

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



Facultad de Ciencias

Filogeografía de las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* revelada por microsatélites de cloroplasto

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

Alejandra Ortiz Medrano

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Daniel Piñero Dalmau

2007



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Filogeografía de las poblaciones mexicanas de Pinus ayacahuite revelada por microsatélites de cloroplasto"

realizado por **Ortíz Medrano Alejandra**, con número de cuenta **300502462** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez

Propietario Dra. Erika Aguirre Planter

Tutor(a)
Propietario Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Suplente Biól. Alejandra Citlalli Moreno Letelier

Suplente Biól. Jaime Gasca Pineda

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 5 de noviembre del 2007
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Hoja de datos del jurado

<p>1. Datos del alumno Ortiz Medrano Alejandra 55 91 11 97 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 300502462</p>
<p>2. Datos del tutor Dr. Daniel Piñero Dalmau</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. Erika Aguirre Planter</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Biól. Jaime Gasca Pineda</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Biól. Alejandra Citlalli Moreno Letelier</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Filogeografía de las poblaciones mexicanas de <i>Pinus ayacahuite</i> revelada por microsatélites de cloroplasto 62 p 2007</p>

A Tere, Luismi y Ana

Índice

INTRODUCCIÓN	1
El género Pinus	1
Estructura genética de las poblaciones	2
Filogeografía	4
Marcadores moleculares	4
Microsatélites	5
Homoplasia	7
La especie	8
Justificación	9
Objetivos	10
MATERIAL Y MÉTODO	11
Colectas	11
Extracción de ADN	11
Amplificación de microsatélites	11
Variación y estructura genética	13
AMOVA	14
Homoplasia molecularmente accesible	14
Filogeografía y demografía histórica	15
Red de haplotipos	16
Distribución mismatch	17
RESULTADOS	18
Diversidad genética	18
Estructuración genética	22
Diversidad genética dentro de los grupos	23
Red de haplotipos	24
Contribución de las mutaciones paso a paso – prueba de permutaciones alélicas	25
Prueba de Mantel	26
Distribución mismatch o de diferencias pareadas	27
DISCUSIÓN	31
Diversidad genética	31
Homoplasia	33
Filogeografía y demografía histórica	36
Red de haplotipos	38
Estructuración dentro de los grupos	38
Estructuración entre grupos	39
Tiempo generacional y tiempo de expansión	40

Vicarianza: el Istmo de Tehuantepec	41
Ejemplos de vicarianza en otros taxa	43
Refugios pleistocénicos de especies de zonas templadas en latitudes tropicales	44
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	47
APÉNDICES	57

Resumen

Los patrones geográficos de la variación genética han mostrado ser el resultado de fenómenos contemporáneos, históricos, y/o una combinación de ambos, en este sentido los estudios filogeográficos han ayudado a caracterizar los impactos de eventos geológicos en las especies, así como su demografía histórica. *Pinus ayacahuite* se distribuye en zonas templadas de latitudes tropicales de México y Centroamérica, en este estudio se determinó la estructura filogeográfica y los procesos demográficos que han operado en las poblaciones de esta especie para relacionarlos con procesos históricos como las glaciaciones del Pleistoceno. Se amplificaron tres microsatélites de cloroplasto en 198 individuos de 14 poblaciones mexicanas, se encontraron 12 haplotipos con los cuales se detectó niveles medios de diversidad genética ($H_e = 0.705$) con un índice de homoplasia de 0.257. Se definieron dos grupos máximamente diferenciados con un análisis espacial de varianza molecular. Entre estos grupos se detecta correlación significativa entre las distancias genéticas y las geográficas, pero no dentro de ellos. La comparación de R_{ST} y pR_{ST} indica que existe estructura filogeográfica en la muestra dada por la existencia de los dos grupos y su relación, y no por las poblaciones dentro de cada grupo, lo cual es consistente con un modelo donde en escalas pequeñas el flujo génico ha determinado la baja diferenciación que se encuentra dentro de los grupos, y donde en escalas grandes el determinante ha sido la mutación. Se detectaron dos expansiones demográficas, la primera en toda la especie, y la segunda sólo en las poblaciones más sureñas. Estos resultados son apoyados por evidencias biogeográficas, palinológicas y filogeográficas de otras especies, que muestran que el Istmo de Tehuantepec funcionó como corredor para las especies de afinidades templadas en algún periodo frío de inicios del Pleistoceno, y después como una barrera.

Abstract

The geographical patterns of genetic variation have demonstrated to be the result of contemporary or historical phenomena, the phylogeographic studies have helped to characterize the impact of geological events in the species, as well as their demographic history. *Pinus ayacahuite* is distributed in temperate zones of tropical latitudes in México and Central America, in this study the phylogeographic structure and the demographic processes that have operated in the populations were determined in order to relate them with historical processes such as the Pleistocene glaciations. Three chloroplast microsatellites were amplified in 198 individuals from 14 Mexican populations, 12 haplotypes were found which gave an average genetic diversity ($H_e = 0.705$) with a homoplasmy index of 0.257. Two maximally differentiated groups were determined with a spatial analysis of molecular variance. Between these two groups significant correlation is detected between the genetic and geographic distances, but not within them. The comparison of R_{ST} and pR_{ST} suggest that a phylogeographic structure exists in the sample, and that this is given by the

existence of the two groups and not by the populations within each group, this is consistent with a model where in small scales the gene flow have determined the low differentiation found within the groups, and in large scales the determinant has been the mutation. Two demographic expansions were detected, the first one in the whole species, the second only in the most southern populations. These results are supported by biogeographic, palinologic and other's species phylogeographic evidence, which show that the Tehuantepec Isthmus worked as a corridor for species with template affinities in some cold period at the beginning of the Pleistocene, and later as a barrier.

Agradecimientos

A mis papás Tere y Luis Miguel por todo, lo genético y lo no genético.

A Daniel Piñero por haberme metido en esto y por mostrarme lo suficiente como para seguirme metiendo.

A Carlos, el amor de mi vida (hasta ahora), por todísimo, especialmente por aguantarme, sostenerme y creerme.

A todos los integrantes del laboratorio de Genética y Evolución, ya que cada uno ayudó en su debido momento y me soportaron durante este tiempo.

A Alejandra Moreno por proporcionarme sus datos (sin ellos esta tesis no sería).

A mis sinodales por haber aceptado serlo y por sus comentarios que fueron de gran utilidad.

A todos mis amigos que me es imposible nombrarlos a cada uno, pero supongo que todos se darán por aludidos.

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo de los proyectos DGAPA PAPIIT-IN215406 y SEMARNAT-CONACYT C01-201/A1

Parece cierto que el hombre –quizá aún más la mujer- tiene necesidad de algunas dosis de ficción, esto es, necesita lo imaginario además de lo acaecido y real. No me atrevería a emplear expresiones que encuentro trilladas o cursis, como lo sería asegurar que el ser humano necesita “soñar” o “evadirse” (...). Prefiero decir más bien que necesita conocer lo posible además de lo cierto, las conjeturas y las hipótesis y los fracasos además de los hechos, lo descartado y lo que pudo ser además de lo que fue.

Javier Marías

INTRODUCCIÓN

El género *Pinus*

El género *Pinus* tiene aproximadamente 110 especies descritas, de las cuales alrededor del 50% habitan en México, haciendo de este país el de mayor diversidad de este género en el mundo. Los pinos se distribuyen principalmente en Norteamérica y Eurasia: en Norteamérica se reconocen tres regiones de alta diversidad; México, California y el sureste de los Estados Unidos (Farjon y Styles 1997). En México hay seis principales regiones de distribución de este género: la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental, el Eje Volcánico Transversal y Mesa Central, la Sierra de Juárez y Sierra San Pedro Mártir en Baja California, la Sierra Madre del Sur y Macizo de Oaxaca, y las tierras altas de Chiapas (Farjon y Styles 1997), las cuales coinciden con las zonas de endemismo propuestas para zonas montañosas por Marshall y Liebherr (2000).

El posible origen de *Pinus* se sitúa en el hemisferio norte, durante el Triásico. Para el Cretácico los dos grupos principales de pinos, Haploxylon (subgénero *Strobus*) y Diploxylon (subgénero *Pinus*) ya estaban diferenciados (Farjon y Styles 1997). Las palinofloras del Terciario en México registran la presencia más antigua de pinos en el norte de este país hace 30 millones de años en el Oligoceno. Durante el Mioceno se encuentra a los géneros *Pinus* y *Picea* en lo que hoy es el estado de Veracruz, aunque con una representación muy pobre. Es durante el Plioceno que tanto la abundancia como la diversidad de los elementos de flora nortea de climas templados aumentan hacia el sur de México y Centroamérica, pues existe una buena representación en el registro fósil de *Abies*, *Picea*, *Alnus*, *Pinus*, *Quercus*, *Ulmus*, entre otros (Graham 1999). En este registro de elementos de climas templados en Latinoamérica se observa un patrón que incluye al tiempo (temprano a tardío) y a la dirección (norte a sur), y coincide con los cambios climáticos que sucedieron en esos periodos.

El clima global durante el periodo Terciario se caracteriza por tres marcadas disminuciones de temperatura, uno en el límite Eoceno-Oligoceno, otro en el Mioceno temprano a medio. Durante el Plioceno temprano las condiciones fueron de enfriamiento estable, y al llegar al Plioceno tardío se da el tercer enfriamiento drástico que culmina en el límite Plioceno-Pleistoceno, el cual corresponde al inicio de las glaciaciones del Cuaternario (Savin 1977). El Pleistoceno se caracteriza por haber tenido varias glaciaciones, cada una de las cuales consistió en un periodo de lento enfriamiento, acumulación y propagación de hielo, para después tener una rápida elevación de temperatura que derritió los hielos y culminó con un periodo interglacial cálido. En cada glaciación, (fueron al menos ocho, EPICA community members 2004) las especies se movieron

temporalmente a latitudes más bajas o altitudes más bajas en las montañas. Estos periodos de enfriamiento global llegaron a las montañas de lo que actualmente es México y la región tropical. En este tiempo las coníferas se desplazaron hacia el sur, en particular los pinos se expandieron hacia Centroamérica. Al elevarse la temperatura en el Holoceno, las poblaciones que se encontraban en lugares tropicales migraron hacia altitudes mayores (Daubenmire 1978), lo que puede explicar la distribución actual de varias especies, así como su diversificación y subsecuente especiación, que a su vez pudieron haber tenido consecuencias genéticas.

Un ejemplo clásico de historia postglacial para pinos en Europa es el de *Pinus sylvestris* (Sinclair *et al.* 1999), donde con RFLPs se analiza la variación intraespecífica del ADN mitocondrial de esta especie, y se encuentran tres principales mitotipos, cada uno con una distribución geográfica particular, con lo cual se sugiere que las poblaciones actuales de este pino en Europa se derivan de al menos tres refugios glaciales situados en el Mediterráneo. Un resultado similar fue encontrado en ocho especies de *Quercus* (Dumolin-Lapègue *et al.* 1997), donde se sugieren tres refugios glaciales situados en España, Italia y los Balcanes.

Estructura genética de las poblaciones

La estructura genética de las poblaciones analiza la distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones e involucra la distribución de alelos o haplotipos en el tiempo y el espacio. Esta estructura es el resultado de las fuerzas evolutivas que han estado operando a lo largo de la historia de las poblaciones, como pueden ser la mutación, la deriva génica, la selección natural y el flujo génico (Hartl y Clark 1989). Todas esas fuerzas pueden llevar a la diferenciación genética de las poblaciones, sin embargo es el flujo génico la que determina principalmente el grado de conectividad genética, ya que si el flujo es alto tiene el efecto de homogenizar la variación genética, pero si es bajo es cuando las otras fuerzas que actúan en cada una de las poblaciones por separado pueden llevar a la diferenciación de éstas (Hedrick 2003).

La estructura genética de una población y el establecimiento de linajes evolutivamente independientes están fuertemente influenciados por el patrón de intercambio genético (flujo génico) entre y dentro de las poblaciones, es así que el mecanismo por el cual los genes migran es también un determinante de la estructura genética. En plantas, el flujo génico ocurre a través del movimiento de semillas o polen. La variación genética está estructurada no sólo por las fuerzas contemporáneas de flujo génico sino también por patrones históricos de relaciones entre las poblaciones, ya que si entre dos especies o poblaciones termina por completo el intercambio genético, el único determinante de similitud genética entre ellas serían los ancestros en común (Schaal *et al.* 1998), por lo que se puede decir que los determinantes primarios de la estructura

genética son los patrones de intercambio génico actuales (flujo génico) y los patrones de relaciones históricas.

Existen varias medidas de la diferenciación genética, siendo las más importantes los coeficientes F de Wright. F_{ST} es un parámetro que describe el grado de diferenciación entre poblaciones, se define como la correlación de estados alélicos entre los genes muestreados de las poblaciones (Excoffier *et al.* 1992), o como la correlación de genes en diferentes individuos en la misma población, es decir, la coancestría (Weir y Cockerham 1984). Una de sus suposiciones es que la tasa de mutación es baja, al menos mucho más baja que la tasa de migración, por lo que se ha sugerido que podría no ser un estimador adecuado para microsatélites (Slatkin 1995, Goldstein *et al.* 1995). Una alternativa a este problema fue propuesta por Slatkin (1995) al crear un estadístico que tomara en cuenta la información de los tamaños alélicos. R_{ST} es un análogo de F_{ST} basado en la correlación de los tamaños alélicos y no en su estado.

Ambos parámetros sólo describen la estructura genética de las poblaciones, sin embargo no distinguen entre los efectos históricos de los procesos recurrentes (Schaal *et al.* 1998), por ejemplo en especies donde el flujo génico a lo largo de su rango está restringido, serían los eventos históricos como las expansiones, fragmentaciones y cuellos de botella los determinantes más fuertes en la estructura sobre los procesos actuales. La similitud genética entre esas poblaciones se debería a ancestría común, es decir, relaciones filogenéticas.

Para poder inferir relaciones filogenéticas se requiere que los variantes genéticos no formen linajes reticulares, por lo que los acercamientos filogenéticos no pueden ser directamente aplicados a nivel de individuos o poblaciones, ya que éstos se caracterizan por tener patrones reticulares de intercambio genético como la recombinación sexual y el flujo génico (Schaal *et al.* 1998). Para tener entonces un acercamiento de este tipo a nivel intraespecífico, se pueden analizar variantes haplotípicos ya que tienen la ventaja de que no forman linajes reticulares y por lo tanto se pueden formar genealogías que den información histórica, debido a que en una filogenia de variantes haplotípicos las relaciones históricas entre ellos pueden ser deducidas del número y la secuencia de los cambios mutacionales que han ocurrido (Avice 1989). Un árbol de genes es la filogenia de los alelos o de los haplotipos de un segmento de ADN (Avice 1989), la relación entre esta filogenia y su distribución geográfica constituye el patrón filogeográfico de una especie.

Filogeografía

El análisis de la distribución espacial de las genealogías de haplotipos es la base de la filogeografía, disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución

geográfica de linajes genealógicos, y enfatiza así los aspectos históricos de las distribuciones espaciales de genes, especialmente aquellos dentro y entre especies cercanamente relacionadas (Avise 1998, Schaal *et al.* 1998, Avise 2001). Este análisis y su interpretación muchas veces requieren de datos de otras disciplinas, como la genética molecular, la genética de poblaciones, la filogenética, la demografía, la etología y la geografía histórica (Avise 1998).

El término fue acuñado por Avise *et al.* en 1987 con la introducción del ADN mitocondrial a los análisis de genética de poblaciones y con esto el cambio de pensamiento genealógico a un nivel intraespecífico. La elección del ADN mitocondrial para este tipo de estudios en animales fue particularmente importante, debido a que esta molécula tiene una serie de propiedades que la convierten en un buen sistema para análisis filogenéticos dentro de las especies, como presentar transmisión genética directa sin recombinación (herencia haploide a través de las generaciones), tener juegos de estados de carácter cualitativos cuyas relaciones filogenéticas se pueden inferir, y tasa de mutación lo suficientemente rápida como para detectar variación intraespecífica (Avise *et al.* 1987).

La tasa de mutación del ADN mitocondrial de plantas se presume que es 100 veces menor a la del ADN mitocondrial de animales (Palmer y Herbon 1988). El ADN del cloroplasto de plantas se considera similar al ADN mitocondrial en animales en el sentido de que pueden tratarse como una unidad de herencia sin recombinación, y a pesar de que el cloroplasto en plantas tiene un menor nivel de variación que la mitocondria en animales, su variación es suficiente para los análisis filogeográficos, por lo que la mayoría de estos estudios en plantas usan a esta molécula como fuente de variación genética, donde esta última se revela con enzimas de restricción, el genoma entero del cloroplasto y microsatélites (Schaal *et al.* 1998).

Marcadores moleculares

Un marcador molecular es un segmento específico de ADN que puede ser identificado. Los marcadores moleculares dan información sobre la variación alélica en un locus dado. Las aloenzimas fueron los primeros marcadores moleculares en ser establecidos, los primeros estudios con ellos mostraron una gran cantidad de polimorfismos dentro de las poblaciones, lo cual llevó directamente a postular la teoría neutral de la evolución (Schlötterer 2004). Sin embargo, no son un método directo para cuantificar la variación en el ADN y por lo tanto no son tan sensibles a los cambios a nivel nucleotídico que pueden ocurrir en esta molécula. Después surgieron los marcadores basados en ADN, donde se puede cuantificar directamente el número de mutaciones entre diferentes alelos. Dentro de estos marcadores se encuentran los basados en PCR, técnica con la cual se logró un gran avance en los marcadores moleculares, ya que cualquier región del

genoma se volvió potencialmente amplificable para ser analizada en muchos individuos sin la necesidad de clonar (Schlötterer 2004). Dentro de esta última categoría se encuentran los RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNAs*), los ISSRs (*Inter-Simple-Sequence-Repeats*), los IRAPs (*Itero Retrotansposon Amplified Polymorphism*), los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y los microsatélites. Desde el descubrimiento de los microsatélites se ha ido incrementando su uso como marcadores moleculares en este tipo de estudios, especialmente en coníferas (Navascués y Emerson 2005).

Todos los marcadores moleculares dependen del proceso mutacional por el cual se genera variación en ellos, sin embargo estos procesos son complejos y poco entendidos (Schlötterer 2004). Los dos principales modelos de mutación son el de alelos infinitos (*Infinite Alleles Model*, IAM, Kimura y Crow 1964) y el de mutación paso a paso (*Stepwise Mutation Model*, SMM, Kimura y Ohta 1978). En el modelo de alelos infinitos cada mutación crea un nuevo alelo al azar, por lo que lo que importa en la diferenciación entre ellos es solamente su estado.

El modelo de mutación paso a paso asume que una secuencia de estados alélicos puede ser expresada como números enteros (... A_{10} , A_{11} , A_{12} ...), y entonces si un alelo cambia de estado por mutación, se mueve un paso en dirección positiva o en dirección negativa en el espacio alélico (Fig. 1). Esto implica que dos alelos que son diferentes en una repetición están más cercanamente relacionados que los alelos que difieren por varias repeticiones. El tamaño importa al hacer pruebas estadísticas de estructura poblacional.

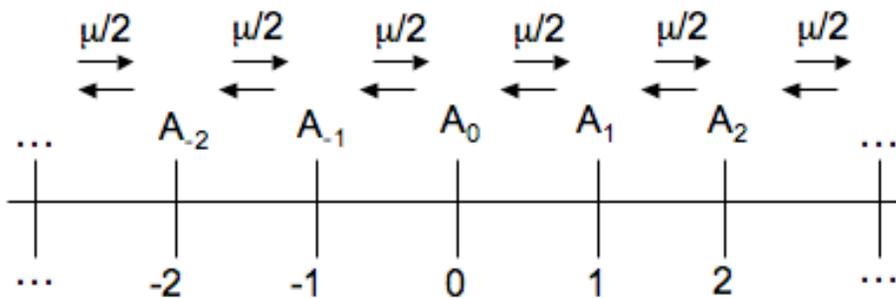


Figura 1. Modelo de mutación paso a paso. Modificado de Nei y Kumar (2000).

Microsatélites

Los microsatélites son secuencias simples y cortas (de una a seis bases) que se repiten en tandem en segmentos de menos de 1 kilobase y se encuentran en mayor o menor abundancia en el

genoma de todos los organismos eucariontes y organelos. Otro nombre por el cual se les conoce es el de *short simple sequense repeat* (SSSR).

Se sabe que las secuencias de microsatélites pueden ser diferentes en el número de repeticiones de individuo a individuo, en general son muy polimórficos y se consideran selectivamente neutros, por lo que se han convertido en un marcador molecular muy popular para los estudios de genética de poblaciones (Chambers y MacAvoy 2000, Schlöterer 2000). Los microsatélites de cloroplasto consisten en motivos de mononucleótidos que se repiten de ocho a 15 veces y se distinguen de los nucleares en dos rasgos principales: son heredados uniparentalmente, en algunas especies es vía materna y en otras vía paterna, por lo que proveen información del linaje de sólo uno de los sexos. En segundo lugar, el cromosoma del cloroplasto es una molécula no recombinante y por lo tanto todos sus loci están ligados (Navascués y Emerson 2005). Particularmente en pinos se ha comprobado la existencia de polimorfismos de microsatélites de cloroplasto (Vendramin *et al.* 1996). Estos marcadores se han utilizado exitosamente en el estudio de estructura genética de poblaciones y filogeografía de coníferas (Petit *et al.* 2002, Burban y Petit 2003, Afzal-Raffi y Dodd 2007), y en algunos casos se ha encontrado que son de mayor utilidad que otros marcadores para este tipo de estudios debido a sus altos niveles de variación (Escalante 2001). Esta alta resolución de los microsatélites en comparación con otros marcadores se debe a que están entre las secuencias más variables en el genoma (Ellegren 2004), por lo que en general los polimorfismos son comunes y tienen alta heterocigosis, en particular en el genoma del cloroplasto existen varios estudios donde se muestra los niveles de diversidad mucho más altos en microsatélites que en RFLPs e isoenzimas (varios ejemplos en Provan *et al.* 2001),

Los microsatélites pueden ser perfectos, imperfectos o compuestos. Los primeros consisten en una secuencia del mismo motivo repetido varias veces; los imperfectos, también conocidos como interrumpidos, son secuencias de repeticiones en tandem interrumpidas por una o más substituciones nucleotídicas; los compuestos pueden verse como un entero formado por porciones de diferentes motivos repetidos (Estoup y Cournet 1999).

El mecanismo predominante por el cual mutan los segmentos de microsatélites es el *slipped-strand mispairing*. Cuando este mecanismo ocurre dentro de un arreglo de microsatélite durante la síntesis de ADN, puede dar como resultado la ganancia o pérdida de una o más unidades de repetición, dependiendo de si la nueva cadena de ADN se curva o la cadena templado lo hace, respectivamente (Chambers y MacAvoy 2000). Los cambios producidos por este mecanismo son compatibles con los polimorfismos de tamaño observados, y una consecuencia de esto es que el

mismo número de repeticiones puede evolucionar en dos diferentes linajes a través de eventos mutacionales independientes, lo que se conoce como homoplasia (Navascués y Emerson 2005).

La forma en que la mutación produce nuevos alelos es un elemento importante para comprender cómo se genera la identidad por estado, y por lo tanto también de cómo se genera la homoplasia, ya que ésta depende directamente del modelo de mutación que se elija para el marcador molecular (Estoup *et al.* 2002). Bajo el IAM no se espera homoplasia, ya que se supone que cada nueva mutación produce un nuevo alelo. En el SMM, los alelos están representados por un número de repeticiones de nucleótidos (tamaño del alelo), y se supone que una mutación incrementa o decrementa el tamaño del alelo en uno, por lo que se espera un cierto grado de homoplasia.

Debido a que los microsatélites mutan por SMM (Valdés *et al.* 1993), las diferencias en el tamaño alélico pueden ser informativas, pues mientras más grande sea la diferencia se espera que hayan pasado más eventos mutacionales desde la ancestría en común, es decir, existe una “memoria” de los eventos mutacionales pasados. Slatkin (1995) y Goldstein *et al.* (1995) mostraron que si el proceso sigue un SMM, entonces la diferencia cuadrada de los tamaños alélicos sigue una función lineal de los tiempos de coalescencia de los alelos comparados. Por el contrario, si el proceso sigue un IAM y por lo tanto las mutaciones resultan en un alelo al azar, la comparación entre dos diferentes alelos da siempre la misma información, el proceso mutacional carece de memoria. De esta forma, se pueden hacer dos tipos de comparación con alelos de microsatélites: diferencias de tamaño y de estado.

Homoplasia

Clásicamente la homoplasia se refiere al hecho de que un carácter presente en dos especies no es derivado del mismo carácter de un ancestro común, sino que son similares debido a factores tales como la convergencia, el paralelismo o la reversión. Cuando se usan marcadores moleculares, la homoplasia ocurre cuando diferentes alelos de un locus son idénticas por estado, pero no son idénticas por descendencia; particularmente en microsatélites, los alelos generalmente se identifican como fragmentos de ADN de diferentes tamaños revelados por métodos electroforéticos, así dos haplotipos pueden ser idénticos en tamaño (electromorfos), pero producto de diferentes linajes evolutivos (Chamber y MacAvoy 2000, Estoup *et al.* 2002). La homoplasia de los electromorfos de microsatélite es llamada homoplasia de tamaño (*Size Homoplasia*, SH).

Existen otros factores evolutivos independientes del modelo de mutación de los cuales depende la homoplasia, como la tasa de mutación, el tamaño efectivo de la población, y el tiempo de divergencia entre poblaciones (la coalescencia). Para acercarse a estas cuestiones, las

simulaciones se pueden usar para calcular los niveles esperados de homoplasia bajo diferentes condiciones (Estoup *et al.* 2002, Navascués y Emerson 2005, Daniel Piñero, com. pers.). En general lo que se ha visto es que a mayor tasa de mutación, mayores tamaños poblacionales y mayores tiempos de coalescencia, aumenta la homoplasia esperada en las muestras; de estos factores, la tasa de mutación parece ser el más significativo. Calcular el porcentaje de homoplasia que existe en una muestra es importante para poder evaluar sus posibles consecuencias en los estimados y por lo tanto para valorar hasta qué punto éstos pueden ser una fuente de error en los análisis.

La especie

Pinus ayacahuite Ehrenberg (subgénero *Strobus*) es una especie típica del sureste de México, aunque se extiende también al centro; se encuentra desde la latitud 15°15'N hasta 20°55'N, y en la longitud de 92°10'W a 103°55'W (Eguiluz Piedra 1978 en Musálem y Ramírez 2003). Crece entre los 2200 y los 3000 msnm y se localiza principalmente en lomas y cañadas, aunque también puede encontrarse en pequeños valles protegidos, puede formar bosques puros pero generalmente se le encuentra asociado a otras especies. Tiene preferencia por lugares sombríos y húmedos, el clima donde se desarrolla es templado caliente con temperaturas medias anuales de 13°C, y los lugares donde se presenta tienen precipitación de 700 a 1200 mm anuales, aunque puede haber meses con menos de 60 mm (Eguiluz Piedra 1978 en Musálem y Ramírez 2003).

La especie fue originalmente descrita por Ehrenberg en 1838, y actualmente se le conocen tres variedades: la variedad *brachyptera* del norte del país, la variedad *veitchii* del centro de éste, y *Pinus ayacahuite* típico (var. *ayacahuite*), aunque existe cierta controversia sobre si la variedad *brachyptera* es en realidad otra especie, *Pinus strobiformis* (Perry 1991, Farjon y Styles 1997, Moreno y Piñero, en preparación, Musálem y Ramírez 2003). Las variedades generalmente se distinguen como el resultado de variaciones menores en el largo de las acículas, el número de éstas, el tamaño del cono, y se considera que las variedades se entrecruzan dentro de las especies (Perry 1991). La distribución de *Pinus ayacahuite* Ehrenberg (var. *ayacahuite*) abarca desde las montañas del sur de México hasta Guatemala, Honduras y El Salvador. En nuestro país se pueden encontrar grupos grandes en las montañas de Chiapas, Oaxaca y Guerrero, y grupos pequeños en Puebla y Tlaxcala (Perry 1991).

La especie se caracteriza por alcanzar alturas de hasta 40 m y diámetro de 2 m. La corteza de los árboles jóvenes es grisácea y suave, mientras que en los árboles adultos se vuelve áspera, gris y dividida en placas rectangulares. Las acículas están en grupos de cinco y miden de 10 a 18 cm de largo, los conos son cilíndricos y afilados hacia la punta, ligeramente curvados y miden de 10 a 40

cm de largo. Las semillas son de color café claro con puntos más oscuros, miden de 5 a 8 mm de largo y tienen un ala bien desarrollada de 30 a 40 mm de largo, tienen de once a trece cotiledones (Musálem y Ramírez 2003).

Su madera se usa en artículos de artesanías, en aserrío, triplay, celulosa, papel, puntales para minas, construcciones y ebanistería (Eguiluz Piedra 1978 en Musálem y Ramírez 2003). Constituye una parte fundamental de los bosques de altura de México; su representación en las cañadas de la alta montaña, lugares de suelo profundo y húmedos, lo convierte en un componente importante en la regulación del ciclo hidrológico, el control de la erosión del suelo, y nicho de flora y fauna de las regiones donde crece (Musálem y Ramírez 2003).

Justificación

Los patrones geográficos de la variación genética han mostrado ser el resultado de fenómenos contemporáneos, históricos, y/o una combinación de ambos (Cuenca *et al.* 2003). El impacto de las glaciaciones en diferentes especies de coníferas ha sido evaluado con métodos filogeográficos en diferentes estudios (Echt *et al.* 1998, Vendramin *et al.* 1999, Marshall *et al.* 2002, Hwang *et al.* 2003), y en particular existen varios que se refieren al género *Pinus* (Afzal-Rafii y Dodd 2007, Moreno y Piñero en preparación, Mitton *et al.* 2000, Bucci *et al.* 2007, Burban y Petit 2003), sin embargo éstos se concentran en especies de Europa y Norteamérica, donde en general los periodos fríos obligaron a las especies a migrar hacia el sur y restringieron sus áreas de distribución a los refugios pleistocénicos, desde donde después, en los periodos postglaciales, pudieron recolonizar hacia el norte. A pesar de que el sureste mexicano es considerado como un área de gran endemismo (Marshall y Liebherr 2000), no existen muchos estudios filogeográficos sobre las especies de afinidades templadas en esta zona, los cuales podrían contribuir al entendimiento de los procesos históricos que dieron forma a la estructura genética actual de las especies. En este sentido, *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite* puede funcionar como un buen modelo para el estudio del impacto de los cambios climáticos históricos en los patrones de distribución de especies de afinidades templadas en climas subtropicales, particularmente del sur de México.

Además, conocer la distribución geográfica de los recursos genéticos y su variación es importante para el planeamiento de estrategias de conservación biológica, cultivo, y también para aumentar el conocimiento sobre la historia evolutiva de las especies ya que las regiones forestales de nuestro país actualmente se encuentran bajo una gran presión antropogénica, la cual se traduce en cambios en la distribución y calidad genética de las poblaciones de árboles (Musálem y Ramírez 2003).

Objetivos

- Estudiar la estructura genética de *Pinus ayacahuite* en México, determinar si existe estructura filogeográfica y explorar las posibles causas históricas de esto.
- Inferir los procesos demográficos que han operado en las poblaciones de *P. ayacahuite*.
- Analizar el grado y efecto que la homoplasia de tamaño puede tener en el estudio.

MATERIAL Y MÉTODO

Colectas

Las poblaciones fueron elegidas tratando de cubrir la distribución sureña de *Pinus ayacahuite* en México, y están basadas en las poblaciones referidas por Farjon y Styles (1997), Perry (1991), y las que aparecen en los herbarios nacionales. En cada población se colectaron acículas de individuos elegidos al azar. Las colectas de Guerrero y Oaxaca fueron realizadas en enero de 2006, y las de Chiapas en julio de 2006. Las colectas del estado de México, Puebla, Hidalgo y Querétaro fueron realizadas entre 2002 y 2005 (Tabla 1).

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total de cada individuo con el protocolo modificado de CTAB 2% (Vázquez-Lobo, 1996).

Amplificación de microsatélites

Se amplificaron tres loci de microsatélites de cloroplasto basados en los polimórficos para *P. strobiformis* (Pt30204, Pt71936 y Pt63718, Moreno y Piñero, en preparación; Vendramin *et al.* 1996) con las siguientes condiciones para un volumen final de 25µl: 10mM de buffer Tris-HCL (Promega), 2.5mM de MgCl₂, 0.2µM de cada primer, 150µM de cada dNTP, 25ng de ADN y 1U de polimerasa Taq (Promega). La amplificación fue hecha en un termociclador Applied Biosystems 2720 con los siguientes parámetros: (1) calentamiento inicial a 95°C por 5 minutos, (2) 25 ciclos de un minuto de desnaturalización a 95°C, alineación a 55°C por 1 minuto, y extensión de 1 minuto a 72°C, (3) extensión final de 1 minuto a 72°C.

Posteriormente se corrieron estos productos en geles de acrilamida 6%, urea 7M, a 60W, con diferentes tiempos de corrida dependiendo del tamaño del microsatélite. Los geles se tiñeron con nitrato de plata, y la determinación del tamaño de los alelos se hizo visualmente, tomando como referencia a un individuo previamente secuenciado cuyo tamaño para cada microsatélite era conocido; este individuo fue corrido en cada gel.

Tabla 1. Poblaciones colectadas de *Pinus ayacahuite* para este estudio.

Estado	Población	Coordenadas	No. de individuos
Chiapas	Rancho Nuevo	16°40'07.3" N, 92°32'25.3" W	20
	Arcotete	16°43'40.2"N, 92°35'05.4"W	16
	El Porvenir	15°25'43.4"N, 92°19'50.2"W	19
Guerrero	Omiltemi	17°33'23.6"N, 99°41'08.0"W	19
Oaxaca	Trinidad	17°15'53.2"N, 96°21'40.9"W	9
	Ixtlán	17°25'06.5"N, 96°29'52.4"W	19
	Suchixtepec	16°06'26.8"N, 96°28'06.2"W	19
Estado de México	San Rafael	19° 21' 38" N, 98° 44' 09" W	17
	Zempoala	19° 02' 54" N 99° 18' 55" W	7
Puebla	Chichicaxtla	19° 44' 17" N 97° 58' 56" W	13
	Ciénega Larga	19° 42' 49" N 98° 05' 02" W	10
Hidalgo	Pueblo Nuevo	20° 10' 44" N 98° 41' 40" W	10
	Agua Blanca	20° 21' 10" N 98° 21' 06" W	11
Querétaro	Pingüica	21° 10' 07" 99° 42' 03"	10

VARIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA

Se asignaron como haplotipos independientes a cada combinación diferente de los tamaños de las variantes en los tres loci utilizados. Para cada población y en total se contaron las frecuencias de cada haplotipo. Con estos datos se estimó la diversidad genética de Nei (a veces llamada heterocigosis promedio), es decir la heterocigosis esperada bajo equilibrio Hardy-Weinberg. La razón de esto es que la heterocigosis esperada depende sólo de las frecuencias alélicas y no depende de la ploidía del organismo, por lo que puede usarse para organelos como el cloroplasto (Hedrick 2003). Está definida como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos en la muestra al azar sean diferentes (Schneider *et al.* 2000), se calcula como

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right)$$

donde n es el tamaño de muestra y p_i la frecuencia del haplotipo i .

La estructura genética de las poblaciones fue estimada con los valores pareados de R_{ST} y F_{ST} . R_{ST} es una medida de diferenciación genética que tiene las mismas propiedades que F_{ST} , pero se asume un modelo de mutación paso a paso el cual es más acorde a la naturaleza de los microsatélites (Slatkin, 1995), ya que bajo este modelo no se borra información sobre el estado alélico ancestral, y en los microsatélites el tamaño del alelo depende del alelo del cual mutó. F_{ST} se deriva del modelo de mutación de alelos infinitos, es por esto que en marcadores donde se encuentran valores altos de heterocigosis (como es el caso de los microatélites) F_{ST} tiene un sesgo donde se subestima la diferenciación genética. La fórmula con la que se calculó cada uno de estos parámetros es la siguiente:

$$F_{ST} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1}$$

$$R_{ST} = \frac{\bar{S} - S_w}{\bar{S}}$$

Donde f_0 es la probabilidad de identidad por descendencia en dos diferentes genes tomados de la misma población, y f_1 es la probabilidad de identidad por descendencia de dos genes tomados de dos diferentes poblaciones. \bar{S} es la suma de los cuadrados de las diferencias en tamaño alélico dentro de cada población, y S_w es el promedio de las diferencias cuadradas entre todos los pares de copias. Ambas fórmulas equivalen a

$$\frac{\bar{t}_1 - \bar{t}_0}{\bar{t}_1}$$

Donde \bar{t}_1 es el tiempo de coalescencia medio de dos genes tomados de dos diferentes poblaciones, y \bar{t}_0 es el tiempo de coalescencia medio de dos genes tomados de la misma población.

La diversidad genética, los valores pareados de F_{ST} y R_{ST} así como el número de migrantes por generación (Nm) basados en estos dos parámetros fueron obtenidos con el software Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

AMOVA

El análisis de varianza (ANOVA o ANDEVA) compara si los valores de un conjunto de datos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. Está basado en la varianza global observada en los grupos de datos a comparar. El análisis de varianza molecular (AMOVA) introducido por Excoffier *et al.* (1992) es parecido a un ANOVA, pero tiene la ventaja de que sus diferentes supuestos pueden ser impuestos al proceso de diferenciación de los haplotipos. Así se construye un análisis jerárquico de varianzas moleculares de una matriz de distancias cuadradas entre todos los pares de haplotipos. Las jerarquías de varianza son “dentro de poblaciones”, “entre poblaciones dentro de grupos” y “entre grupos”, las cuales se traducen como componentes de la diversidad para ver el origen de los variantes haplotípicos. Este análisis introduce tres medidas de correlación haplotípica semejantes a las de los estadísticos F :

Φ_{ST} indica la correlación de haplotipos al azar dentro de poblaciones, relativo a la de pares de haplotipos al azar de toda la especie.

Φ_{CT} indica la correlación de haplotipos al azar dentro de un grupo de poblaciones, relativo a la de pares de haplotipos al azar de toda la especie.

Φ_{SC} indica la correlación de la diversidad molecular de haplotipos al azar dentro de poblaciones, relativo a los pares de haplotipos al azar dentro de un grupo de poblaciones.

Para definir la estructura genética de poblaciones se usó el software SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002). Este programa define grupos de poblaciones que están máximamente diferenciados entre ellos (aquellos para los cuales la proporción de varianza genética total debida a diferencias entre grupos es máxima, o sea Φ_{CT}), con el fin de encontrar barreras genéticas y geográficas.

Homoplasia molecularmente accesible

Debido a que el locus Pt30204 es el único microsatélite compuesto de los usados, se secuenciaron varios individuos de diferentes tamaños para comparar el número electromorfos con el número de haplotipos obtenidos por secuenciación. Las condiciones de PCR fueron las descritas

anteriormente para la amplificación de microsatélites. Los productos fueron purificados de geles de agarosa 1.5% usando el QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

En caso de no haber homoplasia molecularmente accesible (MASH, por sus siglas en inglés), el número de haplotipos obtenidos por secuenciación sería el mismo que el de electromorfos; estos dos resultados pueden utilizarse para calcular el índice de homoplasia P (Navascués y Emerson, 2005):

$$P = 1 - \left(\frac{1 - He_{IAM}}{1 - He_{SMM}} \right)$$

donde He_{IAM} corresponde a la variación genética de los haplotipos obtenidos por secuenciación, y He_{SMM} a la variación genética basadas en el número de electromorfos.

FILOGEOGRAFÍA Y DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

Un patrón filogeográfico ocurre cuando las copias de los genes muestreados en poblaciones cercanas (o dentro de la misma población) llevan alelos que en promedio están más relacionados que otras copias más lejanas geográficamente. Bajo neutralidad, se espera este patrón cuando la tasa de mutación es mayor que la tasa de migración (Hardy *et al.* 2003).

Una forma de probar patrones filogeográficos es con alelos ordenados, es decir alelos donde las diferencias en sus tamaños informen sobre las distancias genéticas. Para probar patrones filogeográficos se puede usar R_{ST} y permutar tamaños alélicos entre alelos.

Se hizo el test de comparación entre F_{ST} y R_{ST} desarrollado por Hardy *et al.* (2003) con el programa SPAGeDI (Hardy y Vekemans 2002). El test compara el valor observado de R_{ST} con el valor esperado cuando las diferencias en los tamaños alélicos no contribuyen a la diferenciación genética (pR_{ST}). Para lograr esto hace un proceso de aleatorización: los diferentes tamaños alélicos observados en un locus son permutados entre los diferentes estados alélicos. Después de esto, cualquier par de genes (individuos) que tenían el mismo estado alélico siguen siendo los mismos, pero sus tamaños pueden ser diferentes, es decir, la información sobre la identidad alélica se mantiene intacta pero no así la información sobre el tamaño de los alelos.

Bajo la hipótesis nula, el procedimiento no debe afectar las medidas de diferenciación como R_{ST} , pero si los tamaños alélicos sí contribuyen a la diferenciación genética, pR_{ST} dependerá sólo de la identidad y tendrá un valor menor a R_{ST} . Es importante notar que pR_{ST} tiene un valor igual al F_{ST} observado de los datos.

La aleatorización de los tamaños alélicos crea replicados de juegos de datos para un proceso de IAM, ya que bajo este modelo los tamaños de los alelos son irrelevantes e intercambiables, así que simula el proceso mutacional pasado que llevó a los datos actuales, pero con otros alelos elegidos al azar después de cada evento mutacional.

Probar R_{ST} global (o sus valores pareados promedio) nos dice si hay una señal filogeográfica dentro de las poblaciones, o sea que contesta la pregunta de si los distintos alelos más relacionados están dentro de las poblaciones o entre ellas (Hardy y Vekemans 2002).

Probar la pendiente de los valores pareados de R_{ST} nos dice si hay una señal filogeográfica entre poblaciones, es decir si los distintos alelos más relacionados están entre poblaciones cercanas o entre poblaciones distantes. Para llevar a cabo este análisis se realizó una prueba de Mantel. La prueba de Mantel es un análisis estadístico de la correlación entre dos matrices, se realizó con el programa XLSTAT para Microsoft Excel. Lo que hace esta prueba es evaluar la relación entre dos matrices al estimar el coeficiente de correlación entre dos juegos de distancias y probar su significancia estadística.

Las distancias geográficas fueron obtenidas con un calculador de distancias entre locaciones geográficas (Bogan, en la red). Para la matriz de distancias genéticas se usaron los valores pareados de R_{ST} .

Red de haplotipos

Las redes de haplotipos se generaron con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000) que utiliza la parsimonia estadística (Templeton *et al.* 1992) para hacer un algoritmo que comienza estimando el número máximo de diferencias entre haplotipos como resultado de sustituciones simples con un 95% de confianza. Este número es el límite de parsimonia. Después se conectan los haplotipos que difieren por un cambio, luego los que difieren por dos cambios, por tres, y así hasta que el límite de parsimonia es alcanzado.

La razón por la que se eligió hacer una red y no un árbol, es que las relaciones genealógicas a nivel poblacional presentan una serie de fenómenos que no son tomados en cuenta por los métodos tradicionales filogenéticos (máxima parsimonia, neighbor joining), en cambio las redes incorporan la información genealógica asociada a la divergencia poblacional, que en general es diferente a la bifurcada que se presenta a nivel de especies (Clement *et al.* 2000).

Distribución mismatch

La distribución mismatch se basa en el hecho de que la información genética molecular, en particular la distribución de diferencias pareadas entre sitios nucleotídicos o de restricción, contiene información sobre los tamaños poblacionales pasados (Rogers 2004). Un crecimiento poblacional súbito produce distribuciones unimodales, mientras que una población con tamaño estable produce distribuciones multimodales.

Para el análisis se utilizó el software Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.* 2005), donde se codificaron los datos de microsatélites binariamente: el número de repeticiones se codificó con "1", y los alelos más cortos se codificaron llenando las diferencias de repeticiones con "0" (Navascués *et al.* 2006; Moreno y Piñero en preparación). El análisis se hizo con toda la muestra de tal manera que los patrones encontrados se refieren a los procesos por los que ha pasado la especie completa, y también para dos grupos diferenciados genéticamente, para encontrar posibles procesos posteriores dentro de estos grupos.

El programa utiliza un algoritmo que minimiza la suma de diferencias cuadradas (SSD, por sus siglas en inglés) entre un modelo y los datos y así estima la combinación de parámetros que se adecuen mejor a los datos ("good of fit", Schneider y Excoffier 1999). El poder del estimado se evalúa con la distribución de SSD, que se obtiene con bootstrap, en este caso de 10 000 réplicas, lo cual da una proporción de bootstraps con SSD más grandes que el original, $p(SSD)$. Un valor significativo de SSD, $p(SSD) < 0.05$, implica que no se acepte el modelo demográfico estimado. Con el bootstrap también se estimó el intervalo de confianza de 95% del parámetro $\hat{\tau}$. $\hat{\tau}$ es un parámetro que mide el tiempo de una época dada (en este caso el tiempo de la expansión poblacional) en unidades de $1/(2\mu)$ generaciones, también llamadas unidades de tiempo mutacional. Cada unidad es la cantidad de tiempo que toma, en promedio, para que una mutación se acumule a lo largo del camino genealógico que separa a dos secuencias o haplotipos (Rogers 2004). La fecha de la expansión poblacional se calculó con la fórmula $\tau = 2L\mu t$, donde L es el número de loci de microsatélites, μ es la tasa de mutación por locus, y t es el tiempo en generaciones (Navascués *et al.* 2006).

RESULTADOS

Diversidad genética

En total fueron analizados 198 individuos de 14 poblaciones. Las combinaciones de los tres loci dieron en total 12 haplotipos basados en los electromorfos (Tabla 2). El haplotipo más común fue H3, con casi la mitad del total de individuos y con representación en todas las poblaciones, excepto por Arcotete (Figura 2, Tabla 3).

Tabla 2. Configuraciones de haplotipos basadas en los electromorfos. Los números representan el tamaño del electromorfo en pares de bases.

Haplotipo	Pt30204	Pt71936	Pt63718
H1	163	147	95
H2	164	147	95
H3	165	147	95
H4	166	147	95
H5	167	147	95
H6	168	147	95
H7	169	147	95
H8	164	147	94
H9	166	147	94
H10	165	146	95
H11	165	147	96
H12	164	147	96

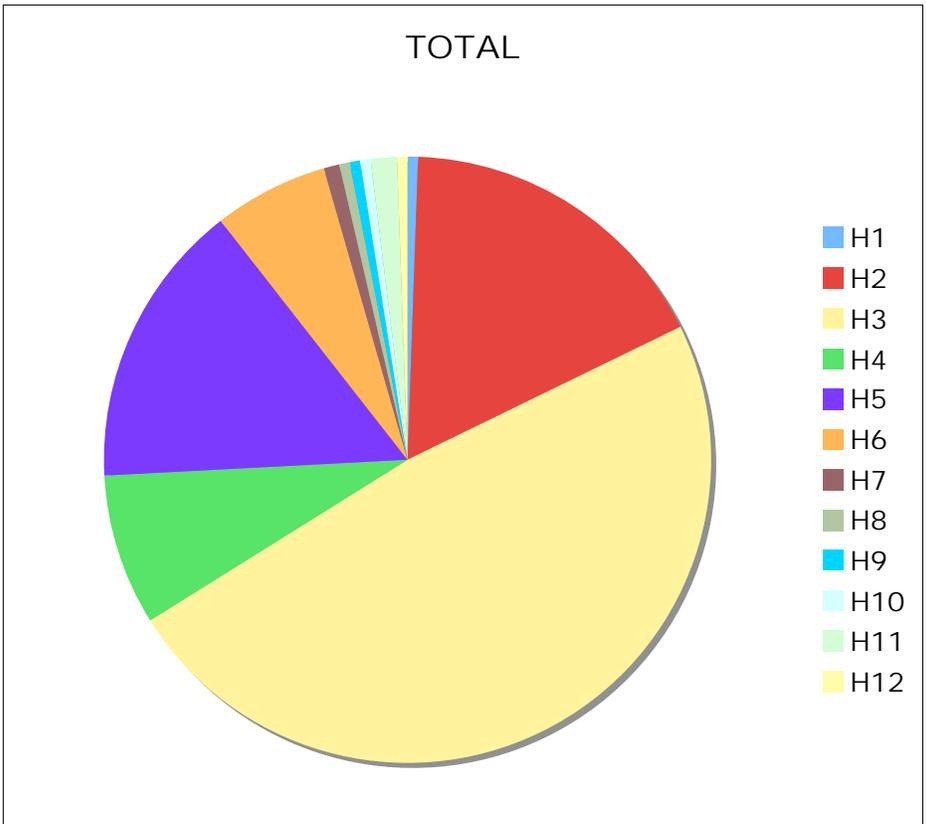


Figura 2. Distribución de los haplotipos en la muestra.

Tabla 3. Frecuencias absolutas de los haplotipos en las poblaciones.

haplotipo	Omitemi	Trinidad	Ixtlán	Suchixtepec	El Porvenir	Arcotete	Rancho Nuevo	San Rafael	Pingüica	Agua Blanca	Chichicaxtla	Ciénega Larga	Pueblo Nuevo	Zempoala	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
h1		1													1	0.0051
h2	1	7	10	1				6		4	1	1		3	34	0.1717
h3	16	1	8	15	1		2	11	8	6	7	7	10	4	96	0.4848
h4	2		1	2	5	1	2		2			1			16	0.0808
h5				1	9	10	10								30	0.1515
h6					3	4	5								12	0.0606
h7					1	1									2	0.0101
h8											1				1	0.0051
h9												1			1	0.0051
h10										1					1	0.0051
h11											3				3	0.0152
h12											1				1	0.0051

El microsatélite Pt30204 fue el que presentó mayor variación, con siete diferentes tamaños en comparación con los microsatélites Pt71936 y Pt63718, que presentaron dos y tres tamaños, respectivamente. Se secuenciaron 28 individuos, en los cuales se encontraron 15 haplotipos diferentes. El microsatélites Pt30204 es un microsatélite compuesto de tres repeticiones, sin embargo sólo dos repeticiones resultaron polimórficas en las secuencias, la configuración más común para este loci fue A(14)A(10)A(10) (Tabla 4).

Tabla 4. Configuraciones de haplotipos basados en la secuenciación. Los números representan el número de repeticiones.

Configuración haplotípica		Pt30204			Pt71936	Pt63718
Tamaño (electromorfos)	Multilocus (secuenciación)	A	A	G	T	T
H1	H1	13	10	9	14	12
H2	H2	13	10	10	14	12
	H3	14	10	9	14	12
H3	H4	13	10	11	14	12
H3	H5	14	10	10	14	12
H4	H6	13	10	12	14	11
	H7	13	10	13	14	11
H5	H8	14	10	12	13	12
	H9	14	10	13	14	13
H7	H10	13	10	15	14	13
H8	H11	14	10	9	14	11
H9	H12	14	10	11	14	11
H10	H13	14	10	10	13	12
H11	H14	14	10	10	14	13
H12	H15	14	10	9	14	13

La diversidad genética para toda la muestra para electromorfos fue de $H_{eSMM} = 0.705$ (0.027), $\theta_{SMM} = 5.260$ $\theta_{IAM} = 1.833$ (0.247). Con los resultados de las secuenciaciones, la diversidad genética tuvo un valor de $H_{eIAM} = 0.797$ (0.022), $\theta_{SMM} = 11.659$ $\theta_{IAM} = 3.112$ (0.458). Esto da un índice de homoplasia molecularmente accesible (MASH) de $P = 0.257$.

La diversidad genética de todas las poblaciones se encuentra en un rango muy amplio (0-0.714), lo cual indica que la diversidad se distribuye de forma heterogénea entre las poblaciones. Tres de los

cuatro valores más altos de diversidad génica pertenecen a las poblaciones más sureñas (Arcotete, El Porvenir y Rancho Nuevo) (Tabla 5).

Tabla 5. Diversidad genética de cada población basada en electromorfos.

Población	He	θ_{SMM}	θ_{IAM}
Omitemi	0.292 (0.127)	0.439	0.308 (0.189)
Trinidad	0.417 (0.191)	0.970	0.532 (0.419)
Ixtlán	0.573 (0.061)	2.244	1.007 (0.258)
Suchixtepec	0.380 (0.134)	0.801	0.0457(0.261)
Arcotete	0.575 (0.115)	2.268	1.015 (0.488)
Rancho Nuevo	0.667(0.086)	4.000	1.519(0.614)
El Porvenir	0.713 (0.077)	5.589	1.911 (0.763)
San Rafael	0.485 (0.079)	1.387	0.704 (0.224)
Pingüica	0.356 (0.159)	0.704	0.411 (0.285)
Agua Blanca	0.618 (0.104)	2.930	1.220 (0.553)
Chichicaxtla	0.692 (0.119)	4.781	1.718 (1.004)
Ciénega Larga	0.533 (0.180)	1.800	0.855 (0.628)
Pueblo Nuevo	0 (0)	0	0
Zempoala	0.571 (0.120)	2.222	1 (0.498)

Estructuración genética

El valor de Φ_{CT} más alto definido por SAMOVA 1.0 se encontró con dos grupos de poblaciones: el primero (grupo A) formado por las poblaciones de El Porvenir, Rancho Nuevo y Arcotete, el segundo (grupo B) por las poblaciones de Omitemi, Trinidad, Ixtlán, Suchixtepec, San Rafael, Pingüica, Agua Blanca, Chichicaxtla, Ciénega Larga, Pueblo Nuevo y Zempoala. El AMOVA para estos grupos muestra que 83.19% de la variación encontrada es entre grupos, 2.53% entre poblaciones dentro de los grupos, y 14.28% entre poblaciones. (Fig. 3). Los índices de fijación fueron $F_{SC} = 0.150$, $F_{ST} = 0.857$, $F_{CT} = 0.832$.

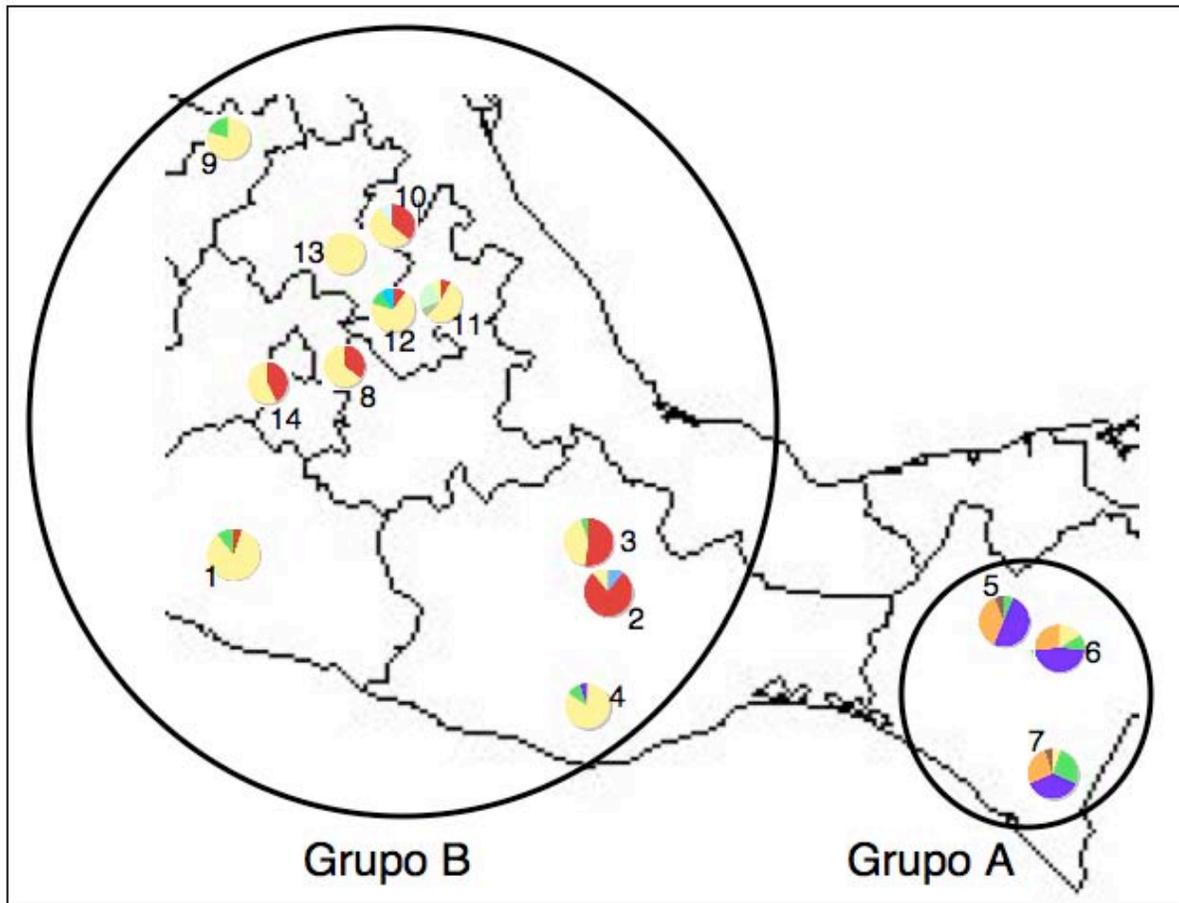


Figura 3. Mapa con las poblaciones y su configuración haplotípica. Los colores siguen el patrón de la figura 1. Los dos círculos grandes agrupan a los dos grupos definidos por SAMOVA. Los números de las poblaciones corresponden a: 1- Omiltemi, 2- Trinidad, 3- Ixtlán, 4- Suchixtepec, 5- Arcotete, 6- Rancho Nuevo, 7- El Porvenir, 8- San Rafael, 9- Pingüica, 10- Agua Blanca, 11- Chichicaxtla, 12- Ciénega Larga, 13- Pueblo Nuevo, 14- Zempoala.

Diversidad genética dentro de los grupos

La diversidad genética de los grupos resultó diferente tanto de la total como entre ellos, Tabla 6

Tabla 6. Diversidad genética de los grupos.

Grupo	He	θ_{SMM}	θ_{IAM}
A	0.648 (0.053)	3.531	1.392 (0.336)
B	0.527 (0.039)	1.735	0.833 (0.134)

El AMOVA para el grupo A muestra que el 99.06% de la variación encontrada está dentro de las poblaciones, mientras que el 0.94% está entre poblaciones. Para el grupo B 75.11% de la variación está dentro de las poblaciones y 24.89% entre ellas.

Red de haplotipos

En la red de haplotipos generada por TCS se incluyó la información sobre las distribuciones geográficas de los haplotipos, basada en los dos grupos definidos por SAMOVA 1.0. Figura 4.

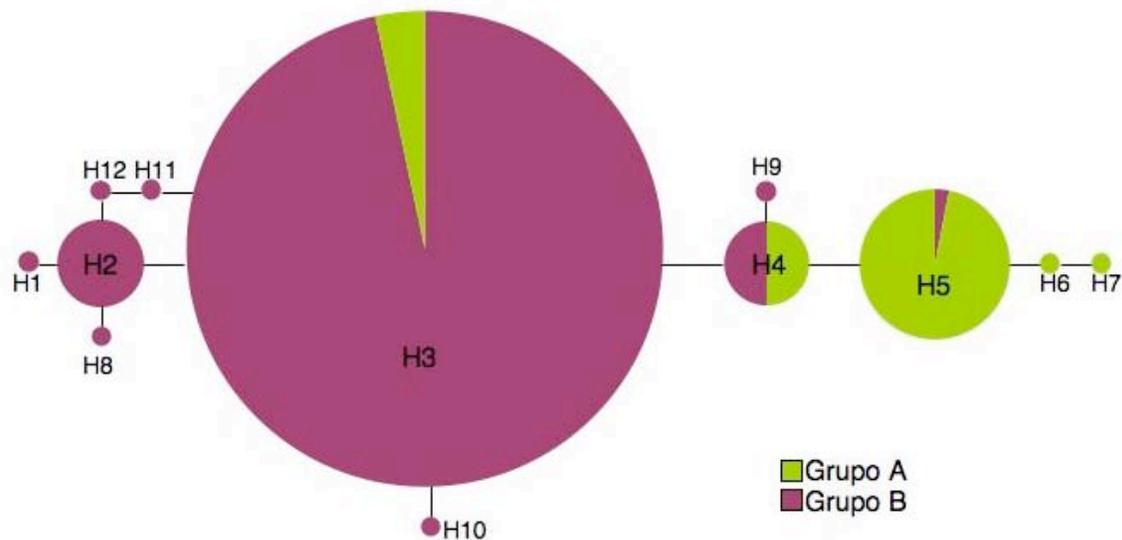


Figura 4. Red de haplotipos. El tamaño de los círculos representa su frecuencia en la muestra.

Se observan dos clados, por un lado el correspondiente al grupo B donde los haplotipos predominantes son el H2 y el H3, y por el otro el que corresponde al grupo A, donde el haplotipo predominante es el H5; H3, a pesar de ser el haplotipo más común en la muestra con una frecuencia de casi el 50%, sólo representa menos del 6% del grupo A. El segundo haplotipo más abundante en la muestra, H2, no se encuentra en ninguna población del grupo A, mientras que H5 representa el 53.7% del grupo A, y sólo tiene un individuo en el grupo B. A pesar de estas marcadas diferencias entre los grupos, la red de haplotipos no muestra grandes discontinuidades genéticas, ningún haplotipo se distingue de sus más cercanos por más de un paso mutacional, lo cual indica que divergieron recientemente (Templeton 2006).

Se generó también la red de haplotipos con los 15 haplotipos multilocus (Fig. 5).

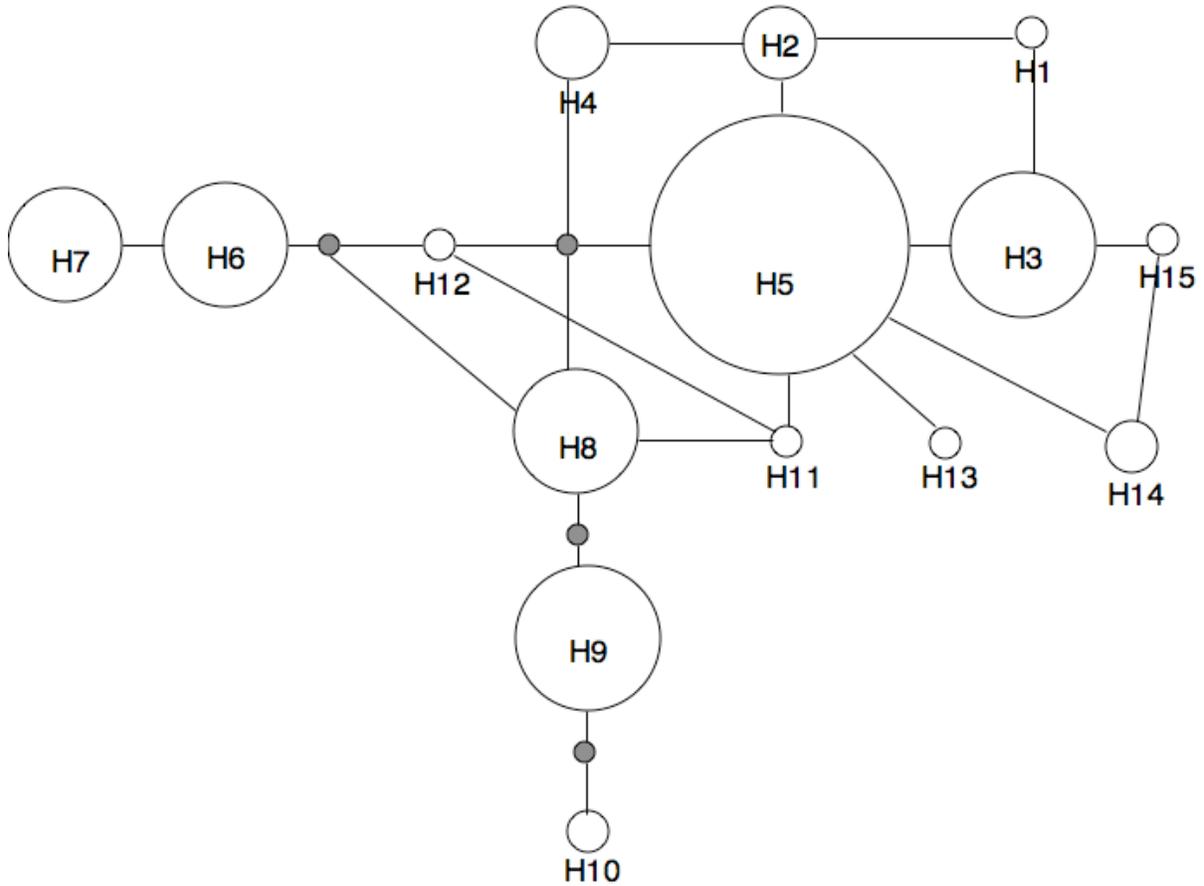


Figura 5. Red de haplotipos multilocus.

Contribución de las mutaciones paso a paso – Prueba de permutaciones alélicas.

Con SPAGeDi se encontró que los índices de diferenciación entre los dos grupos son $R_{ST} = 0.8277$ y $F_{ST} = 0.3883$. En este caso así como en la comparación con todas las poblaciones, el valor de R_{ST} no se encuentra dentro del intervalo de confianza del 95% de pR_{ST} promedio, no así con las comparaciones dentro de los grupos, donde R_{ST} sí está dentro del intervalo de confianza de pR_{ST} promedio (Fig. 4 y Apéndice 1).

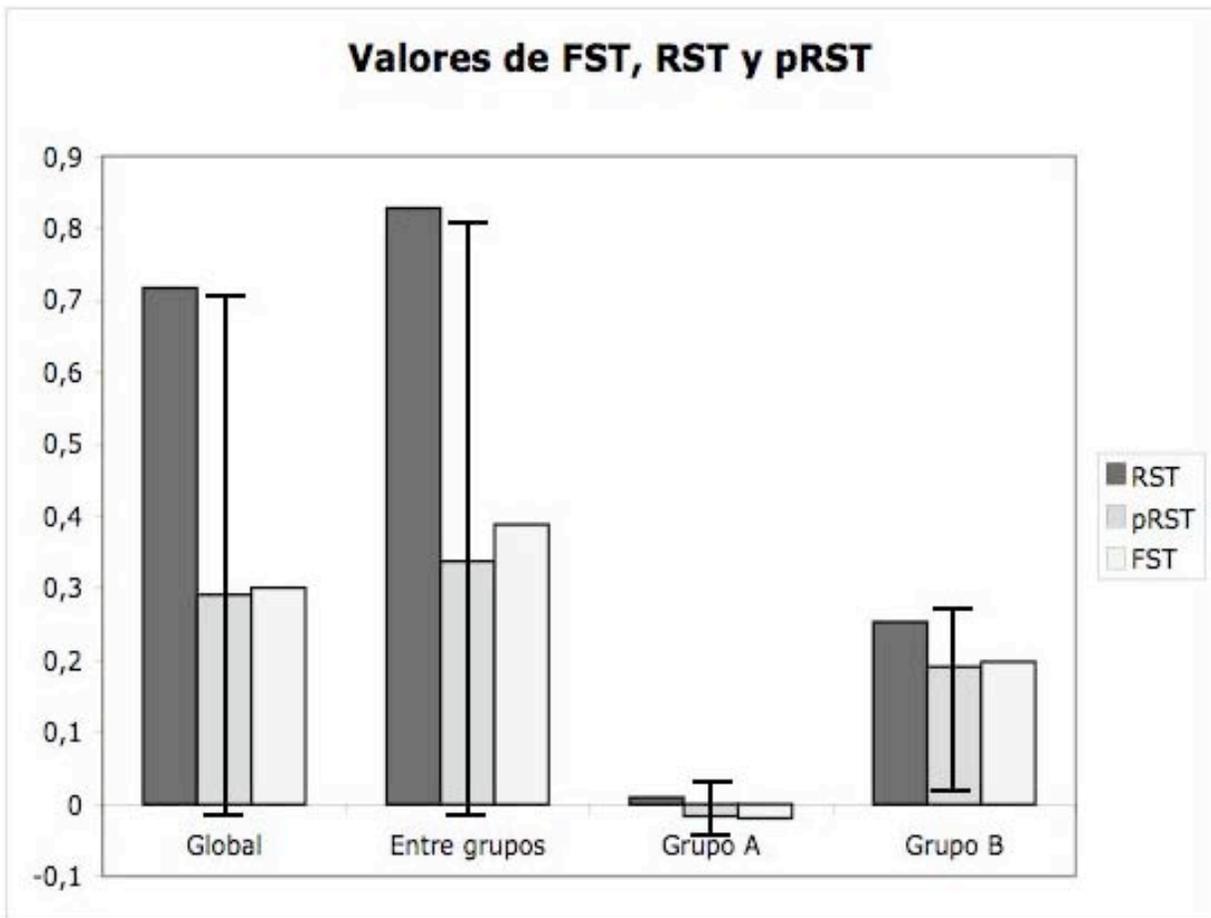


Figura 6. Valores de R_{ST} , pR_{ST} y F_{ST} para diferentes configuraciones con intervalo de confianza de 95%.

Los valores más altos y significativos de R_{ST} pareados (Apéndice 2) son entre las poblaciones del grupo A con las poblaciones del grupo B. Otros valores altos se encontraron entre Omiltemi y Trinidad, Trinidad y Pingüica, y Trinidad y Pueblo Nuevo. Los valores pareados de F_{ST} siguen un patrón similar (Apéndice 4).

Prueba de Mantel

La correlación entre la matriz de distancias geográficas y la matriz de distancias genéticas resultó significativa ($p < 0.0001$). El coeficiente de correlación r con 10 000 permutaciones dio un valor de 0.649 (Fig. 7).

Al hacer esta misma prueba dentro de cada grupo, los resultados son diferentes, ya que en ninguno de ellos se encontró correlación significativa entre las distancias geográficas y las genéticas ($p = 0.85$ y 0.35 para el grupo A y el grupo B, respectivamente).

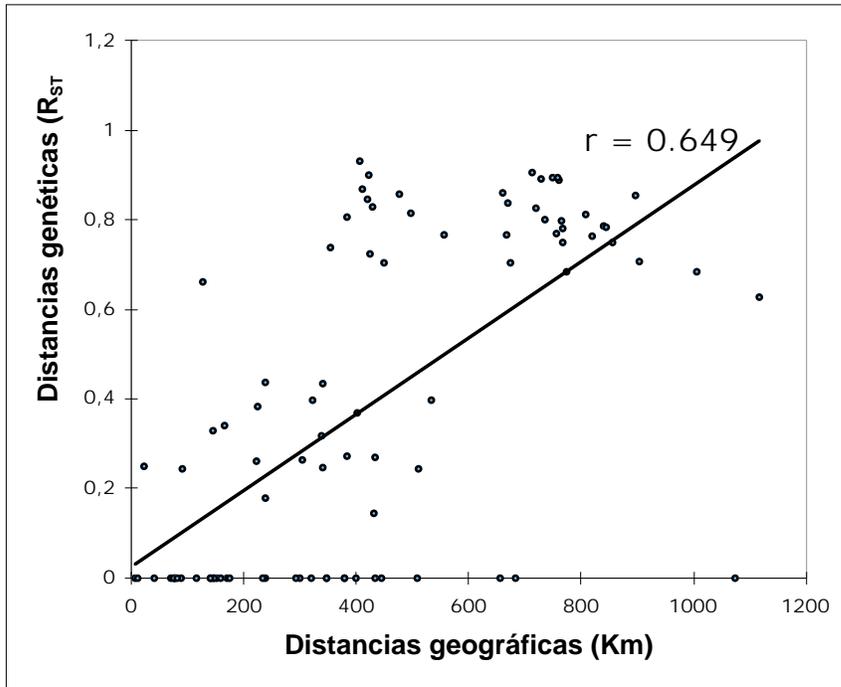


Figura 7. Prueba de Mantel para todas las poblaciones ($p < 0.0001$)

Distribución mismatch o de diferencias pareadas

Los resultados para detectar expansiones poblacionales se reportan en la Tabla 7. El modelo de expansión demográfica fue significativo en la prueba con todas las poblaciones y en el grupo A [$p(\text{SSD}) > 0.05$].

A partir de $\hat{\tau}$ se calculó la fecha de expansión, ya que este parámetro incluye al tiempo generacional y a la tasa de mutación. En este caso se tomó a las tasa de mutación como de 10^{-5} por locus por generación, y se tomaron dos tiempos de generación, 100 y 15 años.

Tabla 7. Resultados de la prueba Mismatch. La fecha de expansión se calculó usando una tasa de mutación de 10^{-5} por locus por generación. En negritas los valores de $\hat{\tau}$ significativos para el modelo de expansión poblacional ($\alpha = 0.05$).

Poblaciones	$\hat{\tau}$ (IC 95%)	Fecha de expansión (MA) (tiempo de generación de 100 años)	Fecha de expansión (miles de años) (tiempo de generación de 15 años)	SSD	$\rho(\text{SSD})$	Figura
Todas	1.595 (0.211-3.850)	2.6583	398750	0.000285	0.892	8
Grupo A	0.996 (0.512-1.635)	1.66	249000	0.0062702	0.208	9
Grupo B	0.734 (0.484-1.195)	1.2233	183500	0.007786	0.0480	10

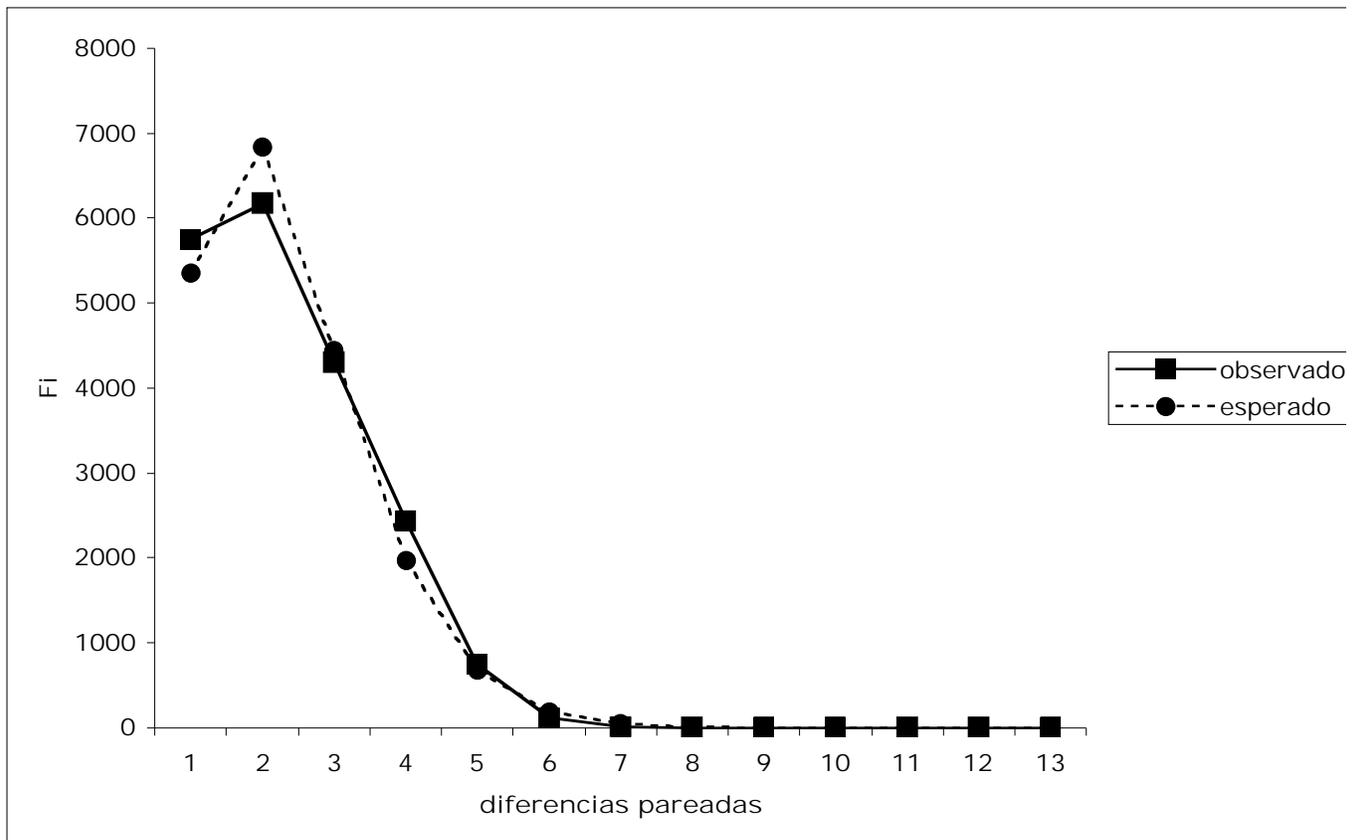


Figura 8. Distribución mismatch en *Pinus ayacahuite* para todas las poblaciones.

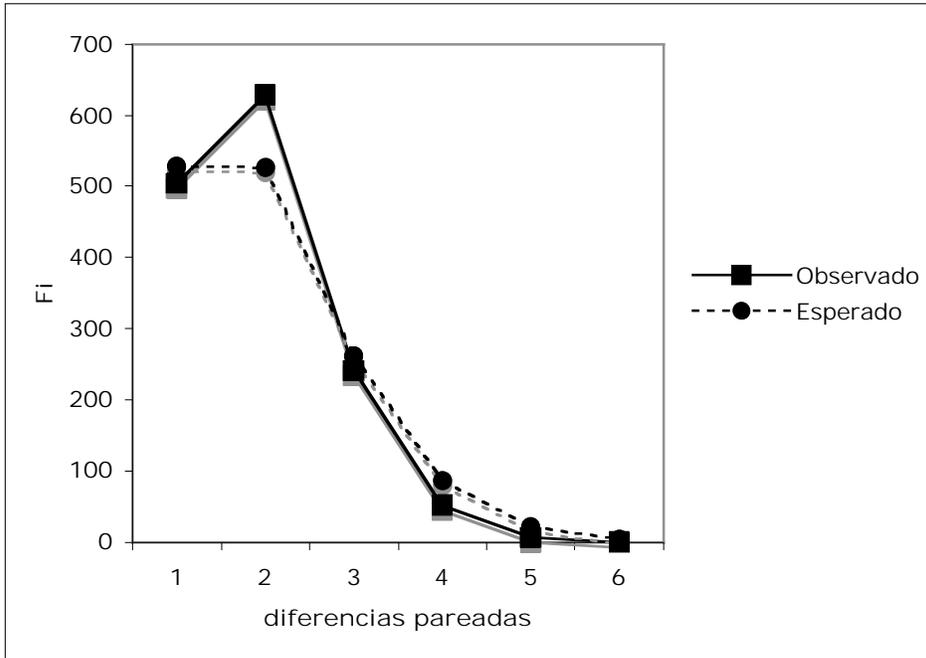


Figura 9. Distribución mismatch para el grupo A.

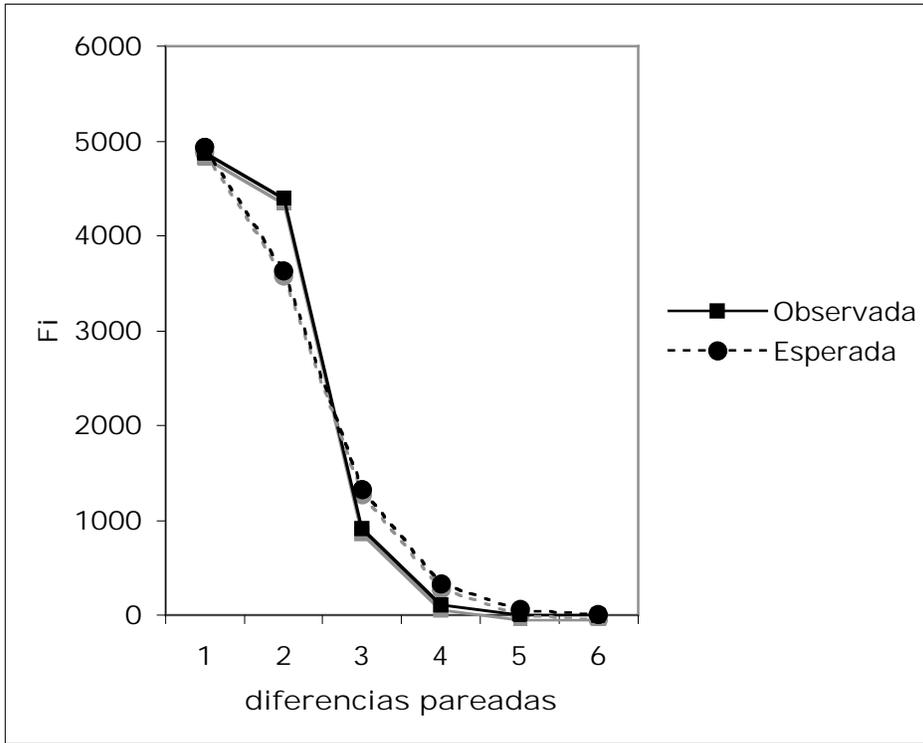


Figura 10. Distribución mismatch para el grupo B.

DISCUSIÓN

DIVERSIDAD GENÉTICA

Considerando la existencia de dos grupos genéticamente homogéneos (el A y el B, al sur y al norte respectivamente del Istmo de Tehuantepec) y al comparar la diversidad genética entre ellos se observa que en el sur existe más diversidad que en el norte, siendo más alta la heterocigosis del grupo A que la del grupo B (0.648 y 0.527, respectivamente). Moreno y Piñero (en preparación) obtuvieron un valor similar al del grupo B en *P. ayacahuite* debido a que las poblaciones que analizaron corresponden a varias de las estudiadas de este grupo en este trabajo, lo cual indica la importancia de muestrear el rango de distribución completo de la especie; en este caso faltan todavía algunas poblaciones de Centroamérica que podrían modificar el valor de diversidad genética total de la especie, pues como se ha visto, este pasa de ser 0.558 en las poblaciones más norteñas (Moreno y Piñero, en preparación), a 0.527 en las poblaciones al norte del Istmo consideradas en este estudio, a 0.705 en todo México. Esto puede deberse a que las poblaciones al sur del Istmo, a pesar de ser las poblaciones más sureñas en este estudio, en realidad son poblaciones centrales dentro del rango completo de distribución de la especie, por lo que no presentarían tanto aislamiento y restricción de flujo genético como las poblaciones marginales, además de que estas últimas presentan los efectos de pocos individuos fundadores (Ledig 1986), lo cual repercute directamente en los estimados de diversidad genética. Las poblaciones norteñas, a pesar de que estrictamente son las poblaciones marginales hacia esta latitud, pueden estar sufriendo introgresión con otras especies, como se sospecha es el caso con *P. strobiformis* (Moreno y Piñero, en preparación). Además esto podría explicar por qué en estas poblaciones la diversidad genética encontrada resultó tan dispar, aun en poblaciones cercanas geográficamente.

El valor de diversidad genética total es intermedio entre otros encontrados con microsatélites de cloroplasto en especies del género *Pinus*, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de diversidad genética encontrados con microsatélites de cloroplasto en diferentes especies de *Pinus*.

Especie	He	θ (Xu y Fu)	Número microsatélites polimórficos	Cita
<i>P. pseudostrobus</i>	0.974	883.54	6	Delgado <i>et al.</i> 2007
<i>P. silvestris</i>	0.95	240.21	17	Provan <i>et al.</i> 1998
<i>P. montezumae</i>	0.949	230.93	6	Delgado <i>et al.</i> 2007
<i>P. contorta</i>	0.859	19.59	6	Marshall <i>et al.</i> 2002
<i>P. strobiformis</i>	0.856	18.77	3	Moreno y Piñero, en preparación
<i>P. pinaster</i>	0.826	12.74	5	Bucci <i>et al.</i> 2007
<i>P. pinceana</i>	0.823	12.4	4	Escalante 2001
<i>P. canariensis</i>	0.73	5.30	6	Gómez <i>et al.</i> 2003
<i>P. nelsonii</i>	0.73	5.30	4	Cuenca <i>et al.</i> 2003
<i>P. ayacahuite</i>	0.705	4.39	3	Este estudio
<i>P. ayacahuite</i> (Eje Neovolcánico)	0.558	1.75	3	Moreno y Piñero, en preparación
<i>P. cembroides</i>	0.53	1.51	3	Cuenca 2003
<i>P. leucodermis</i>	0.411	0.83	1	Powell <i>et al.</i> 1995

En Musálem y Ramírez (2003) se reporta un nivel de polimorfismo promedio usando aloenzimas en *P. ayacahuite* de 37.5%, valor por debajo del porcentaje de polimorfismo promedio en pinos (53%, Ledig 1986), lo cual se interpreta como un bajo nivel de variabilidad genética en la especie. Al comparar la heterocigosis esperada promedio de varias especies de *Pinus* con isoenzimas (Ledig 1998), la de *Pinus ayacahuite* y de otros pinos citados en la Tabla 8 se sitúan en un lugar similar al encontrado con microsatélites de cloroplasto, así *P. sylvestris* tiene uno de los valores más altos en pinos (0.3), mientras que *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* presentan uno intermedio (0.154 para ambos). Musálem y Ramírez (2003), en cuanto a la heterocigosis esperada promedio, reportan una tendencia a disminuir del centro de México hacia Centroamérica. Este patrón encontrado con enzimas difiere del encontrado en este estudio con microsatélites de cloroplasto, ya que las poblaciones con mayor diversidad genética fueron las del sur de México, mientras que en el centro se encuentran algunas con los valores más bajos, además de que la diversidad genética total no

fue baja. La dispersión de marcadores nucleares y del cloroplasto en pinos es la misma ya que ambos se dispersan por polen y semillas (Mitton *et al.* 2000), sin embargo, en marcadores haploides, la deriva génica actúa con mayor fuerza que en marcadores diploides debido a que los tamaños efectivos de los primeros son menores, de esta forma ciertas poblaciones pueden estar perdiendo diversidad genética con mayor rapidez en el cloroplasto que en el núcleo, lo cual podría explicar la diferencia en los patrones. Otra posibilidad es que alguno de los dos marcadores esté bajo selección y por lo tanto la diferenciación genética reflejaría adaptación a condiciones ambientales variables espacialmente, como se ha visto que ocurre ocasionalmente en isoenzimas (Latta y Mitton 1997).

Los valores de θ siguen el mismo patrón que los de diversidad génica, ya que θ se calculó a partir de la homocigosis, sin embargo del valor de θ se puede obtener el tamaño efectivo de la población si la tasa de mutación es conocida o viceversa (Fu 1994); en este caso la tasa de mutación es considerada constante en la especie o incluso en el género *Pinus* (Cuenca *et al.* 2003), por lo que valores altos de θ indican probablemente tamaños efectivos poblacionales altos aunque habría que considerar el número y tipo de microsatélites usados en cada caso para que los valores fueran más comparables. Dentro de este estudio los valores de θ de cada población sí pueden ser comparados, de esta forma puede decirse que en general las poblaciones del sur (Chiapas) tienen un tamaño efectivo poblacional mayor que el resto, lo cual coincide con los resultados de la prueba mismatch, ya que en el grupo A se detectó expansión poblacional y no en el B. La topografía puede ser una explicación para esto, ya que los bosques en Chiapas se encuentran en rangos montañosos mucho más grandes y continuos que los que se encuentran en el Eje Neovolcánico o la Sierra Madre Occidental, donde frecuentemente están separados por valles, por lo que las expansiones de rango de bosques estarían más favorecidas al sur de nuestro país.

Homoplasia

La relación entre la homoplasia de tamaño (SH) y la homoplasia molecularmente accesible (MASH) es muy importante, pero puede ser fácilmente mal entendida. MASH sólo representa una fracción de la SH que realmente ocurre en la muestra; la relación entre SH y MASH depende de la tasa de mutación, el modelo de mutación, el tamaño de la población y la estructura de los microsatélites (Estoup *et al.* 2002). MASH subestima a SH, debido a que siempre habrá una fracción desconocida de SH ya que secuencias idénticas en estado no lo son necesariamente por descendencia, y esto no puede ser detectado en el laboratorio. Esto comúnmente es malinterpretado como que un valor bajo de MASH indica un valor bajo de SH (Estoup *et al.* 2002), sin embargo se ha visto que puede haber un porcentaje alto de SH a pesar de que MASH sea cero (Wimberger *et al.* en preparación). Wimberger *et al.* (en preparación), a través de simulaciones y usando microsatélites ligados

encontraron ciertos patrones al tomar a θ como variable independiente y hacer una serie de correlaciones entre ésta, MASH y SH, debido a que θ incorpora el número de microsatélites, la tasa de mutación y el tamaño efectivo de la población. Indican que con microsatélites ligados (como es el caso de los microsatélites de cloroplasto), mientras más alto sea el valor de θ , más alto será el de SH y el de MASH, que la proporción de SH que puede ser detectada como MASH aumenta si se usan más loci, y que esta proporción sigue una relación lineal; proponen por lo tanto una forma de estimación de SH a partir de MASH, que a su vez puede aproximarse a través de θ . Advierten que la homoplasia de tamaño aumenta con los valores de θ , llegando al 50% con $\theta = 1$, y alcanzando más de 80% con valores de θ entre diez y 100. A pesar de que estos valores son particulares para los parámetros de las simulaciones que utilizaron, se podrían esperar porcentajes similares de homoplasia en diferentes estudios de pinos con microsatélites de cloroplasto, basados en la θ estimada mediante la homocigosis, como la calculada aquí (Tabla 8). Concretamente, en el presente estudio, la MASH calculada del 25.74% con tasa de mutación de 10^{-5} concuerda con la de Wimberger *et al.* (en preparación) para un microsatélite compuesto con la misma tasa de mutación, donde MASH es de 24% y SH de 40%, y donde estos valores encajan también en la correlación de θ , MASH y un tercer tipo de homoplasia definida como la que no puede ser detectada en el laboratorio, la homoplasia estructuralmente accesible (*Structurally Accesible Size Homoplasia*, SASH). La cuestión es si los diferentes porcentajes de homoplasia afectan a los estimados usados por la genética de poblaciones.

La homoplasia es un problema que presentan los marcadores moleculares que evolucionan por SMM, como se presume lo hacen los microsatélites. Para abordar este problema y estimar el efecto que tiene la homoplasia de tamaño en diferentes parámetros poblaciones, se ha utilizado un enfoque donde las simulaciones juegan un papel importante (Estoup *et al.* 2002, Navascués y Emerson 2005, Navascués *et al.* 2006, Wimberger *et al.* en preparación). En general se ha visto que el efecto de la tasa de mutación y el número de microsatélites utilizados es muy grande en la SH: mientras más alta sea la tasa de mutación, se espera mayor SH en la muestra. La opinión sobre los inconvenientes que representa la homoplasia en la genética de poblaciones está dividida. Es un hecho que la homoplasia reduce los índices de diversidad genética, pero por un lado se dice que esto no plantea un problema significativo para los métodos utilizados por la ecología molecular, que no tiene efecto sobre F_{ST} ni R_{ST} , y que no es perjudicial para la eficacia del método de aislamiento por distancia (Estoup *et al.* 2002 Adams *et al.* 2004); por el otro lado se plantea que la diversidad genética no es muy afectada, pero que las distancias genéticas sí lo son (Navascués y Emerson 2005). Los efectos de la homoplasia en las redes de haplotipos no han sido evaluados formalmente, pero Navascués y Emerson (2005) sugieren que la presencia de muchos loops en éstas puede ser causada por la homoplasia en la muestra, como puede observarse en las dos

redes de haplotipos generadas en este estudio (Figs. 4 y 5). Sin embargo, existen ciertos criterios para resolver las ambigüedades en las redes de haplotipos (Crandall y Templeton 1993; Pfenninger y Posada 2002), como el de que los haplotipos raros ocurren generalmente en las puntas de la red y no al interior de éstas, a lo cual se le pueden ser asignadas probabilidades, o el criterio geográfico, donde un singletón se conecta con mayor probabilidad a los haplotipos de su misma población que a los de diferentes poblaciones. La necesidad de estos criterios es muestra de que los loops son comunes en las redes generadas con cualquier marcador, además de que corregir estas ambigüedades muchas veces resulta sencillo.

Estas conclusiones dependen de la tasa de mutación por locus por generación que se tome para el marcador, ya que con tasas de 10^{-4} y 10^{-3} , el porcentaje de homoplasia es demasiado alto como para permitir que los datos sean usados en estudios de genética de poblaciones, sin embargo este valor decrece significativamente cuando la tasa de mutación es de 10^{-5} a 10^{-7} (Estoup *et al.* 2002, Navascués y Emerson 2005). Dada la naturaleza y variabilidad de los microsatélites, éstos tienen el poder de dar mucha información para la genética de poblaciones si la homoplasia no representa un problema. Provan *et al.* (1999) estimaron la tasa de mutación de microsatélites de cloroplasto de 11 repeticiones en *Pinus torreyana* entre 3.2×10^{-5} y 7.9×10^{-5} , mientras que el valor para el mismo número de repeticiones en *Arabidopsis* fue estimado en 1.6×10^{-6} (Jakobsson *et al.* 2007). Existen también estimados más altos, como el de Marshall *et al.* (2002) para *Pinus contorta* donde ubican a la tasa de mutación en aproximadamente 10^{-3} , y el de O'Connell y Ritland (2004) de 6.3×10^{-4} en el cedro *Thuja plicata*. Parece ser que los valores dentro del orden de magnitud del estimado por Provan *et al.* (1999) han sido aceptados para los estudios de genética de poblaciones en pinos (Cuenca *et al.* 2003, Navascués *et al.* 2006, Afzal-Rafii y Dodd 2007, Moreno y Piñero, en preparación).

Un aspecto importante a considerar al referirse a la homoplasia en microsatélites, es el modelo de mutación, ya que éste es necesario para estimar las distancias genéticas entre individuos o poblaciones. El modelo más sencillo para microsatélites es el SMM, que adaptado para estos marcadores dice que una mutación altera la longitud de un arreglo de repeticiones a través de la adición o delección de una repetición a una tasa fija (Valdés *et al.* 1993). Sin embargo, se ha visto que los microsatélites parecen desviarse de ciertas formas de este modelo, como por ejemplo al tener restricciones en su tamaño (lo cual favorecería la homoplasia, Ellegren 2004, Estoup *et al.* 2002), o al ocurrir pasos mutacionales de más de una repetición. En Estoup *et al.* (2002) se revisan una serie de modelos de mutación para microsatélites, en todos, con excepción del IAM, los alelos pueden mutar a estados ya presentes en la población y por lo tanto generar homoplasia de tamaño. El modelo que parece adecuarse más a los microsatélites en humanos es el *Two-phased*

mutation model, donde la mutación es heterogénea habiendo una cierta proporción mayor de mutaciones de un paso y otra porción, menor, que producen la ganancia o pérdida de más de una repetición (Estoup y Cournet 1999), sin embargo, a pesar de que se han hecho acercamientos al modelo de mutación, existen varios otros factores que intervienen en este proceso, como el número de repeticiones y la especie (Ellegren 2004). En pinos, el modelo de mutación más sencillo (SMM) parece estar muy cercano a la realidad, aunque se ha encontrado evidencia de variación en la secuencia flanqueante e indels de más de una repetición (Daniel Piñero, comentario personal).

Otro aspecto que es importante señalar es que aunque los modelos presentados sobre la homoplasia consideran que todos los loci del cloroplasto están ligados, existe evidencia sobre recombinación en esta molécula en pinos (Marshall *et al.* 2001), lo cual resulta en una baja probabilidad de ligamiento completo entre los loci. De ser así, los niveles de homoplasia aumentarían.

Para confirmar los resultados de este estudio y determinar entonces si los microsatélites de cloroplasto son o no un marcador adecuado para estudios filogeográficos en pinos, se requerirían otros análisis con diferentes marcadores que pudieran confirmar la estructura encontrada. Esto supondría algunos problemas, ya que se ha visto que en ocasiones diferentes marcadores muestran contradicciones entre las estructuras genéticas encontradas (Petit *et al.* 1998). En el caso del ADN mitocondrial de animales, Avise (1994) señala que la estructura revelada por este marcador daría información histórica más antigua que la detectada por marcadores nucleares debido a la recombinación. Lo ideal sería encontrar un marcador con características adecuadas para dar resultados comparables con los de microsatélites de cloroplasto, como podrían ser secuencias de cloroplasto, en las cuales se ha visto en pinos que la información que generan es consistente con la de secuencias de mitocondria y con isoenzimas (Latta y Mitton 1997), o utilizar un número mayor de microsatélites polimórficos (Navascués y Emerson 2005).

FILOGEOGRAFÍA Y DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

Los dos grupos diferenciados por SAMOVA 1.0 están también claramente identificados en los otros análisis: red de haplotipos, comparaciones de diferenciación genética (valores de R_{ST}), prueba de permutaciones y prueba de Mantel (Figs. 4, 6, 7, 8, 9 y 10)

La prueba de permutaciones muestra que cuando se comparan todas las poblaciones, R_{ST} es significativamente más alto que pR_{ST} . Al analizar estos valores en dos diferentes escalas (pequeña –dentro de grupos- y grande –entre grupos-), los resultados son diferentes, ya que dentro de los

grupos, las R_{ST} no son significativamente más altas que las pR_{ST} , pero sí lo son cuando la comparación es entre grupos.

Los valores de R_{ST} más altos que los de $F_{ST} - p(R_{ST})$ indican que la tasa de mutación no es despreciable en comparación con la tasa de migración, y que por lo tanto es probable que las mutaciones paso a paso hayan contribuido a la diferenciación genética. En este caso, esto se cumple en la comparación de todas las poblaciones y especialmente en la comparación entre grupos, lo cual responde afirmativamente a la cuestión de si los distintos haplotipos están más relacionados dentro de las poblaciones que entre ellas. Sin embargo, este último supuesto no se cumple cuando se analiza cada grupo independientemente, es decir, dentro de los grupos los haplotipos están más relacionados entre poblaciones que dentro de cada una de ellas, por lo que la tasa de mutación es despreciable en comparación con la de migración.

La prueba de Mantel mostró un patrón similar, pues el resultado fue significativo sólo en la comparación de todas las poblaciones y no en las comparaciones dentro de cada grupo. Un resultado significativo en esta prueba indica que los diferentes haplotipos están más relacionados entre poblaciones cercanas que entre poblaciones más distantes, lo cual, a la luz de estos resultados, señala que las poblaciones de cada grupo están más relacionadas entre sí que con las poblaciones del otro grupo, pero que dentro de cada grupo la distancia geográfica entre poblaciones no interviene en la diferenciación genética.

Todo este conjunto de datos indica que existe una estructura filogeográfica en la muestra tanto dentro de las poblaciones como entre ellas, dada por la existencia de los dos grupos y la relación que existe entre ellos y no por las poblaciones dentro de cada grupo. En otras palabras, la estructuración aparece sólo cuando las poblaciones son analizadas a gran escala.

En otros estudios donde se utilizó la prueba de permutaciones con microsatélites se han encontrado resultados similares, donde R_{ST} es significativamente mayor a pR_{ST} en escalas geográficas grandes, y cercano a F_{ST} en escalas menores (para una revisión ver Hardy *et al.*, 2003). Particularmente, Afzal-Raffi y Dodd (2007) trabajaron con microsatélites de una especie de pino, *Pinus nigra*, y llevaron a cabo el análisis entre 6 regiones y dentro de ellas; en todas las comparaciones entre regiones encontraron que R_{ST} era significativamente mayor a pR_{ST} , mas no así dentro de cada región.

Estos resultados son consistentes con un modelo donde en escalas pequeñas la tasa de migración ha determinado la baja diferenciación, y donde en escalas grandes la tasa de migración es similar

o inferior a la tasa de mutación y/o donde los dos grupos han divergido por un largo tiempo. De ser esto cierto, el modelo de mutación (y por lo tanto el tamaño de los alelos) no tendría relevancia en escalas pequeñas, por lo cual F_{ST} sería el parámetro elegido en este nivel de análisis. Por el contrario, R_{ST} sería el indicado en escalas grandes, pues es en estos niveles donde el modelo de mutación y los tamaños alélicos son informativos sobre la historia evolutiva (Hardy *et al.* 2003).

Red de haplotipos

Los haplotipos y la geografía pueden estar asociados debido a eventos históricos, por ejemplo cuando ocurre una fragmentación, los haplotipos o clados que surgen después de ésta muestran distribuciones espaciales concordantes y restringidas que corresponden a las áreas geográficas ocupadas por las zonas aisladas que ocupan (Templeton 2006). En la red de haplotipos (Figura 4) existen varios haplotipos restringidos a alguno de los dos grupos, que geográficamente hablando indica que están restringidos al área de distribución de éstos. Según la teoría de la coalescencia (Schaal *et al.* 1998), los haplotipos con mayor distribución, mayor número de conexiones y al centro de la red se pueden considerar como los ancestrales, mientras que es muy probable que los haplotipos de las puntas sean más jóvenes que los interiores a los cuales están conectados; de esta forma se puede considerar a H3 como el haplotipo más ancestral del cual deriva el resto. El que este haplotipo se encuentre principalmente en el grupo B, sugiere que la expansión poblacional fue de norte a sur; esto se corrobora con los datos haplotípicos de *P. strobiformis* (Moreno y Piñero, en preparación), donde los haplotipos correspondientes a H2, H3, H4, H8 y H9 de este estudio son los más abundantes en esa especie, mientras que no presenta a H5, H6 y H7.

Estructuración dentro de los grupos

Existen varias razones por las cuales puede no encontrarse estructura genética en las poblaciones, como retención de polimorfismos ancestrales, selección balanceadora o flujo génico actual. Es especialmente difícil distinguir entre los polimorfismos ancestrales y el flujo génico actual, pues aunque se puede calcular el número de migrantes por generación entre poblaciones (Nm) mediante métodos indirectos, es decir, mediante marcadores moleculares, estos métodos tienen limitaciones que traen como resultado baja precisión en los datos y falta de realismo biológico, ya que aunque dan una perspectiva temporal de la estructura genética, esto sólo es una ventaja cuando esta perspectiva temporal puede ser determinada (Bossart y Prowells 1998). Los métodos directos tienen la ventaja de ofrecer valores de flujo génico que están ocurriendo en el presente en las poblaciones. Por ejemplo en dos especies de *Pinus* se ha calculado este flujo génico actual, *P. sylvestris* L. y *P. flexilis* (Robledo-Arnuncio 2005, Schuster y Mitton 2000), y en ambas se encontró migración de polen a larga distancia (4.3% mayor de 30km, y 6.5% mayor a 100km,

respectivamente). En el caso de *P. flexilis*, este valor de flujo génico es consistente con el que se encontró del número de migrantes por generación con variación en el ADN del cloroplasto (Latta y Mitton, 1997).

La matriz de migrantes por generación (Nm) basada en R_{ST} (Apéndice 3) muestra valores muy bajos del número de migrantes (todos menores a 0.25) entre las poblaciones del grupo A y las poblaciones del grupo B. La matriz de Nm basada en F_{ST} (Apéndice 5) tiene a la mayoría de los valores pareados dentro de los grupos por arriba de un migrante por generación; más aun, dentro del grupo A todos los valores son infinitos. Dentro del grupo B la mayoría de los valores están por arriba de uno, excepto por ocho pares que representan el 14.5% del total de este grupo. Seis de estos ocho pares corresponden a Trinidad (Oaxaca) con otras poblaciones, esto se puede deber una vez más a la muestra reducida en esta población. En la matriz de distancias geográficas entre poblaciones (Apéndice 6) se puede apreciar que si bien en general las distancias entre las poblaciones del grupo A y del grupo B son mayores que las distancias dentro de las poblaciones de cada grupo, en éstas últimas existen distancias también muy grandes que incluso superan a las que hay entre grupos. Esto cuestiona si realmente dentro de los grupos existe un flujo génico continuo y actual entre sus poblaciones, o si más bien los resultados de la similitud dentro de los grupos y las diferencias entre ellos se deben a factores históricos. El valor de los parámetros con los que se calcula el flujo génico puede deberse a otras variables, como un muestreo inadecuado, asociaciones históricas entre las poblaciones, y efectos acumulados de otros determinantes de las frecuencias génicas, como pueden ser las fluctuaciones demográficas y los cuellos de botella (Bossart y Prowell 1998). Si el flujo génico actual fuera el responsable de estos valores de Nm , tendría que haberse encontrado asociación geográfica significativa o aislamiento por distancia, cosa que no se encontró dentro de los grupos. De esta forma, creo que aunque pueda existir un flujo de polen a largas distancias, éste no es responsable de los valores de Nm , sino que éstos son efecto de los patrones históricos de distribución de la especie.

Estructuración entre grupos

Cuando se encuentra estructura genética y geográfica, el patrón puede ser resultado de dos procesos distintos. El primero es un evento de vicarianza que restringe el flujo génico entre juegos de poblaciones por aislamiento geográfico. El segundo es el aislamiento por distancia, donde las poblaciones intercambian más migrantes con las poblaciones vecinas que con las distantes. En teoría, el aislamiento por distancia resulta en una relación directa entre las distancias genéticas y geográficas, pero en la realidad estas dos alternativas no pueden ser distinguidas fácilmente

debido a que la dispersión de los puntos en la regresión de distancias es por lo general muy grande (Bossart y Prowell 1998).

Para distinguir entre estas dos posibilidades, Bossart y Prowell (1998) recomiendan estudiar los efectos de las poblaciones solas o de conjuntos de poblaciones en la correlación de distancias geográficas y genéticas, para evaluar así si ciertas poblaciones o conjuntos son responsables de la correlación del aislamiento por distancia. Cuando los valores significativos de la correlación están asociados a poblaciones solas o a conjuntos de ellas, sugieren a la vicarianza como la explicación más viable, mientras que si la significancia está dispersa a través de los pares de poblaciones, apoyan al aislamiento por distancia. Como mencioné antes, las pruebas de Mantel realizadas mostraron que la correlación entre distancias genéticas y geográficas resultó significativa al comparar a todas las poblaciones, pero al comparar cada grupo no se encontraron pruebas de aislamiento por distancia. Aunado a esto están los valores pareados de R_{ST} (Apéndice 2). En éstos se puede observar cómo las poblaciones de El Porvenir, Arcotete y Rancho Nuevo (todas en el estado de Chiapas, Grupo A) tienen los valores más altos de diferenciación cuando seorean con el resto de las poblaciones; entre ellas los valores de R_{ST} son bajos y no significativos, esto puede deberse a que en realidad las tres poblaciones se están comportando como una sola gracias a flujo génico intenso y/o tiempos de divergencia muy cortos. Por otro lado, los valores de R_{ST} entre el resto de las poblaciones son bajos, con excepción de Trinidad, en esta población los valores altos y significativos de R_{ST} con las otras poblaciones del grupo B se deben a que el haplotipo H2 es casi único, lo cual puede ser un efecto de la deriva génica, aunque también pueden deberse al tamaño reducido de muestra.

Tiempo generacional y tiempo de expansión

El tiempo estimado de la expansión poblacional de *Pinus ayacahuite* en este estudio, utilizando un tiempo de generación de 100 años, fue de 2.66 MA, y con 15 años 398750 mil años. El tiempo de generación calculado como el tiempo promedio a la primera reproducción de las dos especies más cercanas a *P. ayacahuite*, es de 15 años para *P. strobiformis* y de 20 a 40 para *P. flexilis* (Syring *et al.* 2007, Krugman y Jenkinson 1974). En varios estudios genéticos y moleculares de pinos, el tiempo a la primera reproducción se ha tomado como el tiempo de generación mínimo: 17.5 años para el subgénero *Strobis*, de 17 a 22 años para *P. nelsonii* y 15 años para *P. ayacahuite* y *P. strobiformis* (Grotkopp *et al.*, 2004, Suzán-Azpiri 2002, Cuenca *et al.* 2003, Moreno y Piñero, en preparación), aunque en realidad no existe un estudio demográfico completo de *Pinus ayacahuite*.

Provan *et al.* (1999) toman el tiempo de generación de *P. torreyana* como 100 años. Usando este tiempo de generación para *P. canariensis*, Navascués *et al.* (2006) calcularon las fechas máximas

de expansión de esta especie en las islas Canarias, las cuales coinciden con la fecha estimada de emergencia de las islas. En estudios de demografía histórica es importante conocer el tiempo de generación de la especie ya que con ello se pueden estimar fechas sobre diferentes acontecimientos. Para Petit y Hampe (2006), el tiempo de generación en árboles es el tiempo que pasa de semilla a semilla, que sin embargo es difícil de distinguir con la edad de madurez. Para Franco y Silvertown (2004), el tiempo de generación es la edad a la cual la progenie de un individuo ha alcanzado la edad reproductiva, que puede ser de dos a diez veces la edad de la primera reproducción. Ellos proponen dos diferentes medidas para éste: la primera, la edad media de los padres de la progenie producida en una distribución de clase estable (A). La segunda, la edad media en que los miembros de una cohorte producen progenie (μ). Basados en datos demográficos de varias especies, calcularon el tiempo de generación de 102 taxa de plantas, y encontraron que las diferencias entre los dos estimados pueden ser de hasta seis veces. En general, lo que concluyen respecto a esto es que plantas más longevas tienen tiempos de generación más largos. El único pino citado en este estudio demográfico es *Pinus palustris*, el cual se reporta con longevidad de 226 años, edad a la primera reproducción de 38.4 años, $A = 175$ años y $\mu = 158$ años; de manera similar, en Van Valen (1975) citado en Petit y Hampe. (2006), se presenta una tabla de vida completa de la palma *Euterpe globosa* donde el tiempo de generación estimado es un valor intermedio entre la edad de madurez y la edad máxima observada. De esta forma parece que determinar el tiempo de generación en especies de árboles puede resultar arbitrario si no se conocen suficientes datos demográficos, lo cual impacta, entre otras cosas, en las edades inferidas con la prueba de mismatch y su interpretación. Aun así, se puede hacer una aproximación basada en lo que se sabe de otras especies, por lo que el tiempo de generación de *P. ayacahuite* quedaría en un valor intermedio entre 15-20 años y su longevidad, 150 años (Alejandra Moreno, comentario personal).

Vicarianza: el Istmo de Tehuantepec

Las discontinuidades genéticas agudas en las frecuencias genéticas son usualmente evidentes en los dos lados de un evento vicariante, con homogeneidad genética entre las poblaciones del mismo lado (Bossart y Prowell 1998, Latta y Mitton 1999). El Istmo de Tehuantepec es considerado como una barrera biogeográfica ya que durante mucho tiempo estuvo sumergido bajo el agua, y aun al emerger (durante el Plioceno, Perry 1991), debido a su baja elevación, los hábitats ecológicos que presenta son distintos a los de las elevaciones que separa (Peterson *et al.* 1999, Marshall y Liebherr, 2000). Actualmente forma una barrera parcial entre los pinos de las montañas de Oaxaca y los pinos de las tierras altas de Chiapas (Perry 1991).

La prueba de mismatch detectó expansión poblacional cuando todas las poblaciones juntas fueron analizadas y en el grupo A, no en el grupo B. Esto quiere decir que ocurrió una primera expansión poblacional antes de la divergencia de los dos grupos, y posteriormente otra en Chiapas. Determinar la fecha exacta de las expansiones demográficas es difícil dado que ni la tasa de mutación ni el tiempo de generación se conocen con certeza en esta especie, sin embargo la historia geológica en relación con los tiempos de expansión puede proporcionar las pistas necesarias para calcular esta fecha, esta aproximación se ha hecho anteriormente con expansión poblacional de pinos revelada por microsatélites de cloroplasto (Navascués *et al.* 2006). El Istmo de Tehuantepec emergió durante el Plioceno (Perry 1991), lo cual coincide con un enfriamiento general y drástico de la Tierra durante el Mioceno tardío y el Plioceno, probablemente reflejo de las etapas tempranas de las glaciaciones (Savin 1977). Las composiciones palinológicas de México y Centroamérica de estas épocas indican también un patrón de decline de la temperatura (Graham 1987, 1999), ya que todas las palinofloras analizadas correspondientes al Terciario contienen pocos o ningún elemento de temperaturas frías, aquellas en el intervalo de Mioceno medio a tardío contienen pocos de estos elementos, mientras que las palinofloras del Plioceno tienen mucha representación, como por ejemplo *Abies* y *Picea* en el sur de Veracruz, y *Pinus* en Chiapas; esto es evidencia de un bosque frío en estas regiones, y de que los efectos de la baja de temperatura durante el Mioceno en las biotas terrestres se extendieron al menos hasta estas latitudes, aunque fueron siendo progresivamente menos favorables debido a las condiciones cálidas y tropicales que comenzaron a dominar (Graham 1987). Durante el último periodo glacial se estima que el decremento de temperatura fue de 5 a 9° C (Vázquez-Selem y Heine 2004), y existe evidencia de que en regiones tropicales de Centroamérica donde en el presente no existen glaciares, durante el Pleistoceno fueron suficientemente frías y húmedas como para albergarlos arriba de 3400m, lo cual demuestra que a alturas relativamente bajas en estas regiones el clima durante las glaciaciones fue significativamente distinto al actual (Lachniet 2004), lo cual podría haber favorecido a las especies de afinidades templadas.

En otros taxa de clima templado se han detectado eventos de vicarianza donde el Istmo de Tehuantepec juega también un papel importante (Sullivan *et al.* 1997, Peterson *et al.* 1999). Estos eventos se relacionan con las glaciaciones del Pleistoceno temprano y medio, donde el Istmo parece haber sido una fuerte barrera durante las fluctuaciones climáticas. Toledo (1982) sugirió que el efecto de estas fluctuaciones en la distribución de las zonas florales en América fue muy dramático, ya que las tierras bajas de México estaban ocupadas por bosques de pino-encino y bosques de niebla durante los periodos fríos. La actual división de los bosques templados en los diferentes sistemas montañosos aparentemente experimentó muchos ciclos de expansión de rango y contracción durante el Pleistoceno, con al menos una expansión que resultó en una biota

templada continua y efímera (Sullivan *et al.* 1997). Esto hubiera propiciado las condiciones necesarias para que *Pinus ayacahuite* expandiera su rango de las montañas de Oaxaca a las tierras altas de Chiapas, dado que los pinos colonizaron México de norte a sur (Perry 1991).

Ejemplos de vicarianza en otros taxa

Al analizar los patrones filogeográficos de diferentes especies simpátricas y comparar esto con evidencia independiente de la historia de la región, como puede ser la geología y la paleopalínología, se pueden identificar los procesos históricos que han ocurrido en dichas regiones. De esta forma la filogeografía comparada ha contribuido al estudio de procesos de especiación, paisajes evolutivos e identificación de regiones histórica y evolutivamente independientes (Bermingham y Moritz 1998, Zink 2002). En la biogeografía de México según Marshall y Liebherr (2000) se analizan las relaciones biogeográficas que existen en nueve áreas montañosas de endemismo y según sus resultados, proponen dos agrupaciones biogeográficas principales en México y Centroamérica: una al norte de la Sierra Transvolcánica, y la otra al sur de ésta, a lo cual llaman la zona de transición. A pesar de que el Istmo de Tehuantepec no da esta división, lo reconocen como una barrera secundaria importante al sur de la zona de transición, donde suponen que la divergencia entre las áreas se dio a lo largo de los últimos tres millones de años.

Un ejemplo donde se puede observar este patrón de divergencia es el del ratón *Peromyscus aztecus*, cuya distribución en los rangos montañosos de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Cordillera Transvolcánica y Sierra Madre del Sur se ve interrumpida por valles xéricos. Su hábitat son bosques de pino-encino y bosques de niebla en alturas de moderadas a altas. En un estudio sobre la filogeografía y sistemática molecular de esta especie y sus subespecies (Sullivan *et al.* 1997), se indica cómo las muestras correspondientes a la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur y la meseta sureña forman un grupo monofilético, lo cual indica que estas regiones compartieron afinidades faunísticas cercanas. Las muestras de la Sierra Madre del Sur se anidan dentro de las muestras de las tierras altas de Oaxaca, lo cual sugiere flujo génico entre estas regiones; estas muestras presentaron un bajo nivel de divergencia, lo cual es consistente con divergencia reciente. Por otro lado, las poblaciones que habitan en Guatemala y El Salvador son distintas del resto del complejo, lo cual indica que el Istmo de Tehuantepec representa una fuerte barrera geográfica. Los niveles de divergencia con estas poblaciones son altos, lo cual sugiere que el Istmo puede haber separado estas poblaciones muy temprano durante el Pleistoceno, tiempo que coincide con el estimado para *P. ayacahuite*. Los autores concluyen que la evolución de esta especie ocurrió por una serie de eventos de vicarianza que coincidieron con múltiples eventos de glaciación.

Peterson *et al.* (1999) analizaron los nichos ecológicos en diferentes taxa de aves, mariposas y mamíferos en los dos lados del Istmo de Tehuantepec, y encontraron que éstos están sumamente conservados. Según estos resultados, sugieren una hipótesis vicariante de especiación, ya que bajo este modelo las diferencias ecológicas se formarían mucho después del evento de especiación, en cambio bajo otros escenarios, como por ejemplo especiación simpátrica o en un modo de especiación por aislamiento periférico (*peripheral isolates model of speciation*), la invasión de nuevas situaciones ecológicas tiene que formar parte del proceso de especiación.

El hongo *Lophodermium nitens* es un endófito de pinos blandos. La expansión poblacional de este hongo en las poblaciones de la Sierra Madre del Sur, Eje Neovolcánico y Sierra Madre Oriental está calculada en 540 mil años (Santini 2007), esta fecha tiene que haber ocurrido durante o después del establecimiento del bosque de pino, debido a que el hongo vive exclusivamente en las acículas de pinos. La fecha de su expansión poblacional da un límite mínimo a la expansión de *Pinus ayacahuite* en esta zona, ya que es la especie de pino blando más común en la zona de estudio (Perry 1991).

Si los resultados obtenidos en el presente estudio se ponen dentro de este contexto, donde la evidencia sugiere que el Istmo de Tehuantepec ha tenido dos papeles diferentes en la historia de los bosques templados de México, uno como corredor para éstos y otro como barrera, entonces la estructura filogeográfica e historia demográfica de *P. ayacahuite* encontradas concuerdan con la hipótesis de que el impacto de los cambios climáticos del Pleistoceno llegó hasta el sur de México y Centroamérica, permitiendo primero a las especies expandirse hacia el sur y después restringiendo el flujo a través del Istmo.

Refugios pleistocénicos de especies de zonas templadas en latitudes tropicales

Las glaciaciones del periodo Cuaternario tuvieron consecuencias en la distribución de las especies, las cuales se expresan de diferente manera en las zonas boreales, templadas y tropicales (Hewitt 2000). Se habla de los refugios pleistocénicos como las áreas geográficas donde las especies sobrevivieron durante las glaciaciones; se han identificado varios de estos lugares especialmente en Europa y Norteamérica (para una revisión ver Hewitt 2000). Al avanzar las capas de hielo desde los polos, los refugios se encontraban al sur de éstas; durante los periodos postglaciales las especies pudieron avanzar de nuevo hacia el norte, en las llamadas recolonizaciones postglaciales. En especies de árboles existen varios estudios sobre este tema, la mayoría de ellos sobre especies de afinidades templadas de Europa y Norteamérica y existen otros estudios sobre áreas cercanas al polo sur, también se ha explorado este tema en algunas especies tropicales (para varios

ejemplos ver Newton *et al.* 1999 y Hewitt 2000). Sin embargo se conoce poco sobre las consecuencias de las glaciaciones en especies de zonas templadas en latitudes tropicales, como es el caso de *Pinus ayacahuite*.

Hewitt (2000) menciona que en las regiones templadas y sureñas del hemisferio norte la topografía variada que ahí se encuentra habría tendido a subdividir a las especies en poblaciones que pudieron haber evolucionado independientemente sólo con flujo génico ocasional, probablemente durante cada glaciación. En estas regiones los periodos fríos habrían sido benéficos para las especies templadas, y durante los periodos interglaciales estas especies habrían sufrido los mismos efectos que las de regiones boreales durante las glaciaciones. De esta forma el concepto de refugio pleistocénico tendría que ser modificado para las especies templadas en regiones tropicales y subtropicales, aunque se necesitan muchos más estudios filogeográficos para poder establecer patrones generales sobre esto.

CONCLUSIONES

Las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* están divididas filogeográficamente en dos grandes grupos separados por el Istmo de Tehuantepec. Dentro de cada grupo las poblaciones se mantienen relativamente homogéneas, mientras que los dos grupos están claramente diferenciados, siendo la mutación la fuerza evolutiva principal causante de esto. La demografía histórica de estas poblaciones señala que tuvieron una expansión poblacional antes de un posible evento de vicarianza, y que después las poblaciones de Chiapas experimentaron un segundo evento de expansión. Fechar estos eventos es difícil debido a que se desconoce con exactitud el tiempo de generación de la especie y la tasa de mutación de los marcadores, sin embargo datos geológicos, palinológicos y moleculares de otras especies sugieren que la expansión pudo haber ocurrido aproximadamente hacia finales del Plioceno (1.8 millones de años), mientras que la separación de los grupos pudo haber sido durante uno de los primeros periodos interglaciales del Pleistoceno.

Los niveles encontrados de homoplasia fueron los esperados para el tipo y número de marcadores, dicho nivel parece no estar afectando significativamente a los parámetros utilizados y por lo tanto al análisis realizado, sin embargo esto debe tomarse con precaución ya que depende mucho de la tasa de mutación, la cual no se conoce con exactitud.

LITERATURA CITADA

Adams, R.I., K.M. Brown y M.B. Hamilton. 2004. The impact of electromorph size homoplasy on multilocus population structure estimates in a tropical tree (*Corythophora alta*) and an anadromous fish (*Morone saxatilis*). *Molecular Ecology* 13: 2579-2588

Afzal-Rafii, Z. y R.S. Dodd. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Molecular ecology* 16: 723-736

Avise, J.C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43: 1192-1208

Avise J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, Nueva York.

Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379

Avise, J.C. 2001. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. USA.

Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb, y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: te mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst* 18: 489-522

Bermingham, E. y C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-369

Bogan, L., en la red <http://www.go.ednet.ns.ca/~larry/bsc/jslatlng.html>

Bossart, J.L. y D.P. Prowell. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *TREE* 13: 202-206

Bucci, G., S.C. González- Martínez, G. Le Provost, C. Plomion, M.M Ribeiro, F. Sebastián, R. Alía y G.G. Vendramin. 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. Revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology* 16: 2137-2153

Burban, C. y R.J. Petit. 2003. Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology* 12: 1487-1495

Chambers, G.K. y E.S. MacAvoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 126: 455-476

Clement, M., D. Posada y K. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660

Cuenca, A. 2003. Evidencia de dos linajes genéticos en *Pinus cembroides* revelada por microsatélites de cloroplasto. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. México, 86 pp.

Cuenca, A., A.E. Escalante y D. Piñero. 2003. Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology* 12: 2087-2097.

Crandall, K.A. y A.R. Templeton. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969

Delgado, P., R. Salas-Lizana, A. Vázquez-Lobo, A. Wegier, M. Anzidei, E.R. Alvarez-Buylla, G.G. Vendramin y D. Piñero. 2007. Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae): morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences* 168: 861-875

Daubenmire, R. 1978. *Plant geography: with special reference to North America*. Academic press. USA.

Dumolin-Làpegue, S., B. Demesure, S. Fineschi, V. Le Corre, R.J. Petit. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487

Dupanloup, I., S. Schneider y L. Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11:2571-2581

Echt, C.S., L.L. deVerno, M. Anzidei y G.G. Vendramin. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology* 7: 307-316

Eguiluz Piedra, T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis de Ingeniero Agrónomo Especialista en Bosques. Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Bosques. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México. 623 pp.

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445

EPICA community members. 2004. Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature* 429: 623-628

Escalante, A.E. 2001. Estructura genética de poblaciones de *Pinus pinceana* usando como marcadores moleculares microsatélites de cloroplasto (cpSSR's). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 98p.

Estoup, A.P. y J. Cournet. 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data. En Goldstein, D.B. y C. Schlöterer (eds.). *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Gran Bretaña.

Estoup, A., P. Jarne, y J. Cornuet. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591-1604

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

Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequín ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-80

Farjon A, Styles B (1997) *Flora Neotropica: Pinus* (Pinaceae). New York Botanical Garden, New York.

Franco, M. y J. Silvertown. 2004. A comparative demography of plants based upon elasticities of vital rates. *Ecology* 85: 531-538

Fu, Y.X. 1994. Estimating effective population size or mutation rate using the frequencies of mutations of various classes in a sample of DNA sequences. *Genetics* 138: 1375-1386

Goldstein, D.B., A.R. Linares, M.W. Feldman y L.L. Cavalli-Sforza. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471

Gómez, A., S.C. González-Martínez, C. Collada, L. Gil y J. Climent. 2003. Complex population genetic structure in an endemic Canary Island pine using chloroplast microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1123-1131

Graham, A. 1987. Tropical American Tertiary Floras and Paleoenvironments: México, Costa Rica and Panama. *American Journal of Botany* 74: 1519-1531

Graham, A. 1999. The tertiary history of the northern temperate element in the northern latin american biota. *American Journal of Botany* 86: 32-38

Grotkopp, E., M. Rejmánek, M.J. Sanderson y T.L. Rost. 2004. Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: supertree analyses. *Evolution* 58: 1705-1729

Hardy, O.J., N. Charbonnel, H. Fréville y M. Heuertz. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163: 1467-1482

Hardy, O. y X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618-620

Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1989. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Inc. EUA.

Hedrick, P.W. 2003. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett, USA

Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913

Hwang, S., T. Lin, C. Ma, C. Lin, J. Cheng y J. Yang. 2003. Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch análisis of chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* 12: 2689-2695

Jakobsson, M., T. Säll, C. Lind-Halldén y C. Halldén. 2007. Evolution of chloroplast mononucleotide microsatellites in *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 114: 223-235

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

Kimura, M. y T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 2868-2872

Krugman, S.L. y J.L. Jenkinson. 1974. *Pinus* L. En Nisley, R.G. (ed.) *Woody Plant Seed Manual*. Disponible en la red <http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm>

Lachniet, M.S. 2004. Late quaternary glaciation of Costa Rica and Guatemala, Central America. En Ehlers y Gibbard (eds.). *Quaternary glaciations – extent and chronology, Part III*. Elsevier

Latta, R.G. y J.B. Mitton. 1997. A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in lamber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* 146: 1153-1163

Latta, R.G. y J.B. Mitton. Historical separation and present gene flow through a zone of secondary contact in ponderosa pine. *Evolution* 53: 763-776

Ledig, F.T. 1986. Heterosigosity, heterosis and Fitness in outbreeding plants. En Soule, M.E. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sunderland, Massachussets. Sinauer Associates. pp 77-104

Ledig, F.T. 1998. Genetic variation in *Pinus*. En Richardson, S.M. (ed.), *Ecology and biogeography of Pinus*. 251-280 pp. Cambridge University Press, Cambridge.

Marshall, C.J. y J.K. Liebherr. 2000. Cladistic biogeography of the mexican transition zone. *Journal of biogeography* 27: 203-216

Marshall, H.D., C. Newton y K. Ritland. 2002. Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theor Appl Genet* 104: 367-378

Mitton, J., B. Kreiser y R. Latta. 2000. Glacial refugia of lamber pine (*Pinus flexilis* James) inferred from the population structure of mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 9: 91-97

Moreno, A. y D. Piñero. Strong genetic structure, isolation by distance and ancient introgression in a high-altitude pine species (*Pinus strobiformis* Engelm.) suggest changes in distribution and population sizes during the Pleistocene. En preparación.

Musálem, M. y A. Ramírez. 2003. Monografía de *Pinus ayacahuite*. INIFAP, México D.F.

Navascués, M., y B. Emerson. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homplasy. *Molecular Ecology* 14: 1333-1341

Navascués, M., Z. Vaxevanidou, S.C. González-Martínez, J. Climent, L. Gil y B. Emerson. 2006. Chloroplast microsatellites reveal colonization and metapopulation dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology* 15: 2691-2698

Nei, M. y S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. Nueva York.

Newton, A.C., T.R. Allnutt, A.C.M. Gillies, A.J. Lowe y R.A. Ennos. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *TREE* 14: 140-145

O'Connell, L.M. y K. Ritland. 2004. Somatic mutations at microsatellite loci in western redcedar (*Thuja plicata*: Cupressaceae). *Journal of Heredity* 95: 172-176

Palmer, J.D. y L.A. Herbon. 1988. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular Evolution* 28: 87-97

Petit, R.J., A. El Mousadik, O. Pons. 1998. Identifying populations for conservations on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844-855

Petit, R.J., U.M. Csaikl, S. Bordács, K. Burg, E. Coart, J. Cottrell, B. van Dam, J.D. Deans, S. Dumolin-Lapègue, S. Fineschi, R. Finkeldey, A. Gillies, I. Glaz, P.G. Goicoechea, J.S. Jensen, A.O. König, A.J. Lowe, S.F. Madsen, G. Mátyás, R.C. Munro, M. Olalde, M. Pemonge, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, D. Turchini, S.G.M. de Vries, B. Ziegenhagen, A. Kremer. 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26

Petit, R.J. y A. Hampe. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 187-214

Perry, J.P. 1991. *The pines of México and Central America*. Timber Press. EUA.

Peterson, A.T., J. Soberón y V. Sánchez-Cordero. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* 285: 1265-1267

Pfenninger, M. y D. Posada. 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, stylommatophora): fragmentation, corridor migration and secondary contact. *Evolution* 56: 1776-1788

Powell, W., M. Morgante, R. McDevitt, G.G. Vendramin, J.A. Rafalski. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7759-7763

Provan, J., N. Soranzo, N.J. Wilson, J.W. McNicol, G.I. Forrest, J. Cottrell y W. Powell. 1998. Gene-pool variation in caledonian and european scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings: Biological Sciences* 265: 1697-1705

Provan, J., N. Soranzo, N.J. Wilson, D.B. Goldstein y W. Powell. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153: 943-947

Provan, J., W. Powell y P.M. Hollingsworth. 2001. Chloroplast microsatellites; new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in ecology and evolution* 16: 142-147

Robledo-Arnuncio, J.J. y L. Gil. 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94: 13-22

Rogers, A. 2004. Lecture notes on gene genealogies. Disponible en la red www.anthro.utah.edu/~rogers/bio5410/Lectures/a_alu.pdf

Santini, Nadia. 2007. Expansión demográfica histórica del hongo endófito *Lophodermium nitens* revelada por un intrón de actina. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 50 pp.

Savin, S.M. 1977. The history of the earth's surface temperature during the past 100 million years. *Ann Rev Herat Planet Sci* 5: 319-355

Schaal, B. A., D.A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher y W. A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospectus. *Molecular Ecology* 7: 465-474

Schneider, S. y L. Excoffier. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution or pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089

Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Suiza

Schlöterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371

Schöleter, C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature reviews genetics* 5: 63-69

Schuster, W.S.F. y J.B. Mitton 2000. Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Heredity* 84: 348-361

Sinclair W.T., J.D. Morman y R.A. Ennos. 1999. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 8: 83-88

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462

Sullivan, J., J.A. Markert y C.W. Kilpatrick. 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 46: 426-440

Suzán-Azpiri, H., G. Sánchez-Rámos, J.G. Martínez-Avalos, S. Villa-Melgarejo y M. Franco. 2002. Population structure of *Pinus nelsoni* Shaw, an endemic pinyon pine in Tamaulipas, Mexico. *Forest Ecology and Management* 165: 193-203

- Syring, J., K. Farrell, R. Businsky, R. Cronn y A. Liston. 2007. Widespread genealogical nonmonophyly in species of *Pinus* subgenus *Strobus*. *Systematic Biology* 56: 1-19
- Templeton, A. R., K. A. Crandall and C. F. Sing. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619-633
- Templeton, A.R. 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley and Sons Inc. Hoboken, New Jersey.
- Toledo, V.M. 1982. Pleistocene changes in vegetation in tropical Mexico. En Prance G.T. (ed.). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, Nueva York. Pp 93-111
- Valdés, A.M., M. Slatkin y N.B. Freimer. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133: 737-749
- Van Valen, L. 1975. Life, death and energy of a tree. *Biotropica* 7: 260 - 269
- Vázquez-Lobo, A. 1996. Filogenia de hongos endófitos del género *Pinus*: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 66p.
- Vázquez Selem, L. y K. Heine. 2004. Late quaternary glaciation of Mexico. En Ehlers y Gibbard (eds.). *Quaternary glaciations – extent and chronology, Part III*. Elsevier
- Vendramin, G., L. Lelli, P. Rossi y M. Morgane. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595-598
- Vendramin G, Anzidei M, Madaghiele A, Bucci G (1998) Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 456–463.
- Vendramin, G.G., Degen, B., R.J. Petit, M. Anzidei, A. Madaghiele y B. Ziegenhagen. 1999. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Molecular Ecology* 8: 1117-1126

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

Wimberger, D., V. Alavez, A. Moreno-Letelier y D. Piñero. Effect of microsatellite structure and linkage in population parameters estimation in conifers: a simulation study. En preparación.

Xu, H. y Y. Fu. 2004. Estimating effective population size or mutation rate with microsatellites. *Genetics* 166: 555-563

Zink, R.M. 2002. Method in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the north american aridlands. *Integrative and comparative biology* 42: 953-959

Apéndice 1. Prueba de permutaciones alélicas.

RST	PRST promedio (intervalo de confianza 95%)	FST	P(obs>esp)
Todas las poblaciones			
0.7171	0.2911 (-0.0087 – 0.6863)	0.3006	0.0126
Entre grupos			
0.8277	0.3375 (-0.0112 – 0.8200)	0.3883	0.0302
Dentro de Grupo A			
0.0094	-0.0160 (-0.0585 – 0.0390)	-0.0193	0.2543
Dentro de Grupo B			
0.2533	0.1907 (0.0230 – 0.3157)	0.1976	0.3055

Apéndice 2. Valores pareados de R_{ST} . En negritas los valores significativos. Los números de las poblaciones corresponden a: 1- Omiltemi, 2- Trinidad, 3- Ixtlán, 4- Suchixtepec, 5- Arcotete, 6- Rancho Nuevo, 7- El Porvenir, 8- San Rafael, 9- Pingüica, 10- Agua Blanca, 11- Chichicaxtla, 12- Ciénega Larga, 13- Pueblo Nuevo, 14- Zempoala.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.00000													
2	0.73888	0.00000												
3	0.31612	0.24829	0.00000											
4	-0.03261	0.66243	0.32828	0.00000										
5	0.88958	0.92999	0.89979	0.84443	0.00000									
6	0.78063	0.86810	0.82797	0.72464	0.03911	0.00000								
7	0.76232	0.85799	0.81583	0.70419	0.06228	-0.05375	0.00000							
8	0.26129	0.43476	-0.03347	0.27033	0.90626	0.82522	0.81168	0.00000						
9	-0.01198	0.76714	0.39709	-0.07918	0.85389	0.70715	0.68288	0.38184	0.00000					
10	0.24542	0.36741	-0.04579	0.24320	0.89073	0.79991	0.78470	-0.06385	0.34088	0.00000				
11	0.12644	0.39563	0.05779	0.14415	0.86102	0.76595	0.74972	0.02253	0.17815	0.00256	0.00000			
12	-0.05465	0.62720	0.26371	-0.06254	0.83758	0.70488	0.68258	0.21301	-0.07143	0.17352	0.11671	0.00000		
13	-0.06795	0.80562	0.27183	-0.02537	0.89525	0.77005	0.74957	0.24337	0.11111	0.22535	0.07458	-0.05556	0.00000	
14	0.33259	0.32814	-0.10479	0.28730	0.89493	0.79871	0.78274	-0.09842	0.43588	-0.10811	-0.01018	0.21394	0.40552	0.00000

Apéndice 3. Número de migrantes por generación (Nm) calculado con R_{ST} . Los números de las poblaciones corresponden a: 1- Omiltemi, 2- Trinidad, 3- Ixtlán, 4- Suchixtepec, 5- Arcotete, 6- Rancho Nuevo, 7- El Porvenir, 8- San Rafael, 9- Pingüica, 10- Agua Blanca, 11- Chichicaxtla, 12- Ciénega Larga, 13- Pueblo Nuevo, 14- Zempoala.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0.17670													
3	1.08168	1.51376												
4	inf	0.25480	1.02308											
5	0.06206	0.03764	0.05569	0.09212										
6	0.14051	0.07597	0.10389	0.19000	12.28325									
7	0.15590	0.08276	0.11288	0.21003	7.52851	inf								
8	1.41360	0.65007	inf	1.34962	0.05172	0.10590	0.11601							
9	inf	0.15177	0.75917	inf	0.08555	0.20707	0.23219	0.80946						
10	1.53734	0.86087	inf	1.55596	0.06134	0.12507	0.13719	inf	0.96680					
11	3.45448	0.76381	8.15144	2.96863	0.08071	0.15278	0.16692	21.68866	2.30662	194.63138				
12	inf	0.29720	1.39601	inf	0.09696	0.20934	0.23252	1.84727	inf	2.38144	3.78407			
13	inf	0.12064	1.33935	inf	0.05850	0.14931	0.16705	1.55445	4.00000	1.71875	6.20422			
14	1.00336	1.02375	inf	1.24037	0.05870	0.12601	0.13878	inf	0.64712	inf	inf			
	1.83710	0.73298												

Apéndice 4. Valores pareados de F_{ST} . En negritas los valores significativos. Los números de las poblaciones corresponden a: 1- Omiltemi, 2- Trinidad, 3- Ixtlán, 4- Suchixtepec, 5- Arcotete, 6- Rancho Nuevo, 7- El Porvenir, 8- San Rafael, 9- Pingüica, 10- Agua Blanca, 11- Chichicaxtla, 12- Ciénega Larga, 13- Pueblo Nuevo, 14- Zempoala.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0.00000													
2	0.60889	0.00000												
3	0.29311	0.07770	0.00000											
4	-0.04646	0.54778	0.24867	0.00000										
5	0.57144	0.49031	0.42410	0.50801	0.00000									
6	0.46735	0.42676	0.34759	0.40396	-0.03754	0.00000								
7	0.45804	0.40307	0.33269	0.39636	-0.00030	-0.02095	0.00000							
8	0.11195	0.30271	0.02264	0.08169	0.47062	0.37936	0.37641	0.00000						
9	-0.05792	0.57753	0.26766	-0.06006	0.51248	0.40043	0.37858	0.11884	0.00000					
10	0.10708	0.24098	0.00310	0.07536	0.42521	0.33853	0.33465	-0.06385	0.09674	0.00000				
11	0.16840	0.36741	0.20198	0.15081	0.45773	0.39054	0.38986	0.11944	0.13665	0.08816	0.00000			
12	-0.01709	0.39819	0.14310	-0.03466	0.41663	0.31780	0.29498	0.03145	-0.06667	0.01154	0.04953	0.00000		
13	0.02263	0.77695	0.42145	0.04208	0.66117	0.55083	0.54648	0.24337	0.11111	0.22535	0.19289	0.11111	0.00000	
14	0.17616	0.18791	-0.07209	0.12212	0.42637	0.32979	0.32121	-0.09842	0.16020	-0.10811	0.08143	0.01898	0.40552	0.00000

Apéndice 5. Número de migrantes por generación (Nm) calculado con F_{ST} . Los números de las poblaciones corresponden a: 1- Omiltemi, 2- Trinidad, 3- Ixtlán, 4- Suchixtepec, 5- Arcotete, 6- Rancho Nuevo, 7- El Porvenir, 8- San Rafael, 9- Pingüica, 10- Agua Blanca, 11- Chichicaxtla, 12- Ciénega Larga, 13- Pueblo Nuevo, 14- Zempoala.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14											
1												
2	0.32117											
3	1.20583	5.93496										
4	inf	0.41278	1.51073									
5	0.37499	0.51977	0.67897	0.48424								
6	0.56986	0.67162	0.93849	0.73774	inf							
7	0.59160	0.74049	1.00288	0.76147	inf	inf						
8	3.96647	1.15175	21.58360	5.62056	0.56242	0.81799	0.82833					
9	inf	0.36576	1.36801	inf	0.47565	0.74865	0.82072	3.70741				
10	4.16951	1.57483	161.04452	6.13500	0.67588	0.97699	0.99411	inf	4.66870			
11	2.46906	0.86087	1.97553	2.81535	0.59235	0.78028	0.78252	3.68612	3.15903	5.17125		
12	inf	0.75569	2.99403	inf	0.70011	1.07331	1.19500	15.39874	inf	42.82979	9.59397	
13	21.590	0.14354	0.68638	11.38249	0.25623	0.40773	0.41495	1.55445	4.00000	1.71875	2.09221	4.00000
14	2.33830	2.16087	inf	3.59417	0.67268	1.01613	1.05661	inf	2.62105	inf	5.64043	25.83691
	0.73298											

Apéndice 6. Matriz de distancias geográficas, valores en kilómetros. Los números de las poblaciones corresponden a: 1- Omiltemi, 2- Trinidad, 3- Ixtlán, 4- Suchixtepec, 5- Arcotete, 6- Rancho Nuevo, 7- El Porvenir, 8- San Rafael, 9- Pingüica, 10- Agua Blanca, 11- Chichicaxtla, 12- Ciénega Larga, 13- Pueblo Nuevo, 14- Zempoala.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	354.7													
3	339	22.3												
4	378.5	128.6	145.1											
5	761.1	406.5	423.5	420.4										
6	766.4	412	429	424.4	6.7									
7	819.7	476.2	496.5	449.7	146.3	140.9								
8	223.5	341.8	319.6	432.9	713.4	719.7	807.7							
9	399.8	556.8	534.4	655.8	896.1	902.6	1005	224.1						
10	339.9	401	379	510.3	729	735.6	838.9	117	167					
11	301	322.9	1074.5	432.6	660.4	667.4	766.3	239.3	239.3	78.3				
12	292.5	1116.5	304.3	434.3	668.9	675.4	773.1	78.8	233.3	76.1	11			
13	683.1	383.4	383.4	508.5	749.8	756.3	855.1	90.7	151.7	40.7	89.1	82.1		
14	169.7	348.3	348.3	444.1	758	764.1	843.8	69.9	238.2	176.2	159.5	148.9	141.081	