

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Taxonomía de las especies del complejo *Pseudostrobus* distribuidas
en el Estado de Nuevo León y avances de sus relaciones filogenéticas
inferidas mediante secuencias de ADN del cloroplasto".

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

BIÓLOGO

PRESENTA

ISRAEL LOERA CARRIZALES

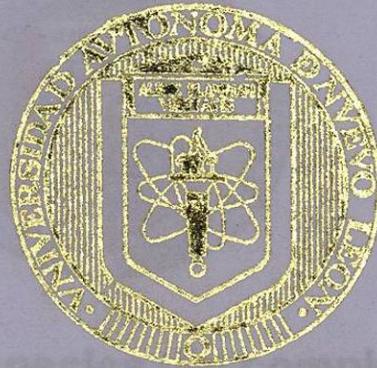
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. AGOSTO DE 2009



1080183104

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Taxonomía de las especies del complejo *Pseudostrobilus* distribuidas en el Estado de Nuevo León y avances de sus relaciones filogenéticas inferidas mediante secuencias de ADN del cloroplasto”.

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

BIÓLOGO

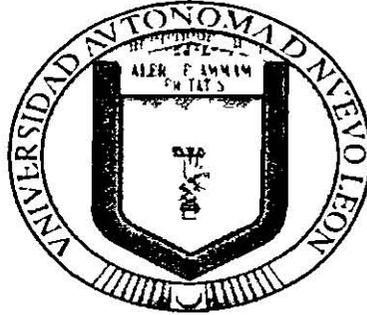
PRESENTA

ISRAEL LOERA CARRIZALES

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. AGOSTO DE 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“Taxonomía de las especies del complejo *Pseudostrobus* distribuidas en el Estado de Nuevo León y avances de sus relaciones filogenéticas inferidas mediante secuencias de ADN del cloroplasto”.

TESIS

Como requisito parcial para obtener el título de:

BIÓLOGO

PRESENTA

ISRAEL LOERA CARRIZALES

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

AGOSTO DE 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Taxonomía de las especies del complejo *Pseudostrobus* distribuidas en el Estado de Nuevo León y avances de sus relaciones filogenéticas inferidas mediante secuencias de ADN del cloroplasto.

TESIS

Como requisito parcial para obtener el título de:

BIÓLOGO

PRESENTA

ISRAEL LOERA CARRIZALES

COMITÉ DE TESIS



Dra. Susana Favela Lara

Director



Dr. Alejandro González Hernández

Secretario



Dr. Glafiro Alanís Flores

Vocal

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

AGOSTO DE 2009

Dedicatoria

A mis padres, Mario Loera Martínez y María Elena Carrizales Fernández.

Agradecimientos.

A la Dra. Susana Favela Lara por creer en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis e introducirme en la sistemática y la biología evolutiva de los pinos mexicanos , apoyarme siempre sin condiciones en todo lo que necesitara con sinceridad y amabilidad.

Al Dr. Alejandro González Hernández y al Dr. Glafiro Alanís Flores por sus comentarios y sugerencias en la realización de esta tesis, elementos que me sirvieron en mucho para tener otro punto de vista y mejorar mi visión y proyección del trabajo.

A mis papás Mario Loera Martínez y María Elena Carrizales Fernández por aceptarme y quererme como soy, apoyarme siempre en mis decisiones personales y darme la última palabra de estas, darme la oportunidad de tener una carrera y desarrollarme como profesionista en mi área de interés, enseñarme en vida el ejemplo de unión y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Tere, Verónica Limón, Joaquín, Kenzy, Arcadio, Ricardo, Roberto y Verónica Ávila, por hacerme pasar buenos momentos en el laboratorio así como mostrar interés y apoyo en mis experimentos, alimentar el trabajo en equipo y aprender unos de otros. Especial agradecimiento a Ricardo Canales por ayudarme en el manejo de software con disponibilidad y atención.

A mis compañeros de colecta, Sarahi, Miguel, Mariana y Verónica Limón por haber formado un equipo en las salidas a campo y ayudarme a coleccionar.

A mis amigos de la FCB por los buenos y malos momentos que pasamos juntos y que supimos sobrellevar en la carrera a pesar de las adversidades.

A Libertad América Sánchez Presa por ser hermosa en todos los sentidos, por su apoyo en buenos y malos momentos de mi vida y en la realización de este trabajo de tesis. Siempre serás una estrella en mi camino.

| ÍNDICE DE CONTENIDO | PÁGINA |
|--|---------------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| IMPORTANCIA | 3 |
| HIPÓTESIS | 4 |
| OBJETIVO | 5 |
| Objetivos particulares | 5 |
| DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO | 6 |
| Localización | 6 |
| Provincias | 6 |
| Climatología | 7 |
| Hidrología | 8 |
| Edafología | 8 |
| Vegetación | 8 |
| ANTECEDENTES | 11 |
| Historia taxonómica del complejo <i>Pseudostrobus</i> | 11 |
| Sistemática del género <i>Pinus</i> y estudios filogenéticos basados en secuencias de ADN | 14 |
| MATERIAL Y METODOS | 18 |
| Colecta de material botánico | 18 |
| Herborización e identificación | 18 |
| Selección de individuos para los análisis filogenéticos | 22 |
| Trabajo de laboratorio | 22 |
| Extracción de ADN | 22 |
| Selección de regiones del cloroplasto | 22 |
| Amplificación | 23 |
| Secuenciación de productos de PCR | 24 |

| | |
|---|----|
| Análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN del cloroplasto | 24 |
| Selección de grupo externo | 24 |
| Alienación y concatenación de secuencias de ADN | 25 |
| Criterios para la inferencia de los árboles filogenéticos | 25 |
| Índices estadísticos de confiabilidad de los árboles filogenéticos | 26 |
| Interpretación de los árboles filogenéticos | 26 |
| RESULTADOS | 28 |
| Identificación taxonómica | 28 |
| Fotografías de los ejemplares identificados y la variación morfológica encontrada en el estudio | 28 |
| Selección de los ejemplares identificados para realizar los análisis filogenéticos | 44 |
| Trabajo de laboratorio | 44 |
| Extracción de ADN | 45 |
| Amplificación | 46 |
| Secuenciación | 47 |
| Alineación | 47 |
| Árboles filogenéticos inferidos a partir de las secuencias de cpDNA | 50 |
| Árbol neighbor joining | 50 |
| Uno de los arboles mas parsimoniosos inferidos bajo el criterio de máxima parsimonia | 51 |
| Estricto consenso de los árboles más parsimoniosos inferidos bajo máxima parsimonia | 52 |
| Árbol majority rule inferido bajo máxima parsimonia | 54 |
| Árbol inferido con el criterio de Máxima verosimilitud | 55 |
| Árbol inferido con el criterio de máxima verosimilitud con análisis bootstrap | 56 |
| DISCUSIÓN | 58 |
| Variación morfológica y determinación taxonómica | 58 |

| | |
|---|----|
| Análisis filogenético inferido mediante ADN del cloroplasto | 61 |
| CONCLUSIÓN | 63 |
| LLITERATURA CITADA | 64 |

| ÍNDICE DE MAPAS | PÁGINA |
|--|---------------|
| Mapa 1. Vegetación de Nuevo León | 10 |
| Mapa 2. Puntos de colecta | 21 |
| | |
| ÍNDICE DE FIGURAS FIGURAS | |
| Figura 1. Extracción de ADN | 45 |
| Figura 2. Productos de PCR de la región tmT-trnL | 46 |
| Figura 3. Cromatograma con la reacción de secuenciación | 47 |
| | |
| ÍNDICE DE TABLAS | |
| Tabla 1. Sitios de colecta | 19 |
| Tabla 2. Secuencias de cebadores | 23 |
| Tabla 3. Selección de ejemplares para análisis filogenético | 44 |
| Tabla 4. Alineación | 48 |
| Tabla 5. Puntos de mutación | 49 |
| | |
| ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS | |
| Foto 1. Variación en los conos encontrada en los ejemplares colectados en las diferentes localidades de Nuevo León. | 28 |
| Foto 2 . Conos de las diferentes especies del complejo <i>Pseudostrobus</i> colectadas en el Estado de Nuevo León. | 28 |
| Foto 3. Variación de los conos de <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 29 |
| Foto 4. Escamas típicas de <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 30 |
| Foto 5. Conos de <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. colectados en diferentes localidades | 31 |
| Foto 6. Conos de <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>megacarpa</i> Loock | 32 |

| | |
|---|----|
| Foto 7. Conos de <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>megacarpa</i> Loock | 33 |
| Foto 8. Comparación entre conos de <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>megacarpa</i> Loock y conos de <i>P. pseudostrobus</i> Lindl. | 33 |
| Foto 9. Cono de <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>protuberans</i> Mart. colectado en Iturbide | 34 |
| Foto 10. Escamas de <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>protuberans</i> Mart. | 34 |
| Foto 11. Conos de <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry colectados en diferentes localidades | 35 |
| Foto 12. Conos de <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 36 |
| Foto 13. Conos maduros e inmaduros de <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 37 |
| Foto 14. Conos de <i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> Mart. colectados en diferentes localidades | 38 |
| Foto 15. Conos característicos de <i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> Mart. | 39 |
| Foto 16. Escamas típicas de <i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> Mart. | 40 |
| Foto 17. Ancho de acículas de <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>P. estevezii</i> (Mart.) Perry | 41 |
| Foto 18. Brácteas de las ramas de <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. y <i>P. estevezii</i> (Mart.) Perry | 41 |
| Foto 19. Árboles adultos de <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. y <i>P. pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> Mart. | 42 |
| Foto 20. Árboles adultos de <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 43 |

RESUMEN

En el presente trabajo se revisó la taxonomía de los taxa del complejo *Pseudostrobus* distribuidos en el Estado de Nuevo León. Debido a las diferentes clasificaciones y controversias taxonómicas que han surgido a través del tiempo en el grupo, producto de su gran variación morfológica, se decidió incluir caracteres basados en información de secuencias de ADN del cloroplasto para tener más información acerca de las relaciones y distancias filogenéticas de estos taxa, y al mismo tiempo complementar la información taxonómica y ayudar a esclarecer el estatus taxonómico de las especies del complejo *Pseudostrobus* distribuidas en el Estado de Nuevo León. Se utilizan 3 regiones no codificantes (trnL-trnF, trnT-trnL, trnS-trnFm) y una región codificante (matK) del genoma del cloroplasto las cuales proporcionaron pocos puntos informativos produciendo politomías en los árboles filogenéticos obtenidos. Sin embargo, la determinación y revisión taxonómica de los taxa del presente estudio si fue capaz de aportar información acerca de las similitudes y diferencias morfológicas de los taxa del complejo *Pseudostrobus* distribuidos en el Estado de Nuevo León. Con los resultados obtenidos se aceptan para Nuevo León los taxa *Pinus pseudostrobus* Lindl., *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* Loock, *P. pseudostrobus* forma *protuberans* Mart., *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* Mart. y *P. estevezii* (Mart.) Perry. Se sugiere la inclusión de los demás taxa del complejo *Pseudostrobus*, un muestreo más amplio de acuerdo a su rango de distribución y la utilización de mas caracteres informativos pueden quizá en un futuro determinar las relaciones filogenéticas de las especies del complejo *Pseudostrobus* y al mismo tiempo clarificar su estatus taxonómico.

INTRODUCCIÓN

El género *Pinus* está compuesto por 111 especies distribuidas ampliamente a través del Hemisferio Norte (Price *et al.*, 1998). México y Centro América albergan el mayor número de especies del género *Pinus* que cualquier región de tamaño similar en el mundo, de las 111 especies aceptadas por Price *et al.* (1998) 47 se encuentran distribuidas en esta región (Perry *et al.*, 1998).

El noreste de México está representado por 13 especies y 5 variedades, lo cual corresponde a un 38% del total de los taxa reportados para México. La gran variedad de sistemas topográficos y climáticos de la Sierra Madre Oriental son los factores que han influenciado en la diversidad y abundancia del género *Pinus* en esta región, encontrándose 16 taxa para el Estado de Nuevo León (Resendiz, 2009).

El género *Pinus* ha sido clasificado desde tiempos de Linneo (1753), sin embargo el comienzo de una clasificación formal comenzó a principios del siglo XX. Al inicio se utilizaban exclusivamente caracteres morfológicos para su clasificación (Shaw, 1909; Martínez, 1948) posteriormente con el establecimiento de la sistemática filogenética (Henning, 1950) la cual propone una clasificación natural de los organismos basándose en sus relaciones evolutivas se comenzaron a introducir caracteres químicos, de entrecruzamiento y ecológicos para su clasificación (Mirov, 1967; Van der Burgh, 1973; Little y Critchfield, 1969; Price *et al.* 1998). Más recientemente, se ha utilizado también información basada en ADN (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995; Wang *et al.* 1999, 2000; Liston, *et al.* 1999, 2003; Geada *et al.*, 2002; Zhang y Li, 2004; Gernandt *et al.*, 2001, 2003, 2005; Favela, 2005; Syring *et al.* 2005; Castro *et al.*, 2008; Willyard *et al.*, 2009) para determinar las relaciones filogenéticas de las especies. Sin embargo, a pesar del gran número de trabajos sistemáticos que se han realizado del género *Pinus* aún existen controversias con respecto a la clasificación y delimitación de algunas de las especies (Castro *et al.*, 2008).

Una de las clasificaciones más aceptadas es la de Little y Critchfield (1969). Su clasificación incorpora información basada en estudios de hibridación y variación bioquímica, así como caracteres morfológicos. Esta clasificación divide al género *Pinus* en 3 subgéneros, 5 secciones y 15 subsecciones y 94 especies. En cuanto a los 3 subgéneros llamados *Ducampopinus*, *Strobus* y *Pinus*, estos dos últimos se diferencian

por la presencia de uno o dos haces fibrovasculares respectivamente, respecto al subgénero *Ducampopinus* fué descrito como un subgénero monotípico con solo la especie *Pinus krempfii*, una especie endémica del sur de Vietnam con grandes diferencias morfológicas con respecto al resto de los pinos (hojas inusualmente aplanadas de hasta 2cm de ancho). Sin embargo, posteriormente varios estudios clasificaron y aportaron información para clasificar a este pino dentro del subgénero *Strobus* (Ertman *et al.*, 1966; Mirov, 1967; Wang *et al.*, 1999, 2000).

Es importante señalar que México posee casi el total de las especies de tres subsecciones y que son reconocidas como endémicas de México. Para el subgénero *Strobus* la subsección *Cembroides* y para el subgénero *Pinus* las subsecciones *Oocarpae* y *Ponderosae*. Existe controversia acerca de la delimitación de muchas especies de estas subsecciones y el proceso de hibridización es común entre especies (Perry *et al.* 1998). Además, la evidencia fósil (Axelrod, 1986) en el caso de la subsección *Ponderosae* sugiere que estos grupos de pinos mexicanos han divergido recientemente. Willyard *et al.* (2007) sugirieron que las aproximadamente 20 especies de la subsección *Ponoderosae* divergieron dentro de los últimos 8 a 15 millones de años.

El grupo *Pseudostrobus* pertenece a la subsección *Ponderosae* de la sección *Trifoliae* dentro del subgénero *Pinus* y se encuentra ampliamente distribuido en México y Centro América. Este grupo ha sido objeto de estudio a través de varios años debido a la alta variabilidad morfológica que los individuos presentan en su hábitat natural. Debido a esto, se han propuesto diferentes clasificaciones basadas principalmente en estructuras morfológicas las cuales han provocado dudas con respecto al número y posición taxonómica de las especies que conforman el complejo *Pseudostrobus* (Martinez, 1948; Stead y Styles, 1984; Favela, 1991; Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997).

Dado que no existen al momento estudios moleculares en donde se hayan incluido a las especies que conforman el grupo *Pseudostrobus* en el presente trabajo se utilizaron secuencias del ADN del cloroplasto con el objetivo de obtener un árbol filogenético que ayude a esclarecer el estatus taxonómico de las diferentes variedades del complejo *Pseudostrobus* distribuidas en el Estado de Nuevo León.

IMPORTANCIA

Una diferenciación taxonómica clara es el primer paso necesario para guiar esfuerzos para conservar la biodiversidad (Meffe y Carrol, 1994). Los pinos son una importante fuente de servicios ambientales y económica para México ya que participan en grado variable en el dosel de formaciones boscosas que en conjunto ocupan cerca del 10% del territorio nacional (Palacio *et al.*, 2000) y representan el principal recurso de la industria forestal del país (Challenger, 1998). Además, los pinos también son hospederos de una amplio rango de organismos como lo son micorrizas, hongos foliares, insectos, aves y angiospermas parasíticas. Conocer las relaciones filogenéticas de los pinos puede formar las bases para estudios coevolutivos entre estos organismos (Liston *et al.*, 1999), además de ayudar a crear nuevos y mejores esquemas de conservación que vayan orientados a la historia y tendencia evolutiva de las especies de los bosques mexicanos (Delgado y Piñero, 2002).

Hasta el momento en la sistemática del complejo *Pseudostrobus* del género *Pinus* se ha estudiado únicamente utilizando caracteres morfológicos y caracteres químicos, las investigaciones a nivel molecular pueden aportar información que ayude a esclarecer las relaciones filogenéticas entre estos taxa y así ayudar a esclarecer su estatus taxonómico.

HIPÓTESIS

“Las diferencias en las secuencias del ADN del cloroplasto utilizadas en el presente estudio pueden inferir las relaciones filogenéticas entre los taxa del complejo *Pseudostrobus* distribuidos en el Estado de Nuevo León y ayudar a resolver su estatus taxonómico”

OBJETIVO

Determinar la posición taxonómica de los taxa pertenecientes al grupo *Pseudostrobilus* que se distribuyen en el Estado de Nuevo León

Objetivos particulares

Identificar y conocer la variación morfológica de las especies del complejo *Pseudostrobilus* que se distribuyen en el Estado de Nuevo León y que ha sido objeto de sus controversias taxonómicas.

Secuenciar las regiones de ADN del cloroplasto matK, trnL-trnF, trnT-trnL y trnS-trnFm de las especies pertenecientes al grupo *Pseudostrobilus* que se distribuyen en el Estado de Nuevo León y realizar un análisis filogenético para ayudar a resolver su estatus taxonómico.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

Localización.

El Estado de Nuevo León se encuentra localizado en el noreste de la República Mexicana entre los paralelos 23° 10' 27" y 27° 46' 06" de latitud norte y los meridianos 98° 26' 24" y 101° 13' 55" de longitud oeste colindando hacia el norte con los Estados Unidos de América, al noroeste y oeste con los estados de Coahuila y Zacatecas, al sur y sureste con el Estado de San Luis Potosí, y al noreste y sureste con el Estado de Tamaulipas. Tiene una extensión de cerca de 65,000 Km² ocupando el decimotercer lugar en el país por su extensión (INEGI, 2000).

Provincias florísticas.

En el Estado se presentan tres zonas florísticas bien definidas (Rzedowski y Reyna, 1990):

Planicie Costera del Golfo.

Ocupa la porción norte, noreste y centro del Estado, se presentan elevaciones desde los 50 a los 250 msnm, su topografía es de forma general plana, a excepción de algunos cerros y lomeríos de poca altitud, es en esta zona donde se localizan los principales ríos del Estado, los cuales fluyen hacia el este en dirección al Golfo de México. Geológicamente hablando, esta región se constituye por sedimentos de la era Cenozoica del periodo Terciario

Sierra Madre Oriental.

Esta zona cruza el estado de sureste al noroeste, con algunas secciones que pueden considerarse islas geográficas, como es el caso de la Sierra Picachos y la Sierra Papagayos. Está compuesta de terrenos muy accidentados que forman pliegues paralelos y que alcanzan un promedio de 2,000 msnm, es en esta provincia donde se localizan los picos más altos, entre los cuales están el Cerro El Potosí, La Ascensión y San Antonio Peña Nevada, todos con cerca de 4,000 msnm.

Altiplano Mexicano

Está localizada en la sección sur suroeste del Estado, esta compuesta de terrenos planos y algunas elevaciones montañosas aisladas y lomeríos suaves, su altura varía entre los 1,500 y 2,000 msnm.

Climatología

En el Estado predominan los climas tipo B caliente y seco de la clasificación de Koeppen (1948), Bw árido o muy seco, y Bs semiárido o seco. También se presentan otros tipos de climas, los cuales tienen una menor ocurrencia o dominancia, entre estos podemos mencionar el semicálido (A) C y el templado subhúmedo C(W). Mientras que en las partes con altitudes arriba de los 3,000 msnm en la Sierra Madre Oriental se pueden observar climas tipo alpino y subalpino de manera muy restringida como es el caso de San Antonio Peña Nevada y el Cerro del Potosí en los municipios de General Zaragoza y Galeana respectivamente (INEGI, 1986).

El régimen de precipitación pluvial muestra una gran variación, en las zonas más secas, localizadas la Planicie Costera del Golfo, en los municipios de García, Mina y Bustamante y el Altiplano mexicano en los municipios de Galeana, Doctor Arroyo, Aramberri, Mier y Noriega y algunas zonas de General Zaragoza, la precipitación puede llegar a ser menor a los 200 mm anuales; en contraste, la zona con mayor precipitación y humedad se localiza en la vertiente este de la Sierra Madre Oriental, al sureste de la ciudad de Monterrey, en los municipios de Cadereyta Jiménez, Juárez, Santiago, Allende y Montemorelos con valores de entre 600 y 900 mm anuales, donde destacan especialmente zonas como la Sierra Cerro de la Silla y el cañón El Calabozo, los cuales están prácticamente inmersos en la zona metropolitana de Monterrey. De manera esporádica se presentan eventos tales como huracanes o tornados, mientras que heladas, granizadas y nevadas se restringen casi de manera exclusiva a la Sierra Madre Oriental y afectan zonas muy restringidas en esta zona (INEGI, 1986).

Hidrología

El Estado de Nuevo León presenta dos cuencas principales en lo que se refiere a la hidrología superficial, una localizada al Norte denominada Cuenca del Río Bravo y otra al sur también conocida como Cuenca del Golfo de México.

Entre los principales ríos del Estado se encuentran el Río Salado, Río Sabinas, Río San Juan, Río Pílon, Río Pesquería, Río Conchos, Río Blanco (INEGI, 1986).

Edafología

Debido a la naturaleza mayormente sedimentaria del Estado y a la predominancia de rocas como las calizas y lutitas, los suelos presentan una marcada tendencia arcillosa y calcárea, su principal forma de origen es la aluvial, es decir, por arrestare de materiales por agua. Se reconocen algunas zonas muy localizadas donde los suelos se han originado por intemperismo de rocas ígneas, como es el caso de la Sierra Picachos en los municipios de Sabinas Hidalgo y Agualeguas.

De acuerdo a la clasificación internacional, los suelos que predominan en Nuevo León, son los litosoles, presentes en gran medida en la Sierra Madre Oriental mezclado en ciertas zonas con rendzinas, por otra parte se presenta una mayor diversidad de suelos en la Planicie Costera del Golfo y el Altiplano Mexicano entre los que destacan los castañozem, los de desierto y semidesierto, grises o xerozem y suelos negros o chernozem (INEGI, 1986).

Vegetación

Bosque de Pino

La distribución de estos bosques puede ocurrir en lugares templados y húmedos, con el factor térmico decreciente a medida que se asciende en altitud; se ubica a partir de 900 y 1 000 msnm. Se trata de una comunidad con árboles hasta 22 m de alto. Se localizan en los municipios de Santa Catarina, Monterrey, San Pedro Garza García, Santiago, Montemorelos, Allende, Linares, Rayones, Iturbide, Galeana, Aramberri y Zaragoza; están asociados comúnmente con algunas especies de encinos *Quercus* spp. y madroño *Arbutus*.

Las especies de pinos características son pino ocote *Pinus teocote*, pino blanco *P. pseudostrobus*, pino real *P. arizonica*, pino ayacahuite *P. ayacahuite*, y pino negro *P. hartwegii*.

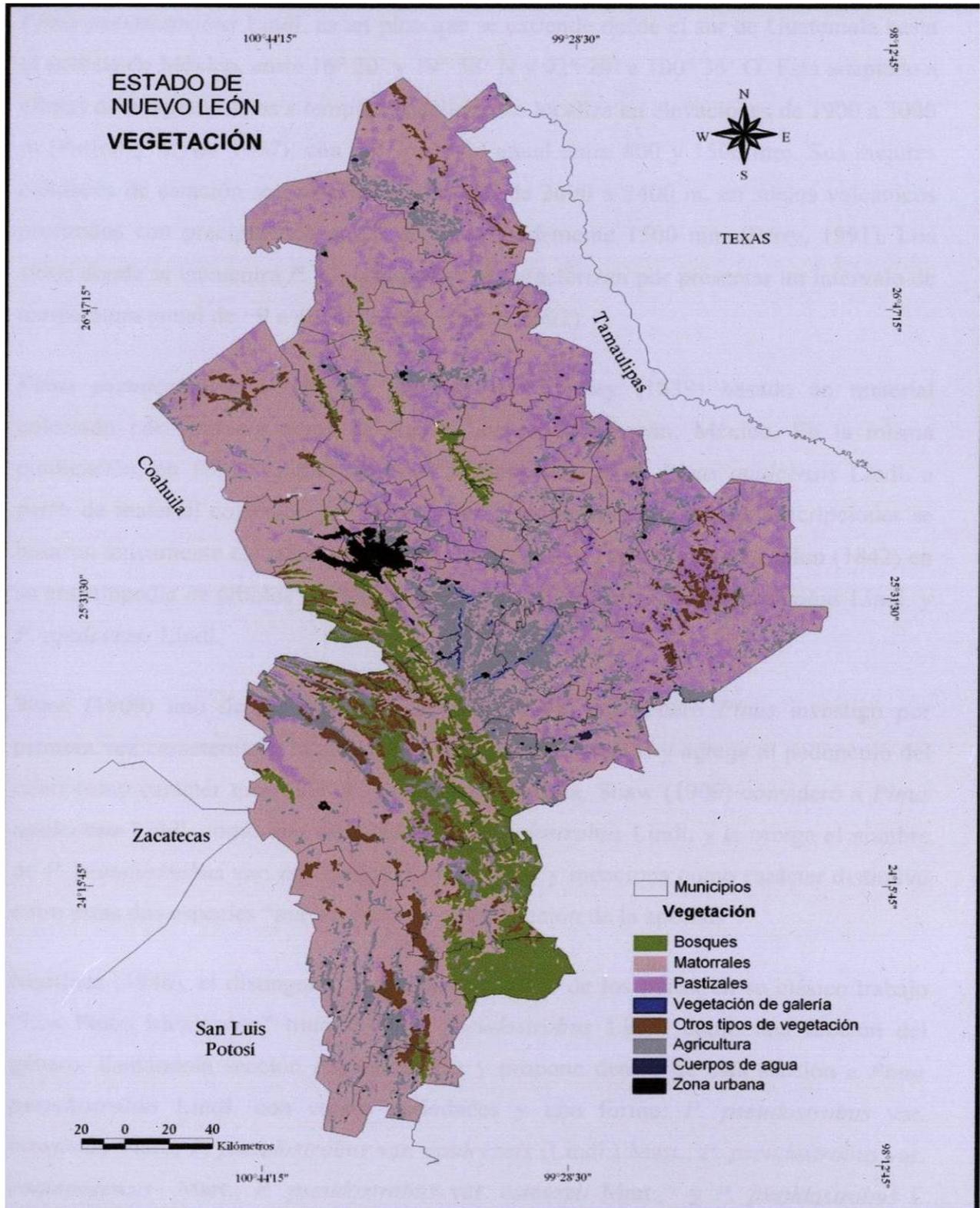
Bosque de Coníferas

Este tipo de vegetación está constituido por árboles altos de 15 a 25 m, que se localizan en cañones protegidos con climas fríos y húmedos, generalmente entre 2 000 a 2 500 msnm en los municipios de Galeana, Iturbide, Aramberri y Zaragoza. Las especies que sobresalen dominando en el dosel arbóreo son pino garabatillo *Pinus greggii* y pino negro *Pinus hartwegii* junto con el hayarín *Pseudotsuga rrenziesii* y *Pseudotsuga flahaulti*, el oyamel *Abies vejari*, y cedro blanco *Cupressus arizonica*.

Bosque de Pino - Encino

Esta unidad se integra por bosques de especies de hoja ancha y en agujas, sobre áreas templadas a subhúmedas en los municipios de Monterrey, Santiago, Allende, Montemorelos, Rayones, Iturbide, Linares, Aramberri, Zaragoza, García, San Pedro Garza García, Bustamante, Mina y Salinas Victoria. A pesar de la amplia gama de condiciones climáticas en la región, la presencia de este tipo de bosque obedece más al factor térmico que a la humedad. Este bosque se presenta entre una altitud de 550 a 900 m. Dominan principalmente los encinos entre los que destacan el encino de asta *Quercus rysophylla*, encino blanco *Quercus laeta*, el encino roble *Quercus polymorpha* y el encino duraznillo *Quercus canbyi* y conviviendo con los encinos se encuentran el pino colorado *Pinus teocote* y el pino blanco *Pinus pseudostrobus*. Los árboles en general no presentan grandes tallas en diámetro o en altura, siendo estas de 10 a 30 cm, y 10 a 14 m respectivamente.

Mapa 1. Mapa general de vegetación de Nuevo León. Tomado de Velazco (2009).



ANTECEDENTES

Historia taxonómica del complejo *Pseudostrobus*

Pinus pseudostrabus Lindl. es un pino que se extiende desde el sur de Guatemala hasta el noreste de México, entre 16° 20' y 19° 58' N y 92° 20' a 100° 35' O. Está adaptado a climas de templado-fríos a templados-cálidos; se localiza en elevaciones de 1900 a 3000 m (Farjon y Styles 1997), con precipitación anual entre 800 y 1500 mm. Sus mejores calidades de estación se presentan a altitudes de 2000 a 2400 m, en suelos volcánicos profundos con precipitación anual de aproximadamente 1500 mm (Perry, 1991). Los sitios donde se encuentra *P. pseudostrabus* se caracterizan por presentar un intervalo de temperatura anual de -9 a 40 °C (López-Upton, 2002).

Pinus pseudostrabus Lindl. fue descrito por Lindley (1839) basado en material colectado por Hartweg cerca de Anganguero en Michoacán, México. En la misma publicación, en 1839, Lindley describe también otro pino, *Pinus apulcensis* Lindl. a partir de material colectado por Hartweg en Apulco, Hidalgo; ambas descripciones se basaron únicamente en caracteres macro morfológicos. Posteriormente Ludon (1842) en su enciclopedia de árboles y arbustos acepto las dos especies *P. pseudostrabus* Lindl. y *P. apulcensis* Lindl.

Shaw (1909) uno de los más grandes monógrafos del género *Pinus* investigó por primera vez caracteres de la anatomía interna de las acículas y agrega el pedúnculo del cono como carácter morfológico. En esta monografía, Shaw (1909) consideró a *Pinus apulcensis* Lindl. como una variedad de *P. pseudostrabus* Lindl. y le otorga el nombre de *P. pseudostrabus* var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw y menciona como carácter distintivo entre estas dos especies “mayor o menor prolongación de la apófisis”.

Martínez (1948), el distinguido mexicano estudioso de los pinos, en su clásico trabajo “Los Pinos Mexicanos” trata a *Pinus pseudostrabus* Lindl. como una sección del género, llamándola sección *Pseudostrobus* y propone dentro de esta sección a *Pinus pseudostrabus* Lindl. con cuatro variedades y una forma: *P. pseudostrabus* var. *oaxacana* Mart., *P. pseudostrabus* var. *apulcensis* (Lindl.) Mart., *P. pseudostrabus* var. *coatepecensis* Mart., *P. pseudostrabus* var. *estevezii* Mart., y *P. pseudostrabus* f. *protuberans* Mart.

Martínez (1948) trata a *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw como sinonimia de *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* Mart. y le da el rango de variedad a *P. apulcensis* Lindley quedando como *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Lindl.) Mart. aclarando que en las descripciones de Shaw (1909) se menciona un pico encorvado que se observa en los ejemplares de Apulco, Hidalgo localidad tipo de *P. apulcensis* Lindl. pero no una prolongación de la apófisis tan característica como se observa en la variedad descrita por Martínez (1948) *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* Mart. colectado mas al sur en Veracruz y Oaxaca y que Shaw (1909) había mencionado como carácter distintivo. Loudon (1842) presentó un dibujo del espécimen *P. apulcensis* Lindl. el cual tiende a confirmar que las escamas tienen un pico encorvado más que un prolongación de la apófisis lo cual va más de acuerdo con las descripciones y diferencias de los taxa reportados por Martínez (1948).

Loock (1950, 1977) después de un trabajo de campo extensivo publicó "Pines of Mexico and British Honduras". Aceptó los taxa propuestos por Martínez (1948) pero agrega una nueva forma, *Pinus pseudostrobus* forma *megacarpa* Loock, encontrada solo en un área restringida en Michoacán, México El carácter morfológico en el que se basó para describir esta forma fue el tamaño del cono mencionando que era mas grande de lo usual, de 13 a 20 cm. de largo, oblicuo y curvado.

Mirov (1958), quien basa su propuesta en estudios de la composición química de las especies de pinos propone elevar a *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* Mart. a rango de especie.

Gausson (1960) en su trabajo extensivo de gimnospermas "Les gymnospermes actuelles et fossiles" reincorporó el tan discutido *Pinus apulcensis* Lindl. y elevó a rango de especie a *P. pseudostrobus* var. *coatepecensis* Mart. y a *P. pseudostrobus* var. *estevezii* Mart.

Stead y Styles (1984) realizaron un estudio fenético de la variación del grupo *Pseudostrobus* a lo largo de su amplio rango de distribución en México y Centro América y proponen a *Pinus pseudostrobus* Lindl. con 2 taxas infraespecíficas *P. pseudostrobus* subsp. *apulcensis* (Lindl.) Stead y *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* (Mirov) Harrison.

Perry (1991) en su libro “Pines of Mexico and Central América” en el cual realizó un extenso trabajo de campo acepta todos los taxa reconocidos por Martínez (1948) y menciona que dadas las tan marcadas diferencias que existen entre los conos y además de la composición química de resinas de las especies del grupo, eleva a rango de especie a *P. pseudostrobus* var. *estevezii* Mart. y a *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* Mart. quedando estos como *P. estevezii* (Mart.) Perry y *P. oaxacana* Mirov respectivamente. Al igual que Loock (1950), acepta a *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* Loock.

Farjon y Styles (1997) en su monografía Flora Neotropica, mencionan que *Pinus pseudostrobus* Lindl. es un taxón muy variable y aceptan dentro del complejo *Pseudostrobus* únicamente a *P. pseudostrobus* Lindl. con dos variedades: *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw y *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* Lindl., esta última con dos formas, *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* f. *pseudostrobus* Lindl. y *P. pseudostrobus* var. *pseudostrobus* f. *protuberans* Mart. rezagando a los demás taxa descritos hasta la fecha como sinonimias.

La historia taxonómica y extensa literatura sobre la clasificación del género *Pinus* ha sido revisada por Price *et al.* (1998). En esta revisión se acepta a *Pinus pseudostrobus* Lindl., *P. pseudostrobus* var. *estevezii* Mart. y a *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Lindl.) Shaw junto con otras especies dentro del grupo *Pseudostrobus* (*P. douglasiana* Mart., *P. maximinoi* Moore y *P. nubicola* Perry).

Como lo reflejan las controversias taxonómicas del grupo, *Pinus pseudostrobus* Lindl. es un taxón muy variable y ampliamente distribuido en los cuales la diversidad genética aparentemente indica relaciones complejas entre las poblaciones (Stead y Styles, 1984; Carvajal y McVaugh, 1992). Estudios morfométricos y químicos han propuesto clasificaciones diferentes. Nueva evidencia, preferentemente basada en datos moleculares, podrían mostrar la existencia de caracteres distintivos, taxonómicamente significantes (Farjon y Styles, 1997).

Sistemática del género *Pinus* y estudios filogenéticos basados en secuencias de ADN.

Debido a su importancia económica ya que constituyen una de las principales materias primas maderables, la clasificación del género *Pinus* ha recibido atención desde diversos y muy variados puntos de vista como morfología, análisis kariotípico, formación de híbridos, metabolitos secundarios, isoenzimas y estudios moleculares (Price *et al.*, 1998). A pesar del gran número de caracteres que se han utilizado a través del tiempo para clasificar el género *Pinus*, los niveles altos de homoplasia (cambio evolutivo compartido pero no adquirido de un ancestro en común) en muchos caracteres morfológicos (Gernandt *et al.*, 2005) y su naturaleza plesiomorfica (ancestral) han contribuido a proponer diversos esquemas de clasificación (Gaeda *et al.*, 2002). Es por esto, que un análisis filogenético estable en el género *Pinus* se ha dificultado por la pequeña cantidad de caracteres distintivos, los cuales son escasos en el género comparado con otros grupos de plantas (Farjon y Styles, 1997).

Numerosas propuestas para clasificación de los pinos se han venido dando desde tiempo atrás (Shaw, 1914; Mirov, 1967; Little y Critchfield, 1969; Styles, 1993; Farjon y Styles, 1997; Price *et al.*, 1998). La clasificación infragenérica propuesta por Little y Critchfield (1969) es en nuestros días la más aceptada por estudiantes del grupo. Esta se basó tanto en diferencias morfológicas como en experimentos de entrecruzamiento e hibridación realizados por Duffield (1952). Little y Critchfield (1969) subdividen el Género *Pinus* en 3 subgéneros, 5 secciones, 15 subsecciones y 94 especies. Distintos datos informativos y técnicas se han utilizado para conocer las relaciones filogenéticas entre las especies, secciones y subsecciones en las cuales está dividido el género *Pinus*, entre ellas se encuentran análisis cladistas la comparación de perfiles de restricción RFLP (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995; Favela, 2005) así como RAPDs (Favela, 2005; Castro *et al.*, 2008), por último, la técnica más utilizada para hacer inferencias filogenéticas con herramientas moleculares ha sido la secuenciación de regiones del ADN nuclear (nDNA) y principalmente del cloroplasto (cpDNA).

Debido al impulso que ha tenido la genómica y la secuenciación de genomas completos de cloroplasto y del núcleo de especies de plantas de diversos grupos, se han diseñado cebadores universales que amplifican regiones tanto de cloroplasto como de núcleo en

diferentes grupos de plantas, permitiendo que el número de trabajos filogenéticos a partir de estas secuencias aumente rápidamente (Clegg y Zurawski, 1991).

El ADN del cloroplasto es una valiosa molécula para el estudio de relaciones filogenéticas entre especies de plantas a diferentes niveles taxonómicos (Palmer, 1988; Clegg y Zurawski, 1991). Debido a su herencia uniparental y la ausencia de recombinación, se ha descrito como una molécula idónea capaz de dar información acerca de los procesos de divergencia entre especies de plantas y a pesar de su modo conservado de evolución, numerosos casos de variación intraespecífica han sido reportados (Soltis, 1991).

El análisis del ADN del cloroplasto se ha utilizado extensivamente en los últimos años para determinar relaciones filogenéticas de diferentes grupos de plantas, entre estas los pinos (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999, 2000; Liston *et al.*, 1999, 2003; Gaeda *et al.*, 2002; Zhang y Li, 2004; Gernandt *et al.*, 2001, 2003, 2005; Favela, 2005; Syring *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2008; Willyard *et al.*, 2009) Unas de las regiones codificantes (que codifican un RNAm que después de traduce en proteína) más utilizadas en plantas han sido las regiones del cloroplasto *matK* y *rbcL*. Sin embargo, se ha determinado que la región *matK* evoluciona más rápido que *rbcL*, haciéndola de gran utilidad en estudios filogenéticos en los que se involucren especies cercanas utilizando ADN del cloroplasto (Wang *et al.*, 1999). Por otro lado, regiones no codificantes del cloroplasto también han sido descritas como regiones con una alta tasa de mutación, capaces de dar información útil para realizar inferencias filogenéticas de especies muy cercanas o que tengan una divergencia reciente (Gielly y Taberlet, 1994). Así, una gran cantidad de estudios a nivel molecular se han realizado para determinar las relaciones filogenéticas de diferentes especies, secciones y subsecciones del género *Pinus* a partir de la información contenida en dichas secuencias de ADN.

A diferencia de otros géneros de coníferas, la región de mayor diversidad de especies del género *Pinus* está situada a lo largo del margen este de América del Norte con una concentración de 43 especies y 10 taxa infraespecíficos en México (Farjon y Styles, 1995). Esta región es tanto lugar de especies paleoendémicas que representan linajes muy antiguos pertenecientes al mesozoico, así como de especies que representan linajes de evolución y especiación reciente. En ambos casos se presentan problemas taxonómicos y a pesar los esfuerzos por la sistemática del grupo desde Shaw (1909)

hasta Price *et al.* (1998) algunas preguntas aun continúan y requieren nuevas investigaciones (Castro *et al.*, 2008).

Estudios taxonómicos en los pinos mexicanos se han basado principalmente en caracteres morfológicos y parcialmente en caracteres moleculares. Sin embargo, sutiles diferencias morfológicas y la falta de resolución que a veces proveen los datos moleculares frecuentemente conducen a controversias taxonómicas (Castro *et al.*, 2008). En cuanto a los trabajos de filogenias moleculares de pinos mexicanos, se encuentran algunos en los cuales se han incluido parcialmente especies mexicanas en el estudio (Liston *et al.*, 1999, 2002; Gaeda *et al.*, 2002) y otros en los cuales incluyen en su mayoría especies mexicanas (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995; Genandt *et al.*, 2003; Favela, 2005; Castro *et al.*, 2008).

Pérez de la Rosa *et al.* (1995) estudiaron las relaciones filogenéticas de 12 especies de pinos mexicanos revisando perfiles de restricción de 3 regiones no codificantes del ADN del cloroplasto (trnT-trnL, trnL-trnF, intron TrnL), en su estudio se obtuvo un árbol que clarifica una separación de las especies del subgénero *Strobus* y del subgénero *Pinus*, internamente la subsección *Ponderosae* (representada en el estudio por las especies *Pinus pseudostrobus*, *Pinus devoniana*, *Pinus patula* y *Pinus hartwegii*) aparece monofilética también pero con politomías en sus partes terminales, por otro lado el clado del subgénero *Strobus* es pobremente resuelto. Pérez de la Rosa *et al.* (1995) sugieren la secuenciación de estas regiones para obtener un número mayor de caracteres y así poder obtener una mejor resolución de las relaciones filogenéticas de estas especies.

Liston *et al.* (1999) analizaron regiones de ADN nuclear ITS utilizando 47 especies de pinos representando todas las reconocidas subsecciones del género *Pinus* incluidas las 3 subsecciones en su mayoría endémicas de México (*Ponderosae*, *Oocarpae* y *Cembroides*). Al igual que en el estudio de Krupkin *et al.* (1996) su análisis basado en secuencias nucleares ITS apoya fuertemente la noción de un grupo distintivo de los pinos de América del Norte con un alto valor bootstrap (97%) y otro clado con un valor más bajo (71%) para las especies eurasiáticas dentro del subgénero *Pinus*. Dentro del clado de Norteamérica la subsección *Ponderosae* apareció monofilética con un valor bootstrap alto (99%) pero con sus nodos internos con politomías en su mayoría.

Gernandt *et al.* (2003) estudiaron las relaciones filogenéticas de la subsección *Cembroides* y *Nelsoniae* utilizando 2 regiones codificantes de cpDNA (*matK*, *rbcL*) y una región no codificante (*rpl16*). Su estudio soportó la monofilia de ambas subsecciones e infirió que la sección *Parrya* es parafilética proponiendo un nuevo reacomodo de las subsecciones dejando en esta sección solamente a las subsecciones de América del Norte (*Cembroides*, *Balfourianae* y *Nelsoniae*). Sin embargo, no todas las especies dentro de la subsección *Cembroides* resultaron resueltas ya que varias de ellas colapsan en politomías y las que son resueltas como especies hermanas la mayoría revela valores bootstrap bajos.

Favela (2005) estudió las relaciones filogenéticas de las subsección *Cembroides* y de la especie relicta *Pinus nelsonii* utilizando 4 regiones del ADN del cloroplasto (*matK*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *TrnS-trnFm*) y 3 exones del gen nuclear *NEEDLY*. Su trabajo apoya que la subsección *Cembroides* es parafilética y propone que la especie relicta *Pinus nelsonii* se agrupe en una subsección monotípica *Nelsoniae*, también propone a *Pinus pinceana* como un hermano de la subsección *Cembroides*. Además, concluye que *Pinus catarinae* es una sinonimia de *Pinus remota* así como *Pinus johannis* lo es de *Pinus cembroides* var. *bicolor* debido a la similitud de sus estructuras genéticas poblacionales inferidas mediante RAPDs. Dentro del clado monofilético en donde se encuentran la mayoría de las especies de la subsección *Cembroides*, a pesar de la cantidad de información analizada (2856 pb), los clados son pobremente resueltos con politomías en sus partes terminales.

Gernandt *et al.* (2005) utilizaron secuencias de cpDNA de las regiones codificantes *matK* y *rbcL* para inferir las relaciones filogenéticas de 101 de las aproximadamente 111 especies del género *Pinus*, a diferencia de trabajos anteriores las regiones que se secuenciaron fueron más grandes conteniendo más información para hacer las inferencias. Al nivel de subsección y más internamente el árbol filogenético es congruente con las filogenias basadas en DNA nuclear. El árbol estricto consenso construido con *matK* y *rbcL* concatenados resultó en una politomía de 11 especies y otra de tres especies para las 14 especies pertenecientes a la subsección *Ponderosae* en la cual se incluyó un espécimen de *Pinus pseudostrobus* Lindl. colectado en Hidalgo, México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de Material Botánico:

Se realizaron 9 salidas de campo en el área de distribución del complejo *Pseudostrobus* en el Estado de Nuevo León. A través de este rango, se colectaron un total de 55 individuos (Tabla 1 y Mapa 2).

En cada una de las localidades se colectó material botánico, específicamente colecta de conos y ramas, además se tomaron datos del árbol como altura total del árbol, disposición de las ramas, color del follaje, floración y fructificación, forma y color de la corteza, también asociaciones de especies con las que se encontraban y la altitud. La mayoría de los ejemplares colectados en campo fueron georreferenciados y se tomaron fotografías de cada uno de ellos.

De cada uno de los individuos, además se colectaron 5 acículas las cuales se almacenaron en bolsas de plástico que contenían 10 gr de sílica gel, material que posteriormente se procesó en el laboratorio para la extracción de ADN genómico.

Herborización e identificación.

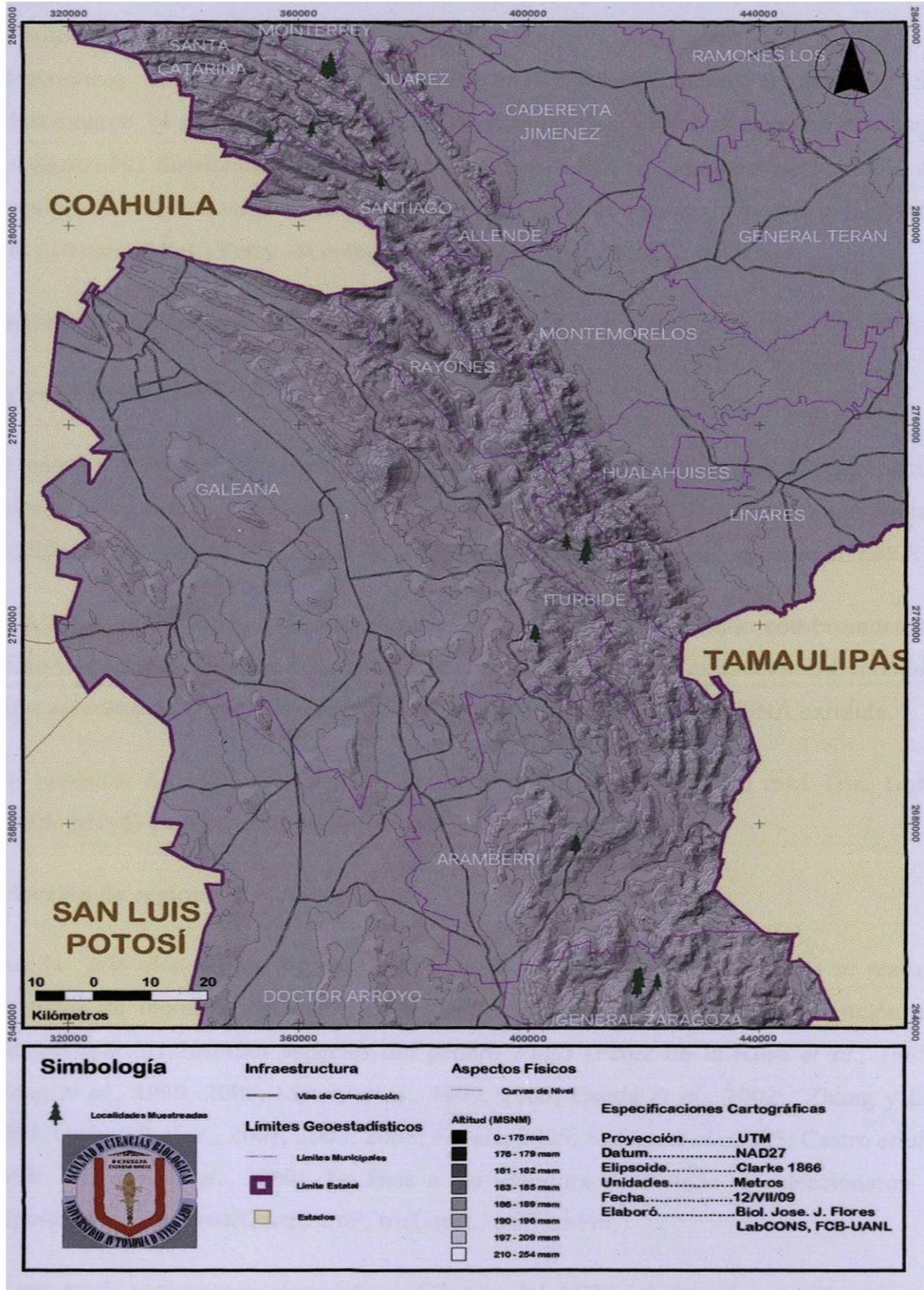
Las muestras vegetativas una vez tratadas para su posterior herborización se trasladaron a las instalaciones del Departamento de Ecología de la F.C.B., U.A.N.L., en donde se tomaron las mediciones y análisis correspondientes para su posterior identificación en base a claves taxonómicas botánicas especializadas. La identificación taxonómica de los ejemplares se llevó a cabo utilizando las claves botánicas de Perry (1991), y tomando en cuenta sus criterios de clasificación como arreglo taxonómico de los taxa incluidos en el del presente estudio. Por otro lado, diversas claves taxonómicas de otros especialistas (Martínez, 1949; Farjon y Styles, 1997) se utilizaron para discutir los diferentes arreglos taxonómicos propuestos y la variación morfológica del grupo.

Tabla 1. Sitios de colecta y ejemplares colectados en las diferentes salidas de campo en el Estado de Nuevo León.

| Localidad | Clave de muestra | Longitud este (UTM) | Latitud norte (UTM) | Altura (m) |
|------------------------|------------------|---------------------|---------------------|------------|
| Iturbide | 1.1 | 41°01'99" | 273°35'43" | 1405.8 |
| Iturbide | 1.2 | 41°02'85" | 273°49'76" | 1426.5 |
| Iturbide | 1.3 | 41°03'04" | 273°49'38" | 1449.8 |
| Iturbide | 1.4 | 41°02'65" | 273°49'44" | 1445.3 |
| Iturbide | 1.5 | 41°01'95" | 273°54'45" | 1391.9 |
| Iturbide | 1.6 | 40°67'01" | 273°62'85" | 1550.7 |
| Iturbide | 1.7 | 40°66'94" | 273°62'74" | 1552.3 |
| Santa Rosa, Iturbide | 1.8 | 40°66'86" | 273°62'68" | 1560.7 |
| Santa Rosa, Iturbide | 1.9 | 40°97'23" | 273°36'19" | 1549.5 |
| Santa Rosa, Iturbide | 1.10 | 40°98'36" | 273°35'24" | 1553.6 |
| Santa Rosa, Iturbide | 1.11 | 41°01'53" | 273°35'80" | 1573.8 |
| Santa Rosa, Iturbide | 1.12 | 40°98'69" | 273°35'22" | 1554.1 |
| | | | | |
| Pabllillo, Galeana | 2.1 | 40°12'81" | 271°80'52" | 2315.4 |
| Pabllillo, Galeana | 2.2 | 40°12'47" | 271°80'86" | 2333.5 |
| Pabllillo, Galeana | 2.3 | 40°12'47" | 271°80'79" | 2313.3 |
| Pabllillo, Galeana | 2.4 | 40°12'85" | 271°80'45" | 2249.6 |
| Pabllillo, Galeana | 2.5 | 40°14'21" | 271°79'41" | 2305.1 |
| Pabllillo, Galeana | 2.6 | 40°12'08" | 271°83'51" | 2291.9 |
| Pabllillo, Galeana | 2.7 | 40°14'14" | 271°79'29" | 2303.9 |
| | | | | |
| La Encantada, Zaragoza | 3.1 | 41°90'09" | 264°67'22" | 2200.4 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.2 | 41°90'09" | 264°66'52" | 2176.3 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.3 | 41°94'86" | 264°81'87" | 1981.9 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.4 | 41°95'62" | 264°80'32" | 2003.0 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.5 | 41°91'42" | 264°70'89" | 2180.4 |
| | | | | |
| La Encantada, Zaragoza | 3.6 | 41°94'33" | 264°82'31" | 1944.1 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.7 | 41°92'83" | 264°88'13" | 1849.2 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.8 | 41°93'04" | 264°88'66" | 1824.0 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.9 | 41°92'16" | 264°88'90" | 1823.3 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.10 | 41°89'74" | 264°89'13" | 1798.0 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.11 | 41°88'90" | 264°90'26" | 1773.7 |
| La Encantada, Zaragoza | 3.12 | 41°95'26" | 264°94'51" | 1671.4 |
| | | | | |
| El Salto, Zaragoza | 3.13 | 42°24'54" | 264°81'59" | 1623.8 |
| El Salto, Zaragoza | 3.14 | 42°24'61" | 264°81'70" | 1647.3 |
| | | | | |
| Las Norias, Aramberri | 3.15 | 40°84'19" | 267°58'24" | 1966.7 |
| | | | | |
| Las Norias, Aramberri | 3.16 | 40°84'06" | 267°57'86" | 1958.5 |
| Las Norias, Aramberri | 3.17 | 40°83'04" | 267°56'74" | 1953.5 |
| Las Norias, Aramberri | 3.18 | 40°81'98" | 267°54'51" | 1966.2 |
| Las Norias, Aramberri | 3.19 | 40°82'27" | 267°53'48" | 1970.6 |

| | | | | |
|-----------------------|------|-----------|------------|--------|
| Las Norias, Aramberri | 3.20 | 40°85'18" | 267°58'52" | 1925.2 |
| Agua Fría, Santiago | 4.1 | 36°28'81" | 279°98'56" | 1522.4 |
| La Ciénega, Santiago | 4.2 | 37°42'71" | 280°86'66" | 1349.8 |
| Santa Catarina | 5.1 | 35°52'07" | 281°73'85" | 1686.7 |
| Santa Catarina | 5.2 | 36°24'02" | 281°92'55" | 1264.5 |
| Chipinque | 6.1 | 36°51'78" | 283°11'97" | 1839.8 |
| Chipinque | 6.2 | 36°51'29" | 283°11'11" | 1700.2 |
| Chipinque | 6.3 | 36°50'31" | 283°11'24" | 2029.4 |
| Chipinque | 6.4 | 36°51'59" | 283°11'42" | 1971.3 |
| Chipinque | 6.5 | 36°51'22" | 283°11'42" | 1922.8 |
| Chipinque | 6.6 | 36°51'14" | 283°11'44" | 1860.9 |
| Chipinque | 6.7 | 36°51'43" | 283°11'04" | 1346.5 |
| Chipinque | 6.8 | 36°51'40" | 283°11'05" | 1350.6 |
| Chipinque | 6.9 | 36°50'78" | 283°11'17" | 1315.5 |
| Chipinque | 6.10 | 36°51'12" | 283°11'19" | 1316.1 |
| Chipinque | 6.11 | 36°50'67" | 283°10'11" | 1314.2 |

Mapa 2. Puntos de colecta de las salidas a campo.



Selección de individuos para el análisis filogenético.

El criterio que se utilizó para la selección de los individuos a someter en los análisis filogenéticos fue basado principalmente en la identificación taxonómica. Se seleccionaron 14 ejemplares que representaron tanto los diferentes taxa del complejo *Pseudostrobus* distribuidos en el Estado de Nuevo León (*P. pseudostrobus* Lindl., *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* Loock, *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (Lindl.) Mart. y *P. estevezii* (Mart.) Perry así como las diferentes localidades de colecta.

Trabajo de laboratorio

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de .05 gramos de las acículas de cada uno de los 55 ejemplares colectados siguiendo el método CTAB propuesto por Doyle y Doyle (1987) con ligeras modificaciones para extracción de ADN en pinos propuestas por Palomera *et al.* (2008).

El ADN extraído fue visualizado en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV, esto con el fin de observar si la extracción había tenido éxito así como determinar indirectamente la cantidad y la calidad del DNA extraído.

Las muestras de ADN fueron almacenadas a 4°C en buffer TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8) para permitir su conservación y posterior utilización.

Selección de regiones del cloroplasto.

Para la selección de las regiones utilizadas para los análisis filogenéticos se realizó búsqueda de literatura de análisis filogenéticos en plantas con especial atención en trabajos que involucraran especies del género *Pinus* (Pérez de la Rosa *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999, 2000; Liston *et al.*, 1999, 2003; Gaeda *et al.*, 2002; Zhang y Li, 2004; Gernandt *et al.*, 2001, 2003, 2005; Favela, 2005; Syring *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2008; Willyard *et al.*, 2009). En base a la literatura consultada se seleccionaron 4 regiones a utilizar: matK, trnL-trnF, trnT-trnL, trnS-trnFm.

El gen matK pertenece a una región codificante del ADN del cloroplasto utilizada muy ampliamente en estudios filogenéticos de plantas y que ha mostrado una tasa de

mutación alta a pesar de ser una región codificante (Xiang *et al.*, 1993). Por otro lado, las tres regiones intergénicas (trnL-trnF, trnT-trnL, trnS-trnFm) restantes, son regiones no codificantes del ADN del cloroplasto las cuales se ha propuesto como ideales para el estudio de relaciones filogenéticas entre especies cercanamente relacionadas debido a tener tasas de mutación altas (Wang *et al.*, 1999), característica que permite obtener de ellas información a cerca de divergencias recientes.

Amplificación

Para amplificar las regiones seleccionadas (Tabla 2) se utilizaron cebadores universales propuestos por Talabert (1991), diseñados para amplificar regiones no codificantes de ADN del cloroplasto de diferentes grupos de plantas, esto para las regiones trnL-trnF, trnS-trnFm, trnT-trnL. En cuanto a la región codificante matK, la secuencia de los cebadores fue determinada utilizando el software Fast PCR a partir de una secuencia del banco de genes del NCBI (número de acceso AY497268) de *Pinus pseudostrobus* Lindl. colectado en Hidalgo, México.

Tabla 2. Tabla con las secuencias de los cebadores universales, temperaturas de alineación, tiempos de extensión y tamaño de la región que amplifican.

| Nombre del cebador | Secuencia | Temperatura de alineación | Tiempo de extensión | Tamaño del producto |
|--------------------|------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| trnL-trnF F | CGAAATCGGTAGACGCTACG | 56°C | 1min 30 seg. | 895pb |
| trnL-trnF R | ATTTGAAGTGGTGACACGAG | 56°C | 1 min. 30 seg. | 895pb |
| trnT-trnL F | CATTACAAATGCGATGCTCT | 56°C | 50 seg | 443pb |
| trnT-trnL R | TCTACCGATTTGCCATATC | 56°C | 50 seg | 443pb |
| trnS-trnFm F | GAGAGAGAGGGATTCGAACC | 62°C | 1min 30 seg | 915pb |
| trnS-trnFm R | CATAACCTTGAGGTCACGGG | 62°C | 1 min 30 seg | 915pb |
| matK F | TTCGTCGCTGGATCCGAGATGC | 56°C | 2 min | 1054pb |
| matK R | ATTTGAAGTGGTGACACGAG | 56°C | 2 min | 1054pb |

Utilizando el ADN extraído como templado, se amplificaron secuencias blanco correspondientes a las regiones del ADN del cloroplasto previamente seleccionadas de las 14 muestras elegidas para los análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN.

Las condiciones de PCR fueron: buffer 1x, 2.5 mM de MgCl₂, dNTPs 800uM, cebador forward .5mM, cebador reverse .5mM, ½ unidad de taq polimerasa, 500ng de ADN como templado en una reacción final de 37.5 ul. Las condiciones del termociclador fueron: 1 ciclo: 94°C 5 minutos, 30 ciclos: 94°C 50 segundos, 55-62°C 50 segundos (dependiendo del primer), 72°C 50seg-2minutos (dependiendo del tamaño del producto esperado), 1 ciclo: 72°C 10 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% con un ladder de 2Kb para verificar que se trataba del producto deseado y comprobar que no había productos inespecíficos, así como determinar indirectamente la calidad y cantidad de los productos amplificados.

Secuenciación de productos de PCR.

Para realizar la secuenciación, los productos de PCR se enviaron a la compañía Macrogen, USA la cual ofrece comercialmente el servicio de secuenciación de ADN. Para garantizar el éxito de la secuenciación, los productos se enviaron con las especificaciones que solicita la compañía.

Los resultados de la secuenciación fueron visualizadas con el software CHROMAS para conocer la calidad y fiabilidad de la secuenciación y solo se eligieron las partes de cada reacción de secuenciación que tuvieran picos individuales y confiables. Gracias a que se realizaron dos reacciones de secuenciación por cada reacción (Forward y Reverse) se pudieron obtener el total de bases esperado con una lectura clara y confiable.

Análisis filogenético basado en secuencias del ADN del cloroplasto.

Selección de grupo externo

Se seleccionó a *Pinus nelsonii* como grupo externo debido a ser un pino ajeno al grupo interno en estudio y también debido a que se contaban con las secuencias de las mismas regiones analizadas en los taxa de este estudio. Las secuencias de las regiones trnL-trnF,

trnT-trnL, trnS-trnFm fueron tomadas del estudio de Favela (2005) mientras que la secuencia de matK de *Pinus nelsonii* fue obtenida del banco de genes del NCBI (numero de acceso: AY313933).

Alineación y concatenación de secuencias de ADN

Las secuencias se alinearon con el programa ClustalX (Thompson *et al.* 1997) y fueron corregidas manualmente. Cuando se encontraba un punto de mutación, éste se verificó con el programa CHROMAS para comprobar si efectivamente se trataba de una mutación y no de un posible error de lectura entre los picos de secuenciación ó a una baja calidad en la secuenciación. Una vez verificadas y corregidas las secuencias, estas se concatenaron con el software CLC Sequence Viewer uniéndolas en el siguiente orden: matK, trnL-trnF, trnS-trnFm, trnT-trnL.

Se realizó una prueba de homogeneidad utilizando el software PAUP versión 4 (Swofford, 2002) para comprobar que las secuencias presentaban homogeneidad y que no había diferencias significativas entre ellas para poder ser utilizadas como un conjunto de datos concatenados y a partir de esa matriz de datos realizar la inferencia de los árboles filogenéticos.

Criterios para la inferencia de los árboles filogenéticos

Se realizó la inferencia de árboles filogenéticos basados en 3 distintos criterios: neighbor-joining, máxima parsimonia y máxima verosimilitud, los cuales se explica a continuación:

Neighbor-joining. Este algoritmo es un método de distancias el cual crea arboles basados en distancias entre la información analizada de los taxa, es decir comparando el nivel de similitud general entre la información de los diferentes OTUs y colapsando la información de cada caracter en una única medida de distancia. Los arboles basados en este algoritmo se infirieron utilizando el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Máxima parsimonia. El criterio de máxima parsimonia (MP) analiza la comparación de cada carácter para determinar de estos cuales son informativos bajo el principio de parsimonia y así, define arboles con topologías que requieran el mínimo numero de

cambio de caracteres produciendo el o los árboles más parsimoniosos que reflejen la filogenia de los OTUs. De estos árboles, se calcularon con el software PAUP versión 4 (Swofford, 2003) los estadísticos descriptivos de los caracteres en cada árbol: longitud del árbol, índice de consistencia (IC), índice de homoplasia (IH), índice de consistencia reescalado, índice de homoplasia reescalado e índice de retención reescalado (RC), esto con el objetivo de conocer el grado de homoplasia de los caracteres analizados. Además, de los árboles más parsimoniosos se hizo el cómputo de un árbol estricto consenso y del árbol majority rule.

Máxima verosimilitud (Maximum likelihood). Este método probabilístico de inferencia busca el árbol que maximiza la probabilidad de observar los datos informativos basado en un modelo estadístico evolutivo. La inferencia del modelo evolutivo que mejor representaba los datos se realizó con el software MODELTEST (Posada y Candrall, 1998) y la inferencia de los árboles filogenéticos basados en el modelo que mejor representó los datos se realizó con el software PAUP versión 4 (Swofford, 2002) utilizando una búsqueda heurística.

Índices de confiabilidad estadísticos de los árboles filogenéticos.

Para evaluar la confiabilidad de las filogenias inferidas se utilizó el análisis de remuestreo bootstrap el cual es un método estadístico que remuestra los datos de las variables analizadas creando replicas nuevas, las cuales son analizadas y determinan si los nuevos resultados inferidos son iguales o diferentes al muestreo original y el porcentaje de ocasiones en las cuales el remuestreo refleja los datos originales produciendo así, un índice porcentual de confiabilidad de los datos. En este estudio se utilizó el análisis bootstrap para medir la confiabilidad de los clados de los árboles filogenéticos inferidos bajo los tres criterios arriba descritos utilizando un remuestreo de 1000 replicas.

Interpretación de árboles filogenéticos.

Los árboles filogenéticos obtenidos se interpretaron y discutieron con datos paleontológicos, ecológicos, genéticos, taxonómicos y filogenéticos realizados con miembros del complejo *Pseudostrobus* y también con otros estudios en los cuales se incluyeran grupos de especies del género *Pinus* conocidos como “complejos” (Pérez de

la Rosa *et al.*, 1995; Favela, 2005; Gernandt *et al.*; 2003, 2005) así como con la misma variación morfológica encontrada en la identificación de los taxa del presente trabajo.

RESULTADOS

Identificación taxonómica

Fotografías de los ejemplares identificados y la variación morfológica encontrada en el estudio:



Foto 1. Un ejemplo de la variación en los conos encontrada en los ejemplares colectados en las diferentes localidades de Nuevo León del presente estudio.

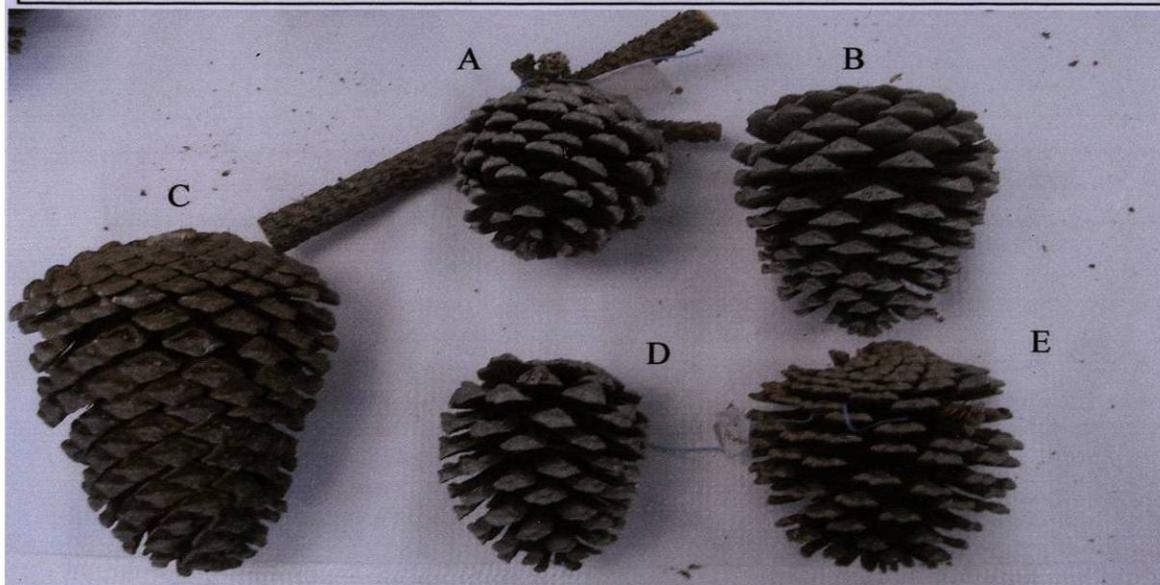


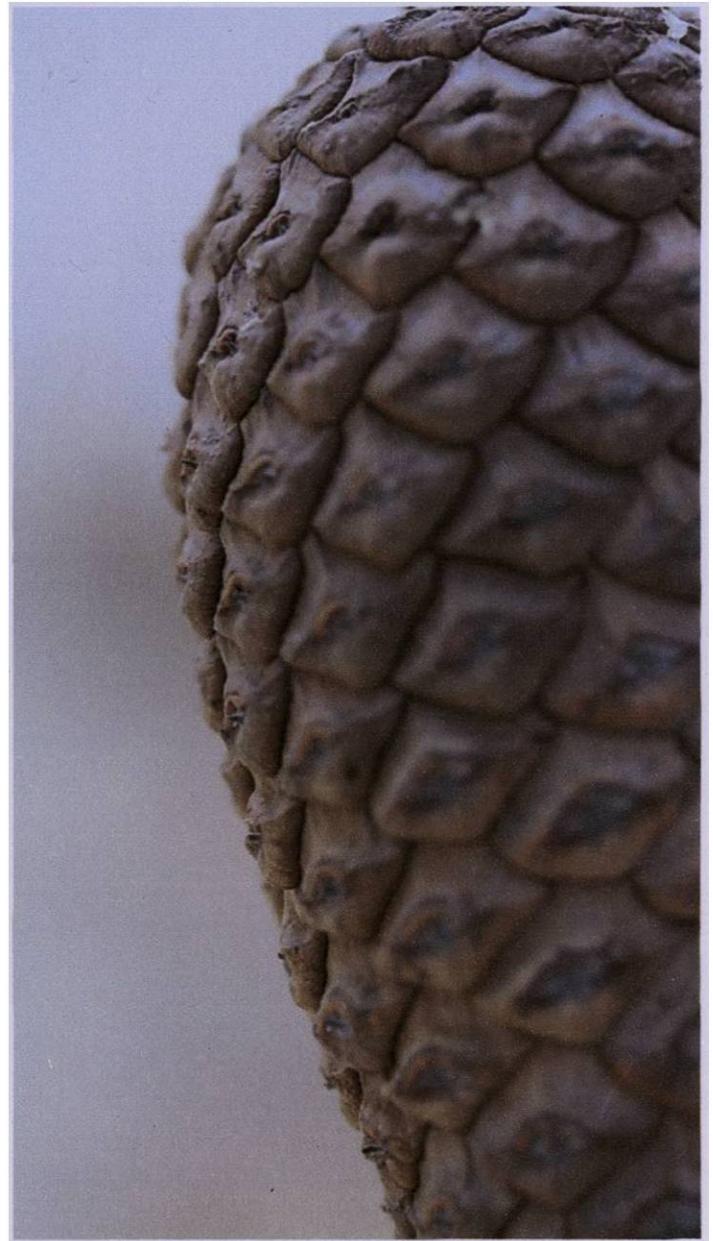
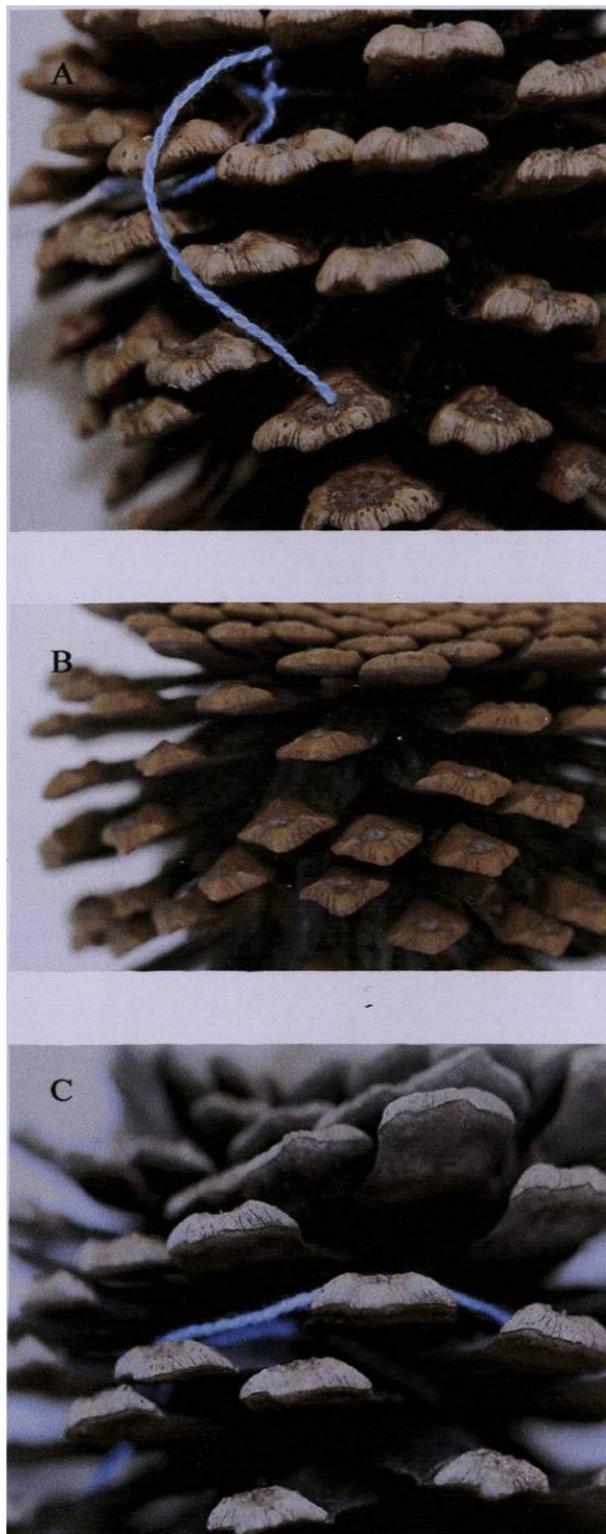
Foto 2. Conos de las diferentes especies del complejo *Pseudostrobus* colectadas en el Estado de Nuevo León.

En la foto: **A.** *Pinus estevezii* (Mart.) Perry (muestra 3.20) de La Encantada, Zaragoza. **B.** *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* Mart. (muestra 4.2) de La Ciénega, Santiago. **C.** *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* Loock (muestra 3.19) de Las Norias, Aramberri. **D.** *P. pseudostrobus* forma *protuberans* Mart. (muestra 1.7) de Iturbide. **E.** *P. pseudostrobus* Lindl. (muestra 1.6) colectado en Iturbide.

Pinus pseudostrobus Lindl.



Foto 3. Variación de los conos de *Pinus pseudostrobus* Lindl.



D

Foto 4. Escamas típicas de *Pinus pseudostrobus* Lindl., delgadas y sueves con apófisis y umbos planos con espinas débiles y pronto caedizas. A la derecha se muestra un cono inmaduro mostrando los caracteres de las escamas desde esa etapa de su desarrollo. En la foto: **A.** *P. pseudostrobus* (muestra 1.6) de Iturbide. **B.** *P. pseudostrobus* (muestra 5.2) colectado en Santa Catarina. **C.** *P. pseudostrobus* (muestra 3.13) de El Salto, Zaragoza. **D.** Cono inmaduro de *P. pseudostrobus* (muestra 5.2) colectado en Santa Catarina.

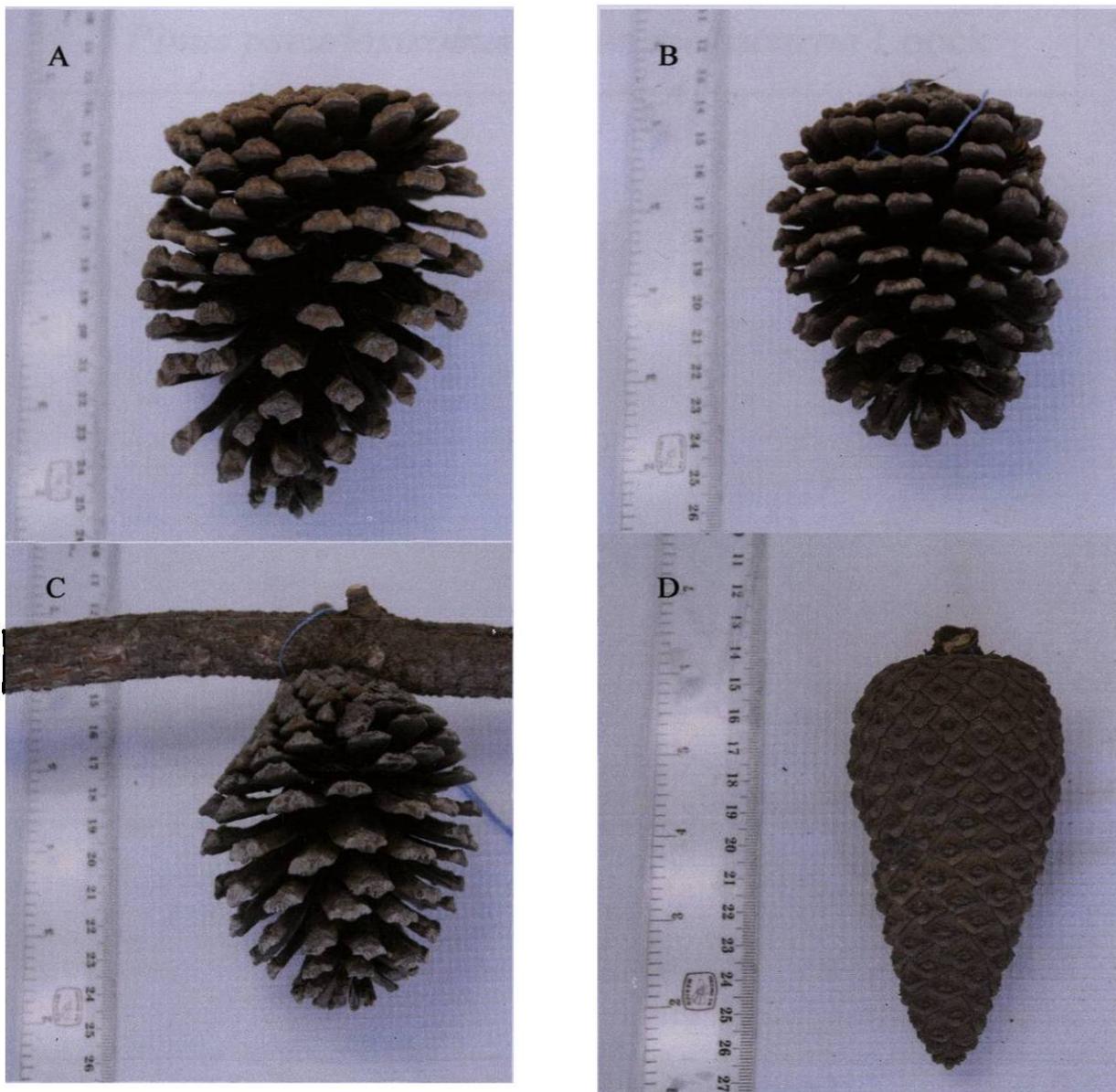


Foto 5. Conos de *Pinus pseudostrobus* Lindl. colectados en diferentes localidades. En la foto: **A.** Cono de *P. pseudostrobus* (muestra 5.2) de Santa Catarina. **B.** *P. pseudostrobus* (muestra 1.6) colectado en Iturbide. **C.** *P. pseudostrobus* (muestra 1.10) colectado en Santa Rosa, Iturbide. **D.** *P. pseudostrobus* (muestra 5.2) colectado en Santa Catarina.

Pinus pseudostrobus forma *megacarpa* Loock

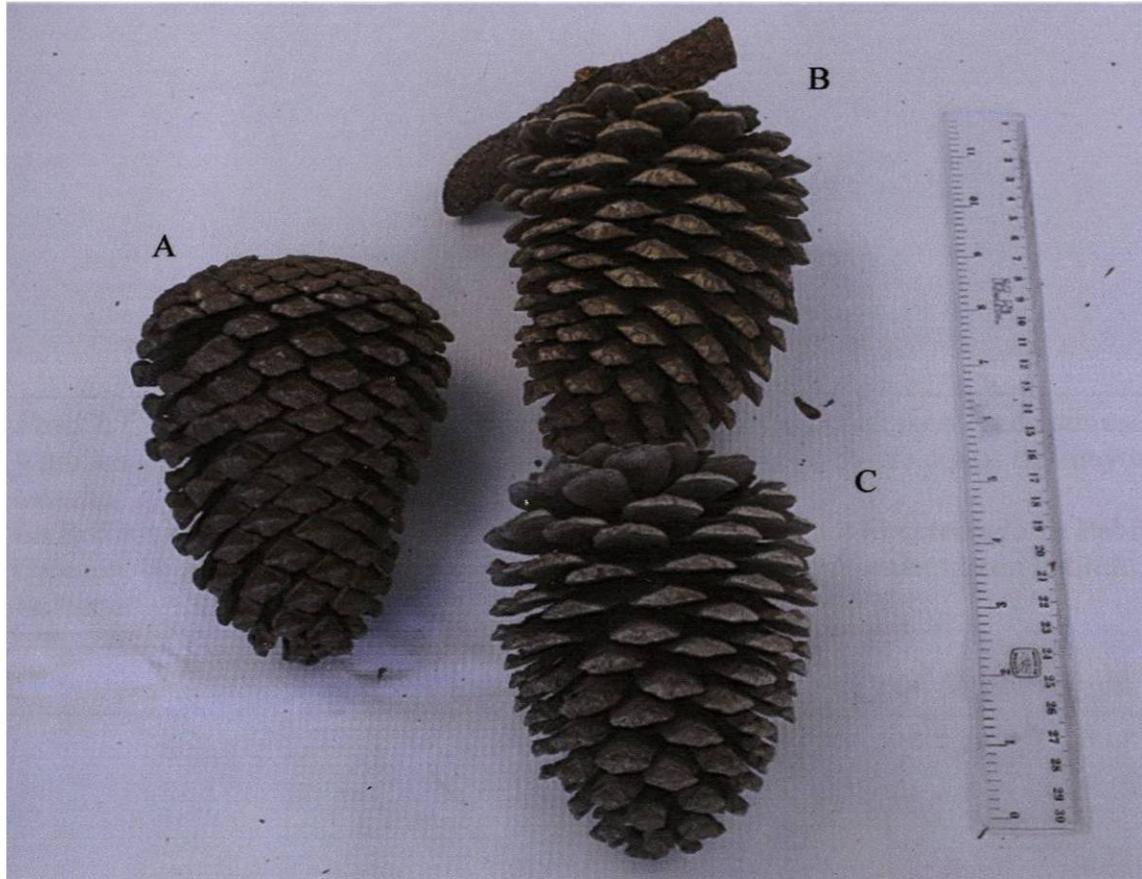


Foto 6. Conos de *Pinus pseudostrobus* forma *megacarpa* Loock.

En la foto: A. *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* (muestra 3.19) colectada en Las Norias, Arambierri. B. *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* (muestra 2.6) de Pablillo, Galeana. C. *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* (muestra 2.6) de Pablillo, Galeana.

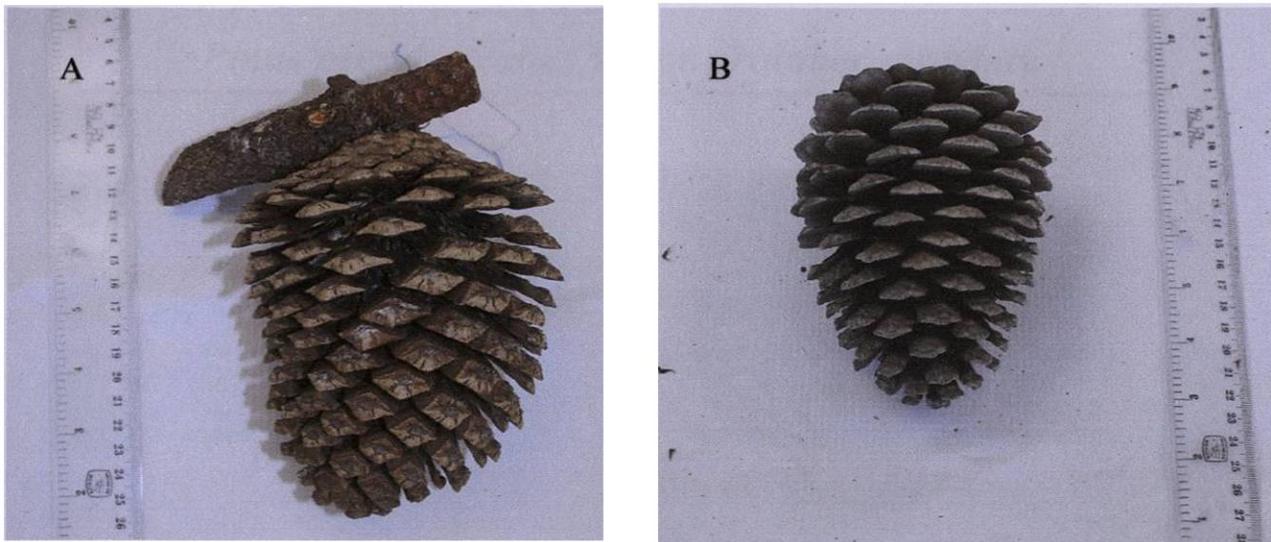


Foto 7. Conos de *Pinus pseudostrobus* forma *megacarpa* Loock mostrando sus escamas y umbos planos como los de *P. pseudostrobus* Lindl. pero con sus conos de mayor tamaño.

En la foto: **A.** *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* (Muestra 2.6) colectado en Pablillo, Galeana. **B.** *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* (muestra 2.6) colectado en Pablillo, Galeana.



Foto 8. Comparación entre conos de *Pinus pseudostrobus* forma *megacarpa* Loock (izquierda) y conos de *P. pseudostrobus* Lindl. (derecha).

Pinus pseudostrobus forma *protuberans* Mart.



Foto 9. Cono de *Pinus pseudostrobus* forma *protuberans* Mart. colectado en Iturbide (muestra 1.7).

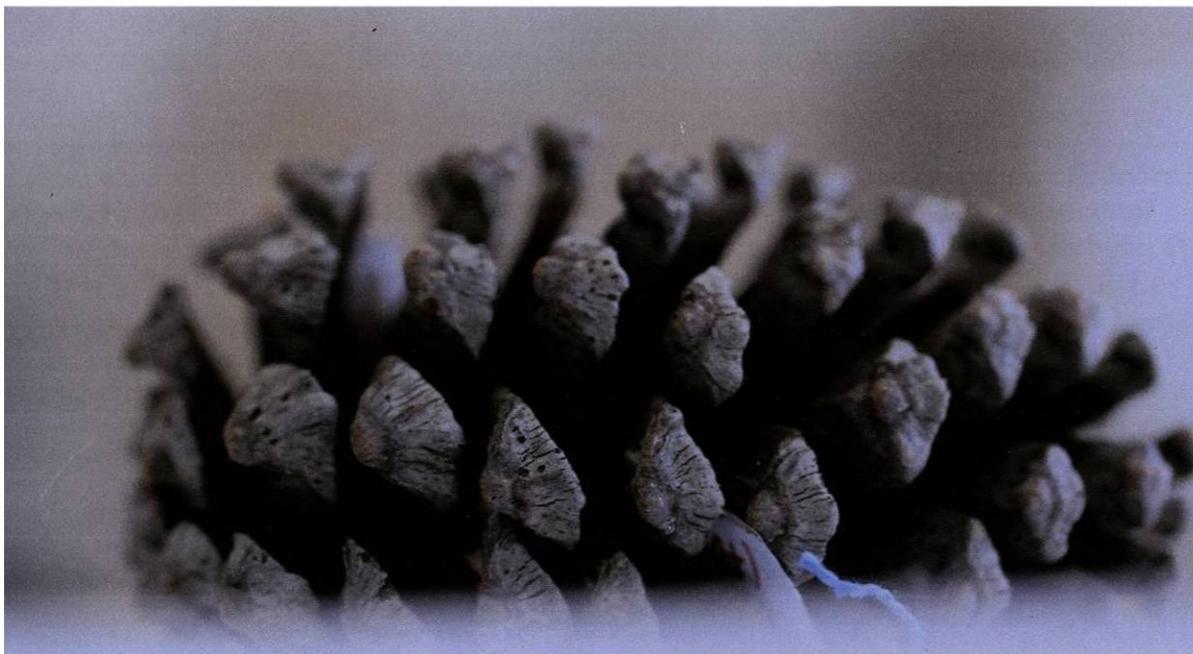


Foto 10. Escamas de *Pinus pseudostrobus* forma *protuberans* Mart. mostrando las apófisis con umbos protuberantes a manera de pezón (muestra 1.7).

Pinus estevezii (Mart.) Perry

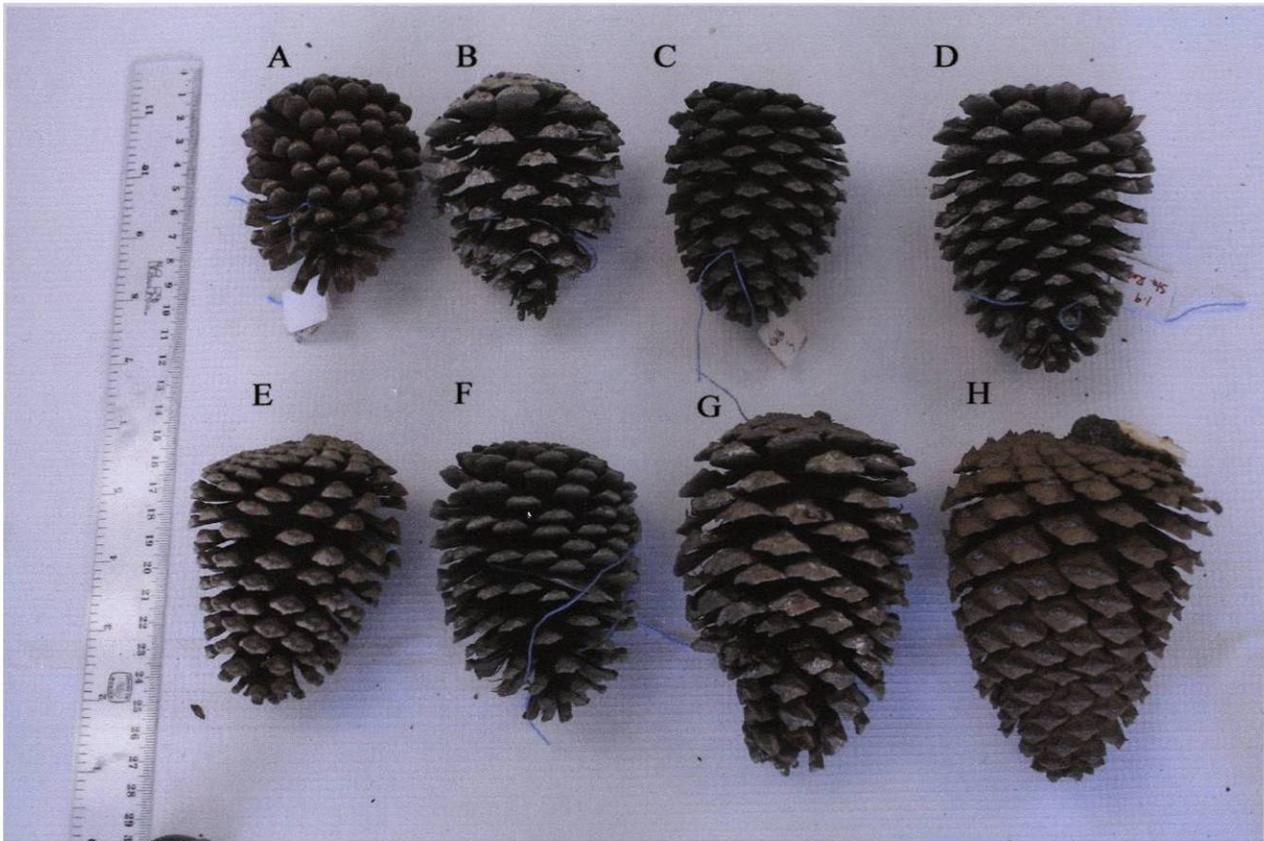


Foto 11. Conos de *Pinus estevezii* (Mart.) Perry colectados en diferentes localidades. En la foto: **A.** *P. estevezii* (muestra 3.1) de La Encantada, Zaragoza. **B.** *P. estevezii* (Muestra 4.20) de Las Norias, Aramberri. **C.** *P. estevezii* (muestra 1.3) de Iturbide. **D.** *P. estevezii* (Muestra 1.9) de Santa Rosa, Iturbide. **E.** *P. estevezii* (muestra 3.20) de Las Norias, Aramberri. **F.** *P. estevezii* (muestra 3.1) de La Encantada, Zaragoza. **G.** *P. estevezii* (Muestra 2.3) de Pabullo, Galeana. **H.** *P. estevezii* (Muestra 6.1) de Chipinque.



Foto 12. Conos de *Pinus estevezii* (Mart.) Perry mostrando sus escamas duras transversalmente quilladas con apófisis y umbos elevados y terminando en espinas fuertes y persistentes.

En la foto: **A.** Cono de *P. estevezii* (muestra 6.1) colectado en Chipinque. **B.** *P. estevezii* (muestra 3.20) colectado en Las Norias, Aramberri.

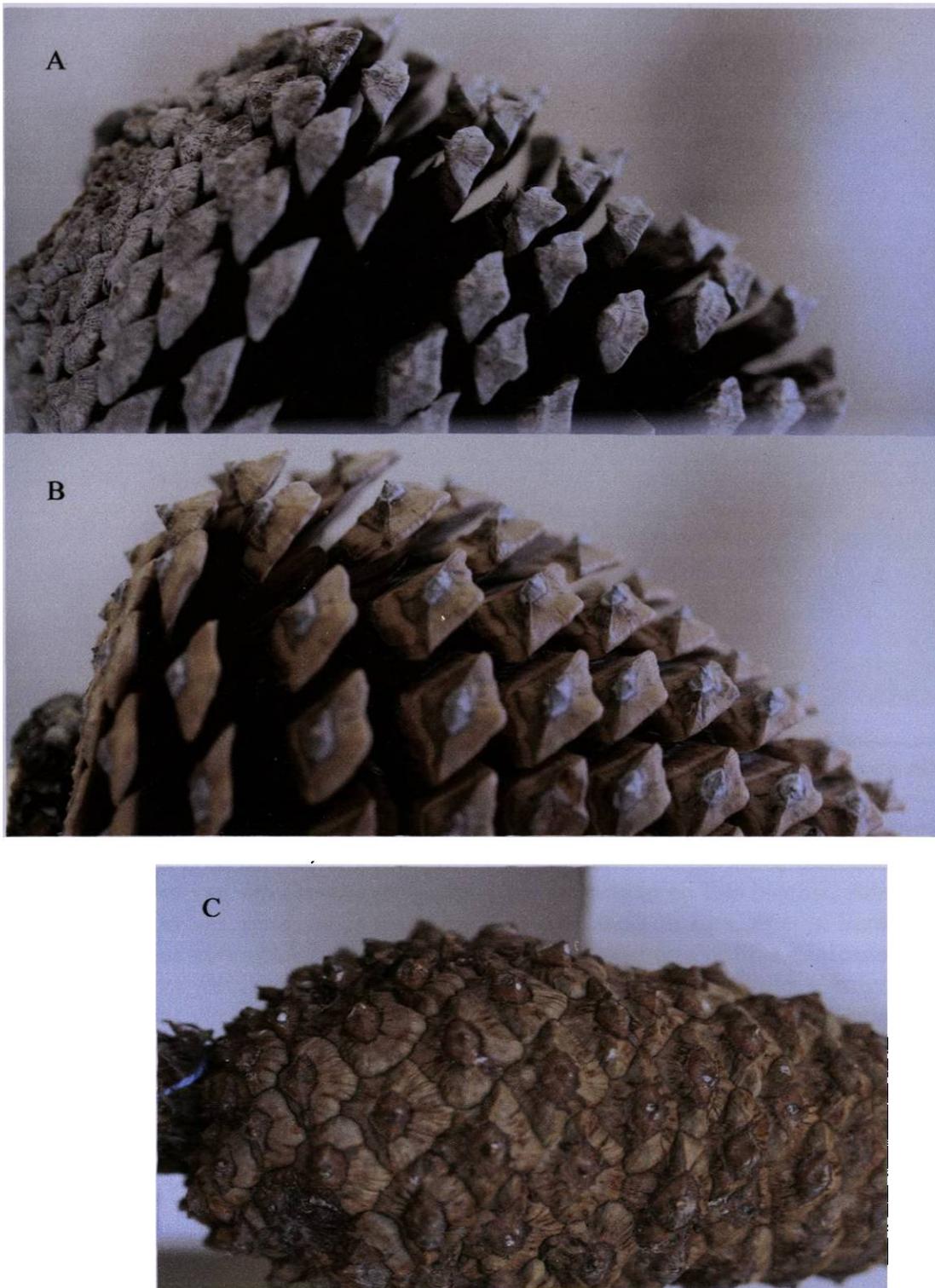


Foto 13. Conos maduros e inmaduros de *Pinus estevezii* (Mart.) Perry mostrando sus escamas características, duras con apófisis y umbos elevados terminando en espinas fuertes y persistentes.
En la foto: A. *P. estevezii* (muestra 3.20) de Las Norias, Aramberri. B. *P. estevezii* (muestra 6.1) colectado en Chipinque. C. Cono inmaduro de *P. estevezii* (muestra 3.20) colectado en Las Norias, Aramberri.

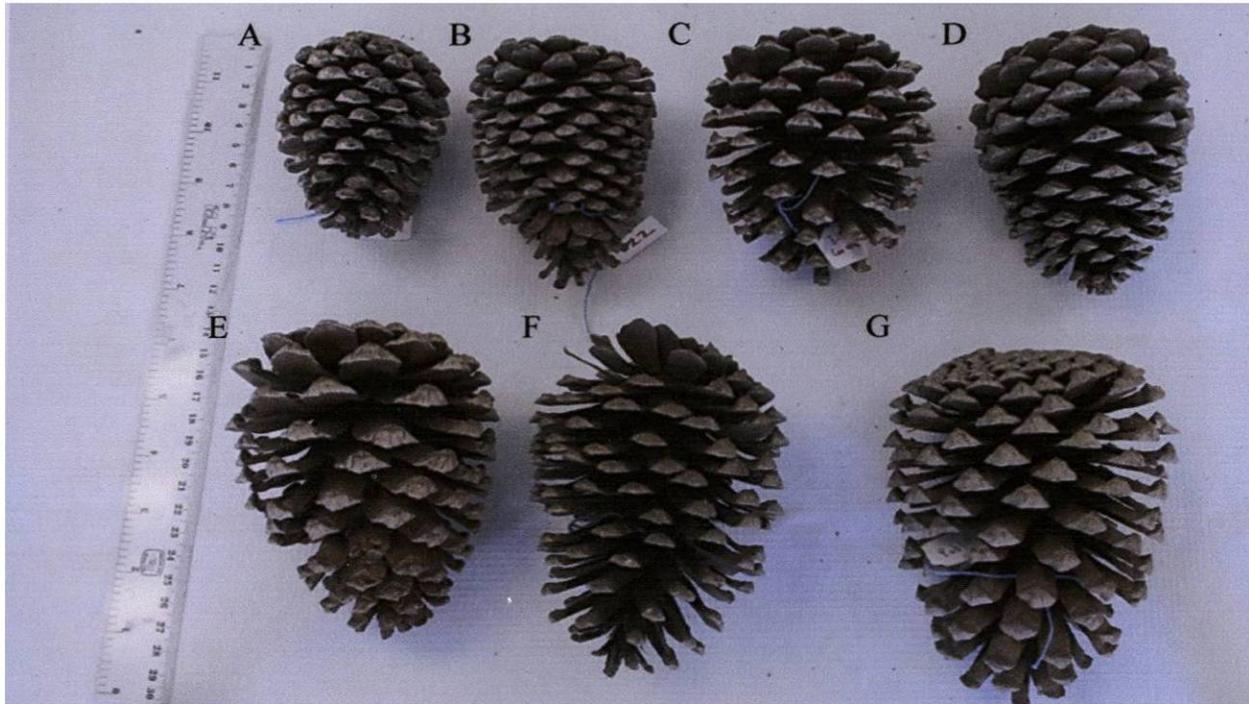


Foto 14. Conos de *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* Mart. colectados en diferentes localidades.

En la foto: A. *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 1.4) colectado en Iturbide. B. *P. psueodstrobus* var. *apulcensis* (muestra 2.2) colectado en Pabllillo, Galeana. C. *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 3.13) colectado en Las Norias, Aramberri. D. *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 4.1) colectado en La Ciénega, Santiago. E. *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 2.4) colectado en Pabllillo, Galeana. F. *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 3.14) colectado en El Salto, Zaragoza. G. *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 2.4) colectado en Pabllillo, Galeana.

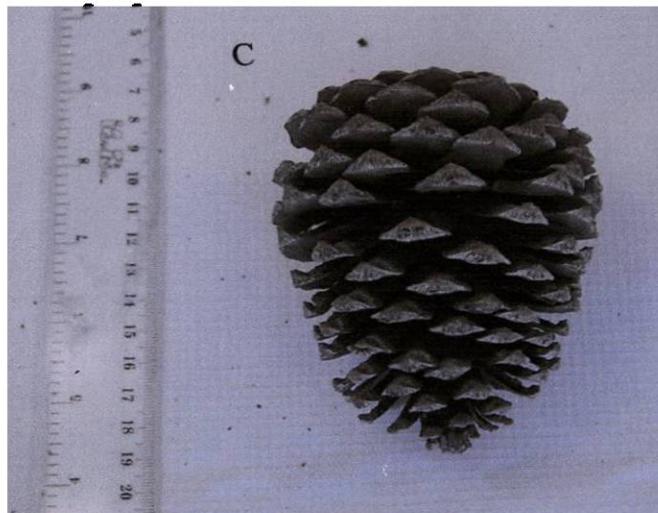
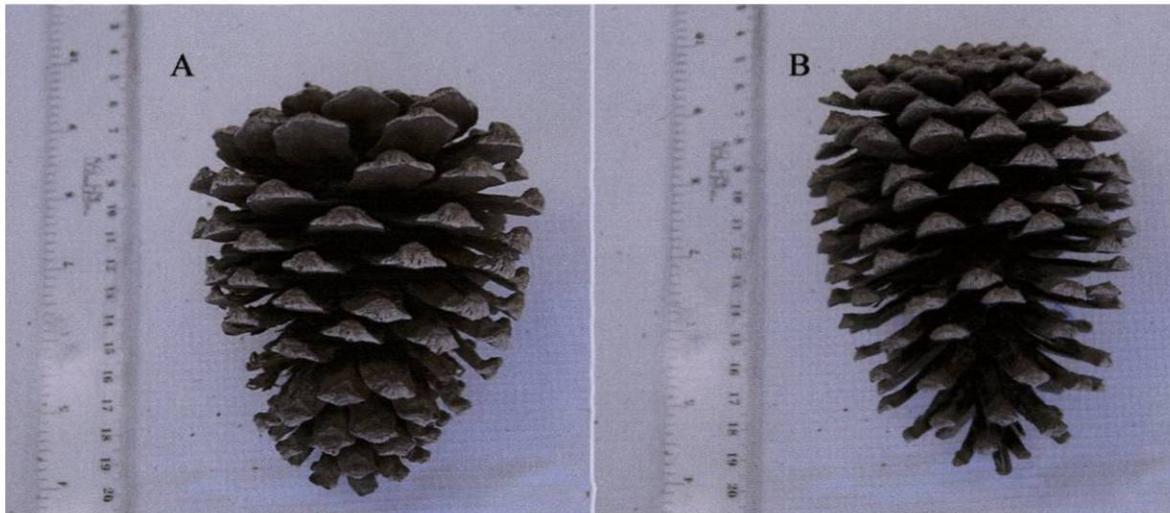


Foto 15. Conos característicos de *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* Mart. mostrando sus escamas duras, con apófisis elevadas y encorvadas hacia la base del cono terminando en una espina dura y persistente.

En la foto: **A.** *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 2.4) colectado en Pablillo, Galeana. **B.** *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 3.14) colectado en El Salto, Zaragoza. **C.** *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 4.2) colectado en La Ciénega, Santiago.

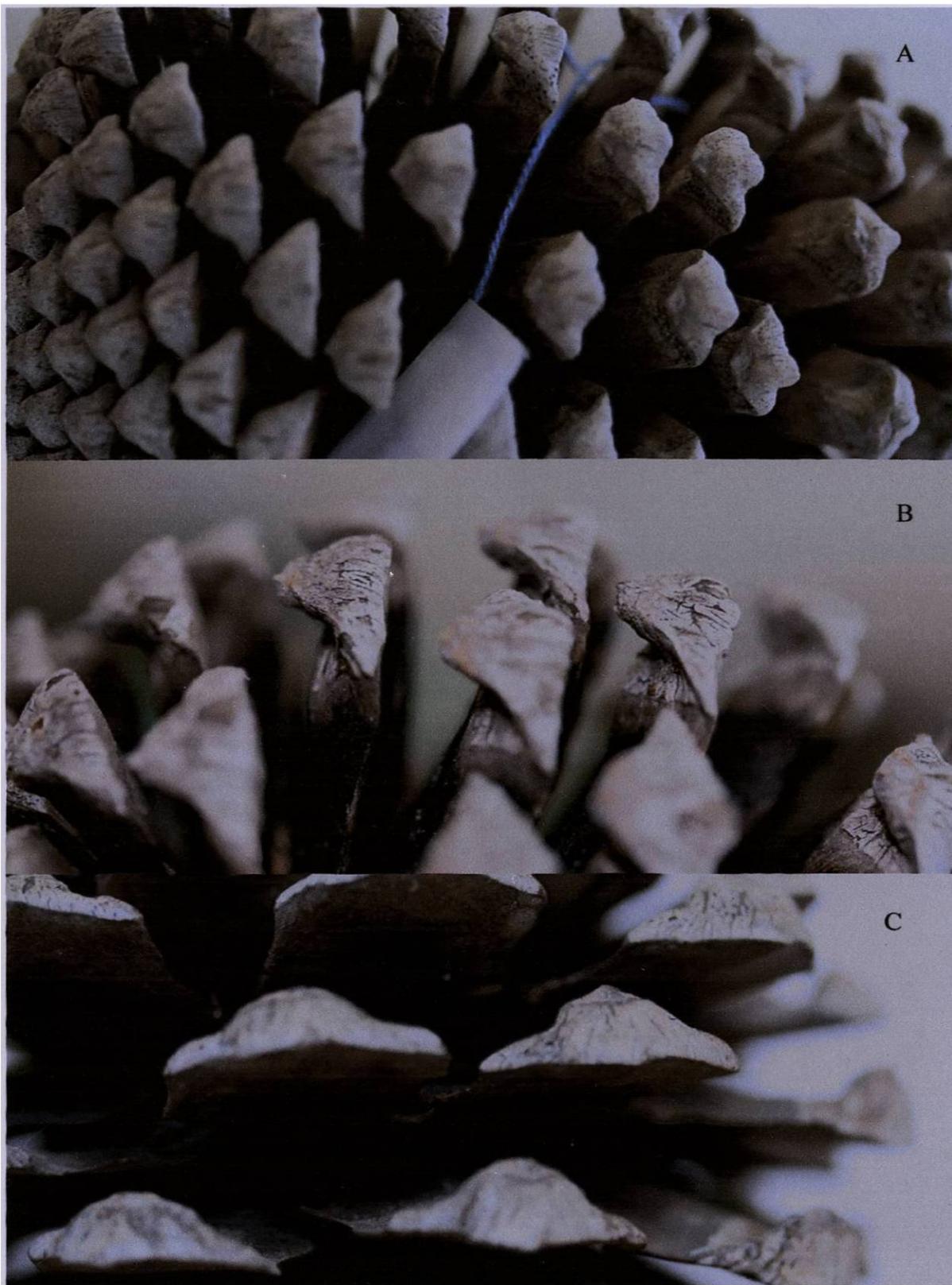


Foto 16. Escamas típicas de *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* Mart.
En la foto: **A.** *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 3.14) colectado en El Salto, Zaragoza. **B.** *P. pseudoostrobus* var. *apulcensis* (muestra 4.2) colectado en La Ciénega, Santiago. **C.** *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 2.4) colectado en Pablillo, Galeana.

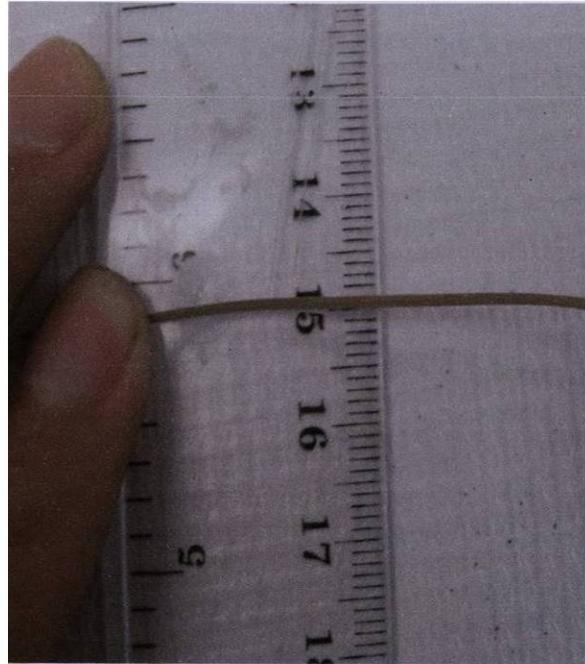
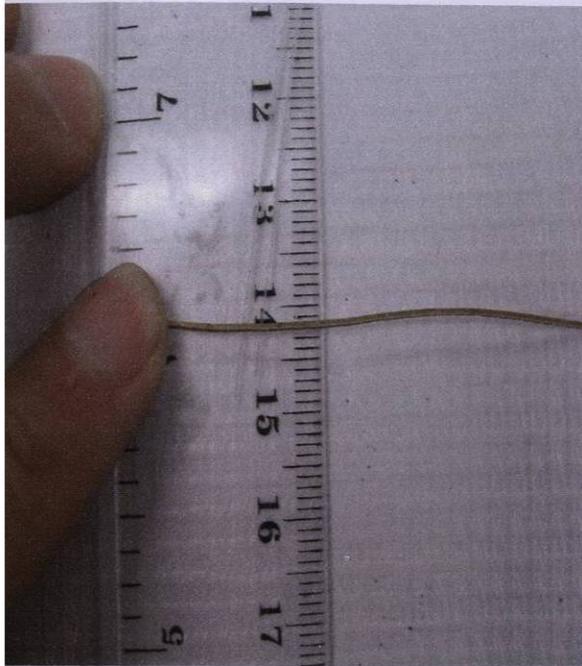


Foto 17. Izquierda: Muestra 1.6. Acícula de *Pinus pseudostrobus* (muestra 1.6) mostrando su anchura de aproximadamente 7-8mm. **Derecha:** Muestra 6.1. Acícula de *P. estevezii* (muestra 2.3) de aproximadamente 1.1 mm de ancho.



Foto 18. Izquierda: Bráctea ligeramente decurrentes de *Pinus pseudostrobus* (muestra 1.6). **Derecha:** Bráctea muy decurrentes de *P. estevezii* (muestra 2.3).

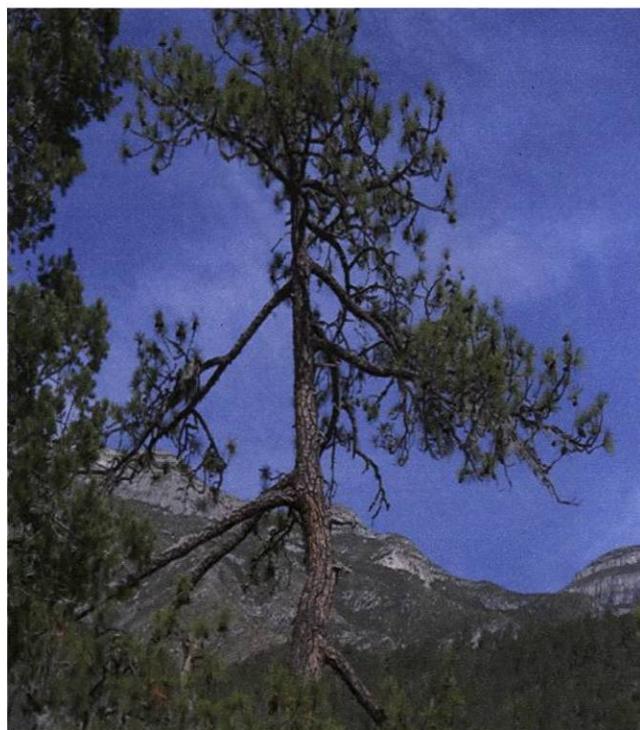
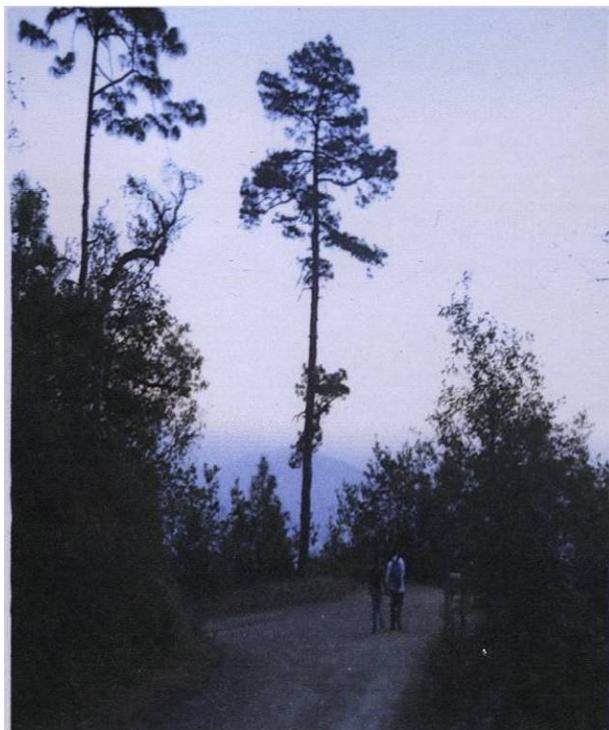


Foto 19. Izquierda: árbol adulto de *Pinus pseudostrobus* de Chipinque.
Derecha: árbol adulto de *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* (muestra 4.2) de La Ciénega, Santiago.



Foto 20. Arriba: árbol adulto de *Pinus estevezii* (muestra 1.5) colectado en Iturbide. **Abajo:** árbol adulto de *P. estevezii* colectado en Las Norias, Aramberri (muestra 3.20).

Selección de los ejemplares identificados para realizar los análisis filogenéticos.

Tabla 3. Lista de los 14 ejemplares seleccionados para el análisis filogenético basado en secuencias de ADN del cloroplasto.

| Taxa | Número de muestra |
|---|-------------------|
| <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 1.1 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>protuberans</i> Mart. | 1.7 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 1.9 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 1.10 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> Mart. | 2.4 |
| <i>Pinus psuedostrobus</i> Lindl. | 3.4 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>megacarpa</i> Loock | 3.5 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>megacarpa</i> Loock | 3.19 |
| <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 3.20 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 4.1 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> Mart. | 4.2 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 5.2 |
| <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 6.1 |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 6.2 |

Trabajo de laboratorio.

Extracción de ADN

A continuación se muestra una foto (Fig.1) de una extracción de ADN genómico de algunos de los taxa del complejo *Pseudostrobus* y un testigo de una extracción de ADN extraído a partir de hojarasca de *Pinus pseudostrobus* (carril 1), se colocaron 5 µl de ADN resuspendido en buffer TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8) por carril y se tiñó con bromuro de etidio.

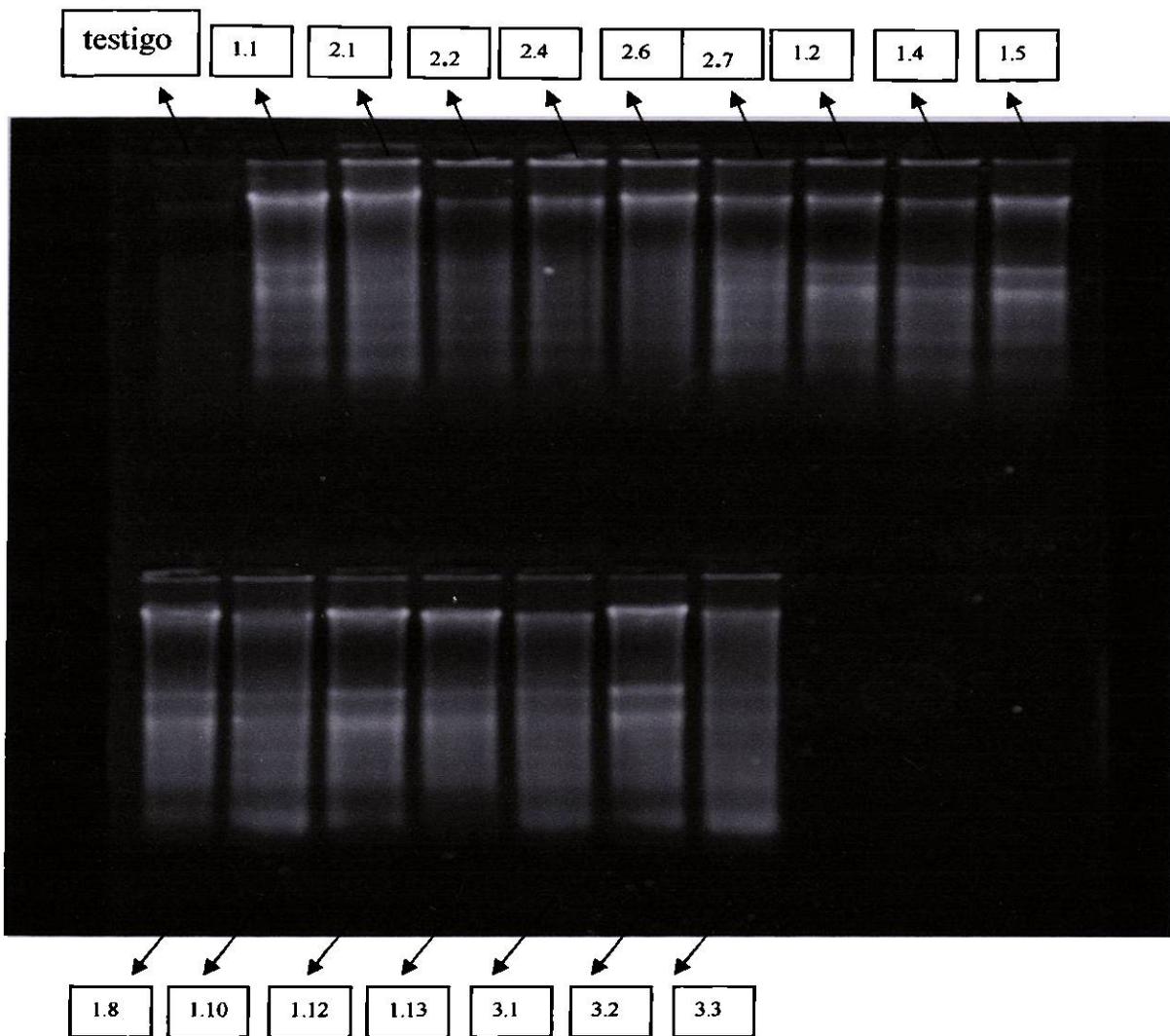


Fig 1. DNA extraído de diferentes muestras del complejo *Pseudostrobus*.

Como lo muestra el ejemplo de la foto, las extracciones de ADN fueron positivas, observando en los geles una gran cantidad y calidad de ADN extraído el cual se utilizó como templado para realizar la amplificación de las regiones del cloroplasto (PCR).

Amplificación de regiones de ADN del cloroplasto.

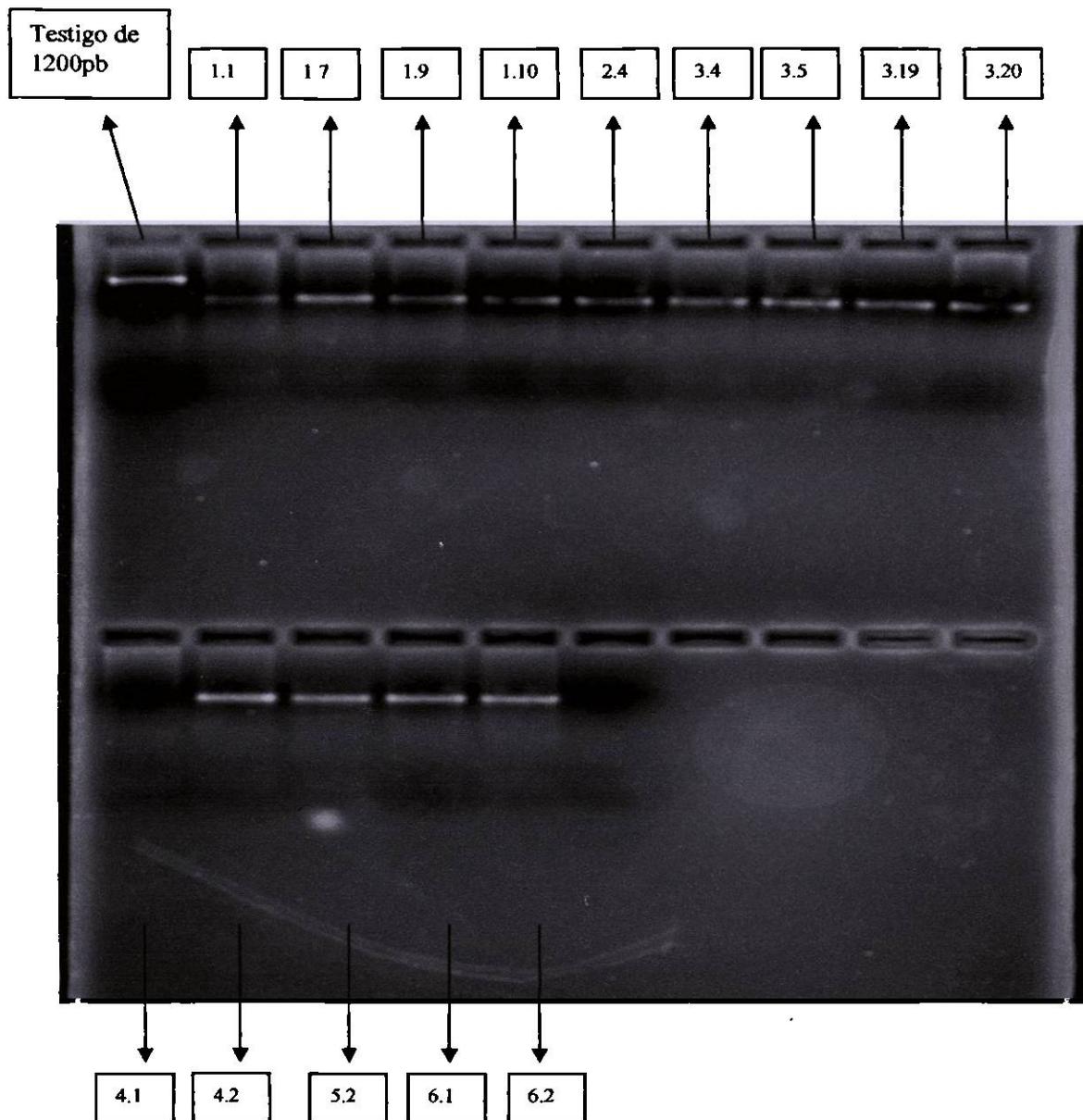


Fig 2. Foto de productos de PCR para la región trnT-trnL (460 pb aprox.) de diferentes taxa del complejo *Pseudostrobus* incluidos en el estudio. Se corrieron 5ul de la reacción de PCR y se tiñó con bromuro de etidio, el primer carril muestra un producto de PCR matK (1200 pb aprox.) utilizado como testigo.

Como lo muestra la fotografía (Fig. 2), los productos de PCR también fueron positivos y correspondían al tamaño deseado sin mostrar productos inespecíficos, cuando se encontraba una amplificación negativa como en la muestra 4.1 de la fotografía, en esta se repetía el PCR hasta que se obtuviera un producto positivo que fuera fiable para la

secuenciación. Los productos que se enviaron a secuenciar a la compañía Macrogen, USA fueron muy parecidos a los de este ejemplo, mostrando una única banda sin productos inespecíficos tanto para esta región como para las demás.

Secuenciación

La secuenciación realizada por Macrogen también fue exitosa, registrándose picos de buena visibilidad en cada uno de los 14 taxa que se enviaron a secuenciar con cada una de las 4 regiones seleccionadas para los análisis filogenéticos.

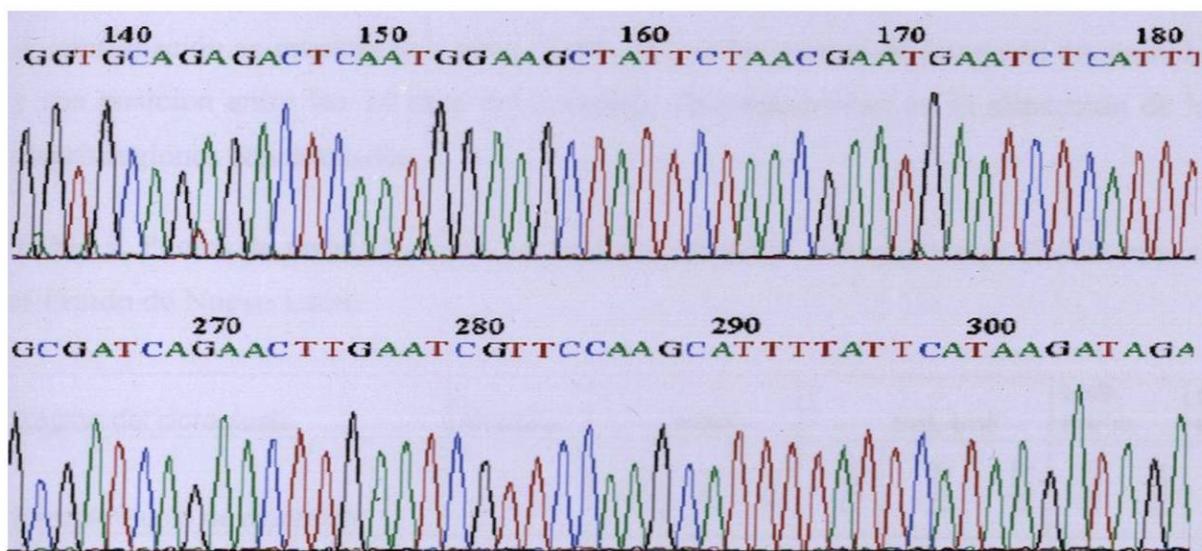


Fig 3. Fragmento del cromatograma de la secuenciación Forward de la región trnL-trnF de la muestra *Pinus pseudostrobus* Lindl. (3.4).

Como se observa en el ejemplo de la foto (Fig. 3), los picos del cromatograma fueron claros y no se traslapaban unos con otros mostrando una buena y confiable reacción de secuenciación. Las otras regiones analizadas en el presente estudio mostraron los resultados de secuenciación similares a los del ejemplo, lo cual garantizó tener una seguridad de las secuencias analizadas.

Alineación.

La alineación realizada con el software Clustal X (Thompson *et al.* 1997) fue corregida manualmente en MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007) y con este software se analizó

la información contenida en ella (Tabla 4). Los datos se muestran a continuación (Tabla 4) :

| | |
|-----------------------------------|------|
| Caracteres (pb) | 3414 |
| Puntos variables | 126 |
| Sitios informativos parsimoniosos | 2 |
| Singularidades | 124 |

Tabla 4. Tabla con la información de la alineación de los 14 taxa seleccionados con *Pinus nelsonii* como grupo externo.

A continuación se muestra una tabla (Tabla 5) con los puntos de mutación encontrados y sus posición entre los 14 taxa del complejo *Pseudostrobus* en la alineación de las cuatro regiones concatenadas.

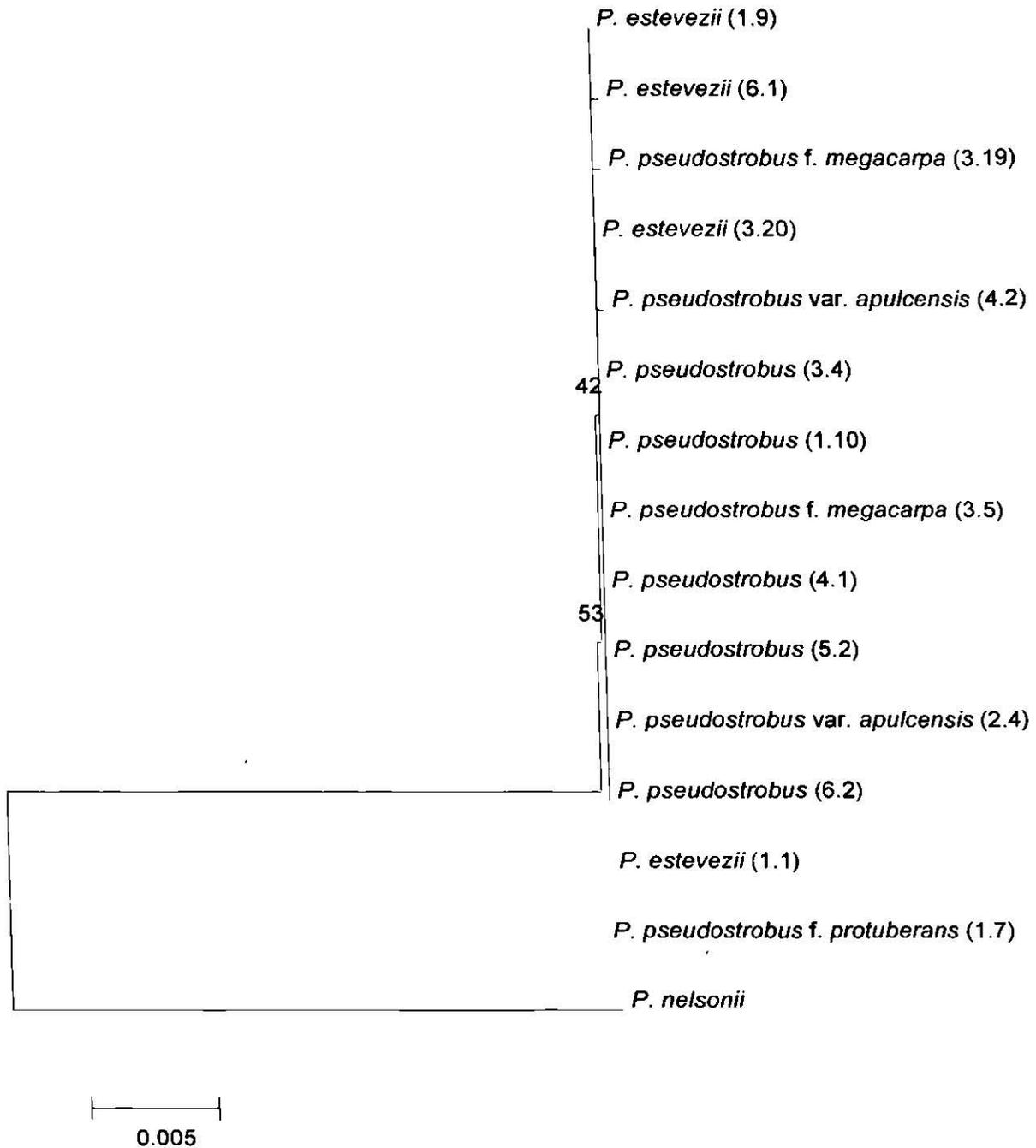
Tabla 5. Puntos de mutación entre los taxa del complejo *Pseudostrobus* distribuidos en el Estado de Nuevo León.

| Región del cloroplasto | Muestra | matK | | | trnL-trnF | | | trnS-trnFm | | trnT-trnL | |
|---|---------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|------------|------|-----------|------|
| | | 225 | 444 | 745 | 1275 | 1576 | 1677 | 1950 | 2864 | 2865 | 3307 |
| Especie\Punto de mutación | | | | | | | | | | | |
| <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 1.1 | C | T | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>protuberans</i> Mart. | 1.7 | C | C | A | T | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 1.9 | C | C | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 1.10 | C | C | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> Mart. | 2.4 | C | C | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus psuedostrobus</i> Lindl. | 3.4 | C | C | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostorbus</i> forma <i>megacarpa</i> Looek | 3.5 | C | C | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> forma <i>megacarpa</i> Looek | 3.19 | C | C | A | G | C | | | | | |
| <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 3.20 | C | C | A | G | T | T | | | | |
| <i>Pinus pseudostorbus</i> Lindl. | 4.1 | C | C | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostorbus</i> var. <i>apulcensis</i> Mart. | 4.2 | C | C | T | G | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostorbus</i> Lindl. | 5.2 | C | C | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus estevezii</i> (Mart.) Perry | 6.1 | A | C | A | G | T | | | | | |
| <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl. | 6.2 | C | C | A | G | T | | | | | |

Como lo muestra la tabla 5, tanto matK como trnL-trnF mostraron 3 puntos de mutación entre los 14 individuos en los que se determinaron las secuencias, las regiones trnT-trnL y trnS-trnFm no mostraron ninguna variación a pesar de ser regiones no codificantes.

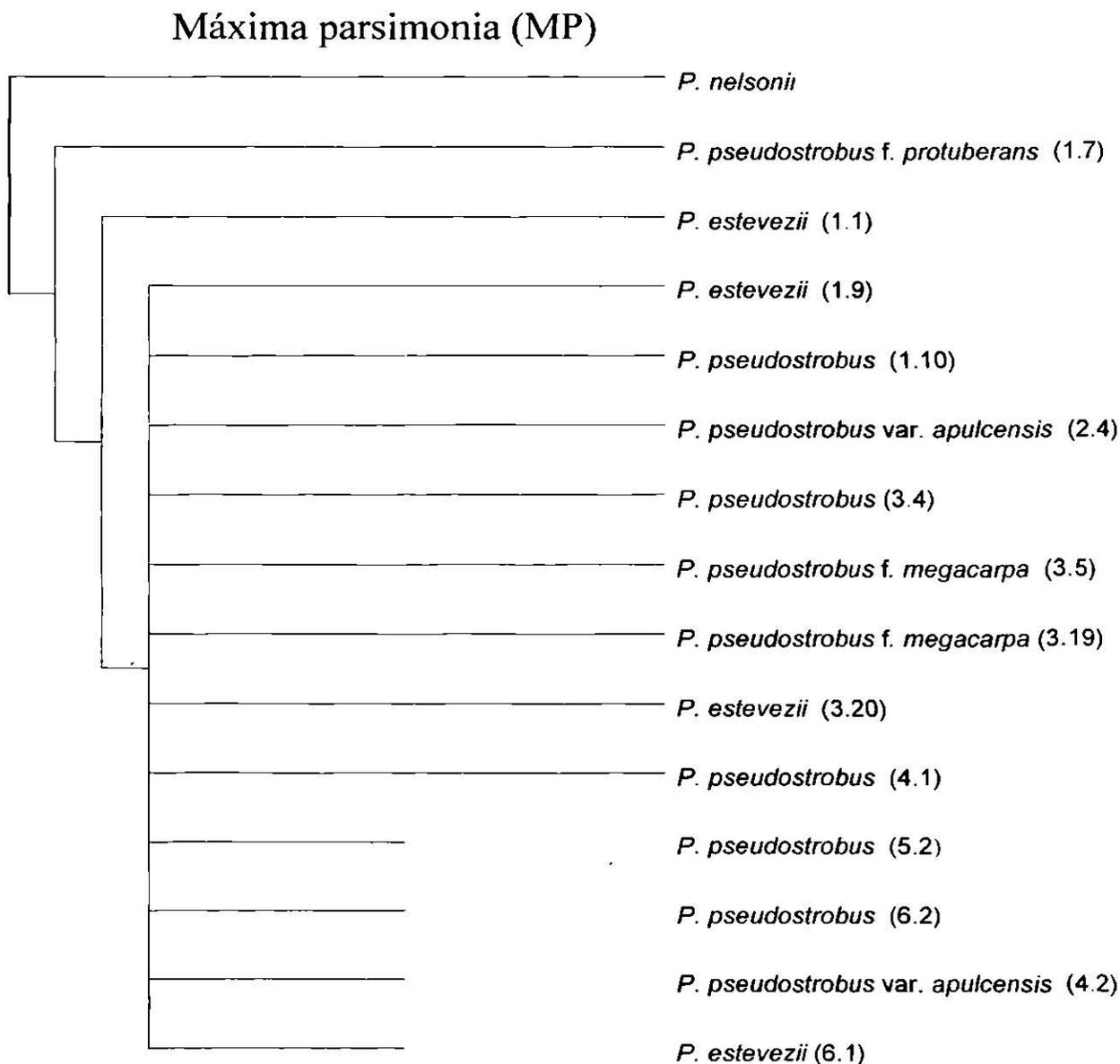
Árboles filogenéticos inferidos a partir de las secuencias de cpDNA.

Neighbor-joining (NJ)



Árbol de distancias genéticas inferido mediante el algoritmo neighbor-joinig analizado mediante el método de bootstrap utilizando 1000 replicas, los índices de confiabilidad bootstrap se muestran arriba de cada nodo.

El árbol NJ muestra una politomía entre todos los taxa del estudio excepto para *Pinus estevezii* (Mart.) Perry colectado en Iturbide y para *P. pseudostrobus* forma *protuberans* Mart. con valores bootstrap muy bajos siendo 42% y 53% respectivamente, lo cual no refleja confiabilidad en los nodos inferidos en el árbol.



Uno de los 4 árboles más parsimoniosos inferidos bajo el criterio de máxima parsimonia (MP).

Descripción del árbol:

Longitud de árbol = 127

Índice de consistencia (CI) = 0.9921

Índice de homoplasia (HI) = 0.0079

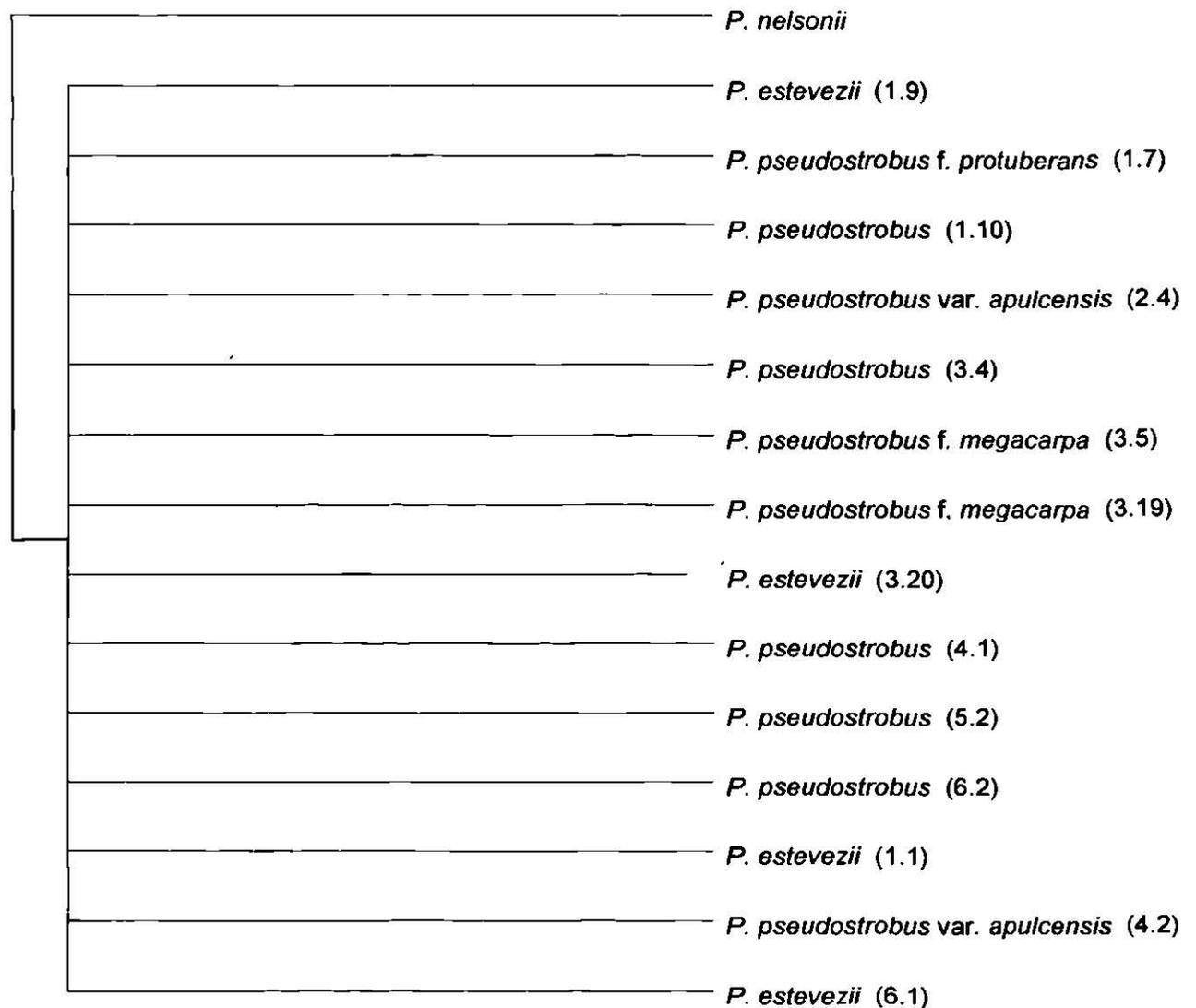
CI excluyendo caracteres no informativos = 0.6667

HI excluyendo caracteres no informativos = 0.3333

Índice de retención (RI) = 0.5000

Índice de consistencia reescalado (RC) = 0.4961

Este árbol colapsó en una politomía entre todas las especies del estudio pero al igual que el árbol basado en el algoritmo neighbor-joining las muestras *Pinus estevezii* (Mart.) Perry y *P. pseudostrobus* forma *protuberans* Mart colectadas en Iturbide aparecen basales al clado de la politomía.



Árbol estricto consenso inferido mediante el criterio de máxima parsimonia (MP).

Descripción del árbol:

Longitud del árbol= 128

Índice de consistencia (CI) = 0.9844

Índice de homoplasia (HI) = 0.0156

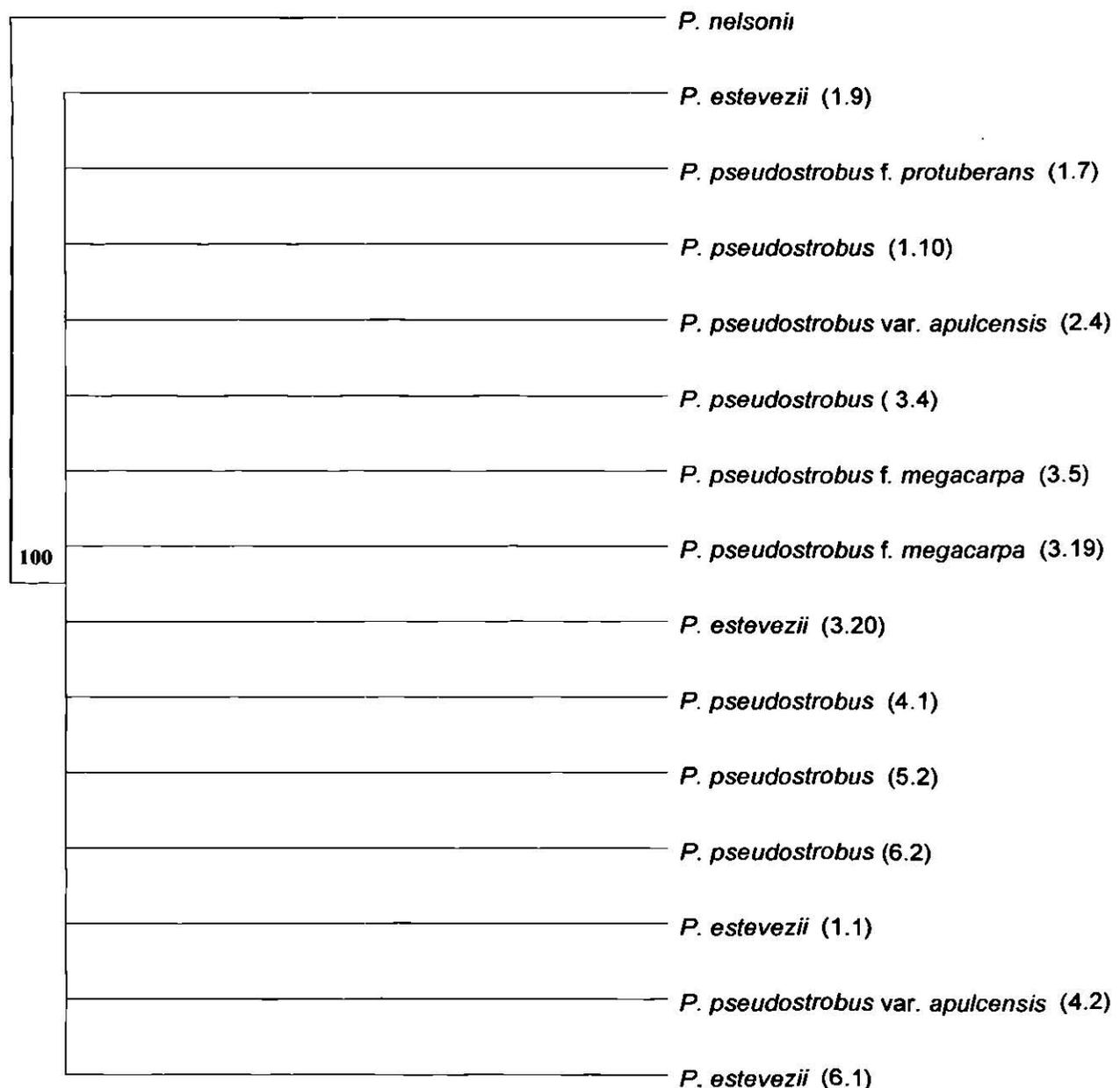
CI excluyendo caracteres no informativos = 0.5000

HI excluyendo caracteres no informativos = 0.5000

Índice de retención (RI) = 0.000

Índice de retención reescalado (RC) = 0.0000

El árbol estricto consenso muestra una politomía entre todos los individuos seleccionados para el análisis filogenético del presente estudio, a diferencia de uno de los árboles más parsimoniosos y del árbol inferido mediante el algoritmo neighbor-joining este no retiene a ningún individuo fuera del clado de la politomía.



Árbol majority rule bajo el criterio de máxima parsimonia (MP) y probado con bootstrap utilizando 1000 replicas. Los índices de confiabilidad se muestran arriba de cada nodo.

Descripción del árbol:

Longitud del árbol = 128

Índice de consistencia (CI) = 0.9844

Índice de homoplasia (HI) = 0.0156

CI excluyendo caracteres no informativos = 0.5000

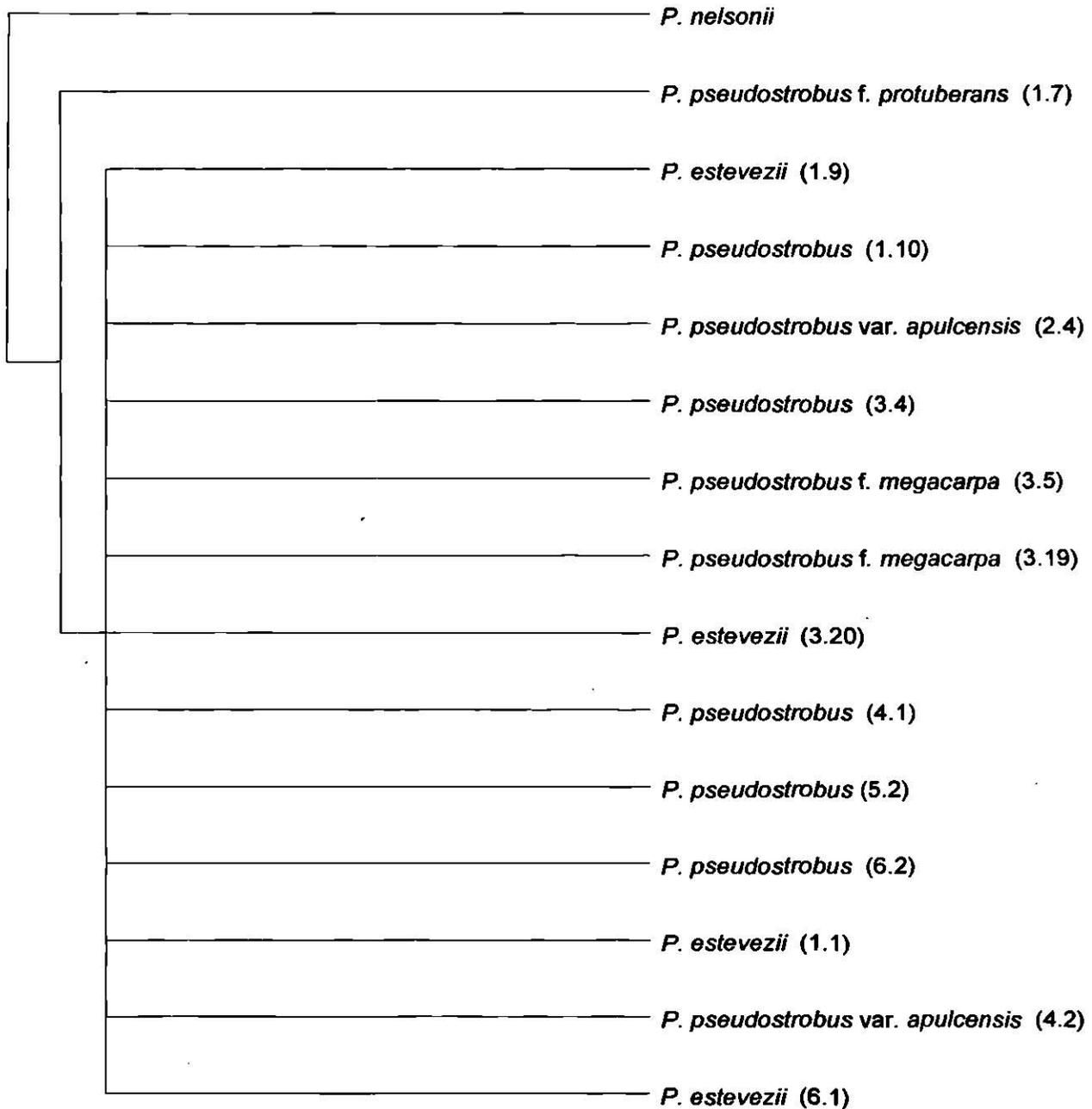
HI excluyendo caracteres no informativos = 0.5000

Índice de retención (RI) = 0.0000

Índice de retención reescalado (RC) = 0.0000

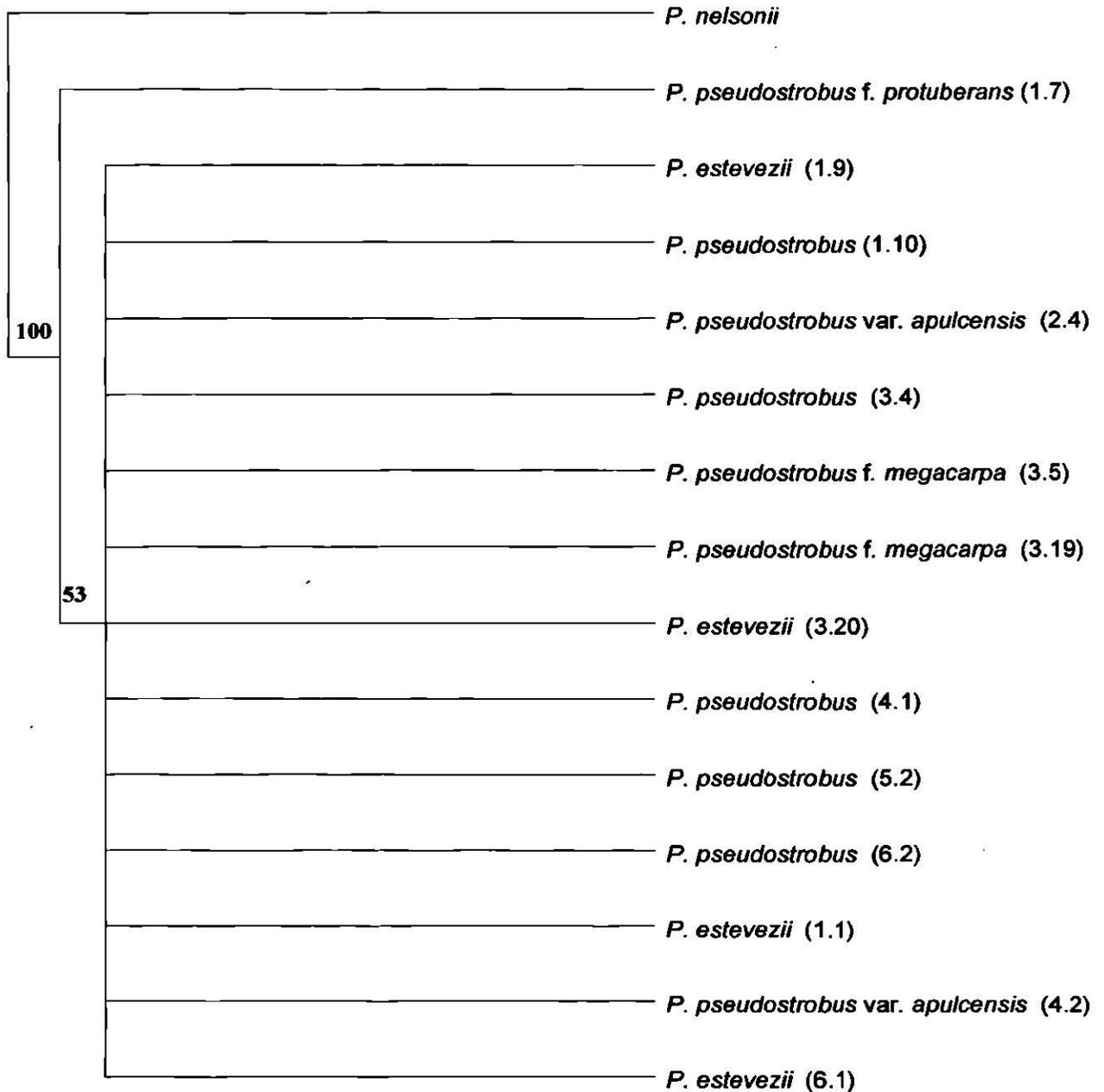
Este árbol mostro la politomía entre todos los individuos seleccionados para el análisis filogenético al igual que el estricto consenso y lo demuestra con un índice de confiabilidad bootstrap de 100% tanto para la confiabilidad del clado de las politomías en donde se encuentran las especies de este estudio.

Máxima verosimilitud (Maximum likelihood)



Árbol de máxima verosimilitud inferido bajo el modelo evolutivo K81uf implementado en MODELTEST.

El árbol de máxima verosimilitud muestra a todos los individuos seleccionados para el análisis filogenético colapsando en una politomía, excepto para *P. pseudostrobilus* forma *protuberans* Mart. colectado en Iturbide.



Árbol de máxima verosimilitud inferido bajo el modelo evolutivo K81uf implementado en MODELTEST y probado con análisis bootstrap utilizando 1000 replicas. Los índices de confiabilidad bootstrap son indicados arriba de cada nodo.

El árbol de máxima verosimilitud probado con análisis bootstrap de 1000 replicas muestra un valor bootstrap del 100% para un clado el cual contiene todos los individuos del presente estudio y un clado con politomías separado de *Pinus pseudostrobus* forma *protuberans* Mart. colectado en Iturbide como basal a este clado pero con un valor bootstrap bajo del 53%.

DISCUSIÓN

Variación morfológica y determinación taxonómica

Los ejemplares del complejo *Pseudostrobus* colectados para realizar el presente estudio presentaron una gran variación morfológica en cuanto a sus conos (Fotos 1, 2, 3, 6, 8, 11, 14), tamaño de las hojas, ramas y formas de los árboles, esta variación fue muy notable a veces inclusive en la misma localidad. Muchos autores han señalado y observado este tipo de variación entre las especies del complejo *Pseudostrobus* y han sugerido que quizá es debida a que los taxa son recientes y que aún se encuentran en un proceso de especiación (Martínez, 1948; Favela, 1991; Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997).

Estos grupos de especies de aparición reciente conocidos como “complejos de especies” presentan problemas taxonómicos con los límites que definen a las especies (Castro *et al.*, 2008) y han sido de gran debate en cuanto a sinonimias y determinación taxonómica debido a caracteres morfológicos similares y variables entre los taxa, además de la presencia de híbridos en varios casos (Zobel, 1951; Libby, 1958; Matos, 1998; Matos y Schaal, 2000; Bucii *et al.*, 1998; Christensen y Dar, 1999) lo cual es generalmente un indicador de una relación filogenética en pinos (Price *et al.*, 1998). La especie *Pinus pseudostrobus* se ha encontrado que hibridiza con *P. montezumae* lo cual ha sido corroborado morfológica y genéticamente (Delgado *et al.*, 2007).

A pesar de la gran variación, existen diferencias morfológicas reconocidas por claves taxonómicas (Martínez 1948; Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997) para discriminar entre las diferentes especies, de las más consistentes y mejor definidas se encuentran la morfología de las brácteas de los conos así como también el ancho de las acículas (Martínez, 1948; Perry, 1991). El tamaño y forma del árbol en *Pinus estevezii* también ha sido mencionado como carácter importante (Perry, 1991) de esta especie siendo en esta un árbol más pequeño (Foto 20) y que lo distingue del resto de las especies del grupo. Estas características fueron las principales que permitieron la identificación taxonómica de los ejemplares del presente estudio. Sin embargo, es también importante señalar que algunos caracteres como lo son el color y largo de las hojas y el tamaño y forma de los conos fueron muy variables y en algunos ejemplares aparecían como intermedios o poco definidos.

Las diferencias morfológicas de las especies *P. pseudostrobus*, *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* y *P. pseudostrobus* forma *protuberans* son sutiles (Martínez, 1948; Perry, 1991) siendo discriminante solamente la prolongación del umbo la cual es mucho mas protuberante en *P. pseudostrobus* forma *protuberans* (Foto 10) que en los dos primeros (Foto 8) y en el caso de *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* el tamaño del cono es mayor (14-20cm) que en *P. pseudostrobus* (8-13 cm.). También es importante mencionar que *P. pseudostrobus* forma *protuberans* solo se encontró en una localidad y solo se colectó un ejemplar el cual fue seleccionado para el análisis de cpDNA.

Pinus pseudostrobus y sus dos formas se diferenciaron de los otros taxa por sus escamas delgadas y flexibles con umbos aplanados o poco levantados, espinas débiles pronto caedizas, así como también una quilla transversal la cual no es marcada o a veces es apenas visible (Fotos 3-5), estas características han sido mencionadas como consistentes (Martínez, 1948; Perry, 1991) para diferenciar estas especies de *P. estevezii* y de *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* en los cuales las escamas tienden a ser duras y rígidas así como las apófisis levantadas y sus espinas duras y no pronto caedizas (fotos 11-16), además de tener hojas más gruesas y rígidas (Foto 17), características que ayudaron en mucho a la identificación taxonómica. Otra característica importante que ayudo en diferenciar morfológicamente los taxa y que también han sido mencionadas por Perry (1991) son el ancho de las hojas y el tamaño de las vainas siendo en *P. pseudostrobus* y sus dos formas hoja delgadas y flexibles con vainas de 15mm de largo a lo contrario que pasa con *P. estevezii* y con *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* en los cuales las hojas son mas anchas (1mm o excepcionalmente 1.2mm), rígidas y ásperas (Foto 17) con vainas mas largas (de 20 a 25 mm). Por otro lado, las brácteas de las ramas de *P. estevezii* y de *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* son mas decurrentes (Foto 18) haciéndolas rasposas a diferencia de *P. pseudostrobus* en los cuales las brácteas de las ramas parecen mas bien hundidas (Foto 18) en la rama dándoles un tacto suave (Martínez, 1948; Perry, 1991).

Pinus estevezii y *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* comparten mas características morfológicas entre si que con el resto del grupo (Perry, 1991), entre estas características se encuentran sus conos con escamas duras, apófisis y umbos elevados, espinas persistentes (Fotos 11-16) y hojas más gruesas y rasposas (Foto 17). Las características que pudieron determinar una diferenciación morfológica clara entre estos dos taxa

consistió en las escamas de los conos las cuales en *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* tienen una apófisis más elevada encorvada hacia atrás con espina dura y persistente también curvada hacia la base del cono (Foto 16) a diferencia del *P. estevezii* en el cual la espina por lo general se curva hacia afuera del cono o aparece recta y la apófisis tampoco está curvada hacia la base del cono (Foto 13) pero sí menos elevada. Por otro lado, también se ha mencionado que *Pinus estevezii* es un pino más pequeño (de 15- 25 m de altura) con ramas gruesas en la base del árbol (Perry, 1991), característica que también se encontró en los ejemplares colectados (Foto 20) a diferencia del resto de las especies en las cuales los árboles tienden a ser más altos (20-35m de altura) y las ramas más cercanas a la base tienden a caerse (Foto 19) tendiendo a dejar un fuste limpio con una corona en la parte superior.

En la identificación taxonómica de este estudio se corroboró tal como lo indican las claves taxonómicas de Perry (1991) que *Pinus pseudostrobus*, *P. pseudostrobus* forma *protuberans* y *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* son parecidos entre sí y se pueden distinguir de *P. estevezii* y de *Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* por varios caracteres como los son principalmente diferencias en sus conos y en las hojas. Estas diferencias morfológicas consistentes junto con grandes diferencias de la composición de las resinas de los taxa (Mirov, 1967; Perry, 1991) es lo que llevó a Perry (1991) a clasificar la sección *Pseudostrobus sensu* Perry en dos subsecciones, la subsección *Pseudostrobus* y la subsección *Oaxacana*, la primera comprende a *P. pseudostrobus* *P. pseudostrobus* forma *protuberans* y *P. pseudostrobus* forma *megacarpa* además de otro taxa no incluido en el estudio debido a su ubicación geográfica (*P. maximinoi*) y en la subsección *Oaxacana* Perry (1991) incluyó a *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* y *P. estevezii* además de otros taxa también no incluidos en el presente estudio debido a su ubicación geográfica (*P. oaxacana*, *P. pseudostrobus* var. *coatepecensis* y *P. nubicola*).

Los caracteres arriba mencionados fueron los más consistentes y que más ayudaron a diferenciar los taxa y realizar la selección de los 14 ejemplares más representativos para realizar el análisis filogenético basado en secuencias de ADN del cloroplasto con el objetivo de obtener más información que ayude a esclarecer el estatus taxonómico de las especies.

Análisis filogenético inferido mediante ADN del cloroplasto.

Los puntos de mutación encontrados en las especies incluidas en el presente estudio tal y como lo señalan los resultados fueron muy pocos (6 entre los 14 taxa) a pesar de haber utilizado 3 regiones no codificantes del cloroplasto y 1 región codificante de aprox. 1200 pb para construir una matriz de 3414 bp y a partir de esta hacer las inferencias. Las regiones no codificantes han sido de particular interés para estudiar la variación genética del ADN del cloroplasto dentro y entre especies cercanamente relacionadas ya que tienden a evolucionar más rápido que regiones no codificantes, acumulando inserciones y delaciones a una tasa al menos igual que las hacen las sustituciones nucleotídicas (Gielly y Taberlet, 1994). Estas son las razones por las que se utilizaron 3 regiones no codificantes en el presente estudio, sin embargo, de estas solo trnL-trnF mostró variación dejando las regiones trnT-trnL y trnS-trnFm sin ningún punto de mutación entre los taxa. Por otro lado, la región matK es una de las regiones codificantes del ADN del cloroplasto que más se ha utilizado para determinar relaciones filogenéticas en pinos debido a su alta tasa de mutación en comparación de otras secuencias codificantes, sin embargo, en las secuencias analizadas solo se encontraron 3 puntos de mutación entre los 14 taxa.

Los árboles inferidos a partir de las secuencias de ADN del cloroplasto de los 14 taxa seleccionados no pudieron mostrar una separación consistente de los taxa con ninguno de los tres algoritmos utilizados (NJ, MP, ML), generalmente colapsando la información en politomías en el clado de los taxa pertenecientes al grupo, solo *Pinus pseudostrobus* forma *protuberans* (muestra 1.7) y *P. estevezii* (muestra 1.1) ambos colectados en el municipio de Iturbide aparecieron basales al clado de las politomías en el árbol NJ pero los valores bootstrap fueron demasiado bajos siendo 53% y 42% respectivamente, lo cual no refleja una filogenia confiable. También uno de los 4 árboles más parsimoniosos mostró esta topología, sin embargo, el estricto consenso y el majority rule bajo el criterio de MP colapsó todos los taxa del complejo en politomías. Por otro lado, el árbol inferido por el criterio de maximum likelihood obtuvo una politomía completa entre todos los taxa en el estudio excepto para *P. pseudostrobus* forma *protuberans* pero al igual que con los demás algoritmos, al probar la filogenia con análisis bootstrap de 1000 replicas se determinaron un valor bajo para este clado (53%). Diferentes estudios a cerca de las relaciones filogenéticas de diferentes secciones

y subsecciones del género *Pinus* en los cuales se han incluido especies de pinos mexicanos (Favela, 2005; Gernandt *et al.*, 2005; Pérez de la Rosa *et al.*, 1995) han mostrado este tipo de politomías, principalmente en los grupos conocidos como “complejos de especies”. Pérez de la Rosa *et al.* (1995) utilizaron perfiles de restricción de 4 regiones no codificantes del ADN del cloroplasto y obtuvieron politomías en las especies de las subsecciones *Cembroides* y *Ponderosae*, el árbol estricto consenso de Gernandt *et al.* (2005) construido con las regiones codificantes *matK* y *rbcL* concatenadas resultó en una politomía de 11 especies para 14 especies pertenecientes a la subsección *Ponderosae* a la cual pertenece el grupo *Pseudostrobus*, Favela (2005) obtuvo politomías con las especies del complejo *Cembroides* al determinar la filogenia de la subsección *Cembroides*.

Como también se menciona en la primera parte de la discusión “variación morfológica y determinación taxonómica”, la poca diferenciación genética observada en este estudio se cree puede deberse a que se tratan de un grupo muy reciente y que aún puede estar en proceso de especiación (Perry *et al.*, 1998) lo cual por otro lado, también puede dar lugar a eventos de introgresión e hibridación, factor importante en la evolución de muchas plantas (Ellstrand y Schierenbeck, 2000) y que a nivel molecular tienden a retener polimorfismos ancestrales por la captura del cloroplasto provocando ausencia o poca coalescencia entre las secuencias, lo cual se puede traducir en politomías al hacer inferencias filogenéticas basadas en secuencias de ADN del cloroplasto (Willyard *et al.*, 2007), escenario que no tiende a pasar en especies con una divergencias y aislamiento reproductivo mas ancestral en las cuales estos factores favorece que se fijen mutaciones necesarias para separar los taxa y reflejar así su divergencia.

CONCLUSIÓN

Los taxa pertenecientes al complejo *Pseudostrobus* son muy variables morfológicamente pero presentan diferencias morfológicas consistentes que pueden ayudar a su discriminación taxonómica. La propuesta de clasificación taxonómica de de Perry (1991) es la más consistente debido a que las diferencias morfológicas que marca entre los taxa del grupo *Pseudostrobus* coinciden con las diferencias de los taxa incluidos en el presente estudio.

Una filogenia inferida mediante la comparación entre los taxa de 3 secuencias no codificantes de cpDNA y 1 codificante concatenadas, representando una matriz de 3414 caracteres, no fue suficiente para revelar las relaciones filogenéticas entre los taxa produciendo politomías, dicha información no se pudo utilizar en el presente estudio como complemento de la taxonomía para resolver el estatus taxonómico de los taxa del complejo *Pseudostrobus* distribuidos en el Estado de Nuevo León.

Debido a sus diferencias morfológicas más consistentes se aceptan dentro del complejo *Pseudostrobus* distribuido en el Estado de Nuevo León a las especies *Pinus pseudostrobus*, *P. pseudostrobus* forma *megacarpa*, *P. pseudostrobus* forma *protuberans*, *P. pseudostrobus* var. *apulcensis* y *P. estevezii*. Siendo más afines morfológicamente los tres primeros ya que comparten muchas características entre sí al igual que pasa con los dos últimos.

El estatus taxonómico de los taxa del complejo *Pseudostrobus* aún se encuentra en debate y el arreglo taxonómico determinado en el presente estudio aún no es definitivo, estudios con marcadores moleculares de evolución más rápida ó con más caracteres informativos así como la inclusión de todas las especies del complejo no ubicadas en el área geográfica y un muestreo más completo dentro de su rango de distribución podrían ayudar a obtener mejor evidencia para inferir sus relaciones filogenéticas y tendencias evolutivas para así poder clarificar su estatus taxonómico.

LITERATURA CITADA

- Axelrod, D. 1986. Cenozoic history of some western American pines. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **73**:565-641.
- Bucci, G.M. 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Mol. Ecol.* **7**:1633-1643.
- Carvajal, S. y McVaugh, R. 1992. *Pinus* L. In R. McVaugh, *Flora Novo-Galiciana* 17. 32-100. University of Michigan Herbarium, Ann Arbor.
- Castro, F.P., Pérez de la Rosa, J.A., Vargas, A.G., Velásquez, M.S., Santerre, A., López, T.F., Villalobos, A.R. 2008. Genetic relationships among Mexican white pines (*Pinus*, Pinaceae) based on RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology.* **36**. Pp. 523-530.
- Challenger, A. 1998. Utilización y Conservación de los Ecosistemas Terrestres de México. Pasado, Presente y Futuro. Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Instituto de Biología-UNAM y Agrupación Sierra Madre, A.C., México, D.F.
- Christensen, K. I. y Dar, G. H. 1999. A morphometric study of hybridization between *Pinus mugo* and *P. sylvestris* (Pinaceae). *Acta Horti.* **615**.
- Clegg, M. T. y Zurawski, G. 1991. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny. *Molecular systematics of plants.* Pp. 1-13.
- Delgado, P. y Piñero, D. 2002. Sistemática filogeográfica y sus aplicaciones a la evolución y conservación de los bosques de coníferas de México: el caso de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus*. *Acta universitaria.* Vol. **12**, No. 2.
- Delgado, P., Salas, R., Vásquez, A., Wegier, A., Anzidei, M., Alvarez, E.R., Vendramin, G.G., Piñero, D. 2007. Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb. and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pineaceae): morphological and molecular (cpSSR) evidence. *Int. J. Plant Sci.* **168**, 861– 875.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochem Bull.* **19**: 11-15.
- Dufield, J.W. 1952. Relationships and species hybridization in the genus *Pinus*. *Silvae genetic.* **1**, 93-7.

- Erdtman, H., Kimland, B. y Norin, T. 1966. Wood constituents of *Ducampopinus krempfi* (Lecomte) . *Phytochemistry*, **5**, 927-31.
- Farjon, A. y Styles, B. T. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica, Monograph 75*. The New York Botanical Garden, Bronx, NY
- Favela, L.S. 1991. Taxonomía de *Pinus pseudostrobus* Lindl., *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus hartwegii* Endl. Reporte Científico No. 26. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares, Nuevo León, México. 30 p.
- Favela, L. S. 2005. Taxonomy and genetic variation of pinyon pines (*Pinus* subsection *Cembroides*) in the Northeast of Mexico. *Sciences and Engineering*. Edinburgh Scotland, Edinburgh. **PhD.**: 224.
- Gaeda, G., Kamiya, K. y Harada, K. 2002. Pylogenetic relationships of diploxylon pines (subgenus *Pinus*) based on plasatid sequence data. *Int. J. Plant Sci.* **1663**: 773-747.
- Gaussen, H. 1960. Les gymnospermes actuelles et fossiles. Trav. Lab. Forest. Toulouse Tome 2, sect. 1, pt. 2, chapt. 11. 227p.
- Gernandt, D., Liston, A. y Piñero, D. 2001. Variation on the nrDNA of *Pinus* subsection *Cembroides*: implications for molecular systematic studies of pine species complexes. *Molecular Phylogenetics and evolution*. **21**:3, Pp. 449-2001.
- Gernandt, D. S., Liston, A. y Piñero, D. 2003. Phylogenetics of *Pinus* subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* Inferred from cpDNA Sequences. *Systematic Botany*, **28**(4): 657-673.
- Gernandt, D., Gaeda, G. y Liston, A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* **54**:29-42.
- Gielly, L., Taberlet, P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies : Noncoding versus rbcL sequences. *Mol. Biol. Eol.* **11**(5), 769-777.
- Henning, W. 1950. Grundzüge einer Theorie der Phylogenetischen Systematik. Deutscher Zentralverlag, Berlin
- INEGI. 1986. Síntesis Geográfica de Nuevo León. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 170 pp.
- INEGI. 2000. Marco Geoestadístico.
- Koeppen, W. 1948. Climatología. Fondo de la cultura económica. México, D.F.
- Krupkin, A. B., Liston, A. y Strauss, S. H. 1996. Phylogenetic analysis of the hard

- pinos (*Pinus* subgenus *Pinus*, *Pinaceae*) from chloroplast DNA restriction site analysis. *Amer. J. Bot.* **83**: 489–498.
- Libby, W. 1958. The backcross hybrid Jeffrey x (Jeffrey x Coulter) pine. *J Forest* **56**:840-842.
- Lindley, J. 1839. Miscellaneous notices: Mexican pines. *Bot. Reg.* **25**, 63.
- Liston, A., Robinson, W.A., Piñero, D. y Alvarez, E. R. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (*Pinaceae*) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molec. Phyl. Evol.* **11**: 95-109.
- Liston, A., Gernandt, D. S., Vining, T. F., Campbell, C. S. y Piñero, D. 2003. Molecular phylogeny of *Pinaceae* and *Pinus*. Pp. 107–114 in: Mill, R. R. (ed.), Proceedings of the International Conifer Conference. International Society for Horticultural Science, Brugge. *Acta Hort.* No. 615.
- Little, E. L. Jr. y Critchfield, W. B. 1969. Subdivisions of the Genus *Pinus* (Pines). U.S.D.A. Forest Service Miscellaneous Publication 1144, Washington, D.C.
- Loock, E.E.M. 1950, 1977. The pines of Mexico and British Honduras eds. 1 and 2. Bulletin Union of South Africa Department of Forestry No. **35**. 244p.
- López, U.J. 2002. *Pinus pseudostrobus* Lindl. In: Vozzo, J. A. (ed). Tropical Tree. Seed Manual. United States Department of Agriculture. Forest Service. USA. pp: 636-637.
- Ludon, J.C. 1842. Enciclopedia of trees and shrubs. London, Longman. 1162p.
- Martínez, M. 1948. Los Pinos de México. Ed. Botas. México, D.F. 361 p.
- Masera, C.O. 1992. Carbon emission from deforestation in Mexico: current situation and long-term scenarios. In: Carbon Emissions and Sequestration in Forest: Case Studies from Seven Developing Countries. W Makundi, J Santhaye (eds). Energy and Environment Division. Lawrence Berkeley Laboratory. Berkeley, CA, USA. 49 p.
- Matos, J. A. 1998. A coalescent approach to chloroplast genome relationships within and between populations of *Pinus devoniana* in Mexico. *Aliso* **17**:145-156.
- Matos, J. y Schaal, B. 2000. Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A coalescent approach to hybridization. *Evolution* **54**:1218-1233.
- Meffe, G.K. y Carrol, C.R. 1994. Principles of conservation Biology. Sinauer associates, Sunderland, MA.
- Mirov, N.T. 1958. *Pinus oaxacana*: a new species from Mexico. *Madroño* **14**, 145-76.

- Mirov, N.T. 1967. The genus *Pinus*. The Ronald Press, Nueva York, NY.
- Palacio, P.J. 2000. La condición actual de los recursos forestales en México: resultados del Inventario Forestal Nacional 2000. *Investigaciones Geográficas* **43**:183-203
- Palmer, J.D., Cansen, R.K., Michaels H.J., Chase M.K., y Manhart J.R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Garden* **75**: 1180-1206.
- Palomera, A. V., Castro, F. P., Villalobos, A. A. 2008. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*). *African journal of Biotechnology*, **7**, 051-054.
- Pérez de la Rosa, J., Harriz, S.A. y Farjon, A. 1995. Noncoding chloroplast DNA variation in Mexican pines. *Theoretical and Applied Genetics*, **91**, 1001-6.
- Perry, P.J. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231 p.
- Perry, P.J, Graham A., Richardson, M.D. 1998. The history of pines in Mexico and Central America. Pp. 137-149 in: Richardson, D. M. (ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Posada, D. y Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14** (9): 817-818.
- Price, R. A., Liston, A., y Strauss S. H. 1998. Phylogeny and Systematics of *Pinus*. *Ecology and Biogeography of Pinus*. D.M. Richardson. Cambridge, Cambridge University Press:49-68.
- Resendiz, F.B. 2009. Taxonomía, Distribución y Ecología del género *Pinus* L. (Pinaceae) en el Noreste de México. Facultad de Ciencias Biológicas UANL. Tesis de licenciatura.
- Rzwedowski, J. y Reyna, T. 1990. Tópicos biogeográficos. Atlas nacional de México, vol. III, instituto de geografía, UNAM, México D.F.
- Shaw, G.R. 1909. The pines of Mexico. *Publications of the Arnold Arboretum* **1**. 29p.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Clegg, M.T. y Drubin, M. 1991. Intraspecific chloroplast DNA variation; systematic and phylogenetic implication. Pp. 117-150 in Soltis, P.S., Soltis, D.E. y Doyle, J.J., eds. *Molecular systematics of plants*. Chapman & Hall, new York.
- Stead, J.W. y Styles B.T. 1984. Studies of Central American pines: a revision of the 'Pseudostrobus' group. *Bot. J. Linnean Soc.* **89**:249- 275.

- Styles, B.T. 1993. Genus *Pinus* a Mexican purview. In: Biological diversity of México: Origin and distribution. Bye, R., Lot, A., and Fa, J. Eds. Oxford University Press. New York, U.S.A. pp:397-420.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods, version 4.0b10). Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Syring, J., Willyard, A., Cronn, R. y Liston, A. 2005. Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci. *American Journal of Botany* **92**(12): 2086-2100.
- Taberlet, P.L., Geilly, G., Auton, P. y Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology* **17**, 1105-1109.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**:4876-4882.
- Van der Burgh, J. 1973. Hölzer der niederrheinischen Braunkohlenformation, 2. Hölzer der Braunkohlengruben "Maria Theresia" zu Herzogenerath, "Zukunft West" zu Eschweiler und "Victor" (Zülpich Mitte) zu Zulpich. Nebts einer systematisch-anatomischen Bearbeitung der Gattung *Pinus* L. Rev. *Paleobot. Palyn.* **15**: 73-275.
- Velazco, M.C. 2009. Analisis florístico del Estado de Nuevo León, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis doctoral.
- Wang, X.-R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K. y Szmidt, A. E. 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. *Amer. J. Bot.* **86**: 1742-1753.
- Wang, X.-Q., Tank, D. C. y Sang, T. 2000. Phylogeny and divergence times in Pinaceae: evidence from three genomes. *Molec. Biol. Evol.* **17**: 773-781.
- Willyard, A. J., Syring V., Germandt D. S., Liston A., y Cronn R. 2007. Fossil

- Calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Mol. Biol. Evol.* **24**:90-101.
- Willyard, A., Cronn, J., Liston, A. 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. *Molecular phylogenetics and evolution* **52**: 498-511.
- Xiang, Q-Y., Soltis, D.E., Morgan, D.R. y Soltis, P.S. 1993. Phylogenetic relationships of *Cornus* L. *sensu lato* and putative relatives inferred from rbcL sequence data. *Ann. Mo. Bot. Garden* **80**: 9054-9058.
- Zhang, Z.-Y. y Li, D.-Z. 2004. Molecular phylogeny on section *Parrya* of *Pinus* (Pinaceae) based on chloroplast matK gene sequence data. *Acta Botanica Sinica*. **46**: 171-179.
- Zobel, B. 1951. The natural hybrid between Coulter and Jeffrey pines. *Evolution* **5**:405-413.

