *P. torreyana* y *P. jeffreyi*, más la muestra de un híbrido entre *P. washoensis* y *P. jeffreyi* (washoensis X jeffreyi DSG 707) se agrupan de forma consistente en un solo clado a través de todos los análisis realizados.

Existe variación en la posición de algunas especies entre los diferentes análisis, por ejemplo en la región James así como en el análisis combinado, las muestras de *P. washoensis* (washoensis DSG 708 y washoensis AL01) y *P. ponderosa* (ponderosa DSG 665 y ponderosa RMP414) se encuentran incluidas en una politomía con las especies del grupo Montezumae y Pseudostrobus (bootstrap = <50%, decaimiento = 0), pero en las regiones Don y Lanner se mantienen dentro del grupo Ponderosae. La posición de la muestra ponderosae DSG 698, es variable, con una posición cercana a las especies del grupo Sabinianae en el análisis general y en la región James, mientras en la región Don se encuentra en una politomía junto con las especies del grupo Ponderosae, y no se tienen secuencias disponibles de la muestra para la región Lanner.

La posición de *P. devoniana* y *P. douglasiana* con el resto de las especies del grupo *Ponderosae*, es constante a través de todos los análisis. Debido a dificultades en la amplificación en la región Lanner no fue posible la inclusión de *P. devoniana*, por lo cual su posición permanece sin resolver únicamente para esta región. El clado que incluye a las especies de los grupos Montezumae y Pseudostrobus (excepto *P. douglasiana* y *P. devoniana*), presenta a *P. maximinoi* (maximinoi DSG 446) agrupada con las especies del grupo Ponderosae únicamente en la región Don. Las muestras de *P. pseudostrobus* (DSG 631, DSG 411 y *pseudostrobus* var. *estevezi* DSG 681) se agrupan en un clado, con valor de bootstrap de 62% tanto en el análisis general como en la región James; mientras que en las regiones Lanner y Don se encuentran en un politomía con el resto de las especies del grupo.

DISCUSION

Utilidad filogenética de diez regiones del genoma del cloroplasto

El total de oligonucleótidos evaluados en este estudio exhiben la misma eficacia en cuanto a la amplificación debido a que se empleó un solo par de oligonucleótidos por región desde la PCR hasta la reacción de secuenciación. En cuanto a las tres regiones más variables elegidas, comprobaron ser adecuadas para el análisis filogenético dentro de la subsección. Lanner, la región entre los genes *chlN* y *orf1756* (Pt95300-95767; "Lanner") fue la única región que presentó problemas en la amplificación y requiere un rediseño del oligonucleótido para la obtención de mejores resultados. En cuanto a resolución filogenética las regiones Lanner y Don son similares, mientras James es la que presenta menor resolución, sin embargo es la región que incluye un mayor número de secuencias dentro del estudio.

Actualmente se están explorando diversas regiones no codificantes del genoma del cloroplasto para su uso en estudios filogenéticos a niveles taxonómicos por debajo de subsección, con la suposición de que las regiones no codificantes, están sometidas a menos selección funcional que aquellas codificantes, por lo cual deben proveer niveles mayores de variación (Gielly y Taberlet, 1994). Hasta hace poco el uso de las regiones no codificantes en estudios de filogenia estaba restringido a unas pocas, pero hasta ahora se ha visto un incremento del número de regiones empleadas (Shaw *et al.*, 2005).

La utilidad filogenética de diferentes regiones no codificantes dentro de un grupo taxonómico dado, puede variar de manera importante, pero el seleccionar una región apropiada de DNA en la investigación filogenética es comúnmente difícil por la falta de información acerca del ritmo de evolución entre diferentes regiones no codificantes, por lo que es difícil establecer una regla, para elegir una región específica del genoma del cloroplasto en la resolución de filogenias y hasta ahora para la mayoría de las investigaciones elegir la región apropiada para un nivel taxonómico en particular es regularmente un trabajo de intuición (Shaw *et al.*, 2005).

La propuesta de Shaw *et al.*(2005), que sugiere que una muestra inicial de tres especies es suficiente para inferir y predecir los niveles totales de variación y la utilidad filogenética que se encontrará en una determinada región parece no ser suficiente para el estudio de grupos tales como la subsección *Ponderosae*, que presentan niveles de variación sumamente bajos. Las cinco muestras por región empleadas en este estudio fueron útiles en la elección de las

regiones más variables, además es importante incluir más de una muestra por especie dentro de los análisis filogenéticos, para verificar la posición de las especies y comprobar la monofilia de los genes, debido a que diversos fenómenos, tales como la hibridización, introgresión y “lineage sorting”, pueden causar la inclusión de dos muestras de una misma especie en clados distintos (Syring *et al.*, 2007).

Implicaciones para la sistemática de la subsección *Ponderosae*.

La idea de grupos dentro de la subsección *Ponderosae* no es nueva y ha sido mantenida entre diferentes autores. Los conceptos en los que se han manejado han sido similares reconociendo principalmente tres grupos (*Ponderosae*, *Montezumae* y *Pseudostrobus*) con la reciente incorporación del grupo *Sabinianae* dentro de la subsección *Ponderosae* (Krupkin *et al.*, 1996; Price *et al.*, 1998; Gernandt *et al.*, 2005). Martínez (1948) reconoció tres secciones afines a *P. ponderosa* (*Ponderosae*, *Montezumae* y *Pseudostrobus*) para las especies de los pinos en México. Little y Critchfield (1969) por su parte no consideran agrupaciones internas dentro de la subsección y las especies *P. coulteri*, *P. sabiniana* y *P. torreyana* están clasificadas en la subsección *Sabinianae*. Price *et al.* (1998) propusieron cuatro grupos para las especies dentro de la subsección *Ponderosae*: grupo *Ponderosae* (seis especies), grupo *Montezumae* (cuatro especies), grupo *Pseudostrobus* (cuatro especies) y grupo *Sabinianae* (tres especies).

De acuerdo con los resultados de este estudio con base en DNA del cloroplasto se puede distinguir entre tres linajes separados dentro de la subsección, con el reconocimiento del grupo *Ponderosae* (siete especies), grupo *Montezumae* (seis especies) y grupo *Sabinianae* (cuatro especies), lo que es consistente con clasificaciones anteriores excepto que no se puede distinguir entre los grupos *Montezumae* y *Pseudostrobus* de acuerdo a los resultados del presente estudio. El grupo *Ponderosae* es parafilético con respecto al grupo *Montezumae* y estos dos conforman el grupo hermano del grupo *Sabinianae*, siendo este último al parecer el más divergente de la subsección.

Propuesta de clasificación para la subsección *Ponderosae*.

Con base en los resultados del análisis de las regiones del DNA del cloroplasto, existe un total de tres grupos dentro de la subsección *Ponderosae* (Cuadro 6), el primero formado por

las especies del grupo Sabinianae incluyendo a *P. jeffreyi*, con una distribución en Baja California (en México), California y Oregon en los Estados Unidos de América; un segundo grupo incluye al grupo Montezumae y Pseudostrobus excluyendo a *P. douglasiana* y *P. devoniana*, especies que se incluyen en un tercer grupo formado por las especies cercanas a *P. ponderosa* o grupo Ponderosae.

Cuadro 6. Propuesta de clasificación de tres grupos principales de acuerdo a los resultados obtenidos del análisis a través de secuencias de DNA del cloroplasto, comparada con la clasificación de Price *et al.* (1998).

Propuesta de clasificación	Propuesta de clasificación de Price <i>et al.</i> (1998)
Grupo Sabinianae	Grupo Sabinianae
<i>P. coulteri</i>	<i>P. coulteri</i>
<i>P. jeffreyi</i> ←	<i>P. sabiniana</i>
<i>P. sabiniana</i>	<i>P. torreyana</i>
<i>P. torreyana</i>	
Grupo Ponderosae	Grupo Ponderosae
<i>P. cooperi</i>	<i>P. cooperi</i>
<i>P. devoniana</i> ←	<i>P. durangensis</i>
<i>P. durangensis</i>	<i>P. engelmannii</i>
<i>P. douglasiana</i> ←	<i>P. jeffreyi</i>
<i>P. engelmannii</i>	<i>P. ponderosa</i>
<i>P. ponderosa</i>	<i>P. washoensis</i>
<i>P. washoensis</i>	
Grupo Montezumae	Grupo Montezumae
<i>P. donnell-smithii</i>	<i>P. devoniana</i>
<i>P. hartwegii</i>	<i>P. donnell-smithii</i>
<i>P. pseudostrobus</i> ←	<i>P. hartwegii</i>
<i>P. maximinoi</i> ←	<i>P. montezumae</i>
<i>P. montezumae</i>	
<i>P. nubicola</i> ←	
	Grupo Pseudostrobus
	<i>P. douglasiana</i>
	<i>P. maximinoi</i>
	<i>P. nubicola</i>
	<i>P. pseudostrobus</i>

La resolución obtenida en este estudio presentó un intervalo en los valores de bootstrap que va del 50-71% (mostrados en los árboles) para el grupo interno, la cual es alta con respecto a la resolución obtenida en estudios anteriores para las especies de la subsección *Ponderosae*. Este estudio también es uno de los pocos que incluye a la mayoría de las especies

(16 de 17 especies), así como algunas variedades que actualmente están clasificadas en la subsección.

a) Grupo Sabinianae

Los resultados de este estudio recuperan un clado que une el grupo Sabinianae: *Pinus sabiniana*, *P. torreyana* y *P. coulteri*; (Price *et al.*, 1998) con *P. jeffreyi*. La relación de grupos hermanos entre *P. jeffreyi* y las tres especies de grupo Sabinianae es consistente con los resultados del estudio realizado por Krupkin *et al.* (1996), a partir del análisis de enzimas de restricción de DNA del cloroplasto. Por otra parte se han documentado híbridos tanto naturales como artificiales entre *Pinus coulteri* y *P. jeffreyi* (Saylor y Smith, 1966), lo que es consistente con los resultados del presente estudio si consideramos estas dos especies dentro de un solo grupo. La presencia de alto porcentaje de alcanos n-heptano en los componentes volátiles de las oleorresinas unen también a *P. jeffreyi* y *P. sabiniana* (Mirov, 1961), aunque este tipo de datos no siempre son consistentes y algunas veces se han empleado para diferenciar especies hermanas más que para comprobar su monofilia (Price *et al.*, 1998).

Al interior del grupo Sabinianae, *P. sabiniana*, *P. coulteri* y *P. torreyana* forman un grupo que presenta una reducción importante del ala en la semilla, lo cual puede ser considerado como una novedad evolutiva. *Pinus jeffreyi* forma parte del grupo Ponderosae en la propuesta de Price *et al.* (1998); con base en evidencia anterior (Saylor y Smith, 1966; Mirov, 1961), y los resultados de este estudio, al parecer *P. jeffreyi* está más relacionada con *Pinus sabiniana*, *P. coulteri* y *P. torreyana*, por lo que estas cuatro especies se consideran como componentes del grupo Sabinianae.

Todas las muestras de *P. jeffreyi* más un híbrido (*P. jeffreyi* X *P. washoensis*) provenientes de distinta localidad, se encuentran agrupadas de manera consistente en la misma posición que al parecer es típica para la especie y no resultado de introgresión del cloroplasto. El agrupamiento de secuencias de una región a partir de distintas muestras pertenecientes a una especie, puede ser reflejo de la monofilia de las secuencias o de la estabilidad de la especie (Syring *et al.*, 2007). El análisis de la anatomía foliar, más la posición del híbrido entre *P. washoensis* y *P. jeffreyi* a través de los distintos análisis, revelan un mayor parecido morfológico a *P. washoensis* y similitud genética a *P. jeffreyi*. Tomando en cuenta el patrón de

herencia paterna del DNA del cloroplasto en *Pinus* (Mogensen, 1996), su posición se encuentra determinada por el material genético proveniente del polen de *P. jeffreyi*.

b) Grupo Montezumae

La mayoría de las especies reconocidas por Price *et al.* (1998) dentro de los grupos Montezumae y Pseudostrobus, se agrupan en un solo clado en los diferentes análisis de este estudio (*P. pseudostrobus*, *P. donnell-smithii*, *P. hartwegii*, *P. montezumae* y *P. maximinoi*). Dos especies que fueron incluidas en este grupo, *P. douglasiana* y *P. devoniana*, se agrupan de forma consistente a través de los análisis realizados fuera de este clado. Debido a que, para estas dos especies se incluyó más de una muestra, se considera que la posición inferida a través de los resultados no es un efecto de introgresión.

Martínez (1948) reconoce a los grupos Montezumae y Pseudostrobus como independientes, sin embargo Shaw (1909), sólo reconoce especies tales como *P. montezumae* (*Pinus montezumae* var. *lindleyi*, *Pinus montezumae* var. *rudis*, *Pinus montezumae* var. *hartwegii*), *P. pseudostrobus* (*P. pseudostrobus* var. *apulcensis*, *P. pseudostrobus* var. *tenuifolia*) y *P. ponderosa* (*P. ponderosa* var. *macrophylla*, *P. ponderosa* var. *jeffreyi*, *P. ponderosa* var. *jeffreyi*) dejando el resto de las especies como variedades dentro de cada una de estas tres especies principales.

Con base en el DNA del cloroplasto no existe evidencia de diferenciación entre las especies de los grupos Montezumae y Pseudostrobus, estos dos grupos se han considerado como estrechamente relacionados y han sido referidos en numerosas ocasiones como el complejo Pseudostrobus-Montezumae (Farjon y Styles, 1997). Lo que indica que no sólo son dos grupos morfológicamente relacionados, si no que, de acuerdo a los resultados de este estudio, son dos linajes genéticamente difíciles de diferenciar.

La hibridación dentro y entre estos dos grupos ha sido documentada más de una ocasión, así como también la hibridación con especies incluidas en *Ponderosae*. Por ejemplo, existe evidencia morfológica y de DNA del cloroplasto de hibridización entre *P. montezumae* y *P. hartwegii* (Matos, 1995). Perry (1991) también observó casos de hibridización natural aparente entre *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, pero además entre *P. montezumae* y *P. devoniana*, de dos grupos diferentes de acuerdo a los resultados de este estudio (grupo Montezumae y Ponderosae, respectivamente). La habilidad de dos especies de hibridizar

libremente es evidencia de estrecho parentesco (Price *et al.*, 1998). *Pinus montezumae* parece crear una conexión en términos de entrecruza y morfología entre el grupo Ponderosae y los grupos Montezumae y Pseudostrobus (Martínez, 1948). Aun cuando no se incluyeron muestras de *Pinus nubicola* para el análisis debido a la falta de recolectas, con base en el esquema de clasificación y la evidencia anterior, esta especie debe ubicarse en el grupo Montezumae (Perry, 1981; Price *et al.*, 1998).

c) Grupo Ponderosae

El grupo Ponderosae se puede reconocer con base en los resultados de los análisis realizados como un grupo parafilético, probablemente debido a la poca resolución en esta parte del árbol. Dicho grupo se encuentra formado por *Pinus cooperi*, *P. durangensis*, *P. engelmannii*, *P. devoniana*, *P. ponderosa*, *P. washoensis* y *P. douglasiana*. La inclusión de *P. devoniana* y *P. douglasiana* dentro de este tercer grupo es otra evidencia en contra de las clasificaciones de Martínez (1948) y de Price *et al.* (1998). La posición de estas especies es consistente a través de todos los análisis realizados y no existen indicios de su inclusión junto a las especies del grupo Montezumae. Martínez (1948) presenta a *P. devoniana* (como *P. michoacana*) dentro del grupo Montezumae y *P. douglasiana* en el grupo Pseudostrobus, separados a través de un análisis con fundamentos básicamente morfológicos. Gernandt *et al.* (2005), a través del análisis de *rbcL* y *matK* (dos genes del cloroplasto) presenta en una politomía a *P. douglasiana* y *P. devoniana* junto a las especies que corresponden a los grupos Ponderosae y Sabinianae, no junto a las especies de los grupos Pseudostrobus y Montezumae, lo cual también es consistente con los resultados obtenidos en este estudio.

Pinus montezumae y otras especies, como *P. engelmannii*, *P. jeffreyi* y *P. ponderosa*, presentan entrecruzamientos en una variedad de formas (Saylor y Smith, 1966). La muestra de *P. ponderosa* DSG698 presenta una posición inesperada a través de los diferentes análisis, lo que sugiere posibles eventos de introgresión o “lineage sorting”, lo cual resulta difícil de distinguir.

CONCLUSIONES

De las diez regiones evaluadas en este estudio las regiones Lanner, James y Don presentaron la mayor cantidad de variación y por lo tanto mayor utilidad para resolver relaciones de filogenia en la subsección *Ponderosae*. Solo la región Lanner presentó problemas de amplificación por lo que es necesario un rediseño de los oligonucleótidos.

Con base en el análisis filogenético de las regiones Lanner, James y Don del genoma del cloroplasto es posible distinguir tres grupos consistentes a través de los diferentes análisis, el grupo *Ponderosae*, grupo *Sabinianae* y grupo *Montezumae*, resultados que son parcialmente consistentes con propuestas anteriores de clasificación para las especies de subsección excepto que no se puede distinguir como diferentes a los grupos *Montezumae* y *Pseudostrobus* y que *P. douglasiana* y *P. devoniana* se agrupan de forma consistente dentro del grupo *Ponderosae*.

Debido al reciente origen evolutivo de las subsecciones del género *Pinus*, se necesita mayor investigación sobre fuentes de variación en otras regiones del cloroplasto, así como en otros genomas tales como el núcleo y la mitocondria, que ayuden a comprobar o modificar la hipótesis de filogenia aquí propuesta, tomando en cuenta que estos dos organelos exhiben un patrón de herencia y tasas de coalescencia diferentes al DNA del cloroplasto empleado en este estudio.

Una delimitación oportuna de especies dentro de la subsección ayudará a establecer planes de manejo y conservación más eficaces y representativos en el país ya que son necesarios esfuerzos de conservación para muchas especies de pinos en México, las cuales representan valiosos recursos genéticos, tomando en cuenta que el mayor centro de diversidad de las especies de pinos de la subsección *Ponderosae* está en Norte y Centroamérica con concentraciones particulares en México, California y el sureste de los Estados Unidos de América.

LITERATURA CITADA

- Critchfield, W.B., y Little, E.L., Jr., 1966, Geographic distribution of the pines of the world: U.S. Department of Agriculture Miscellaneous Publication 991, p. 1-97.
- Engelmann, G. 1880. Revision of the genus *Pinus*, and description of *Pinus elliottii*. Transactions of the Academy of Sciences of St. Louis 4: 161-190
- Erwin, D. M. y Schorn H. E. 2006. *Pinus baileyi* (section *Pinus*, Pinaceae) from the paleogene of Idaho, USA. *American Journal of Botany* 93: 197-205.
- Farjon, A. 1984. Pines: Drawings and Descriptions of the Genus *Pinus*. E. J. Brill and W. Backhuys, Leiden.
- Farjon, A. y Styles, B. T. 1997. *Pinus*. Flora Neotropica Monograph 75: 1-291.
- Farjon, A. 2001. World Checklist and Bibliography of Conifers, 2da. ed. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Geada-López, G., Kamiya, K. y Harada, K. 2002. Phylogenetic relationships of *Diploxylon* pines (subgenus *Pinus*) based on plastid sequence data. *International Journal of Plant Sciences* 163: 737-747.
- Gernandt, D. S., Geada-López, G., Ortiz-García, S. y Liston, A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54: 29-42.
- Gielly, L. y Taberlet, P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution*.11: 769-777.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hart, J. A., 1987. A cladistic analysis of conifers, preliminary results. *Journal of the Arnold Arboretum* 68: 269-307
- Klaus, W. 1989. Mediterranean pines and their history. *Plant Systematics and Evolution* 162: 133-163.
- Krupkin, A. B., Liston, A. y Strauss, S. H. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*, Pinaceae) from chloroplast DNA restriction site analysis. *American Journal of Botany* 83: 489-498.
- Ledig, F. T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. pp. 251-280 en: Richardson, D. M. (ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- Le Maitre, D. C. 1998. Pines in cultivation: a global view. pp. 407-431 en: Richardson, D. M. (ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Little, E. L. Jr. y Critchfield, W. B. 1969. Subdivisions of the Genus *Pinus*. USDA Forest Service Miscellaneous Publication 1144.
- Little, E. L., Jr., 1971, Atlas of United States trees, volume 1, conifers and important hardwoods: U.S. Department of Agriculture Miscellaneous Publication 1146.
- Martínez, M. 1948. Los Pinos Mexicanos, 2da. ed. Ediciones Botas, México, D.F.
- Matos, J. A. 1995. *Pinus hartwegii* and *P. rudis*: A critical assessment. *Systematic Botany* 20: 6-21.
- Millar, C. I. 1998. Early evolution of pines. pp. 69-91 en: Richardson, D. M. (ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Miller, C. N. Jr. y Malinky, J. M. 1986. Seed cones of *Pinus* from the Late Cretaceous of New Jersey, U.S.A. *Review of Palaeobotany and Palynology* 46: 257-272.
- Mirov, N. T. 1961. Composition of gum turpentines of pines. USDA Forest Service Technical Bulletin 1239.
- Mogensen, H. L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* 83: 383-404.
- Perry, J. P. Jr. 1991. The pines of Mexico and Central America. Portland, Oregon: Timber Press.
- Price, R. A., Liston, A. y Strauss, S. H. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. pp. 49-68 en: Richardson, D. M. (ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Richardson, D. M. y Rundel, P. W. 1998. Ecology and Biogeography of *Pinus*: an introduction. pp. 3-46 en: Richardson, D. M. (ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Robison, C. R. 1977. *Pinus triphylla* and *Pinus quinquefolia* from the upper Cretaceous of Massachusetts. *American Journal of Botany* 64: 726-732.
- Rushforth, K. 1987. Conifers. London: Helm, Londres.
- Saylor, L. C. y Smith, B. W. 1966. Meiotic irregularity in species and interspecific hybrids of *Pinus*. *American Journal of Botany* 53: 453-468.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059- ECOL-2001, protección ambiental-especies nativas de México y de

flora y fauna silvestres—categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio—lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, México, 6 de marzo, pp. 1–80.

Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E. y Small, R. L. 2005. The tortoise and the hare II, relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166

Shaw, R. G. 1909. The pines of Mexico. *Publications of the Arnold arboretum*. Num. 1.

Stead, J. W. y Styles, B. T. 1984. Studies of Central American pines: a revision of the “pseudostrobus” group (Pinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 249-275

Swofford, D.L. 2003. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.

Syring, J., Farrell, K., Businský, R., Cronn, R. y Liston, A. 2007. Widespread genealogical nonmonophyly in species of *Pinus* subgenus *Strobus*. *Systematic Biology* 56: 1-19.

Van der Burgh, J. 1973. Hölzer der niederrheinischen Braunkohlenformation, 2. Hölzer der Braunkohlengruben "Maria Theresia“ zu Herzogenrath, "Zukunft West“ zu Eschweiler und "Victor“ (Zülpich Mitte) zu Zülpich. Nebst einer systematisch- anatomischen Bearbeitung der Gattung *Pinus* L. *Review of Palaeobotany and Palynology* 15, 73-275.

Willyard, A., Syring, J., Gernandt, D. S., Liston, A. y Cronn, R. 2007. Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Molecular Biology and Evolution* 24: 90-101.

ANEXO: ANATOMÍA FOLIAR

La anatomía foliar del género *Pinus* presenta importantes características diagnósticas. Por ejemplo la presencia de uno o dos ases vasculares sirve para distinguir claramente entre los subgéneros *Strobos* y *Pinus* respectivamente (Gernandt *et al.*, 2005). Los caracteres de las hojas tanto internos como externos, también pueden ser útiles en la delimitación de especies y la documentación de hibridación interespecífica en el género.

Los canales resiníferos, son tubos estrechos que corren usualmente de forma longitudinal a través de toda la hoja, su posición ha sido usada como carácter de clasificación desde 1880 por Engelmann; su número y posición son altamente variables entre las especies y pueden ser útiles como caracteres diagnósticos en la identificación (Farjon y Styles, 1997; Price *et al.*, 1998), dentro de las especies de la subsección *Ponderosae* los canales resiníferos suelen ser medios, por su ubicación en el mesófilo, sin contacto alguno con estructuras dérmicas (Gernandt *et al.* 2005).

Por otra parte la hipodermis también presenta altos grados de variación estructural, debido a que las capas de células esclerenquimatosas que la forman, no se distribuyen de manera uniforme, y presentan concentraciones en los márgenes laterales y axiales de las hojas. En algunas especies como *Pinus douglasiana* la hipodermis forma extensiones que penetran a través del mesófilo (intrusiones hipodermales) y se conectan con la endodermis envolviendo comúnmente a los canales resiníferos (Farjon y Styles, 1997; Fig. 11H).

En el presente estudio además del empleo de las características morfológicas, tanto de conos como de hojas, también se realizaron cortes transversales foliares de las diferentes muestras recolectadas, con la finalidad de corroborar las identificaciones. Los cortes foliares realizados fueron consistentes con las identificaciones y se pudieron observar intrusiones de células hipodérmicas en dos especies, *P. douglasiana* y *P. maximinoi*. *Pinus douglasiana* y *P. maximinoi* exhiben intrusiones hipodermales (Fig. 11D, H), lo que sugiere que son dos especies cercanamente emparentadas (Stead y Styles, 1984; Farjon y Styles, 1997), sin embargo los resultados de este estudio contradicen esta hipótesis, ya que ambas especies se encuentran incluidas en dos grupos claramente diferenciados (Fig. 6-10). Considerando que los resultados basados en DNA del cloroplasto son únicamente una evidencia, se requiere la evaluación y estudio de este tipo de caracteres, para inferir relaciones de parentesco entre especies.

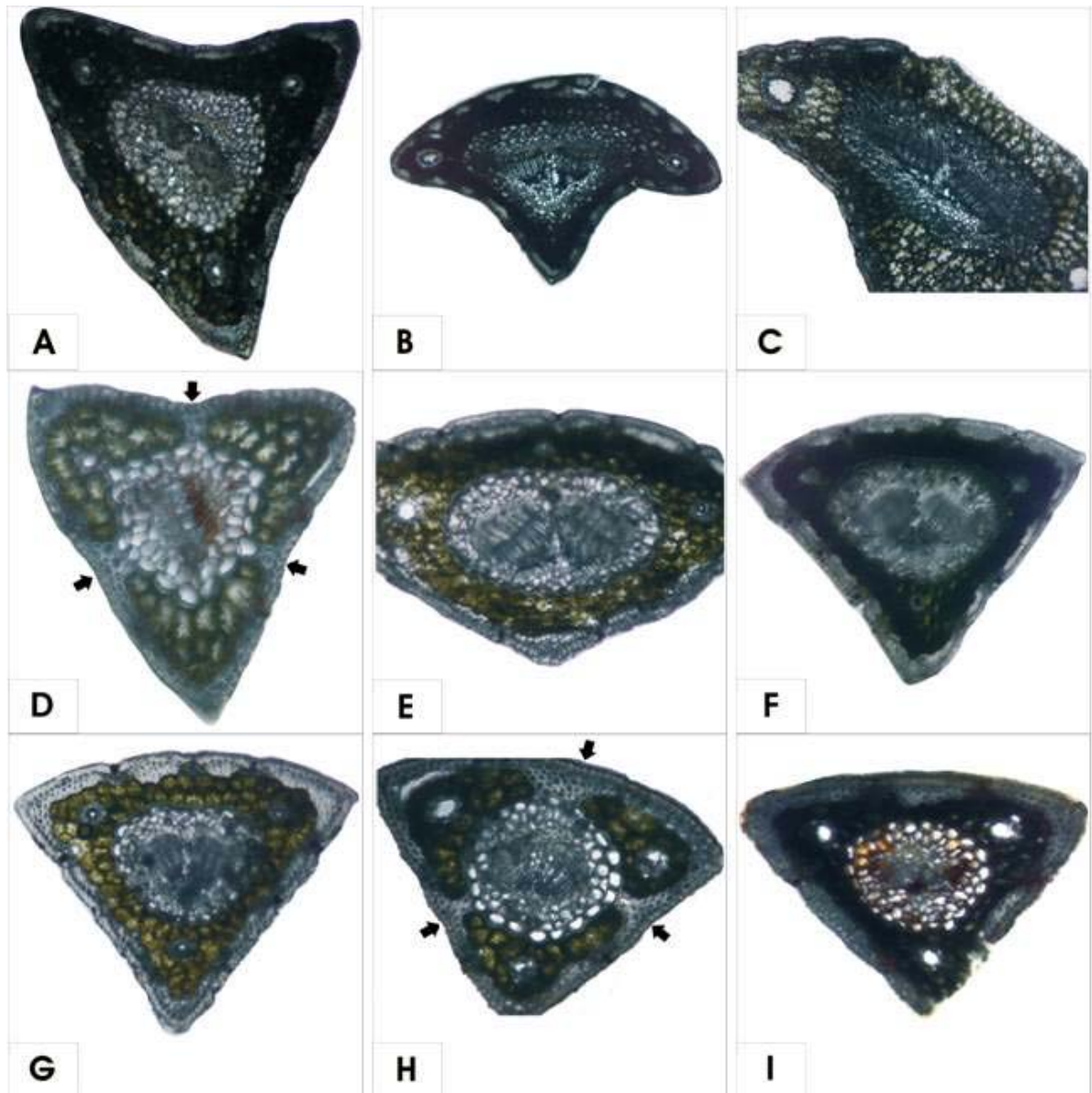


Figura 11. Cortes foliares de algunas especies de la subsección *Ponderosae*. **A.** *Pinus cooperi* (ALCOOP01). **B.** *P. ponderosa* (DSG698). **C.** *P. washoensis*X*jeffreyi* (DSG707). **D.** *P. maximinoi* (DSG742). **E.** *P. scopulorum* (DSG780). **F.** *P. engelmannii* (DSG783). **G.** *P. arizonica* (DSG784). **H.** *P. douglasiana* (DSG434). **I.** *P. pseudostrobus* (DSG643). Las intrusiones hipodermales se señalan con flechas en D y H.

GLOSARIO

Definiciones con base en:

Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. 3era ed., Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachussets.

Hillis, D. M., Moritz, C. Mable, B. K. (ed.). 1996. *Molecular Systematics*, 2da. ed., Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Schuh, T. R. 2000. *Biological Systematics. Principles and Applications*. Cornell University Press, New York.

alineación: Comparación por posición ya sea de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos, para maximizar la similitud o minimizar el número de cambios inferidos entre ellas.

apomorfía: Estado de carácter derivado.

bp: Pares de bases.

chlN: *Photochlorophyllide reductase subunit N*.

cladogénesis: Surgimiento de linajes a través del tiempo, con el consecuente incremento en número de taxa.

coevolución: Evolución conjunta de dos o más especies que interactúan ecológicamente, cada una de las cuales evoluciona en respuesta a fuerzas de selección impuestas por la otra.

cpDNA: DNA del cloroplasto

divergencia: Evolución con diferenciación creciente entre linajes, en uno o más caracteres.

DNA polimerasa: Enzima que cataliza la síntesis de DNA a partir de una cadena sencilla.

dNTP. Desoxirribonucleótidos.

electroforesis: Separación de moléculas en un campo eléctrico.

endémico: Especie restringida a una región o localidad específica.

enzima de restricción: Enzima que corta la doble cadena de DNA en secuencias específicas pequeñas, la variación en estas secuencias dentro de una población resulta en la variación de tamaño de las secuencias del DNA después del tratamiento con enzimas de restricción.

filogenia: Relaciones históricas entre linajes de organismos o partes de ellos (e.g. genes).

grupo externo: Grupo de organismos no pertenecientes al grupo en estudio, el cual proporciona información acerca de los estados plesiomórficos.

grupo interno: Grupo en el que se asume monofilia, generalmente comprende los taxa de interés primario.

grupo monofilético: Grupo de taxa definido por sinapomorfias y que contiene un ancestro común, e incluye a todos sus descendientes.

híbrido: Individuo resultado de la cruce entre poblaciones o especies usualmente diferenciadas genéticamente.

homología: Origen común de dos o más genes o productos de genes.

homoplasia: Conjunto de fenómenos que resultan en estados de carácter similares, no heredados por parte de un ancestro común. Incluidas la convergencia, paralelismo y reversión.

indel: Evento de inserción / deleción.

índice de consistencia: Medida de la cantidad de homoplasia exhibida por un carácter o grupo de caracteres dentro de un árbol; definido como la suma de los cambios de carácter mínimos individuales dividido por el número de cambios observados. Si no existe homoplasia, las cantidades serán iguales y el índice de consistencia alcanzará su valor máximo de uno.

índice de retención: Cuantifica la cantidad de sinapomorfía esperada en función de la sinapomorfía total. Reduce la tendencia basada en autopomorfias.

introgresión: Infiltración o migración de genes, de una especie o población ancestral en otra por hibridación seguida por retrocruza de híbridos con uno u otro de los tipos originales.

lineage sorting: Proceso por el cual cada especie, de varias especies descendientes adquieren un solo linaje genético, de los diversos linajes genéticos exhibidos por la especie ancestral común; de ahí la derivación de un árbol monofilético en base a genes, para algunas de las especies descendientes, a partir de la condición genética parafilética heredada por el ancestro común.

máxima parsimonia: Criterio para estimar determinados parámetros a partir de la información observada bajo el principio de minimizar el número de eventos requeridos para explicar los datos. En análisis filogenético, el árbol óptimo bajo el criterio de máxima parsimonia es aquel que requiera el menor número de cambios en los estados de carácter.

método heurístico: Proceso de análisis que no garantiza encontrar la solución óptima a un problema. Empleado cuando los datos son demasiados, que no permiten el uso de métodos exactos, el método heurístico no garantiza un resultado óptimo pero reduce el tiempo de análisis.

oligonucleótido: Cadena corta de nucleótidos, muchas veces sintetizado en laboratorio.

orf: marco de lectura abierto.

pcr: Reacción en cadena de la polimerasa. Proceso en el que se amplifica una región del DNA varias veces, en el cual series de ciclos térmicos resultan en la desnaturalización de una cadena doble de DNA , la unión de oligonucleótidos "primers" a las cadenas de una sola hebra, y la extensión del "primer" catalizada por la DNA polimerasa.

politomía: Nodo en un árbol que conecta más de tres ramas.

“primer”: Oligonucleótido empleado para iniciar la síntesis de DNA por medio de la DNA polimerasa o la retrotranscriptasa.

Pt: *Pinus thunbergii*.

sinapomorfía: Estado de carácter derivado, compartido entre dos o mas taxa, indicativo de relación filogenética.

transición: Sustitución de nucleótidos de una purina a otra purina (e.g., A-G), o de una pirimidina a otra pirimidina (e.g., T-C).

transversión: Sustitución de nucleótidos de una purina a una pirimidina (e.g., A-C), o viceversa (e.g., T-G).