



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Facultad de Ciencias**

**ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN DE SEMILLAS EN UNA  
METAPOBLACIÓN DE LA EPÍFITA *Tillandsia recurvata* L.  
(BROMELIACEAE) A TRAVÉS DEL USO DE  
MICROSATÉLITES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

**CYNTHIA ALEJANDRA RAMÍREZ PADILLA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA TERESA VALVERDE VALDÉS

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

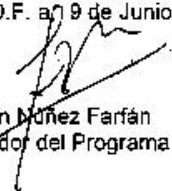
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de Marzo de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **CYNTHIA ALEJANDRA RAMÍREZ PADILLA** con número de cuenta **94266573** con la tesis titulada "**Análisis de la dispersión de semillas en una metapoblación de la epífita *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae) a través del uso de microsátélites**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA TERESA VALVERDE VALDÉS**.

Presidente: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA  
Vocal: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS  
Secretario: DRA. MARÍA TERESA VALVERDE VALDÉS  
Suplente: DR. SOFÍA SOLORZANO LUJANO  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 9 de Junio de 2008.

  
Dr. Juan Muñoz Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

## Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Ma.Teresa Valverde Valdés, por todo el apoyo, confianza y enseñanza en todo momento. Dra. Ma. del Carmen Mandujano Sánchez, por el apoyo siempre brindado en el laboratorio y al Dr. Ken Oyama Nakagawa por sus valiosos comentarios y sugerencias para el mejoramiento de esta tesis.

A los miembros del Jurado: Dra. Sofía Solórzano Lujano y al Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, por todos los valiosos comentarios, sugerencias y observaciones que ayudaron al mejoramiento del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología “CONACyT” por otorgarme la beca de maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado “DGEP”, de la UNAM, por otorgarme la beca complementaria

Al proyecto: “Demografía, estructura genética y dinámica metapoblacional de *Tillandsia recurvata* en Tehuacán, Puebla” (Proyecto PAPIIT IN221401) de la Dra Valverde para la realización de esta tesis.

Al proyecto “SEMARNAT-CONACyT 0350” de la Dra. Mandujano.

## Agradecimientos

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Tere Valverde (Tere), pues una vez más ha confiado en mí, brindándome en todo momento su apoyo, conocimiento, cariño, comprensión y paciencia.

Agradezco también a la Dra. Ma. del Carmen Mandujano (Meli) por apoyarme en todo momento con las cuestiones del laboratorio, y hacerme sentir parte de él.

A los miembros de mi comité: Dra. Tere Valverde, Dra. Ma. Del Carmen Mandujano y el Dr. Ken Oyama, por el apoyo, comentarios y observaciones para el mejoramiento de mi tesis.

A Erick García, por su amistad, por enseñarme el mundo de los microsatélites (PCR, geles, análisis, etc), y por todas las veces que de seguro lo desquicié con mis múltiples dudas.

A Rodrigo Vega por ayudarme cuando tenía problemas con la corridad de mis geles.

A Lucía Plasencia por su valiosa amistad y por bridarme en todo momento y con suma paciencia la ayuda cuando más la necesitaba.

A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio Especializado de Ecología, en especial a Tere Valverde, Mariana Apolinar, Pedro, Marce, Rodrigo, Juan Carlos, Consuelo, Irene, Felix, etc., por su amistad, muestras de cariño y solidaridad.

También agradezco a los integrantes del Laboratorio de Dinámica de Poblaciones: Laura, por lo que compartimos en la maestría..., Mariana Rojas, Lucy, Meli, Jordan, Coni, Belinda, Gis, Violeta, Isrra, Hugo (gracias por los mapas), Erick, Haba, Yup, Karla, Rosa y Silvia, además del vecino Brian, por todas las muestras de afecto, por hacer que el trabajo de laboratorio fuera más ameno y por los momentos tan divertidos que pasamos tanto dentro como fuera del instituto.

Gracias a las chicas del Laboratorio de Macroecología: Rebeca, Susette, Anahí, y Aliete, por su gran amistad, risas (carcajadas), porras, y por animarme cada vez que lo necesitaba.

A la Dra. Ella Vázquez por haber ayudarme a solucionar los problemas y dudas en la corrida de mis geles. A Miros, por ayudarme con la matriz para la prueba de Mantel.

A mis amiga(o)s de la carrera, en especial a Noemi, Itzel y Nino, por la amistad de tantos años.

De manera muy especial y con mucho cariño agradezco a mis padres: Guadalupe Padilla y Ricardo Ramírez, por todo su amor, apoyo y comprensión, por esperar siempre lo mejor de mí, y por motivarme en todo memento a seguir adelante.

A mis otros papás: Anita (†) y Juanito, por todo el cariño y apoyo incondicional que siempre me han brindado, por los momentos felices a su lado, y porque la distancia física no ha sido impedimento para que sigan junto a mí.

A mi hermana Arlette, por todos los momentos que hemos compartido, reído y aprendido juntas, por decirme lo cuan orgullosa te sientes de mí (aunque la verdad, es al revés), y por estar siempre conmigo en todo momento.

A mis hermanos Ricardo y Yazmín, por lo cuan diferentes somos, por ser ustedes el polo “positivo”. A mi sobrina Valeria, por ser la personita que me ha dado tanta alegría y ser una razón más para seguir en el camino.

A toda mi familia, en especial a mis tíos: Mario, Carlos y Raúl, así como a todos mis primos, por todo el afecto que siempre me han dado.

A la vida misma...

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque no concibo mi vida sin ella.

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de “Dinámica de Poblaciones y evolución de historias de vida” del Instituto de Ecología, UNAM. a cargo de la Dra. Ma. del Carmen Mandujano. Así como en el laboratorio “Especializado de Ecología” de la Facultad de Ciencias a cargo de la Dra. Ma. Teresa Valverde.

## **D e d i c a t o r i a**

*A mi familia*

*A mis amigos*

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	2
<b>Presentación</b>	3
<b>Capítulo I. Introducción</b>	5
<i>I.1 Las plantas epífitas</i>	5
<i>I.1.1 Clasificación de las epífitas</i>	7
<i>I.1.2 La familia Bromeliaceae</i>	7
<i>I.1.3 Genética de poblaciones en algunas especies de epífitas y bromelias</i>	9
<i>I.2 La teoría metapoblacional</i>	12
<i>I.2.1 El modelo de Levins</i>	13
<i>I.2.2 Otros modelos metapoblacionales</i>	15
<i>I.2.3 Evidencias de la existencia de metapoblaciones en epífitas</i>	16
<i>I.2.4 Evaluación de la dispersión de semillas en un contexto metapoblacional</i>	16
<i>I.2.5 Consecuencias de la dinámica metapoblacional sobre la estructura genética</i>	20
<i>I.3 Marcadores moleculares</i>	23
<i>I.4 Objetivos</i>	26
<i>I.5 Hipótesis</i>	26
<b>Capítulo II. Métodos</b>	27
<i>II.1 La especie en estudio: Tillandsia recurvata L.</i>	27
<i>II.2 Obtención del material biológico</i>	28
<i>II.3 Técnicas de laboratorio para la extracción, amplificación y visualización de los microsatélites</i>	33
<i>II.4 Métodos de análisis genético</i>	35
<i>II.4.1 Variación genética intra-poblacional</i>	35
<i>II.4.2 Variación genética inter-poblacional</i>	37
<i>II.4.3 Análisis de paternidad. Estimación del número de inmigrantes por población</i>	40
<b>Capítulo III. Resultados</b>	41
<i>III.1 Resultados generales</i>	41
<i>III.2 Variación genética intra-poblacional</i>	43
<i>III.3 Variación genética inter-poblacional</i>	48
<i>III.4 Análisis de paternidad. Estimación del número de inmigrantes por población</i>	54
<b>Capítulo IV. Discusión</b>	57
<i>IV.1 Variación genética intra-poblacional</i>	57
<i>IV.2 Variación genética inter-poblacional</i>	64
<i>IV.3 Análisis de paternidad</i>	71
<i>IV.4 Conclusiones</i>	74
<b>Bibliografía</b>	75
<b>Apéndices</b>	83



## Resumen

*Tillandsia recurvata* es una epífita que forma metapoblaciones, las cuales son sistemas dinámicos conformados por poblaciones locales de la misma especie conectadas por la dispersión de individuos entre ellas, manteniendo un balance entre la extinción y colonización. Al ser la dispersión uno de los procesos más importantes en la dinámica de una metapoblación, en este trabajo se evaluó la dispersión de semillas a través del uso tres loci de microsatélites en una metapoblación de *T. recurvata* en el valle de Tehuacán, Puebla.

Se describió la diversidad y estructura genética de nueve poblaciones locales de *T. recurvata*, analizándolas tanto de forma completa como separándolas por adultos y plántulas. Además, se realizó un análisis de paternidad por exclusión para obtener el porcentaje de plántulas proveniente de padres externos y evaluar la intensidad de la inmigración en cada una de las poblaciones estudiadas; esta última se buscó relacionar con su nivel aislamiento, evaluado con base en la distancia a la que se encontraba el árbol colonizado más cercano. Se encontró una alta variabilidad genética en las poblaciones locales de *T. recurvata*, con una heterocigosis observada ( $H_o$ ) de 0.668 y una heterocigosis esperada ( $H_e$ ) de 0.736. En los individuos adultos se encontró una tendencia hacia un exceso de heterocigos ( $F_{IS} = -0.0279$ ), mientras que en las plántulas se encontró una deficiencia de heterocigos ( $F_{IS} = 0.163$ ). Con base en estos resultados, se sugiere que hay una selección a favor de los genotipos heterocigos en los estadios tempranos.

Se observó un bajo nivel de diferenciación genética entre las poblaciones locales ( $F_{ST} = 0.094$ ), el cual parece estar determinado por la elevada dispersión de semillas ( $Nm = 2.75$ ). No se encontró evidencia de aislamiento por distancia. El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que el mayor porcentaje de variación se encontró a nivel intrapoblacional (85.7%).

El análisis de paternidad mostró que la inmigración es muy elevada: el porcentaje de plántulas inmigrantes varió de 57 a 100%; sin embargo, no se correlacionó con el nivel de aislamiento, al menos en los niveles de aislamiento considerados (2 a 31 m). En conclusión, la intensa dispersión de semillas y la probable selección a favor de los heterocigos podrían contrarrestar el efecto de la autogamia en *T. recurvata*, homogenizando a las poblaciones y manteniendo cierto grado de heterocigosidad entre ellas. Con respecto a la dinámica metapoblacional, la intensa dispersión de semillas podría determinar que este sistema de poblaciones locales corresponda a una metapoblación del tipo “poblaciones a manera de parches”, de entre los tipos metapoblacionales propuestos por Harrison (1991).

## Abstract

*Tillandsia recurvata* is an epiphyte that forms metapopulations. These are dynamic systems formed by local populations connected through migration which are maintained by a balance between colonizations and extinctions. Since dispersal is one of the most important metapopulation processes, in this study we evaluated seed dispersal through the use of three microsatellite loci in a metapopulation of *T. recurvata* in Tehuacán, Puebla.

The genetic diversity and structure of nine local populations of *T. recurvata* were studied, both considering whole populations, and subdividing them in size categories (adults and seedlings). Additionally, a paternity analysis (by exclusion) was performed to estimate the proportion of seedlings originating from external parents and thus evaluate the intensity of immigration in each of these populations. The relationship between immigration and isolation level of each population (*i.e.*, distance to the nearest colonized tree) was also explored. A high genetic diversity was found in the *T. recurvata* populations evaluated, with observed heterozygosity ( $H_o$ ) of 0.668 and expected heterozygosity ( $H_e$ ) of 0.736. A trend towards an excess of heterozygotes was found among adults ( $F_{IS} = -0.0279$ ), while among seedlings a deficit of heterozygotes was detected ( $F_{IS} = 0.163$ ). Based on these results, we propose that there is selection in favour of heterozygotes during the early stages of development.

A low genetic differentiation level between populations was observed ( $F_{ST} = 0.094$ ), apparently determined by a high level of seed dispersal between them ( $Nm = 2.75$ ). No evidence of isolation by distance was found. An analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the highest proportion of genetic variation occurred at the intrapopulation level (85.7%).

The results of the paternity analysis performed showed that immigration is very high: the percentage of immigrant seedlings varied between 57 and 100%; however, this percentage was not correlated to the isolation level of the local populations, at least within the isolation levels considered (2 to 31 m). We conclude that the intense seed dispersal and the apparent selection in favour of the heterozygote genotypes could compensate for the effect of autogamy in *T. recurvata* through the homogenization of populations and the maintenance of a certain degree of heterozygosity. In relation to the metapopulation dynamics, the intense seed dispersal could determine that this system of local populations corresponds to a metapopulation of the type “patchy populations”, from those recognized by Harrison (1991).

## PRESENTACIÓN

Los estudios sobre ecología de poblaciones suponen que las poblaciones funcionan como unidades aisladas y cerradas, en las que los parámetros fundamentales que afectan su dinámica son los nacimientos y las muertes, suponiendo que la migración no juega un papel importante en la dinámica de las mismas (Krebs, 1995). Sin embargo, esta suposición no ha sido sustentada por evidencia sólida debido a la dificultad para evaluar este parámetro en las poblaciones naturales. Por el contrario, la evidencia empírica parece apuntar hacia el hecho de que muchas especies, entre ellas, algunas especies de insectos (Hanski et al., 1994) y anfibios (Sjörger, 1991) forman poblaciones que no funcionan de manera aislada, sino que su dinámica se ve afectada por la inmigración y emigración de individuos entre localidades. De esta manera, muchas especies se organizan en grupos de poblaciones locales conectadas por la dispersión de individuos entre ellas; estas entidades se conocen como metapoblaciones (Levins, 1969). Este fenómeno ha sido principalmente estudiado en procesos de fragmentación de hábitat y la necesidad de conocer la conectividad entre fragmentos (Cruzan, 2001; Williams et al., 2003)

La migración es un proceso ecológico de gran importancia pues, además de ser la responsable de una buena parte del contacto genético entre poblaciones, permite la colonización de parches nuevos en un contexto metapoblacional (Hanski, 1998). Así, una metapoblación es un sistema dinámico en el que hay una constante colonización de nuevos sitios (parches de hábitat), y que mantiene un balance con la extinción de poblaciones locales. Estos dos procesos, colonización y extinción, determinan la dinámica metapoblacional. De esta forma, el análisis de dicha dinámica involucra el estudio tanto de la tasa de colonización, como de la tasa de extinción de las poblaciones locales, así como la evaluación de las condiciones que permiten un equilibrio entre ambos procesos, permitiendo la permanencia de las especies a nivel regional (Hanski, 1991).

Un ejemplo de estructura y funcionamiento metapoblacional es el de las especies de plantas que viven sobre otras plantas (*i.e.*, epífitas), pues cuentan con muchas de las características descritas anteriormente. Tal es el caso de la epífita *Tillandsia recurvata*, que se establece sobre árboles y arbustos de diversos géneros en las comunidades semi-áridas del centro de México, por lo que representa un sistema idóneo para estudiar algunos de los aspectos que determinan la dinámica metapoblacional en especies vegetales (Bernal, et al., 2005). Es claro que la presencia de esta especie en un área determinada depende de su

probabilidad de ocupar a los forofitos (árboles hospederos) potenciales (*i.e.*, colonización), y que dichos forofitos tarde o temprano mueren (*i.e.*, extinción local), por lo que este sistema debe mantenerse en un balance entre colonizaciones y extinciones. Incluso si el proceso de colonización de nuevos forofitos por dispersión de semillas ocurre con una baja frecuencia (la cual depende tanto del patrón de distribución espacial de los forofitos, como de sus características arquitectónicas y de la amplitud de la dispersión de semillas; Benzing, 1981a; Bullocky Clark, 2000), e incluso si las poblaciones locales presentan una baja probabilidad de extinción (pues los forofitos son longevos y presentan una alta probabilidad de sobrevivencia; Bernal, 2006), estos dos procesos intuitivamente resultan claves para explicar la presencia o ausencia de *T. recurvata* en un ecosistema determinado.

En el presente trabajo nos concentramos en la evaluación de la dispersión de semillas entre poblaciones locales de la epífita *T. recurvata* en el Valle de Tehuacán, particularmente en la región de Zapotitlán Salinas, Puebla, México aspecto central para comprender la dinámica de esta metapoblación. Para evaluar la dispersión de semillas en este sistema, utilizamos a los microsatélites, que son marcadores moleculares altamente variables que permiten distinguir diferencias entre individuos a escalas espaciales muy pequeñas. Con los resultados de los microsatélites, realizamos un análisis de paternidad por exclusión, con la finalidad de distinguir de entre las plántulas recientemente establecidas, aquellas que no provienen de los adultos de la población focal. De esta forma, se cuenta con una estimación de la inmigración que ha recibido dicha población. Esta estimación puede ser comparada con medidas clásicas de genética poblacional que hacen referencia a este mismo proceso pero que evalúan su importancia de manera teórica (*i.e.*,  $R_{ST}$ ,  $F_{ST}$ ,  $Nm$ , etc.).

El presente estudio constituye un esfuerzo pionero en el ámbito del análisis de la dispersión de semillas entre poblaciones vegetales con el uso de herramientas moleculares y representa un ejemplo de la utilidad de este tipo de herramientas en la evaluación de procesos ecológicos. Sus resultados permitirán complementar la información ecológica que se ha generado como parte del proyecto “Demografía, estructura genética y dinámica metapoblacional de *Tillandsia recurvata* en Tehuacán, Puebla” (Proyecto PAPIIT No. IN221401), del cual forman parte también los estudios de Hernández-Rosas (2003), Bernal et al. (2005), Bernal (2006), Jiménez-Lobato y Valverde (2006) y García-Morales (2007).

# Capítulo I

## Introducción

### *1.1 Las plantas epífitas*

Las plantas epífitas son aquellas que pasan todo o la mayor parte de su ciclo de vida situadas sobre otras plantas, sin tener contacto con el suelo y sin tomar nutrientes directamente del hospedero (Lüttge, 1989; Benzing, 1990), ya que éste es utilizado únicamente como medio de soporte, obteniendo sus alimentos ya sea a través del agua de lluvia o del vapor de agua del aire, así como de sales minerales de partículas de polvo arrastradas por el viento (Valdivia, 1977). Así, una epífita no establece relaciones metabólicas con su hospedero como sucede con la simbiosis o el parasitismo (Lüttge, 1989).

Las epífitas se enfrentan a una baja disponibilidad de agua y nutrientes, cambios bruscos de temperatura y un sustrato habitable que se distribuye a manera de parches, lo que convierte a los hospederos en sustratos no estables ya que ofrece condiciones favorables de forma intermitente (Benzing, 1981). Por tal motivo, las epífitas han desarrollado una serie de adaptaciones para poder sobrevivir, apareciendo en varios linajes evolutivos y derivando en una gran diversificación morfológica (Valdivia, 1977).

Dadas las condiciones limitantes de su ambiente, las epífitas presentan una mayor diversidad en los bosques tropicales húmedos, lo cual está relacionado con la diversidad de nichos ecológicos, diversidad de sustratos y de posibles polinizadores aunado a la presencia de condiciones microclimáticas favorables (Gómez- Pompa, 1971), mientras que su ocurrencia en lugares secos es menos común, encontrándose menos *taxa* pero no necesariamente en abundancias bajas (Benzing, 1990).

De acuerdo con la información disponible, se estima que cerca de un 10 % (23,456 especies) de plantas vasculares son epífitas, agrupadas en 84 familias, entre las que destaca *Orchidaceae* (13,951 especies), *Araceae* (1349 especies) y *Bromeliaceae* (1144 especies) (Kress, 1989; Benzing, 1990).

El forofito (árbol hospedero), fungen como soporte para las plantas epífitas (Benzing, 1990), debe presentar ciertas características para el establecimiento y posterior crecimiento de las mismas. Las características de la corteza de los árboles hospederos son un factor decisivo para el desempeño de las epífitas, pues determinan sus probabilidades de fijación, así como el almacenamiento o retención del agua de lluvia, por lo que tienen un efecto sobre la abundancia de epífitas (Valdivia, 1977). Sin embargo, la corteza de los árboles, a

diferencia del suelo, amortigua débilmente la aridez, por lo que las epífitas están expuestas al calentamiento y el enfriamiento por efecto de las corrientes de aire circundantes. Además, estos ambientes presentan eventos de sequía periódicos y prolongados y rápidas fluctuaciones de temperatura. Los nutrientes son escasos y únicamente están disponibles durante los breves episodios de lluvia (Benzing, 1978a), limitando así el crecimiento de las plantas epífitas (Zotz, 1995). Así mismo, existen otros factores limitantes que varían con la estratificación del dosel. La luz por ejemplo, es un factor que tiene gran relevancia para la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas, pues la cantidad y la calidad lumínica varía de acuerdo al estrato del dosel; en las zonas más bajas de la vegetación se recibe un pequeño porcentaje de la radiación que se capta en las copas más altas. Así, estas calidades lumínicas son limitantes para las plantas de aquellas partes bajas del dosel (Lüttge, 1989). En respuesta a lo anterior, muchas epífitas presentan adaptaciones xeromórficas, como la presencia de tejidos suculentos en los cuales se almacena agua y nutrientes minerales los cuales se encuentran sumamente diluidos (Benzing, 1978b) o el presentar una hipodermis en las hojas (la cuál podría actuar como un escudo al calor y amortiguar las oscilaciones de temperatura), además de un metabolismo CAM (metabolismo ácido-crasuláceo) en el que los estomas permanecen cerrados durante el día y abiertos en la noche cuando las plantas fijan CO<sub>2</sub> en los ácidos orgánicos (Griffiths, 1989; Madison, 1997;).

Para colonizar la copa de un hospedero a otro, las epífitas son dispersadas por el viento o por las aves como agentes dispersores de semillas (Benzing, 1978a).

Cabe señalar que aunque las epífitas no son organismos parásitos (ya que no establecen relaciones metabólicas con su hospedero), se han denominado “parásitas de espacio”, ya que al tener un crecimiento abundante, las epífitas pueden perjudicar y competir con su hospedero por la luz, además de imponerle un estrés mecánico (Lüttge, 1989). De esta forma, al aumentar la densidad de epífitas en algunas ramas puede influir indirectamente en la putrefacción y actividad microbiana provocando la descomposición y caída del árbol (Valdivia, 1977). Por esta razón, en algunos países tropicales se eliminan regularmente a las epífitas de los árboles (Lüttge, 1989). Existen mecanismos naturales para eliminar a las epífitas como ocurre con la simbiosis entre el árbol *Cecropia* y las hormigas *Azteca* quienes dejan libres de epífitas a su hospedero (Perry, 1985 en Lüttge, 1989).

### ***1.1.1 Clasificación de las epífitas***

Existen diversas clasificaciones de las epífitas que se basan en diferentes características de estas plantas o del tipo de ambiente en el que viven. Una de ellas es la clasificación que toma en cuenta los requerimientos de humedad de la planta o su tolerancia a la desecación. Así, se

considera que existen las epífitas poikilohídricas que se reconocen como aquellas especies que dependen fuertemente de la humedad ambiental para mantener sus tejidos húmedos, como es el caso de algunos helechos y las epífitas homohídricas que incluyen a las especies que mantienen sus tejidos hidratados independientemente de la humedad ambiental (Benzing, 1990). A su vez, dentro de este último grupo se reconocen los siguientes tipos:

a) Epífitas xéricas. Poseen una gran capacidad para resistir la sequía así como para obtener nutrientes minerales de la atmósfera. La mayoría de estas plantas presentan metabolismo tipo CAM y requieren una alta intensidad de radiación lumínica para su desarrollo. Un ejemplo de lo anterior lo representan las plantas de los géneros *Tillandsia* y *Vriesea* de la familia Bromeliaceae (Benzing, 1978b, 1990).

b) Epífitas méxicas. Se distribuyen en regiones tropicales donde la humedad atmosférica es alta. Además, son capaces de sobrevivir a bajas intensidades lumínicas gracias a su gran contenido de clorofila y a su metabolismo fotosintético tipo C<sub>3</sub>, por lo cual presentan altas tasas de crecimiento y en ocasiones pueden propagarse vegetativamente (Benzing, 1978b, 1990).

De acuerdo con Benzing (1978b), el epifitismo xérico y el méxico son estrategias ecológicamente relacionadas que se encuentran en extremos opuestos a lo largo de un continuo ambiental y que representan diferentes formas de adaptación al ambiente epífito. Ambos tipos de epifitismo se encuentran representados en la familia Bromeliaceae, que es una de las familias de plantas superiores que cuenta con un mayor número de epífitas y es a la que pertenece nuestra especie de estudio, *Tillandsia recurvata*.

### **I.1.2. La familia Bromeliaceae**

La familia Bromeliaceae se compone de 50 géneros de los cuales 27 son de hábito epífito. De las 2,000 especies aproximadamente con las que cuenta la familia, 1,145 son epífitas. Esta familia es de origen neotropical (Madison, 1977), por lo que aparentemente se trata de una familia relativamente joven (Smith, 1989). La familia Bromeliaceae es subdividida en tres subfamilias:

- a) La subfamilia Pitcairnioideae, formada de plantas terrestres que crecen en hábitats expuestos, elevados y pobres en nutrientes. Esta subfamilia se considera la más antigua y cuenta con alrededor de 731 especies (Smith, 1989).
- b) La subfamilia Tillandsioideae, que cuenta aproximadamente con alrededor de 800 especies, la mayoría de las cuales son epífitas. Esta subfamilia muestra un amplio espectro de tipos de epifitismo, desde las epífitas extremas xeromórficas que crecen en

ambientes áridos, hasta las especies méxicas tolerantes a la sombra que se distribuyen en zonas húmedas (Smith, 1989).

- c) La subfamilia Bromelioideae, que tiene alrededor de 557 especies entre las cuales se registran tanto epífitas como terrestres. La mayoría de las cuales se distribuyen en ambientes tropicales húmedos (Smith, 1989).

De acuerdo con su forma de obtención de recursos y a su dependencia del sustrato, Pittendrigh (1948 en Lüttge 1989) clasificó a las bromelias en cuatro tipos:

Tipo I. Suelo-raíz. Representado por las especies terrestres que dependen de un sistema común suelo-raíz para la obtención de agua y nutrientes. En este grupo se encuentran la gran mayoría de plantas pertenecientes a la subfamilia Pitcairnioideae. (Smith, 1989).

Tipo II. Tanque-raíz. En esta categoría se agrupan todas las especies terrestres de la subfamilia Bromelioideae. En estas plantas el arreglo de las hojas a manera de roseta forma una estructura tipo tanque en la que se acumula el agua de la lluvia y la materia orgánica. El tanque tiene una baja capacidad de retención de agua, sin embargo, la planta presenta un sistema de raíces bien desarrollado en la base de la roseta que contribuye a la obtención de agua y solutos (Smith, 1989).

Tipo III. Tanque-tricomas absorbentes. Todas las especies en este grupo son epífitas y la raíz presenta únicamente una función mecánica y de fijación. El tanque formado por las hojas se encuentra altamente desarrollado y puede almacenar grandes cantidades de agua y detritos orgánicos. La base de las hojas presenta tricomas, estructuras responsables de la obtención de agua y nutrientes. En este grupo se encuentran la mayoría de las Tillandsioideae y todas las epífitas de la subfamilia Bromelioideae (Smith, 1989).

Tipo IV. Atmosférico-tricomas absorbentes. Las especies de este grupo presentan hojas cubiertas de tricomas absorbentes, mientras que la raíz es exclusivamente una estructura de fijación (Benzing, y Renfrow, 1971; Benzing y Otto, 1981; Benzing, 1990). Los tricomas foliares son altamente especializados y a través de ellos la planta absorbe agua y nutrientes, mientras que el tanque se encuentra pobremente desarrollado. La mayoría de las especies de este grupo son del género *Tillandsia* en el que se encuentran las epífitas atmosféricas extremas que carecen completamente de tanque (Smith, 1989). Este género comprende entre aproximadamente entre 450 especies, de las cuales 400 son epífitas (Kress, 1989).

Las especies del género *Tillandsia* presentan dos características cruciales que han evolucionado para definir el hábito epífita: la presencia de un tanque en algunas de ellas (e.g.



*T. depeanna*, *T. imperialis*), el cual se ha definido como un reservorio de agua en la base de las hojas que se origina por la disposición sobrelapada de las mismas, y la presencia de hojas suculentas cubiertas de tricomas absorbentes en las especies de tipo atmosférico (e.g. *T. ionantha*, *T. recurvata*, *T. pueblensis*, *T. usneoides* y *T. circinnata*) (Benzing y Renfrow, 1971; Gilmartin y Brown, 1986; Benzing, 1990). Por otra parte, el metabolismo CAM se encuentra ampliamente representado en el género *Tillandsia*, principalmente en especies xeromórficas extremas como es el caso de *T. recurvata* (Lüttge, 1989).

Debido al tipo de hábitat que ocupan las plantas epífitas, en las que los parches ocupables (*i.e.* forofitos) se encuentran distribuidos de manera discreta en el ambiente (García-Suárez et al., 2003), se ha sugerido que forman metapoblaciones que se mantienen en un balance entre la formación de poblaciones locales nuevas (colonización) y la desaparición de poblaciones, por ejemplo, como producto de la muerte de los forofitos (Bernal et al., 2005).

### ***1.1.3 Genética de poblaciones en algunas especies de epífitas y bromelias***

A pesar de que las plantas epífitas representan el 10% de la flora vascular (Kress, 1989), los trabajos de genética de poblaciones en este grupo son escasos y la mayoría de ellos se han realizado con isoenzimas, como se detalla en los siguientes párrafos.

La manera en la que se distribuye la variación genética dentro y entre poblaciones constituye su estructura genética y es resultado de la acción de las fuerzas evolutivas como la mutación, la migración, la selección natural y la deriva génica (Loveless y Hamrick, 1984). Sin embargo, otros factores también pueden influir en la diversidad y estructura genética de las poblaciones de plantas, tales como los sistemas reproductivos, los mecanismos de dispersión de semillas y otras características de historia de vida (por ejemplo, si son iteróparas o semélparas) (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick y Godt, 1989).

Existe una gran variedad de sistemas reproductivos en las plantas, desde los que involucran autofertilización (autogamia) hasta los que presentan fertilización cruzada, que tienen consecuencias diversas sobre la variabilidad y estructura genética de las poblaciones (Izquierdo, 1995). En general, las plantas que se autofertilizan presentan bajos niveles de diversidad genética y alta diferenciación entre poblaciones (Hamrick et al., 1979). Esto se aplica también para especies de epífitas, como *Tillandsia recurvata*, que es una especie autógena (según Soltis et al., 1987, de acuerdo con su morfología floral). Soltis et al. (1987), trabajando con isoenzimas, encontraron en esta especie una heterocigosis de  $H_o = 0.0$ , una  $F_{IS} = 1$  y una  $F_{ST} = 0.906$ . Estos resultados indican que no existe diversidad genética en sus

poblaciones, probablemente debido a la intensa endogamia; asimismo, la diferenciación genética entre poblaciones es extremadamente alta. En la bromelia terrestre *Aechmea mexicana*, que también es autógena, se encontró una  $H_o = 0.054$ , una  $F_{IS} = 0.643$  y una  $F_{ST} = 0.615$  (Izquierdo, 1995). Esta baja diversidad genética se debe, argumenta el autor, a la endogamia, la cual origina un exceso de homocigos. También se presenta una elevada diferenciación genética entre poblaciones como resultado del flujo génico limitado entre ellas ( $Nm = 0.185$ ).

Las plantas con fecundación cruzada, a diferencia de las autógenas, generalmente presentan una mayor diversidad genética al interior de sus poblaciones y una menor diferenciación genética entre poblaciones (Hooper y Haufler, 1997). En el grupo de las epífitas, un ejemplo de lo anterior se encuentra en los helechos epífitos del género *Pleopeltis*, en el que los gametofitos se originan a partir de las esporas de diferentes esporofitos. En este grupo se reporta un alto porcentaje de loci polimórficos (62%) y una heterocigosis observada de  $H_o = 0.181$ ; por su parte, en este género la  $F_{IS}$  fue cercana a cero y la  $G_{ST} = 0.048$ , indicando que no existe endogamia y que hay una diferenciación genética relativamente baja entre poblaciones, como producto de un elevado flujo génico ( $Nm = 3.9 - 7.6$ ) (Hooper y Haufler, 1997). En contraste, la bromelia epífita *Tillandsia ionantha*, que también presenta fecundación cruzada, tiene bajos niveles de variación genética ( $H_o = 0.064$ , con isoenzimas) y una baja diferenciación entre poblaciones ( $F_{ST} = 0.043$ ) (Soltis et al. 1987).

En las plantas que presentan tanto fertilización cruzada como autopolonización y/o propagación vegetativa, la variación y la estructura genética varían mucho, dependiendo del sistema que predomine. Por ejemplo, la especie *Pitcairnia geyskesii*, una bromelia saxícola (*i.e.*, que se establece sobre piedras) que se propaga vegetativamente a través de rizomas y que además produce semillas, presenta una heterocigosis observada relativamente alta ( $H_o = 0.185$ , obtenida a partir de isoenzimas); sin embargo, la diferenciación genética entre poblaciones también es elevada ( $F_{ST} = 0.322$ ) probablemente debido al limitado flujo génico ( $Nm = 0.234$ ) (Sarhou et al. 2001). La bromelia terrestre *Aechmea magdanelae* presenta tanto reproducción sexual (autógena) como propagación vegetativa y tiene una baja heterocigosis ( $H_o = 0.099$ , en isoenzimas) y una  $F_{IS} = 0.179$ , lo cual indica un déficit de heterocigos como resultado de la endogamia. Además, presenta una elevada diferenciación genética ( $G_{ST} = 0.356$ ) y un flujo génico limitado ( $Nm = 0.43$ ) (Murawski y Hamrick 1990). De acuerdo con los autores, este último resultado, aunado a la deriva génica, juega un importante papel en la estructura genética de esta especie.

A pesar de que la polinización cruzada promueve la diversidad genética, cuando intervienen otros factores como la fragmentación del hábitat, la variación y la estructura genética se ven alteradas, presentando generalmente una reducción en la diversidad genética y un aumento en la diferenciación entre poblaciones conforme aumenta la fragmentación (Young et al., 1996). Un ejemplo de esto es el trabajo de González –Astorga et al. (2004), con la epífita *Tillandsia achyrostachys*, la cual aparentemente presenta polinización cruzada mediada por aves (lo que se infiere a partir de su morfología floral). Los autores encontraron que esta especie presentó una heterocigosis moderada ( $H_o = 0.127$ ), con valores altos de  $F_{IS}$  ( $F_{IS} = 0.433$ ), indicando un exceso de homocigos como resultado de la endogamia; además, se observó una alta diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{ST} = 0.391$ ), presumiblemente debido al bajo flujo génico entre ellas ( $Nm = 0.46$ ). Esto último se explica por la fragmentación del hábitat (selva baja caducifolia), que provoca un mayor aislamiento entre las poblaciones.

### ***1.2 La teoría Metapoblacional***

Cuando se estudia la dinámica de una población ecológica (conjunto de individuos de la misma especie que coexisten en un espacio común al mismo tiempo) generalmente se hace referencia a los parámetros demográficos básicos: la natalidad, la mortalidad (Krebs, 1995). Sin embargo, a menudo la migración es ignorada, pues se supone que no tiene efectos importantes sobre la dinámica de la población; incluso si se reconoce su importancia potencial, cuantificar el efecto de la migración representa una serie de dificultades técnicas que han sido difíciles de sortear (Wang y Smith, 2000). Así, los demógrafos han tendido a evaluar la dinámica de las poblaciones naturales únicamente en términos de los nacimientos y las muertes (Valverde, 1999).

Sin embargo, en fechas recientes se ha demostrado cada vez con mayor claridad que la migración afecta de manera muy importante a la dinámica de muchas poblaciones. La mayoría de las poblaciones no funcionan como unidades espacialmente aisladas, sino que mantienen contacto con otras poblaciones a través de la migración. En ocasiones se forman grupos relativamente ensamblados de poblaciones locales; en este contexto cada población es susceptible de extinción y la migración permite la colonización de espacios nuevos. Este tipo de grupos se conocen como metapoblaciones, que se han definido como conjuntos de poblaciones locales interconectadas por la migración de individuos entre ellas (Levins, 1970; Valverde, 1999).

La existencia de metapoblaciones ya había sido considerada por Andrewartha y Brich en 1954, quienes observaron que la distribución o estructuración espacial de las especies en ocasiones forman conjuntos de poblaciones locales conectadas por la migración. Estos autores reconocieron las oscilaciones poblacionales, documentaron la existencia de extinciones locales y plantearon la posibilidad de recolonización de las poblaciones en espacios vacíos (Hanski y Simberloff, 1997). Sin embargo, no introdujeron un concepto particular para nombrar a este tipo de unidades ecológicas.

El concepto metapoblacional fue introducido propiamente en 1969 por Richard Levins, un ecólogo teórico y entomólogo interesado en el control de plagas, quien planteaba que los mecanismos de regulación poblacional no eran tan eficientes como se suponía, y que si se seguía a una población por un tiempo prolongado, se observaría que a la larga tendería a la extinción. De esta manera, la permanencia a nivel regional de especies con este tipo de comportamiento debía estar determinada por un balance entre la extinción de poblaciones locales y la formación de poblaciones nuevas (mediante la migración) al interior de un conjunto de poblaciones locales efímeras (Levins, 1969; Hanski y Simberloff, 1997). Levins (1969, 1970) además, planteó un modelo matemático sencillo a partir del cual es posible evaluar la dinámica de una metapoblación.

### ***1.2.1 El modelo de Levins***

El modelo metapoblacional de Levins considera a las especies que muestran patrones de distribución espaciales a manera de parches discretos en el hábitat en los que pueden establecerse poblaciones propensas a la extinción. En su planteamiento original, estos parches son del mismo tamaño y se encuentran inmersos en una matriz de hábitat no colonizable. Las poblaciones que se establecen en estos parches están conectadas entre sí a través de la migración y se encuentran en un balance entre colonizaciones y extinciones (Husband y Barrett, 1996; Hanski y Simberloff, 1997; Valverde, 1999). El modelo matemático que plantea Levins (1969, 1970) analiza la manera en la que cambia la proporción de parches ocupados a través del tiempo ( $dp/dt$ ), según la siguiente ecuación:

$$dp / dt = m p (1 - p) - e p$$

donde  $p$  indica la fracción de parches de hábitat que están ocupados por poblaciones locales,  $m$  indica la probabilidad de colonización y  $e$  la probabilidad de extinción (Husband y Barrett, 1996).

El modelo de Levins considera únicamente los parches en los que la especie puede establecerse (por ejemplo, los árboles hospederos de una especie epífita) y describe el estado

de la metapoblación en un momento dado en términos de la proporción de estos parches que se encuentran realmente ocupados por la especie ( $p$ ) y la proporción de parches que se encuentran vacantes ( $1 - p$ ) (Valverde, 1999). De esta manera, el destino de la metapoblación está mediado por el balance entre la tasa de colonización y la tasa de extinción (Husband y Barrett, 1996).

De acuerdo con Valverde (1999), los supuestos fundamentales del modelo de Levins son:

- 1.- Las poblaciones locales tienen a extinguirse y, por lo tanto, la permanencia de una especie en una región depende de la colonización.
- 2.- Todos los parches disponibles tienen la misma probabilidad de ser colonizados, es decir, no hay un efecto de la distribución espacial o de las distancias entre los parches.
- 3.- La tasa de colonización es proporcional a la fracción de parches ocupados.
- 4.- Todas las poblaciones tienen la misma probabilidad de extinguirse, pues no hay un efecto del tamaño o la calidad del parche, o de la dinámica interna de las poblaciones locales.
- 5.- La probabilidad de extinción de cada población es independiente; no ocurren las extinciones correlacionadas.

Después de la propuesta inicial de Levins, se han seguido tres líneas de trabajo en torno al tema de las metapoblaciones: a) la búsqueda de evidencia empírica sobre el funcionamiento y estructura de las metapoblaciones en la naturaleza (e.g. Harrison, 1991); b) el uso de criterios metapoblacionales en el área de la conservación ecológica (Schtickzelle et al., 2005) y c) la construcción de modelos matemáticos con diferente grado de complejidad que buscan reflejar de manera más certera la dinámica de las metapoblaciones (e.g. Hanski et al., 1995; Perry y González-Andujar, 1993; Valverde y Silvertown, 1997; Bernal, 2006).

### ***1.2.2 Otros modelos metapoblacionales***

La diversidad de modelos metapoblacionales que se ha planteado a la fecha es muy grande y con la finalidad de sistematizar el tipo de modelos que se han generado, Hanski y Simberloff (1997) los clasifican de acuerdo a la manera en la que integran la variable espacial. De esta forma, estos autores reconocen tres tipos de modelos metapoblacionales:

1) *Modelos especialmente implícitos*: La variable espacial no se modela en detalle, sino que se incluye de forma implícita. El modelo de Levins es un ejemplo de este tipo de enfoque, pues no describe un espacio particular en el que ocurre la dinámica metapoblacional, sino que incorpora al espacio de manera implícita al convertirlo en la variable fundamental del modelo, ignorando el arreglo espacial de los parches (Hanski y

Simberloff, 1997). Los modelos espacialmente implícitos se han utilizado ampliamente en epidemiología (de hecho, el mismo modelo de Levins está fundamentado de un modelo epidemiológico – Carter y Prince, 1986).

2) *Modelos espacialmente explícitos*: Estos modelos parten de la descripción de un espacio particular en el que ocurre la dinámica metapoblacional. Este espacio generalmente se describe como un conjunto de celdas a manera de una rejilla regular en el que las poblaciones aparecen y desaparecen al ocupar y desocupar las celdas de la rejilla. La característica clave que diferencia a los modelos espacialmente explícitos de los espacialmente implícitos es la presencia de interacciones localizadas que simulan la dispersión; en general se considera que las poblaciones interactúan sólo con las celdas más cercanas, como en el caso de los modelos de tipo autómatas celulares (Hanski y Simberloff, 1997). Estos modelos han sido útiles en el estudio de los núcleos de infección en los modelos epidemiológicos (Fuentes y Kuperman, 1999).

3) *Modelos espacialmente realistas*: Estos modelos incluyen la variable espacial también de manera explícita, pero pretenden hacerlo de forma más realista que los del inciso anterior, incluyendo la geometría específica de los parches, así como las distancias entre ellos y sus niveles de interconexión. Además, estos modelos pueden tomar en cuenta cuántos parches ocupables hay, qué tan grandes son y la localización exacta de cada uno de ellos. De esta manera, este tipo de modelos pueden ser útiles para valorar las consecuencias de destruir ciertos parches específicos o de aumentar el nivel de conectividad entre otros. Un ejemplo de modelo espacialmente realista es el desarrollado por Hanski (Hanski y Simberloff, 1997), que se caracteriza por incluir un número finito de parches de hábitat que difieren en su área, afectando las probabilidades de extinción de las poblaciones en ellos establecidas, así como las de recolonización, las cuales son función del sitio específico que ocupan en el paisaje.

En un intento por darle una mayor generalidad al concepto de metapoblación, Harrison (1991) propone los siguientes cuatro tipos de metapoblaciones basados en la dinámica de los procesos de colonización-extinción. Éstos son los siguientes:

1) *Metapoblaciones tipo isla-continente*: Son metapoblaciones en las que existe una población grande (continente) que funciona como la fuente principal de colonizadores de los parches pequeños (islas) cercanos a ella. La extinción local ocurre únicamente en las poblaciones pequeñas, mientras que la población grande es inmune a la extinción. Como ejemplos de este tipo de metapoblaciones se pueden señalar las de algunas especies de mariposas (Hanski et al., 1994), así como el caso de algunas aves (Gilpin y Diamond, 1976) y roedores (Crone et al., 2001).

2) *Metapoblaciones tipo mosaico*: Son aquéllas en las que la especie presenta una distribución espacial en forma de parches discretos, pero la migración de individuos entre ellos es tan generalizada e intensa, que realmente no se puede considerar que dichos parches discretos funcionan como poblaciones locales independientes. Más bien, el conjunto de parches forma una entidad demográfica única y la migración, siendo tan activa, impide la extinción local. Un ejemplo de este tipo de metapoblación podrían ser ciertos insectos especializados en frutos caídos (Harrison, 1991)

3) *Metapoblaciones no equilibradas*: Son aquéllas donde la recolonización de los parches de hábitat vacantes se ve limitada por la baja capacidad de migración de los individuos, por lo que la tasa de extinción excede a la tasa de colonización. Este tipo de metapoblaciones se presenta en el contexto de una disminución generalizada en la abundancia de muchas especies, determinada por el deterioro paulatino del hábitat, como podría presentarse en algunas especies de mamíferos (Brown, 1971).

4) *Metapoblaciones clásicas*: Son las que se asemejan a la metapoblación propuesta en el modelo original de Levins, donde existe un balance real entre colonizaciones y extinciones, que finalmente determina la permanencia de la especie a nivel regional. Este tipo de metapoblaciones puede ejemplificarse con algunas especies de anfibios que ocupan charcas dispersas en el paisaje, en las que la extinción y la formación de nuevas poblaciones son procesos comunes (Sjögren, 1991).

### ***1.2.3 Evidencias de la existencia de metapoblaciones en epífitas***

A pesar de que existen trabajos que abordan el estudio metapoblacional en especies vegetales (e.g., Valverde y Silvertown, 1997), la existencia de metapoblaciones reales en plantas ha sido cuestionada debido a la incertidumbre que existe con respecto al nivel de interconexión entre poblaciones locales y a la importancia real de la extinción de las mismas (Harrison, 1991; Husband y Barret, 1996; Bullock y Clarke, 2000). También existe controversia en torno a la función que tiene la dispersión en la formación de nuevas poblaciones, en contraste con la importancia de procesos como la expansión clonal o la formación de bancos de semillas a largo plazo. Por lo anterior, existe una gran dificultad para medir los parámetros metapoblacionales básicos como son la tasa de extinción, colonización y migración (Husband y Barret, 1996).

Sin embargo, entre las especies de plantas que viven sobre otras plantas (*i.e.*, epífitas) es más clara la posible existencia de metapoblaciones, pues los árboles hospederos pueden concebirse como los parches colonizables que se encuentran ubicados en el espacio de

manera discontinua y sobre los cuales se forman poblaciones locales, al ser colonizados por las epífitas (García-Suárez et al., 2003; Bernal et al., 2005). Las epífitas entonces se distribuyen en el paisaje a manera de poblaciones locales (hospederos colonizados) conectadas unas con otras a través de la dispersión de semillas que, en muchos casos ocurre por viento. Los árboles hospederos tarde o temprano mueren, dando lugar a la extinción de las poblaciones locales. La persistencia de estas especies en el paisaje depende por lo tanto, de la colonización de nuevos árboles.

#### ***1.2.4 Evaluación de la dispersión de semillas en un contexto metapoblacional***

La dispersión de semillas es un proceso ecológico de suma importancia, tanto desde el punto de vista demográfico, como desde una perspectiva genética. Este proceso es el que liga el fin del ciclo reproductivo de las plantas adultas con el establecimiento de su prole, además de que tiene un profundo efecto sobre la estructura de la vegetación (Wang y Smith, 2002). Por otro lado, junto con la polinización, la dispersión de semillas permite el flujo de genes entre poblaciones más o menos distantes, constituyéndose en una fuerza evolutiva de gran trascendencia (Hanski, 1998; Dieckmann et al., 1999). Asimismo, la dispersión de semillas, al tener una influencia sobre la colonización de hábitats por parte de las especies vegetales, afecta también la diversidad de las comunidades, así como los procesos de sucesión y regeneración (Wang y Smith, 2002). Por último, la dispersión también es la responsable de los cambios en las áreas de distribución de las especies en un tiempo evolutivo (Higgins y Richardson, 1999).

Como puede verse, la dispersión (i.e. la migración) es un fenómeno ecológico multifacético que tiene consecuencias a muchos niveles y el breve espacio que se le hemos asignado en esta Introducción no podría hacerle justicia a dicha complejidad. Por tanto, aquí abordamos únicamente lo relacionado con los efectos, las consecuencias y la dinámica de la dispersión en un contexto metapoblacional, es decir, en lo que se refiere a la salida de individuos de una población local y su probabilidad de arribar a espacios colonizables para formar nuevas poblaciones.

Así, en las metapoblaciones, la dispersión de semillas es el proceso que permite el establecimiento de nuevas poblaciones (Levins, 1969; Olivieri et al., 1995; Ims y Yoccoz, 1997). Dicho proceso generalmente involucra grandes riesgos, pues la probabilidad de supervivencia de las semillas migrantes, así como la probabilidad de establecimiento de las plántulas para dar lugar a un evento real de colonización son, en general, bajas (Valverde y Silvertown 1997a y 1997b). A la vez, la dispersión también afecta la probabilidad de



extinción de las poblaciones locales existentes, pues puede ejercer un “efecto de rescate” hacia las poblaciones que están a punto de extinguirse (Brown y Kodric-Brown, 1977).

Debido a la importancia de la dispersión en la dinámica de las metapoblaciones, es de particular interés poder estimar la magnitud del contacto entre poblaciones locales como producto de la dispersión, pues de la dispersión depende la tasa de colonización, que es una de las variables que explica la dinámica metapoblacional (Hanski, 1999). Sin embargo, la mayor parte de los estudios metapoblacionales en plantas han partido de un desconocimiento de la magnitud de la dispersión; más bien, los modelos metapoblacionales se han utilizado precisamente para evaluar, de manera teórica, la importancia de la dispersión (e.g. Horvitz y Schemske, 1986; Valverde y Silvertown, 1997; Bohrer et al., 2005), en vista de la dificultad de cuantificarla debido a la imposibilidad de observar y seguir el destino de cada semilla, sobre todo de aquellas que se dispersan a larga distancia, que son precisamente las que pueden tener un efecto más importante sobre la dinámica metapoblacional al permitir la colonización de parches ocupables relativamente aislados (Silvertown, 1991; Bullock y Clarke, 2000; Cain et al., 2000; Wang y Smith, 2002).

El estudio de la dispersión de semillas se ha abordado desde diferentes puntos de vista. Uno de ellos ha sido el seguimiento directo del destino de las semillas (e.g. Lee, 1984; Bullock y Clarke, 2000; Bernal, 2006). Otro conjunto de métodos que ha sido útil en este sentido ha sido el uso de marcadores genéticos, tales como isoenzimas, microsatélites y análisis de secuencias de ADN. Ouborg et al. (1999) y Wang y Smith (2000) coinciden en que el uso de marcadores moleculares para medir el flujo génico puede ser de gran valor para el estudio de la dispersión en un contexto metapoblacional. Estos autores reconocen dos tipos de métodos que se pueden emplear para evaluar la dispersión entre poblaciones de la misma especie: los métodos directos y los indirectos. Una diferencia importante entre ambos es que los indirectos dan información del flujo génico histórico, mientras que los directos dan información del flujo génico actual (Ouborg, 1999; Cain et al., 2000). Los marcadores moleculares se pueden utilizar en ambos tipos de métodos, como se detalla a continuación.

*1) Métodos Indirectos:* Se basan principalmente en observar la distribución espacial de alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los patrones de flujo génico entre ellas (Slatkin, 1985a). De esta manera, la intensidad del flujo génico se infiere a partir medidas de diferenciación genética entre poblaciones locales, tales como la  $F_{ST}$ , la cual mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones y por tanto la diferenciación genética entre ellas

( $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ ; Hedrick 2000). La  $F_{ST}$  también se relaciona con la migración, como lo evidencia otra de las ecuaciones que se utiliza para calcularla:

$$F_{ST} = 1/4 (Nm + 1),$$

en donde  $Nm$  es el número de migrantes por generación (Wright, 1940). Cuanto mayor es la distancia genética entre dos poblaciones, se puede concluir que el supuesto intercambio de migrantes entre ellas será menor, es decir, existe un flujo génico limitado entre ellas.

Utilizando este tipo de técnicas indirectas de estimación del flujo génico, es posible diferenciar entre el asociado a la dispersión del polen y el que proviene de la dispersión de semillas: en las angiospermas, las semillas cuentan con material genético tanto de origen paterno, como materno mientras que el polen no. Así, la comparación del ADN nuclear con el citoplásmico puede ofrecer información de interés. En el grupo de las angiospermas el polen no posee ADN citoplásmico, sólo nuclear. En los pinos, sin embargo, el ADN mitocondrial se hereda a la semilla, mientras que el ADN de cloroplasto proviene del polen (Latta y Mitton, 1997; Hedrick, 2000). Un ejemplo de este tipo de análisis lo encontramos en el estudio de Latta y Mitton (1997) con *Pinus flexilis*. Estos autores examinaron la variación en el ADNmt y ADNcp de esta especie y encontraron una mayor diferenciación entre las semillas ( $F_{ST}(mt) = 0.679$ ), que en el polen ( $F_{ST}(cp) = 0.013$ ), indicando un mayor flujo génico por esta última vía.

2) *Métodos Directos*: Los métodos directos que se basan en marcadores moleculares para estimar el flujo génico (vía polen o vía semillas) entre poblaciones analizan los genotipos de un conjunto de padres potenciales, así como de la progenie, y buscan determinar el origen de esta última (Jones y Ardren, 2003). En este rubro se han desarrollado diferentes métodos que en conjunto se conocen bajo el título de *análisis de paternidad*, los cuales varían en su complejidad y en el tipo de información de la que parten. La mayoría de ellos se ha desarrollado para organismos dioicos, por lo que con frecuencia se parte de que se conoce el genotipo de por lo menos alguno de los padres. Sin embargo, para organismos hermafroditas con autopolinización el tipo de métodos disponibles es más restringido. A continuación se presenta un breve resumen de algunos de los métodos de análisis parental más utilizados:

a) *Por exclusión*: Se basan en la aplicación de las leyes mendelianas de la herencia para analizar el genotipo de dos conjuntos de individuos de una población: los padres potenciales y la progenie. Según las reglas de herencia mendeliana, se pueden detectar incompatibilidades entre los alelos de los padres potenciales con respecto a los que presenta la progenie, para así *excluirlos* como padres putativos (Jones y Ardren, 2003). Por ejemplo, si entre los padres tenemos los genotipos AA, AC, AB y CB, podemos concluir que un hijo

con genotipo DG definitivamente no proviene de ese conjunto de padres. Según el ejemplo de Golubov y Ortega (2007), una madre de genotipo AA tendrá hijos de genotipo AA, de tal manera que todos los individuos dentro de la población con genotipo BB pueden ser excluidos como padres potenciales de un hijo con genotipo AA. Para realizar este tipo de análisis de paternidad, es necesario muestrear a todos los padres potenciales y a toda la progenie de la población local en estudio, a partir de lo cual se puede conocer qué proporción de los nuevos reclutas proviene de padres "externos" (*i.e.* que no están representados entre los padres potenciales muestreados). Existen una serie de programas de computación desarrollados para llevar a cabo este tipo de análisis parental (para una síntesis al respecto, ver Golubov y Ortega 2007).

Como se detallará más adelante, en el presente estudio se utiliza precisamente un análisis parental por exclusión para estimar la tasa de migración entre poblaciones locales de *Tillandsia recurvata*. Este tipo de análisis pueden ser muy poderosos, especialmente cuando se tiene un número relativamente bajo de padres potenciales y se utilizan marcadores moleculares altamente polimórficos para estimar los eventos de dispersión individual (Cain et al., 2000; Wang y Smith, 2002; Jones y Ardren, 2003).

b) Por asignación fraccionada o categórica: Estos análisis parte de un cálculo de la probabilidad (por máxima verosimilitud) de asignarle un progenitor a una progenie (Golubov y Ortega, 2007). Para cada descendiente que forma parte de es progenie, se asignan varios padres putativos, cada uno con una probabilidad específica de realmente ser el progenitor. Para esto se calcula el logaritmo de la proporción de la máxima verosimilitud ("likelihood ratio" o LOD) para determinar probabilísticamente si un individuo es el padre de la progenie (Jones y Ardren, 2003). El valor obtenido se coteja con el valor de los otros posibles padres y el que tenga el LOD más alto se considera como el padre más probable de la progenie. A diferencia de los métodos por exclusión, en este caso no se asigna la progenie a un solo padre, sino que se puede asignar a varios padres compatibles (Golubov y Ortega, 2007).

c) Por reconstrucción parental: Estos métodos utilizan los genotipos multilocus de uno de los progenitores, el cual debe de conocerse *a priori*, y de la progenie para reconstruir los genotipos de los progenitores desconocidos que contribuyeron al arreglo genómico de la progenie (Jones y Ardren, 2003). Esta técnica es muy demandante en términos de programas computacionales y no es aplicable para casos en los que hay combinaciones genéticas en la progenie que podrían asignarse a más de seis padres putativos (Golubov y Ortega, 2007).

Existen en la literatura una serie de ejemplos que utilizan análisis de paternidad para contestar preguntas ecológicas diversas. Por ejemplo, Dow y Ashley (1996) trabajaron con el encino *Quercus macrocarpa*, en el que realizaron un análisis de paternidad por exclusión y examinaron la distribución espacial de 62 individuos adultos y 100 árboles jóvenes a partir de cuatro loci de microsatélites. Estos autores encontraron que los genotipos de 94 de estos árboles jóvenes coincidieron con el genotipo de al menos uno de los adultos en el lugar de estudio. Los árboles jóvenes por lo general se encontraron formando conjuntos de medios hermanos alrededor de los que se presumen eran los árboles progenitores (maternos); se observó que sólo cuatro adultos eran los principales árboles progenitores de los juveniles muestreados. El 69% de los árboles jóvenes se encontraban establecidos cerca del árbol madre (0 a 15 m), mientras que sólo unos cuantos estaban a distancias mayores (> 90m), lo cual fue atribuido a la dispersión secundaria. Por otro lado, aparentemente existen altos niveles de polinización a larga distancia, pues la mayoría de los eventos de polinización provienen de árboles externos a la población estudiada; la distancia promedio de polinizaciones parece encontrarse por encima de los 60 m. De esta manera, más de la mitad de árboles jóvenes provenían de un padre (donador de polen) externo a la población.

### ***1.2.5 Consecuencias de la dinámica metapoblacional sobre la estructura genética***

Como hemos visto antes, los hábitats adecuados para el establecimiento de diversas especies de plantas y animales comúnmente se presentan en el paisaje a manera de parches. Esta distribución discontinua de los ambientes favorables lleva a las especies a subdividirse o a estructurarse espacialmente, formando sistemas de poblaciones locales (Giles y Goudet, 1997; Tero et al., 2003). Esta subdivisión tiene consecuencias genéticas importantes, como lo señaló S. Wright (1931), cuando se planteó la existencia de “demos”. La teoría metapoblacional retoma precisamente este concepto y lo analiza desde una perspectiva ecológica (Hanski, 1999); pero además, profundiza sobre las consecuencias genéticas, no sólo de la estructuración espacial de las poblaciones, sino también de los procesos de colonización y extinción propios de la dinámica metapoblacionales (McCauley et al., 1995). Es en este sentido que la teoría metapoblacional podría fungir como un eslabón efectivo entre la ecología poblacional y la genética de poblaciones, como lo comentó Silvertown (1991) desde hace más de 15 años.

La primera consecuencia importante de la estructuración espacial es que los individuos de una población local naturalmente tendrán una mayor probabilidad de reproducirse con individuos de su misma población que con individuos de otras poblaciones

(McCauley et al., 1995). Esto daría lugar a una diferenciación genética entre poblaciones locales (Tero et al., 1996), que dependería del nivel de selección local, de endogamia y de deriva génica que experimenten dichas poblaciones (Gilpin, 1991; James et al., 1996). Sin embargo, en un sistema metapoblacional el aislamiento entre poblaciones locales no es total, sino que hay cierto nivel de contacto entre poblaciones a través de la migración (Giles y Goudet, 1997). De esta forma, la dispersión tiene un efecto directo no sólo sobre la persistencia de las poblaciones locales (efecto rescate - Brown y Kodric-Brown, 1977), sino también sobre la diferenciación genética entre ellas (Bohrer et al., 2005). A mayores niveles de dispersión, la diferenciación genética entre poblaciones será menor (Hedrick, 2000).

Por otro lado, la dinámica metapoblacional puede tener consecuencias importantes sobre la variación genética dentro de las poblaciones locales y a nivel de toda la metapoblación (Tero et al., 1996), como producto de la expansión y la contracción numérica de las poblaciones locales, así como por la formación de nuevas poblaciones y la desaparición eventual de las mismas. La magnitud de estos efectos dependerá de la distancia a la que se dispersan los organismos (James et al., 1996), así como de la fuente de la que provienen los fundadores de las nuevas poblaciones, *i.e.*, si las nuevas poblaciones se forman a partir de organismos que provienen de una sola población (y por lo tanto con una alta probabilidad de estar relacionados entre ellos) o si provienen de fuentes múltiples (Slatkin, 1977; Whitlock y McCauley, 1990; Hanski, 1999).

Desde hace tiempo se ha reconocido que la dinámica de la dispersión entre poblaciones locales tiene un efecto importante sobre la estructura espacial de la variación genética. A este respecto se han propuesto una serie de modelos de flujo génico que plantean diferentes escenarios. Uno de ellos es *el modelo de islas* de Wright (1931), que supone la existencia de una serie de poblaciones de tamaño similar y con las mismas probabilidades de intercambiar migrantes entre ellas (sin importar la distancia). Para este modelo, Wright demostró que el grado de diferenciación genética entre poblaciones locales, medido a través de  $F_{ST}$ , es una función de los números efectivos de migrantes entre las poblaciones ( $Nm$ ), siendo:

$$Nm \approx \frac{1}{4}(1/F_{ST}-1) \quad \text{y} \quad F_{ST} \approx 1/4Nm + 1$$

Otro modelo es el de *piedras de paso* (“stepping-stone” – Kimura y Weiss, 1964), en el cual sólo las poblaciones adyacentes intercambian migrantes, produciendo una menor diferenciación entre poblaciones locales que se encuentran contiguas. Esta dinámica tendría consecuencias genéticas similares a las del modelo de *aislamiento por distancia* (“neighborhood” - Wright, 1943), que parte de la base de que la migración entre dos

poblaciones locales decrece como una función de la distancia entre ellas. Es importante aclarar que, en sus versiones originales, la mayoría de estos modelos no contemplan el efecto de la extinción de las poblaciones locales (Giles y Goudet, 1997).

Aunque Wright (1940) en su modelo de islas sugirió que la extinción podía incrementar la diferenciación entre poblaciones locales. Los efectos de la extinción y la recolonización (recambio de poblaciones, o “population turnover”: proceso dado por el surgimiento y desaparición de poblaciones locales) sobre la variación genética se empezaron a analizar en la década de 1970, cuando, Slatkin (1977) introdujo explícitamente el concepto metapoblacional a la teoría de la genética de poblaciones. Según Slatkin (1977), el recambio de poblaciones lleva a una diferenciación genética entre ellas como producto de la recolonización que representa una fuente adicional de deriva génica dado por el efecto fundador. Así, Slatkin (1977) formuló su modelo sobre la estructura genética de las metapoblaciones en términos de la varianza en las frecuencias génicas entre poblaciones, considerando dos opciones que difieren en cuanto a la fuente de la que provienen los colonizadores:

- a) Los colonizadores pueden provenir de un *pool de migrantes*, en el cuál  $K$  colonizadores son tomados de una muestra al azar de todas las poblaciones locales que conforman a la metapoblación.
- b) Los colonizadores pueden provenir de un *pool de propágulos*, donde los  $K$  colonizadores son tomados de una sola población elegida al azar.

De esta manera, en el caso del *pool de propágulos*, se daría un efecto del muestreo reducido durante el establecimiento de la nueva población (*i.e.* efecto fundador) y además, la deriva génica exacerbaría la diferenciación entre poblaciones. Por otro lado, bajo el modelo de *pool de migrantes*, la mezcla de genotipos que forman a la nueva población constituye en sí misma un evento de flujo génico que reduce el grado de diferenciación entre poblaciones (Whitlock y McCauley, 1990; Mc Cauley et al., 1995; Giles y Goudet, 1997).

Por su parte, Whitlock y McCauley (1990) generalizaron los modelos de pool de migrantes y pool de propágulos al introducir un nuevo parámetro,  $\Phi$ , que corresponde a la proporción de colonizadores que provienen de un origen común. En el modelo de pool de migrantes,  $\Phi$  toma valores cercanos a 0, mientras que en el modelo de pool de propágulos es igual a la unidad. Estos autores llegaron a la conclusión de que la diferenciación genética entre las poblaciones locales de una metapoblación se vería acentuada en comparación con la que predice el modelo de islas de Wright, cuando

$$2 K (1 - \Phi) + \Phi < (4 Nm + 1)$$

donde  $K$  es el número de colonizadores,  $(1 - \Phi)$  es la probabilidad de que los colonizadores provengan de poblaciones diferentes, y  $Nm$  es el número efectivo de migrantes por generación.

Whitlock y McCauley (1990) llegaron a la conclusión de que los valores de  $F_{ST}$  entre poblaciones jóvenes (*i.e.* más recientemente fundadas) sería más alto que entre poblaciones más antiguas. Mc Cauley et al. (1995) demostraron este hecho en la planta *Silene alba* en la que calcularon la  $F_{ST}$  promedio, tanto entre poblaciones recientemente establecidas como entre poblaciones más antiguas, encontrando valores de  $F_{ST}$  más altos entre las poblaciones recién fundadas, y valores de  $F_{ST}$  relativamente bajos entre poblaciones antiguas. Estos resultados apuntan claramente en el sentido de que la dinámica metapoblacional puede llevar a una mayor estructuración genética (*i.e.* mayor diferenciación genética entre poblaciones).

### ***1.3 Marcadores moleculares***

En años recientes se ha reconocido el surgimiento de una nueva subdisciplina de la ecología: la ecología molecular, que se caracteriza por el uso de técnicas moleculares para el análisis de diversos aspectos genéticos de las poblaciones con el objeto de abordar el estudio de fenómenos de carácter ecológico (Burke et al., 1992; Cain y Provine, 1992). La genética de poblaciones se ha considerado tradicionalmente como una disciplina de la biología evolutiva. Sin embargo, la relación entre la biología evolutiva y la ecología, basada en el reconocimiento de que los procesos ecológicos constituyen fuerzas evolutivas importantes, sienta las bases para que la genética de poblaciones constituya una herramienta de gran utilidad para estudiar procesos ecológicos.

La dispersión es claramente uno de esos procesos ecológicos cuyo efecto a nivel evolutivo es más tangible, como se detalló en las secciones anteriores, por lo que ha sido uno de los objetos de estudio más comunes en ecología molecular (Wang y Smith, 2002). Otros temas ecológicos que se han abordado desde esta perspectiva son el comportamiento social (Hughes, 1998), algunos temas relacionados con la conservación (e.g. los efectos de la fragmentación sobre la persistencia de las poblaciones, los análisis de viabilidad poblacional – Schemske et al., 1994; Haig, 1998), y los efectos de la propagación clonal sobre la estructura genética de las poblaciones (Carrillo, 2006).

Existe una gran diversidad de marcadores moleculares a través de los cuales se puede analizar la estructura y la variabilidad genética de las poblaciones. Los primeros marcadores moleculares que se desarrollaron fueron las isoenzimas, que analizan las diferentes expresiones fenotípicas (*i.e.*, proteínas) de genes particulares entre los individuos de una

población. Los métodos más recientes se enfocan directamente al análisis del genoma, ya sea nuclear, mitocondrial o del cloroplasto. Entre ellos se encuentran los RAPDs (por sus siglas en inglés: Random Amplified Polymorphic DNA) que parten de una fragmentación aleatoria del genoma, dando como resultado un patrón específico de fragmentos de ADN de diferentes tamaños (Ritland y Ritland, 2000); los RFLPs (por sus siglas en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphisms) que detectan variación en las secuencias de ADN que constituyen el lugar de anclaje de enzimas de restricción particulares; los VNTRs (por sus siglas en inglés: Variable Number Tandem Repeats), que son secuencias de ADN formadas por la repetición de series de nucleótidos y que en general se piensa que no son codificantes; entre estos últimos están los minisatélites y los microsatélites (Parker et al., 1998); y la secuenciación directa del ADN que se ha utilizado para detectar variación en la secuencia de nucleótidos de genes específicos.

Los diversos marcadores moleculares con los que se cuenta en la actualidad difieren en su nivel de variabilidad, de resolución y de repetibilidad. Por esa razón, algunos se utilizan más para responder preguntas evolutivas, biogeográficas o taxonómicas (por ejemplo, los marcadores poco variables o que varían a escalas espaciales y temporales muy amplias), mientras que otros son más adecuados para abordar preguntas ecológicas (por ejemplo, marcadores altamente variables, o que varían en escalas espaciotemporales más reducidas). En este estudio, nos centraremos en los microsatélites, que son marcadores moleculares altamente variables, por lo que han facilitado el estudio de la dispersión de semillas y la medición del flujo génico mediante el análisis de paternidad (Ouborg et al., 1999; Sork et al., 1999), razón por la cual se utilizaron en el presente estudio.

Los microsatélites son repeticiones en tándem de 1 a 6 nucleótidos y han sido encontrados en los genomas nucleares de muchos taxa (Selkoe y Toonen, 2006). Los microsatélites se encuentran en regiones no codificantes y varían en términos del número de repeticiones (Jarne y Lagoda, 1996; Zane et al., 2002). Las repeticiones en di, tri y tetra nucleótidos son las más utilizadas en estudios de genética molecular (Selkoe y Toonen, 2006). Las secuencias de ADN que se encuentran a ambos lados del microsatélite son llamadas regiones de flaqueo, las cuales son regiones conservadas entre los individuos de la misma especie y algunas veces entre diferentes especies. A diferencia de las regiones de flaqueo, las secuencias repetidas del microsatélite mutan frecuentemente (con una tasa de mutación de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  mutaciones por locus por generación) debido a errores en la replicación del ADN. Estos errores modifican el número de repeticiones en el microsatélite, repercutiendo en la longitud del mismo y generando así altos niveles de diversidad alélica,



los cuales son muy importantes para los estudios genéticos involucrados en procesos que ocurren en una escala de tiempo ecológico (Selkoe y Toonen, 2006).

Para analizar la variación genética a través de microsatélites en una especie, es necesario primero detectarlos en el genoma, aislarlos, conocer las secuencias de flaqueo y diseñar *primers* o *iniciadores* que identifiquen dichas secuencias, con el objeto de amplificar el fragmento que incluye al microsatélite a través de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) y poderlo visualizar y conocer su tamaño usando la técnica de electroforesis. Los diferentes alelos que se identifican para un mismo microsatélite corresponden a fragmentos de ADN que difieren en su tamaño, como producto de un número diferente de repeticiones de las secuencias en cuestión. Así, los microsatélites son marcadores codominantes, pues es posible identificar heterocigos al reconocer la presencia simultánea de dos alelos de un mismo microsatélite en un individuo (Sunnucks, 2000; Zane et al., 2002).

El proceso de desarrollo de los microsatélites que se describió en el párrafo anterior es muy complicado, costoso y demandante de tiempo; además, por el hecho de que las secuencias de las regiones de flaqueo suelen ser específicas para cada especie (Selkoe y Toonen, 2006), es necesario llevar a cabo todo este procedimiento para cada una de las especies que se desee analizar. Estas son algunas de las desventajas de trabajar con microsatélites. Por otra parte, una de sus ventajas es que, una vez que se conocen las secuencias de flaqueo y se han diseñado los *primers* correspondientes, se pueden llevar a cabo los análisis genético-ecológicos.

## ***1.4 Objetivos***

### **Objetivo general**

Se pretende llevar a cabo un análisis genético de diversas poblaciones locales de *Tillandsia recurvata* utilizando tres loci de microsatélites, y realizar un análisis de paternidad para evaluar la intensidad de la migración entre poblaciones locales, así como el efecto del nivel de aislamiento de las poblaciones estudiadas sobre esta variable. Con esto, se busca evaluar la importancia de la dispersión de semillas como fuerza de cohesión entre las poblaciones locales que conforman la metapoblación.

### **Objetivos particulares**

- a) Describir la variación genética de nueve poblaciones de *Tillandsia recurvata*, así como la diferenciación entre poblaciones, tomando en cuenta tres niveles de análisis: poblaciones completas, sólo a las plantas adultas y sólo a las plántulas.
- b) Realizar un análisis de paternidad por exclusión para cada población mediante la comparación de los alelos de los tres loci de microsatélites presentes entre los adultos y entre las plántulas; con base en esta información, se busca identificar a las plántulas que provienen de padres externos a la población (*i.e.* inmigrantes).

## ***1.5 Hipótesis***

García-Morales (2007) analizó la variación genética dentro y entre poblaciones de *T. recurvata*, utilizando los mismos loci de microsatélite que se usaron en esta tesis. En dicho estudio encontró valores altos de heterocigosidad y una ligera diferenciación genética entre poblaciones, aparentemente debida a los elevados niveles de dispersión de semillas entre ellas. Así, a partir de esos resultados, pareciera que los árboles colonizados por *T. recurvata* tienen un contacto genético muy dinámico con otros árboles. De esta manera, las principales hipótesis de este trabajo son las siguientes:

- Se espera obtener altos niveles de flujo génico entre las poblaciones estudiadas de *T. recurvata*.
- Se espera que el flujo génico entre poblaciones disminuya al aumentar la distancia entre ellas; por lo tanto, se espera que los árboles que se encuentra más aislados (*i.e.*, más lejos de otros árboles colonizados) tengan una menor entrada de inmigrantes por dispersión de semilla

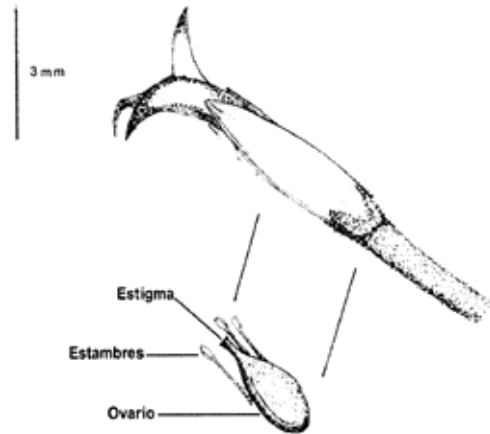
## Capítulo II

### Métodos

#### ***II.1 La especie en estudio: Tillandsia recurvata L.***

*Tillandsia recurvata* es una epífita herbácea que pertenece a la familia Bromeliaceae. Esta planta crece formando pequeñas masas esféricas de hojas, que poco a poco van rodeando a la rama del hospedero en el que se encuentran establecidas. La altura de estas esferas, en su estado adulto, varía entre 4 y 15 cm. Las hojas son dísticas, ovaladas, de 5 a 10 cm de largo; presenta láminas recurvadas y densamente escamosas. La inflorescencia es terminal, produciéndose en un escapo de hasta 13 cm de largo y con 1 ó 2 flores tubulares (Figura 1). La morfología floral sugiere que las semillas se forman por autopolinización (Soltis et al., 1987), pues los estambres y pistilo se encuentran incluidos en el fondo de la corola tubular (Figura 1) (Rzedowski y Rzedowski, 2001); sin embargo, los estambres son más largos que el pistilo, por lo que se podría sugerir también que la polinización por viento puede ser posible. Los frutos son vainas elíptico-ovaladas, de hasta 25 cm de largo, que contienen hasta 60 semillas plumosas (Bernal, 2006). En la región de Tehuacán, la época de floración es durante el otoño y la dispersión de semillas que ocurre por viento se registra durante el invierno (García-Morales, 2005).

*Tillandsia recurvata* se distribuye a lo largo del continente Americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y Chile, en altitudes de 100 hasta 2900 m. Habita en bosques de encino y matorrales xerófilos, ocupando diferentes especies de árboles y arbustos hospederos; ocasionalmente se le puede encontrar establecida incluso sobre los cables de las líneas eléctricas (Rzedowski y Rzedowski, 2001).



**Figura 1.** Izq. Individuo de *Tillandsia recurvata* sobre uno de sus árboles hospederos. Der. Esquema de la morfología floral de *T. recurvata*, mostrándose la cercanía de los estambres y el estigma. Dibujo: Mariana Rojas-Aréchiga.

## II.2 Obtención del material biológico

### Sitio de colecta

La colecta del material biológico de los individuos de *T. recurvata* se realizó cerca del poblado de Zapotitlán Salinas, en el Valle de Tehuacán, que se localiza en la parte sureste del estado de Puebla. El clima de esta zona es semiárido, con una precipitación anual de 400 mm que se concentra en los meses del verano, con una canícula bien definida a mitad del periodo de lluvia. Las condiciones áridas del valle se deben principalmente al efecto de sombra orográfica que produce la Sierra Madre Oriental y la desecación paulatina de los mantos freáticos (Villaseñor, 1990 en Dávila et al., 1993).

La vegetación predominante en la región de Zapotitlán Salinas en la que se realizó la colecta de material biológico es matorral xerófilo, aunque es común encontrar en la zona otros tipos de vegetación como bosque tropical caducifolio y bosque espinoso (en las partes más húmedas), y bosque de encino y de pino-encino (en las partes más elevadas) (Valiente-Banuet et al., 2000). En los matorrales xerófilos de esta región dominan varios géneros de la familia Cactaceae (*i.e.*, *Cephalocereus*, *Neobuxbaumia*, *Myrtilocactus*, *Echinocactus*, etc.), así como diversas especies de arbustos y árboles que toleran las arduas condiciones de sequía que imperan durante la mayor parte del año; entre estos últimos están *Prosopis laevigata* y *Cercidium praecox*, así como diferentes especies de los géneros *Acacia* y *Mimosa* (Figura 2). Estos árboles y arbustos constituyen los hábitats colonizables de *T. recurvata* en esta zona (Bernal et al., 2005; Bernal, 2006).



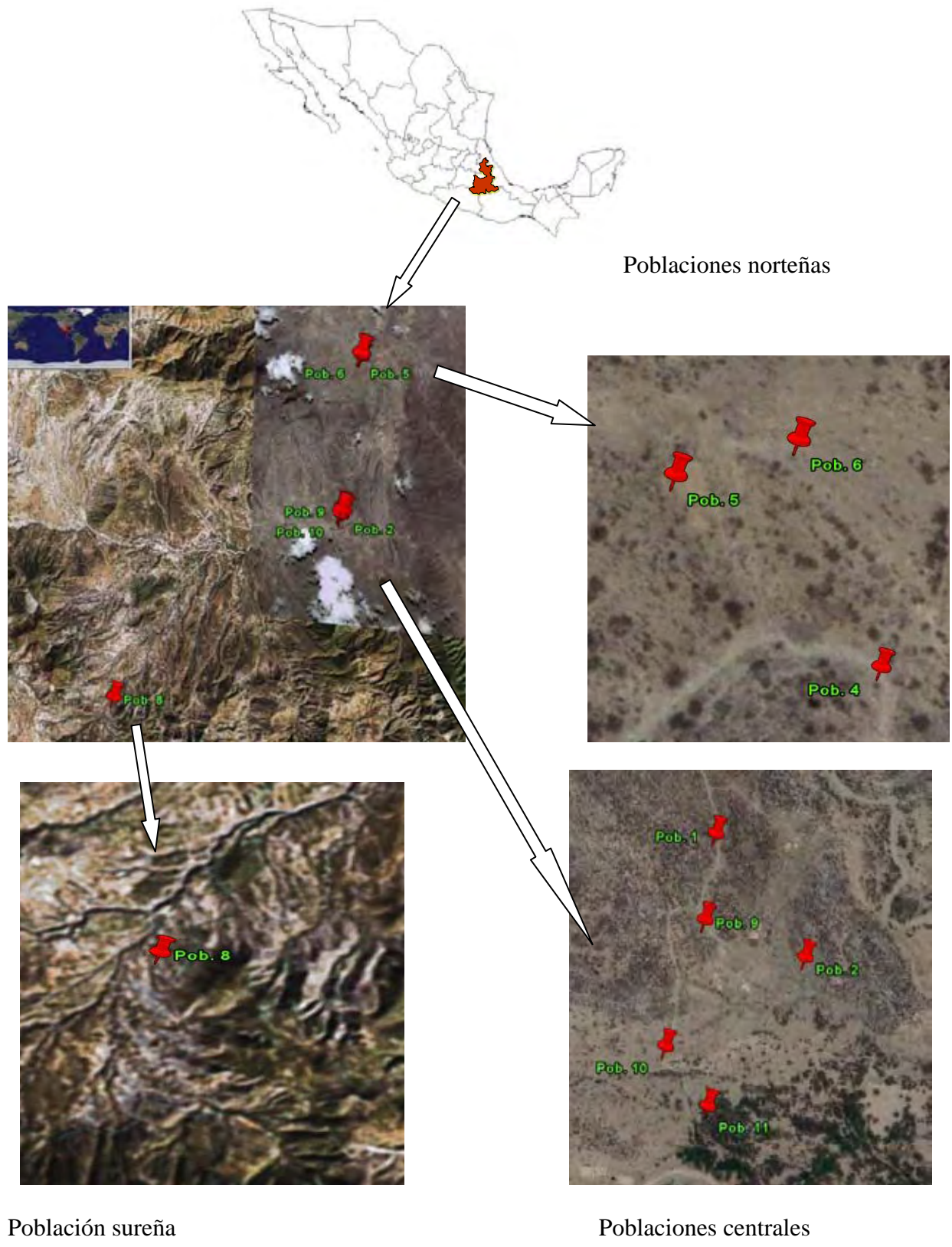
**Figura 2.** Paisaje semiárido de la región de estudio

### ***Colecta de material biológico***

Se eligieron nueve árboles colonizados por *Tillandsia recurvata* (i.e., poblaciones locales) a partir de los cuales se colectó el material biológico (Figura 3). Los árboles escogidos fueron de tamaño y densidad de colonización similar (en cuanto a la población de epífitas). Cabe señalar que la mayor parte de la colecta se realizó en árboles hospederos de la especie *Prosopis laevigata* (ocho de los nueve árboles hospederos fueron de esta especie); el noveno fue un árbol de *Cercidium praecox*. Esto se debió a la limitación en la disponibilidad de árboles con las características necesarias para llevar a cabo la colecta (i.e., que fueran árboles de tamaño y densidad de colonización similares en cuanto al número de epífitas, que tuvieran un número no demasiado alto, pero tampoco demasiado bajo de adultos y de plántulas). Se consideró que era importante mantener relativamente constantes estos criterios de colecta (que muy pocos árboles cumplían), y que la identidad específica del árbol hospedero era secundaria. De acuerdo con Bernal (2006), los principales hospederos de *T. recurvata* en el Valle de Tehuacán, Puebla, son *Prosopis laevigata*, *Cercidium praecox* y *Acacia bilimekii*. Esta autora no encontró diferencias entre *P. levigata* y *C. praecox* en cuanto al número de individuos de *T. recurvata* que pueden albergar, y tampoco se han reportado diferencias importantes en la capacidad de supervivencia y crecimiento de las plántulas de *T. recurvata* en ambos hospederos (Hernández-Rosas, 2003;

Bernal et al. 2005). Por tal motivo se decidió coleccionar indistintamente de ambas especies de árboles hospederos.

Entre los nueve árboles focales, se definieron tres categorías en términos de su nivel de aislamiento: alto, medio y bajo (Tabla II.1). El nivel de aislamiento se calculó a partir de la distancia entre el árbol focal y el árbol colonizado por *T. recurvata* más cercano (Tabla II.2), el cual se presume que constituye la fuente de colonizadores más inmediata (Figura 4). Para cada nivel de aislamiento se tuvieron tres árboles focales, lo que dio un total de nueve. En cada uno de estos árboles focales se coleccionó material biológico (hojas) de todos los adultos y los nuevos reclutas de *Tillandsia recurvata* presentes en el árbol. Los nuevos reclutas eran plantas pequeñas, formadas apenas por un brote, que se estima que tendrían entre uno y dos años de edad (según la experiencia que se tiene de observar su crecimiento – Hernández-Rosas, 2003); estos individuos serán referidos en adelante como “plántulas”.



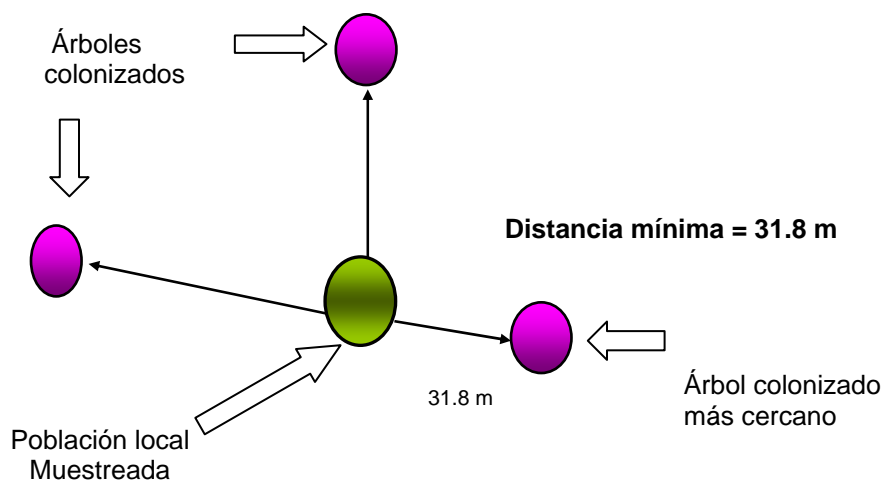
Población sureña

Poblaciones centrales

**Figura 3.** Mapa y ubicación de las nueve poblaciones colectadas de *T. recurvata* las cuales se encuentran en tres grupos; al Norte, Centro y Sur

**Tabla II.1** Categorías de nivel de aislamiento definidas para estudiar el efecto del aislamiento poblacional sobre la variabilidad genética y la inmigración de semillas en poblaciones de *T. recurvata*. El aislamiento se definió en términos de la distancia mínima entre poblaciones (ver texto y Figura 4).

Nivel de aislamiento	Distancia al árbol colonizado más cercano
Bajo	1 m < 5 m
Intermedio	5.1 m < 10 m
Alto	10.1 m < 35 m



**Figura 4.** Esquema que ejemplifica la manera en la que se consideró el nivel de aislamiento de cada población colectada de *T. recurvata*, a partir de su distancia al árbol colonizado más cercano.



**Tabla II.2** Poblaciones de *T. recurvata* de las que se colectó material biológico, según su nivel de aislamiento. Dist Min = Distancia al árbol colonizado más cercano. Niveles de aislamiento: A = alto, I = intermedio, B = bajo. Georef= coordenadas geográficas de localización de la población.

<b>Pob. agrupadas</b>						
<b>por nivel de</b>					<b>Nivel</b>	
<b>aislamiento</b>	<b>Hospedero</b>	<b>No. de</b>	<b>No. de</b>	<b>Dist Min</b>	<b>aislamiento</b>	<b>Georef.</b>
<b>mínimo.</b>		<b>Adultos</b>	<b>plántulas</b>	<b>(m)</b>	<b>mínimo</b>	
1 B	<i>Prosopis laevigata</i>	8	26	2	B	N 18° 19' 44.4'' W 97° 27' 17.6''
9 B	<i>Cercidium praecox</i>	16	35	2.1	B	N 18° 19' 40.47'' W 97° 27' 18.11''
11B	<i>Prosopis laevigata</i>	10	25	2.1	B	N 18° 19' 32.0'' W 97° 27' 17.91''
8 I	<i>Prosopis laevigata</i>	15	26	7.3	I	N 18° 15' 6.16'' W 97° 32' 58.6''
10 I	<i>Prosopis laevigata</i>	17	29	9.8	I	N 18° 19' 34.7'' W 97° 27' 20.0''
4 I	<i>Prosopis laevigata</i>	17	36	6.2	I	N 18° 23' 22.0'' W 97° 26' 48.7''
2 A	<i>Prosopis laevigata</i>	12	30	14.7	A	N 18° 19' 38.8'' W 97° 27' 13.2''
5 A	<i>Prosopis laevigata</i>	23	45	31.8	A	N 18° 23' 24.1'' W 97° 26' 50.9''
6 A	<i>Prosopis laevigata</i>	5	15	11	A	N 18° 23' 24.5'' W 97° 26' 49.6''

### **II. 3 Técnicas de laboratorio para la extracción, amplificación y visualización de los microsatélites**

#### **Extracción de ADN**

Se extrajo el ADN genómico de los individuos colectados de las nueve poblaciones de *T. recurvata*. Para esto, se utilizó tejido foliar (un mínimo de ca. 0.03 g para los individuos adultos, y ca. 0.001 g para las plántulas), el cual se maceró en un mortero con nitrógeno líquido para después seguir el protocolo de extracción modificado por García-Morales (2007) a partir del protocolo original sugerido por los fabricantes del kit de extracción utilizado (AquaPure Genomic DNA Tissue Kit, BIORAD, ver Apéndice I). El ADN extraído se almacenó en tubos estériles Ependorf a -20°C. El tiempo máximo que permaneció el ADN en congelación fue de 6 meses.

### ***Amplificación de los microsatélites***

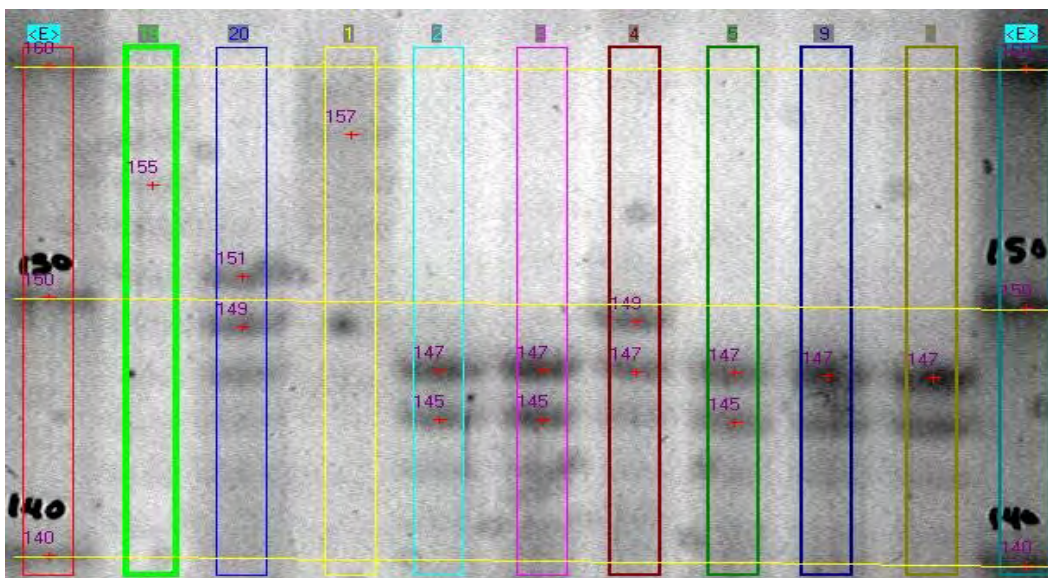
Se utilizó el ADN extraído para llevar a cabo reacciones de PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando un termociclador (PTC-100 MJ Reserch) con la temperatura de alineamiento correspondiente a cada locus y con los ciclos para todos los pares de oligonucleótidos (Apéndice II). Dichas reacciones se realizaron con 4 pares de oligonucleótidos o primers para amplificar los loci de microsatélites de cada uno de los individuos colectados. Los primers para amplificar las regiones de microsatélites fueron diseñados por T. Valverde (en el laboratorio de Jan van Groenendael, Universidad de Nijmegen, 2000) y fueron estandarizados por García Morales (2007). Según los resultados de García Morales (2007), el número de alelos de estos cuatro loci de microsatélites varía entre 8 y 17. Las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 12.5  $\mu$ l para cada locus. Las concentraciones de oligonucleótidos fueron 1.0  $\mu$ M y la de  $MgCl_2$  fue de 3.0 mM. Los reactivos utilizados para las reacciones fueron: amortiguador de reacción 10X (viene con la taq polimerasa), mezcla de dNTP's (0.2mM) de la marca Fermentas), amplificasa (Biotecnologías universitarias), agua ultrapura y ADN de cada individuo. Las condiciones específicas para las reacciones de PCR con cada par de primers se detallan en el Apéndice II.

En este trabajo sólo se utilizaron tres de estos loci de microsatélites, pues no fue posible amplificar el cuarto para todos los individuos colectados.

### ***Visualización de los productos de PCR***

Los productos de PCR se separaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, utilizando cámaras de secuenciación (CBS Scientific modelo DDH-400-33) y una fuente de poder, aplicando 1300 V durante ca. 3.5 horas. Se utilizó un marcador moléculal (escalera) de 10 pares de bases (pb) como referencia para conocer el tamaño de los productos amplificados. Una vez terminado el corrimiento, los geles se tiñeron con nitrato de plata (1 g/l) para poder visualizar los productos (Apéndice III). Posteriormente, los geles se fotografiaron y la imagen resultante se leyó con el programa LabWorks v.4.5 (UVP, California), este programa permite conocer tanto la intensidad como el peso moléculal de cada banda (producto del PCR) (Figura 5). Los diferentes alelos de un microsatélite corresponden a productos de PCR de distinto tamaño, por lo que el genotipo de cada individuo está dado en estos términos (*i.e.* tamaño, en

pares de bases). Para mayor detalle sobre la preparación y el corrido de los geles, ver el Apéndice III.



**Figura 5.** Fotografía de un gel de poliacrilamida al 6 % teñido con plata, mostrando los alelos en diferentes individuos y su peso molecular con el primer 3, los carriles externos corresponden a las escaleras de 10 pb.

## II. 4 Métodos de análisis genético

Las variables de genética de poblaciones obtenidas en este trabajo se pueden categorizar en tres rubros: variación genética intra-poblacional, variación genética inter-poblacional y análisis de paternidad. A continuación se detalla las variables obtenidas y su interpretación, para cada uno de estos rubros.

### II.4.1 Variación genética intra-poblacional

Se analizó la diversidad genética de tres loci de microsatélites para las nueve poblaciones de *T. recurvata* utilizando el programa Gen AlEx, v.6 (Peakall y Smouse, 2006) a partir de lo cual se obtuvo el número de alelos por locus ( $N_a$ ), la frecuencia alélica de cada locus en cada población, el número de alelos privados por población, y la heterocigosis esperada ( $H_e$ ), esta última calculada como:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ . Además, se calculó la heterocigosis observada ( $H_o$ ) de la siguiente forma:

$$H_o = \text{No. de heterócigos} / N$$

donde  $N$  es el número de muestras. Por último, se calculó el número efectivo de alelos ( $N_e$ ), como el recíproco de la homocigosidad (Nei, 1987):

$$N_e = 1 / 1 - H_e$$

donde  $H_e$  es la heterocigosidad esperada. Estos análisis se realizaron tanto para las poblaciones completas (*i.e.* adultos y plántulas), como considerando por separado a los individuos adultos y a las plántulas.

Se estimó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para cada uno de los tres loci para las nueve poblaciones de *T. recurvata*, tanto para las poblaciones completas (*i.e.* adultos y plántulas) como considerando por separado a los individuos adultos y a las plántulas, utilizando el programa GenePop, v. 3.4 (Raymond y Rousset, 1995). El equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo de genética de poblaciones que asume que las proporciones genotípicas se mantienen constantes o en equilibrio a través del tiempo, si se cumplen ciertos supuestos (que en la población el apareamiento es al azar –panmixia-, que el tamaño poblacional es grande, por lo que no existe deriva génica, que no ocurren procesos de mutación, ni de migración, ni de selección natural - Hedrick, 2000).

Además, de las variables antes citadas, también se calculó, para cada locus y para cada población, el índice de fijación ( $F_{IS}$ ) para determinar si existía exceso o deficiencia de heterócigos. De acuerdo con Hedrick (2000),  $F_{IS}$  es una medida de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones, basada en la heterocigosidad observada y esperada. Este índice puede tomar valores positivos, indicando una deficiencia de heterócigos como producto de procesos de endogamia, o valores negativos que sugieren un exceso de heterócigos (Nei, 1987); si adquiere valores cercanos a cero, indica que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (Hedrick, 2000). Este análisis se llevó a cabo con el programa GenePop, v. 3.4 a partir de los métodos de Weir y Cockerham (1984).

#### **II.4.2 Variación genética inter-poblacional**

La información sobre la diversidad genética de las nueve poblaciones, en los tres loci de microsatélites evaluados, se utilizó para calcular la diferenciación genética entre poblaciones y otras variables asociadas a este nivel de variación, como se detalla en los siguientes incisos:

a) Índices de fijación de Wright

Wright desarrolló tres índices para evaluar la variación genética a diferentes niveles: a nivel de la población total (T), a nivel de las subpoblaciones (S) y entre individuos (I). Estos índices son  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IS}$ , respectivamente (Hedrick, 2000). Estos estadísticos F estiman la reducción de la heterocigosidad en cada nivel de la jerarquía poblacional respecto a un nivel más inclusivo o superior (Hartl y Clark, 1997). De esta manera,  $F_{IS}$  mide la reducción de la heterocigosidad de los individuos respecto de las subpoblaciones (Hartl y Clark, 1997) y se calcula cómo:

$$F_{IS} = H_s - H_o / H_s$$

donde  $H_o$  es la heterocigosidad observada promedio dentro de la subpoblación y  $H_s$  es la heterocigosidad esperada promedio dentro de subpoblaciones

$F_{ST}$  mide esta reducción, pero de las subpoblaciones con respecto al total (Hartl y Clark, 1997) y se calcula cómo:

$$F_{ST} = H_t - H_s / H_t$$

donde  $H_s$  es la heterocigosidad esperada promedio dentro de subpoblaciones y  $H_t$  es la heterocigosidad esperada promedio en la población total.

y  $F_{IT}$  evalúa la reducción de los individuos con respecto al total (Hartl y Clark, 1997) y se calcula cómo:

$$F_{IT} = H_t - H_o / H_t$$

donde  $H_o$  es la heterocigosidad observada promedio dentro de la subpoblación y  $H_t$  es la heterocigosidad esperada promedio en la población total.

$F_{ST}$  es una medida de la diferenciación genética entre las subpoblaciones y siempre toma valores positivos entre cero y uno; cuando adquiere valores cerca de cero, implica que las subpoblaciones se parecen mucho, mientras que valores cercanos a uno sugieren que la diferenciación entre subpoblaciones es alta. Por su parte,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  son medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg, la primera al interior de las subpoblaciones y la

segunda en el contexto de la población total. Para estas medidas puede haber valores tanto positivos como negativos; los valores positivos indican una deficiencia de heterócigos y los valores negativos indican un exceso de heterócigos en el nivel que se esté evaluando (Hedrick, 2000).

Para obtener los estadísticos  $F$  de Wright se utilizó el programa TFPGA v. 1.3. (Miller, 1997) Estos valores se calcularon por locus, para todas las poblaciones (tanto para las poblaciones completas como considerando por separado a los adultos y a las plántulas) utilizando los métodos de Weir y Cockerham (1984).

#### b) Cálculo de $R_{ST}$ y Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Con el programa Arlequín V. 3.0, se calculó la variable  $R_{ST}$ , que es análoga a la  $F_{ST}$  de Wright (1951) que se describió en el inciso anterior. Sin embargo, este índice es específico para microsatélites, pues la manera en la que se comportan estos marcadores no se asemeja al modelo de alelos infinitos del que se parte para el cálculo de  $F_{ST}$ , ya que los microsatélites presentan una alta tasa de mutación y tienen un tipo de “memoria” del estado alelico previo, lo que determina que se comporten de manera más cercana al modelo de mutación por pasos (Slatkin, 1995). Estudios empíricos han mostrado que la mayoría de las mutaciones de los microsatélites resultan de la inserción o deleción de una o dos unidades repetidas (Scribner y Pearce, 2000), a partir de un alelo previo.

En esta sección se obtuvieron los índices de fijación ( $F_{CT}$ ,  $F_{SC}$  y  $F_{ST}$ ) a partir de la  $R_{ST}$ .y se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para determinar de qué manera contribuyen los diferentes niveles de estructuración espacial a la variación genética. En este caso, distinguimos tres escalas espaciales de agrupación a partir de las cuales se obtuvieron los índices de fijación: a) la escala de cada población local (la diferenciación entre poblaciones medida a través de  $F_{ST}$ ); b) la escala de las poblaciones locales, pero concebidas como parte de un grupo de poblaciones cercanas; en este caso se distinguieron tres grupos, el más norteño (formado por las poblaciones 4, 5 y 6), el central (formado por las poblaciones 1, 2, 9, 10 y 11), y el más sureño (formado por la población 8 – ver figura 3); la  $F_{SC}$  evaluó la diferenciación entre poblaciones dentro de los grupos; por último, c) la escala de los grupos de poblaciones, para la cual se utilizó el índice  $F_{CT}$  que mide la diferenciación entre grupos. El AMOVA identifica qué

porcentaje de la variación genética total se encuentra en cada nivel de agrupación (Tero et al., 2003).

c) Número de migrantes por generación ( $Nm$ ) a partir del método de alelos privados y número absoluto de migrantes ( $M$ )

Se utilizó el programa GenePop, v. 3.4, para obtener  $Nm$ , el número de migrantes por generación, el cuál es una medida indirecta del flujo génico entre las poblaciones locales. El programa mencionado calcula esta variable por el método de alelos privados, el cual considera las frecuencias de los alelos privados de cada subpoblación (Slatkin, 1985). Este autor encontró que el logaritmo de  $Nm$  esta relacionado aproximadamente de manera lineal con el logaritmo de la frecuencia promedio de alelos privados:

$$\ln [P(I)] = a \ln (Nm) + b$$

donde  $P(I)$  es la frecuencia promedio de los alelos privados y  $a$  y  $b$  son constantes que dependen del número de individuos muestreados en cada subpoblación y son determinados por datos simulados (Slatkin, 1985).

El valor de  $Nm$  se obtuvo tanto para las poblaciones completas, como considerando por separado a los individuos adultos y a las plántulas, con el objeto de evaluar la manera en la que varía este valor en las diferentes fases del ciclo de vida de la especie en estudio. Además, se utilizó el programa Arlequín v. 3.0 (Excoffier et al., 2005), para estimar el número absoluto de migrantes intercambiados, por generación, entre pares de poblaciones (árbol) ( $M$ ). Esta variable se estimó únicamente para las poblaciones completas y su cálculo partió de los valores de  $F_{ST}$  para pares de poblaciones de la siguiente forma:

$$M = 1 - F_{ST} / 2 F_{ST}$$

d) Distancia genética de Nei

Se utilizó el programa Arlequin v.3.0 (Excoffier et al., 2005) para calcular las distancias genéticas de Nei, que evalúan la magnitud de la diferenciación genética entre las poblaciones locales (Nei, 1987). Se espera que la distancia genética de Nei incremente con el tiempo de manera lineal (Nei, 1972; Hedrick, 2000). Esta medida es apropiada para marcadores moleculares selectivamente neutros (que presumiblemente es el caso de los microsátélites) y bajo el modelo de alelos infinitos (en los que cada nueva mutación da lugar a un nuevo alelo).

e) Análisis de aislamiento por distancia (prueba de Mantel)

Se realizó una prueba de Mantel para saber si existe una correlación entre las distancias geográficas (en km) entre pares de poblaciones locales y sus distancias genéticas (de Nei), así como entre las distancias geográficas y el número absoluto de migrantes ( $M$ ) obtenido a partir de la  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones locales. Este análisis se realizó utilizando el programa Arlequín v. 3.0 (Excoffier et al., 2005).

#### ***II.4.3 Análisis de paternidad. Estimación del número de inmigrantes por población.***

Se llevó a cabo un análisis de paternidad para definir cuáles de los recientes reclutas de cada población (*i.e.* plántulas) provienen de padres “externos” a la población y no de padres “locales”. Esto se determinó con base en el genotipo de cada plántula: si una plántula tenía por lo menos un alelo (de entre los diferentes loci de microsatélites extraídos) que no estuviera representado entre los padres potenciales (*i.e.* adultos) de su propia población, entonces se definía como “migrante”; asimismo, cuando una plántula tenía una combinación de alelos que no pudiera provenir (asumiendo autopolinización) de ninguno de los padres potenciales, también se definió como “migrante”. Esta técnica nos permite definir con toda seguridad aquellos genotipos que no provienen de los padres locales. Sin embargo, existe la posibilidad de que algunas de las plántulas que comparten el genotipo con alguno de los padres locales, en realidad sean inmigrantes y no lo estemos pudiendo detectar debido al bajo número de loci de microsatélites con los que trabajamos. Esta técnica nos permitirá tener una medida directa de la inmigración y correlacionarla con la distancia a la fuente más cercana de colonizadores.



## Capítulo III

### Resultados

#### III.1 Resultados generales

Se amplificó el ADN de 386 individuos de *T. recurvata* pertenecientes a nueve poblaciones ubicadas en Tehuacán, Puebla, México. Esta amplificación se llevó a cabo usando tres pares de oligonucleótidos (primers) de microsatélites diseñados para *T. recurvata*. Al analizar estos tres loci en las nueve poblaciones completas (adultos y plántulas), se encontraron 35 alelos (Tabla III.1). El locus que presentó el mayor número de alelos fue el microsatélite 3, con 14 alelos, mientras que el que presentó un menor número de alelos, fue el microsatélite 4, con 8 alelos. Estos mismos microsatélites obtuvieron, respectivamente, el mayor y menor número de alelos efectivos ( $N_e$ ) y la mayor y menor heterocigosis esperada (Tabla III.1).

**Tabla III.1** Evaluación general de los tres loci de microsatélites amplificados para las nueve poblaciones completas de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos encontrados,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Locus	Rango del tamaño del producto (pb)	$N$	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
3	135-161	386	14	5.425	0.742*	0.790	0.0783 (P= 0.0000)
4	140-154	386	8	2.898	0.609*	0.625	0.0749 (P=0.0005)
23	166-190	386	13	5.022	0.655*	0.794	0.1994 (P=0.0000)
Promedio			11.6	4.44	0.668	0.736	0.117

\* (P<0.001)

En cuanto a la heterocigosis observada ( $H_o$ ), se muestran desviaciones de las proporciones esperadas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg en los tres loci analizados; estas desviaciones son debidas a una deficiencia de heterócigos en los tres casos (Tabla III.1).

Por otro lado, analizando solamente a los adultos, se encontraron 33 alelos en total, observándose 14 alelos para el locus 3, 13 para el locus 23 y sólo 6 alelos para el locus 4 (Tabla III.2). En cuanto a la  $H_o$ , se observó para el locus 3 y 4 una ligera tendencia hacia un exceso de heterócigos, aunque ésta no fue significativa. Por otro lado, en el locus 23 sí se observó una

desviación de las proporciones esperadas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg, en este caso debido a un déficit de heterocigos, lo cual coincide con lo observado para las poblaciones analizadas globalmente.

**Tabla III.2** Evaluación general de los tres loci de microsatélites para las nueve poblaciones, incluyendo solamente a los individuos adultos de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Locus	Intervalo del tamaño del producto (pb)	$N$	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
3	135-161	123	14	4.368	0.819 <sup>ns</sup>	0.740	- 0.0804 (P=0.249)
4	140-150	123	6	2.762	0.679 <sup>ns</sup>	0.589	-0.1232 (P=0.283)
23	166-190	123	13	3.976	0.712 <sup>*</sup>	0.739	0.1197 (P=0.002)
Promedio			11	3.702	0.736	0.689	-0.0279

\* (P<0.01)

ns = valores no significativos

Por último, al analizar solamente a las plántulas se encontraron 34 alelos en total, observándose 14 alelos para el locus 3, 13 para el locus 23 y 7 alelos para el locus 4 (Tabla III.3). Con respecto a la  $H_o$ , se encontraron desviaciones de las proporciones esperadas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg en los tres loci como resultado de una deficiencia de heterocigos en los tres casos.

**Tabla III.3** Evaluación general de los tres loci de microsatélites para las nueve poblaciones de *T. recurvata*, incluyendo sólo a las plántulas.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Locus	Rango del tamaño del producto (pb)	$N$	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
3	135-161	263	14	5.302	0.697*	0.788	0.1402 (P=0.0000)
4	140-150	263	7	2.783	0.572*	0.613	0.1429 (P=0.0000)
23	166-190	263	13	4.682	0.636*	0.773	0.2076 (P=0.0000)
Promedio			11.3	4.25	0.635	0.724	0.163

\* (P<0.001)

### ***III.2 Variación genética intra-poblacional***

En esta sección se muestran los resultados de la variación genética intra-poblacional considerando a los tres loci en conjunto para cada población. En el Apéndice V se muestran los resultados para cada locus en cada población a mayor detalle. Al igual que en la sección anterior, se presentan los resultados para las poblaciones completas y después separando al grupo de los adultos del grupo de las plántulas. Las variables que se calcularon fueron: número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), número de alelos exclusivos ( $A_p$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) e índice de fijación ( $F_{IS}$ ) (Tablas III.4 a III.6). Por otro lado, se obtuvo el promedio de las heterocigosis tomando en cuenta a los tres loci en conjunto para cada una de las poblaciones, tanto para las poblaciones completas como separando a adultos y plántulas (Figuras 3.1 a 3.3).

#### *Poblaciones completas*

Se encontró una alta variación en el número de alelos al promediar los tres loci por población, observándose desde un promedio de 6.6 alelos por locus en las poblaciones 2A y 10 I, hasta uno de 9.3 alelos por locus en las poblaciones 4I y 5A (Tabla III.4).

Se encontraron cuatro alelos exclusivos, dos en la población 4I para el locus 3 y dos en la población 5A para el locus 4 (ver apéndice V).

Con respecto a las proporciones de heterocigotos y homocigotos, se pudo observar que en la mayoría de las poblaciones se presentaron desviaciones con respecto a las proporciones según el equilibrio de Hardy-Weinberg. En la mayoría de los casos se observó un exceso de homocigotos, siendo el valor más alto el de la población 9B ( $F_{IS} = 0.373$ ). Sin embargo, en las poblaciones 2A, 11B y 10 I se encontraron valores negativos de  $F_{IS}$  (i.e. un exceso de heterocigotos) aunque sólo para 2A el valor fue significativamente diferente de cero.

**Tabla III.4** Resultados de los tres loci para cada una de las poblaciones completas (adultos y plántulas) de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

<b>Pobl. y nivel de aislamiento</b>	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	34	7	4.873	0	0.539*	0.773	0.301
9 B	50	7.3	3.843	0	0.447*	0.684	0.373
11 B	34	6.6	3.548	0	0.754 <sup>ns</sup>	0.671	-0.1
2 A	42	6.6	3.243	0	0.976*	0.681	-0.431
8 I	39	8.3	4.679	0	0.726*	0.778	0.075
10 I	46	6.6	3.530	0	0.65 <sup>ns</sup>	0.662	-0.018
4 I	53	9.3	5.499	2	0.509*	0.770	0.347
5 A	68	9.3	5.038	2	0.684*	0.795	0.152
6 A	20	7.3	5.778	0	0.733*	0.808	0.122

\* Desviación significativa de las proporciones de Hady-Weinberg ( $P < 0.001$ )

ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg

### *Adultos*

Al analizar sólo a los adultos promediando los tres loci para cada población, se observó una menor variación en cuanto al número de alelos por locus en comparación con los resultados de las poblaciones completas: desde 4 alelos por locus para la población 1B, hasta 7.6 para la población 4I (Tabla III.5).

Se encontraron cinco alelos exclusivos entre los adultos, dos alelos en la población 2A y dos en la población 4I para el locus 3, y un alelo exclusivo en la población 4I para el locus 23 (Apéndice V).

La mayoría de las poblaciones presentaron desviaciones de las proporciones esperadas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg, principalmente debido a un exceso de heterocigotoss, siendo la población 2A la que presentó el valor más negativo ( $F_{IS} = -0.639$ ). El valor de  $F_{IS}$  fue negativo pero no fue significativamente diferente de cero en las poblaciones 11B y 10 I. Las poblaciones restantes (1B, 9B y 4I) presentaron un déficit de heterocigos. Por último, en la población 6A el valor de  $F_{IS}$  no fue significativamente diferente de cero (Tabla III.5).

**Tabla III.5** Resultados de los tres loci para cada una de las poblaciones, incluyendo sólo a los adultos de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

<b>Pobl. y nivel de aislamiento</b>	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	8	4	3.120	0	0.583*	0.664	0.149
9 B	16	5.6	3.138	0	0.500*	0.607	0.145
11 B	10	4.6	2.798	0	0.833 <sup>ns</sup>	0.615	-0.331
2 A	12	4.3	2.688	2	1.000*	0.613	-0.639
8 I	15	6	4.076	0	0.866*	0.754	-0.118
10 I	17	4.3	3.102	0	0.608 <sup>ns</sup>	0.616	-0.030
4 I	17	7.6	5.575	3	0.706*	0.810	0.16
5 A	23	6.3	4.343	0	0.797*	0.771	-0.028
6 A	5	5.3	4.478	0	0.733 <sup>ns</sup>	0.766	0.159

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg ( $P < 0.001$ )

ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg

### *Plántulas*

Al analizar únicamente a las plántulas promediando los tres loci para cada población, se encontró que el número de alelos por locus varió desde 6 en la población 1B, hasta 8.6 en la población 5A, siendo estos valores ligeramente más altos que los encontrados cuando se analizaron sólo a los adultos (Tabla III.6).

Se observaron cinco alelos exclusivos, dos de ellos en la población 4I para el locus 3, mientras que los otros tres se encontraron en la población 5A (dos en el locus 4 y uno en el locus 23) (Apéndice V).

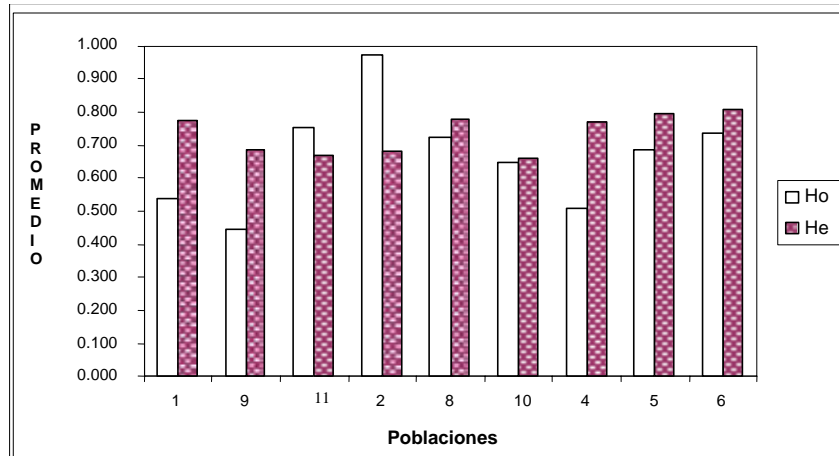
En la mayoría de las poblaciones se presentaron desviaciones significativas de las proporciones esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg, debidas principalmente a un exceso de homocigotos (en las poblaciones 1B, 9B, 8I, 4I y 5A). Sólo la población 2A presento un exceso significativo de heterocigotos (Tabla III.6). Los valores de  $F_{IS}$  de las poblaciones 11B, 10 I y 6A no fueron significativamente diferentes de cero.

**Tabla III.6** Resultados de los tres loci para cada una de las poblaciones, incluyendo sólo a las plántulas de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

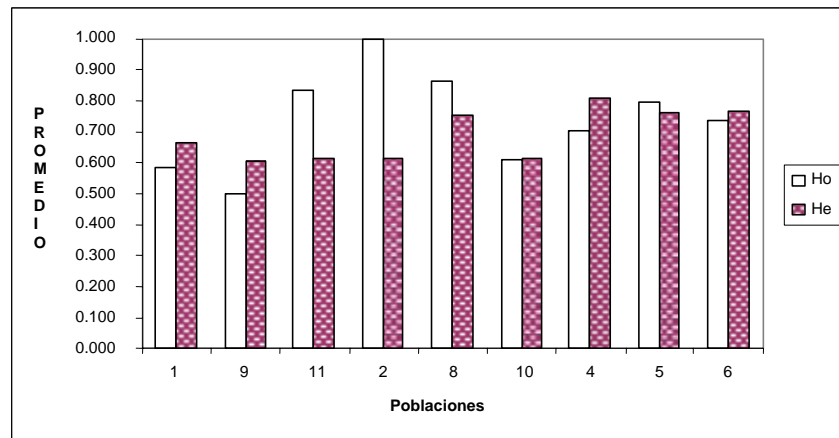
<b>Pobl. y nivel de aislamiento</b>	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	26	6	4.788	0	0.525*	0.776	0.328
9 B	34	7.3	4.021	0	0.421*	0.706	0.447
11 B	24	6.6	3.811	0	0.711 <sup>ns</sup>	0.66	-0.064
2 A	30	6.3	3.323	0	0.966*	0.688	-0.396
8 I	24	6.6	3.985	0	0.639*	0.724	0.130
10 I	29	6.6	3.616	0	0.674 <sup>ns</sup>	0.667	-0.037
4 I	36	7.3	4.621	2	0.416*	0.71	0.419
5 A	45	8.6	4.985	3	0.625*	0.796	0.231
6 A	15	6.6	5.148	0	0.733 <sup>ns</sup>	0.791	0.102

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg (P<0.001)

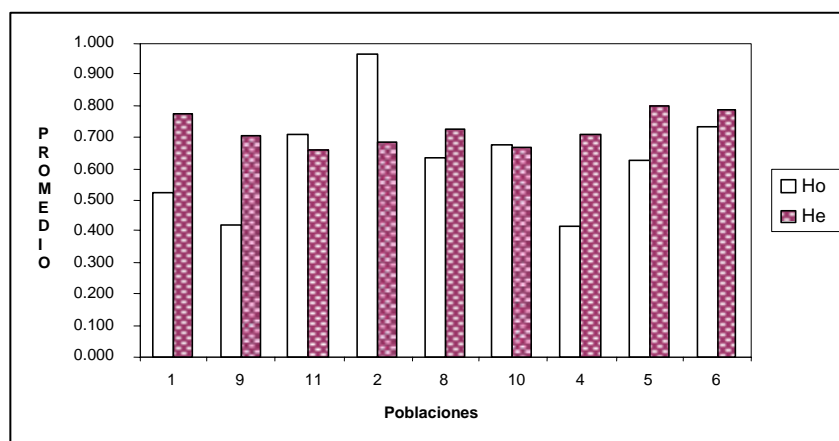
ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg



**Fig 3.1** Promedio de la heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) de los tres loci de microsatélite para cada una de las poblaciones completas de *T. recurvata*.



**Fig 3.2** Promedio de la heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) de los tres loci de microsatélite para cada una de las poblaciones de Adultos de *T. recurvata*.



**Fig 3.3** Promedio de la heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) de los tres loci de microsatélite para cada una de las poblaciones de Plántulas de *T. recurvata*.

### ***III.3 Variación genética inter-poblacional***

En esta sección, se presentan los índices  $F$  de Wright, tanto para las poblaciones completas como para adultos y plántulas por separado. Además, se presentan los valores de los índices de fijación por nivel de estructuración obtenidos a partir de la  $R_{ST}$  ( $F_{CT}$ ,  $F_{SC}$  y  $F_{ST}$ ), así como las distancias genéticas, los valores del número de migrantes por generación y los resultados del AMOVA y de las pruebas de Mantel (de aislamiento por distancia).

#### *a) Índices de fijación ( $F$ ) de Wright*

En las Tablas de la III.7 a la III.9 se presentan los valores de  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$  para cada uno de los tres loci de microsatélites de *Tillandsia recurvata*. Considerando a las poblaciones completas, se observaron valores positivos de  $F_{IS}$  para todos los loci, lo cual sugiere que hay un déficit de heterocigotos en los tres loci (Tabla III.7). Sin embargo, cuando se consideró sólo a los adultos el valor promedio de  $F_{IS}$  fue negativo, sugiriendo un exceso de heterocigotos en este estadio del ciclo de vida (Tabla III.8). En contraste, entre las plántulas los valores de  $F_{IS}$  fueron positivos e incluso más elevados de los que se obtuvieron analizando las poblaciones completas (Tabla III.9), lo que indica que en este estadio del ciclo de vida se presenta un déficit de heterocigotos.

Por otro lado, los valores de  $F_{ST}$  fluctuaron entre 0.06 y 0.17, siendo mayores entre los adultos que entre las plántulas (Tablas III.8 y III.9). Esto sugiere que, en general, los adultos difieren más entre poblaciones de lo que ocurre entre las plántulas. Los valores de  $F_{ST}$  de las plántulas fueron muy parecidos a los que se observaron al analizar a las poblaciones completas y sugieren un cierto nivel de diferenciación entre poblaciones.

Con respecto a los valores de  $F_{IT}$ , se obtuvieron solamente valores positivos, indicando un déficit de heterocigotos, en este caso en los individuos con respecto a todo el conjunto muestreado. Estos valores fueron más altos entre las plántulas que entre los adultos (Tablas III.8 y III.9). El valor de  $F_{IT}$  más alto fue de 0.27, observado en el locus 23 entre las plántulas (Tabla III.9). Este locus fue el que mostró los valores más altos de  $F_{IT}$ , tanto al tomar en cuenta a las poblaciones completas, como entre adultos y entre plántulas.



**Tabla III.7** Índices de fijación de Wright para cada locus y promedio de lo mismos para las poblaciones completas de *T. recurvata*. Se muestra también el promedio obtenido por el método de Jacknife y en paréntesis su desviación estándar: así como el intervalo de confianza al 95 % obtenido por el método de Bootstrap.

<b>Locus</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>	<b><math>F_{IT}</math></b>
3	0.0806	0.1055	0.1776
4	0.0753	0.1148	0.1814
23	0.1993	0.0659	0.2521
<b>Promedio</b>	0.1213	0.0946	0.2044
<b>Promedio por Jacknife</b>	0.1210 (0.0432)	0.0957 (0.0152)	0.2045 (0.0255)
<b>I. C.<sub>(95%)</sub> por Bootstrap</b>	Máximo (0.1989)	Máximo (0.1166)	Máximo (0.2525)
	Mínimo (0.0729)	Mínimo (0.0669)	Mínimo (0.1773)

**Tabla III.8** Índices de fijación de Wright para las poblaciones de *T. recurvata*, incluyendo sólo a los adultos. Se muestra también el promedio obtenido por el método de Jacknife y en paréntesis su desviación estándar: así como el intervalo de confianza al 95 % obtenido por el método de Bootstrap.

<b>Locus</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>	<b><math>F_{IT}</math></b>
3	-0.0813	0.1331	0.0626
4	-0.1246	0.1774	0.0749
23	0.1211	0.0875	0.1980
<b>Promedio</b>	-0.0216	0.1310	0.1122
<b>Promedio por Jacknife</b>	- 0.0172 (0.0788)	0.1300 (0.0246)	0.1133 (0.0454)
<b>I. C.<sub>(95%)</sub> por Bootstrap</b>	Máximo (0.1242)	Máximo (0.1774)	Máximo (0.2005)
	Mínimo (0.1246)	Mínimo (0.0871)	Mínimo (0.0626)

**Tabla III.9** Índices de fijación de Wright para las poblaciones de *T. recurvata*, incluyendo sólo a las plántulas. Se muestra también el promedio obtenido por el método de Jacknife y en paréntesis su desviación estándar: así como el intervalo de confianza al 95 % obtenido por el método de Bootstrap.

<b>Locus</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>	<b><math>F_{IT}</math></b>
3	0.1405	0.1052	0.2309
4	0.1437	0.1071	0.2354
23	0.2076	0.0828	0.2732
<b>Promedio</b>	0.1651	0.0980	0.2469
<b>Promedio por Jacknife</b>	0.1646 (0.0142)	0.0986 (0.0084)	0.2467 (0.0235)
<b>I. C.<sub>(95%)</sub> por Bootstrap</b>	Máximo (0.2076)	Máximo (0.1097)	Máximo (0.2732)
	Mínimo (0.1405)	Mínimo (0.0828)	Mínimo (0.2309)

*b) Cálculo de  $R_{ST}$  y Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)*

El análisis de varianza molecular (AMOVA) con el cual se calcularon también los índices de fijación, pero obtenidos a partir de  $R_{ST}$ , mostró que el mayor porcentaje de variación se encontró a nivel intrapoblacional (85.74 %) con un índice de fijación de  $F_{ST} = 0.14$  y altamente significativo (Tabla III.10). Le siguió en importancia la variación entre poblaciones al interior de los grupos, con un porcentaje de 18.59 y con un índice de fijación significativo ( $P = 0.00$ ) de  $F_{SC} = 0.178$ . En cuanto al nivel de variación entre grupos, éste presentó el menor porcentaje de variación (-4.3 %) con un índice de fijación negativo (-0.04) y no significativo (Tabla III.10).

**Tabla III.10** Resultados de AMOVA con base en  $R_{ST}$ . Las poblaciones estudiadas se clasificaron en tres grupos de acuerdo a su distancia entre ellas: el más sureño (población 8), el central (poblaciones 1, 9, 10, 2 y 11) y el más norteño (poblaciones 4, 5 y 6) Ver figura 3.

<b>Fuente de variación</b>	<b>% de variación</b>	<b>Índices de fijación</b>	<b>Prueba de significancia</b>
Entre grupos	-4.33	$F_{CT} = -0.043$	0.627 +- 0.013
Entre pop., dentro de grupos	18.59	$F_{SC} = 0.178$	0.000 +- 0.000
Dentro de poblaciones	85.74	$F_{ST} = 0.14$	0.000 +- 0.000

*c) Número de migrantes por generación ( $Nm$ ) a partir del método de alelos privados y número absoluto de migrantes ( $M$ )*

El número de migrantes por generación ( $Nm$ ) fue de 2.75. Sin embargo, vale la pena notar que la  $Nm$  fue mucho mayor para plántulas que para adultos (Tabla III.11).

**Tabla III.11** Valores de  $Nm$  a partir del método de alelos privados para las nueve poblaciones de *T. recurvata* analizadas a través de tres loci de microsatélites.

<b>Nivel de análisis</b>	<b><math>Nm</math></b>
Poblaciones Completas	2.75
Adultos	0.25
Plántulas	3.47

Por otro lado, el número absoluto de migrantes entre pares de poblaciones ( $M$ ) obtenido a partir del valor de  $F_{ST}$ , fue muy variable y no mostró, a simple vista, un patrón general de asociación con las distancias geográficas. Por ejemplo, como era de esperarse, la migración más alta se dio efectivamente entre las poblaciones 4 y 6 ( $M = 19.194$ ), que presentan una distancia geográfica entre ellas de sólo 0.08 km. Sin embargo, también se obtuvieron datos inesperados, como el hecho de que las poblaciones 1 y 6 mostraron valores de  $M$  muy altos (18.359), aunque la distancia geográfica entre ellas (que es de 6.82 km) era mucho mayor que entre las poblaciones 4 y 6 (Tabla III.12); por otro lado, el valor de  $M$  más bajo se encontró entre las poblaciones 11 y 10 ( $M = 1.764$ ), aunque la distancia geográfica entre ellas era de sólo 0.11 km (Tabla III.12).

**Tabla III.12** Valores del número absoluto de migrantes entre pares de poblaciones ( $M$ ) calculados a partir de la  $F_{ST}$  (debajo de la diagonal) y distancias geográficas en km (arriba de la diagonal).

<b>Pob. y nivel de aislam.</b>	<b>1 B</b>	<b>9 B</b>	<b>11 B</b>	<b>2 A</b>	<b>8 I</b>	<b>10 I</b>	<b>4 I</b>	<b>5 A</b>	<b>6 A</b>
<b>1 B</b>		0.12	0.38	0.21	13.16	0.30	6.72	6.80	6.82
<b>9 B</b>	3.397		0.26	0.16	13.07	0.18	6.86	6.92	6.93
<b>11 B</b>	6.360	2.890		0.24	12.91	0.11	7.12	7.17	7.19
<b>2 A</b>	2.768	3.961	2.908		13.12	0.24	6.88	6.96	6.98
<b>8 I</b>	6.815	4.557	3.892	2.778		12.91	18.70	18.71	18.75
<b>10 I</b>	2.950	9.806	1.765	2.407	2.909		7.05	7.10	7.11
<b>4 I</b>	6.588	10.386	5.234	6.567	7.608	3.802		0.09	0.08
<b>5 A</b>	7.162	6.053	6.095	3.955	8.712	3.037	11.234		0.05
<b>6 A</b>	18.360	7.733	9.701	4.593	17.76	4.140	19.194	14.513	

#### *d) Distancias genéticas de Nei*

Como era de esperarse, los resultados de  $M$ , los valores de las distancias genéticas de Nei mostraron que la mayor distancia genética se presentó entre la población 11 y 10 ( $D = 0.587$ ), a pesar de que la distancia geográfica que las separa es pequeña (0.11 km) (Tabla III.13). También se encontró que las poblaciones 2 y 10 presentaron valores de distancia genética altos ( $D = 0.424$ ); estas poblaciones también están separadas por una distancia geográfica reducida (0.75 km) (Tabla III.13). Por otro lado, el valor de distancia genética más bajo se presentó entre las poblaciones 4 y 6 ( $D = 0.060$ ) cuya distancia geográfica es de 1.07 km. Entre las poblaciones 1 y 6 también hubo una distancia genética baja ( $D = 0.064$ ), a pesar de que la distancia geográfica

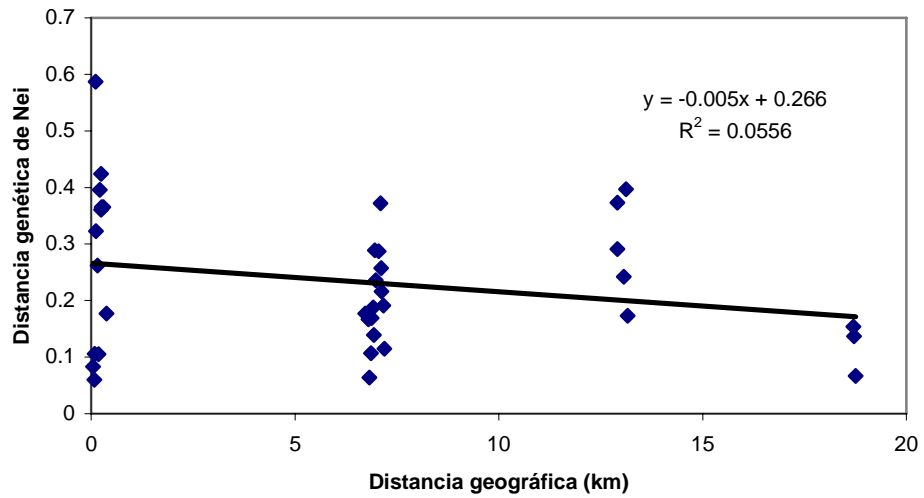
entre ellas es de 6.82 km (Tabla III.13). Por último, llama la atención que las dos poblaciones más alejadas entre ellas, que son la 8 y la 6 (18.75 km), presentaron una distancia genética muy reducida ( $D=0.067$ ).

**Tabla III.13** Valores de distancia genética de Nei entre pares de poblaciones (debajo de la diagonal) y distancias geográficas en km (arriba de la diagonal).

<b>Pob. y nivel de aislam.</b>	<b>1 B</b>	<b>9 B</b>	<b>11 B</b>	<b>2 A</b>	<b>8 I</b>	<b>10 I</b>	<b>4 I</b>	<b>5 A</b>	<b>6 A</b>
<b>1 B</b>		0.12	0.38	0.21	13.16	0.30	6.72	6.80	6.82
<b>9 B</b>	0.323		0.26	0.16	13.07	0.18	6.86	6.92	6.93
<b>11 B</b>	0.177	0.365		0.24	12.91	0.11	7.12	7.17	7.19
<b>2 A</b>	0.396	0.262	0.361		13.12	0.24	6.88	6.96	6.98
<b>8 I</b>	0.173	0.242	0.291	0.397		12.91	18.70	18.71	18.75
<b>10 I</b>	0.365	0.105	0.587	0.424	0.373		7.05	7.10	7.11
<b>4 I</b>	0.177	0.107	0.216	0.169	0.154	0.287		0.09	0.08
<b>5 A</b>	0.167	0.188	0.191	0.289	0.137	0.372	0.106		0.05
<b>6 A</b>	0.064	0.139	0.115	0.236	0.067	0.257	0.060	0.083	

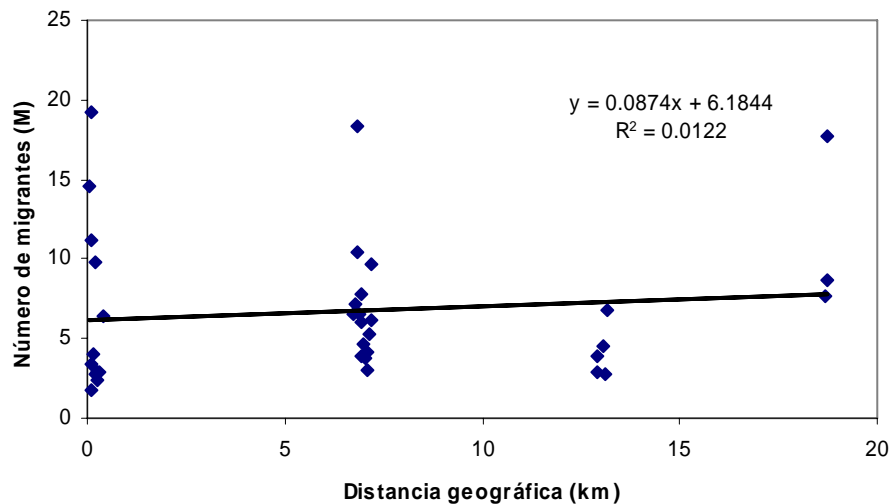
*e) Análisis de aislamiento por distancia (Prueba de Mantel)*

Contrario a lo que se esperaba, la prueba de Mantel en el que se incluyó la distancia genética ( $D$ ) contra la distancia geográfica entre pares de poblaciones, arrojó un coeficiente de correlación negativo ( $r = -0.238$ ), lo que parece sugerir que al aumentar la distancia geográfica, disminuye la distancia genética entre poblaciones (Fig. 3.4); sin embargo, esta tendencia no fue significativa ( $P= 0.793$ ).



**Figura 3.4** Correlación entre la distancia genética de Nei y las distancias geográficas de las poblaciones estudiadas de *T. recurvata*. El coeficiente de correlación fue de -0.238.  $P = 0.793$

De manera análoga, la prueba de Mantel realizada entre el número absoluto de migrantes ( $M$ ) y las distancias geográficas entre pares de poblaciones mostró un coeficiente de correlación positivo ( $r = 0.102$ ), pero no significativa ( $P = 0.299$ ) (Fig. 3.5).



**Figura 3.5** Correlación entre el número absoluto de migrantes ( $M$ ) y las distancias geográficas entre las poblaciones estudiadas de *T. recurvata*. El coeficiente de correlación fue de 0.102.  $P = 0.299$ .

### ***III.4 Análisis de paternidad. Estimación del número de inmigrantes por población***

Para este análisis, se tomaron en cuenta dos criterios para identificar a una plántula como descendientes de padres externos a la población (y por lo tanto inmigrante). El primer criterio partió de la base de que *Tillandsia recurvata* siempre se autopoliniza; según este supuesto, cualquier plántula que no posea una combinación de alelos que esté presente entre los padres de esa población, se puede considerar como externa. Por ejemplo, si hay dos padres potenciales en la población, con genotipos AA y AB para el microsatélite X, y una plántula tiene genotipo AC, según este criterio se le considera como inmigrante. Por otro lado, se utilizó un segundo criterio para identificar a los inmigrantes, que consistió en suponer que eventualmente se puede presentar polinización cruzada. Bajo este criterio, si una plántula presenta un alelo que se encuentra representado entre los padres potenciales, esa plántula podría ser descendiente (vía polinización cruzada) de alguno de los padres presentes en esa población, por lo que no se podría afirmar que es inmigrante. Por ejemplo, si hay dos padres potenciales en la población, con genotipos AA y AB para el microsatélite X, y una plántula tiene genotipo AC, según este criterio no se le puede considerar como inmigrante, a menos que en otro de los microsatélites extraídos ambos alelos estén ausentes entre los padres potenciales. Un ejemplo de los resultados detallados de este análisis, se encuentra en el Apéndice VI. Los resultados del número de inmigrantes bajo cada uno de estos criterios se analizaron con relación al nivel de aislamiento mínimo que presentaron las poblaciones. (ver Métodos, sección II.2, Tabla II.2).

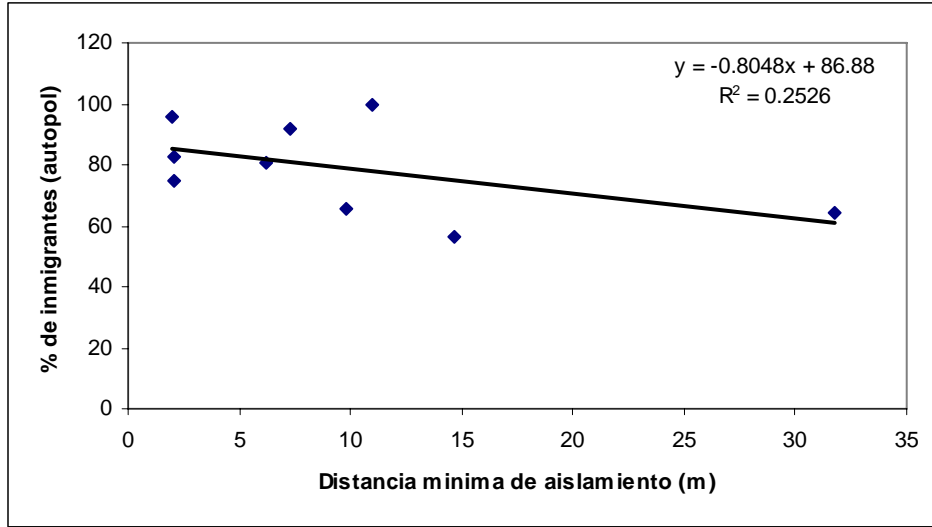
Tomando en cuenta el supuesto de que las plantas de *T. recurvata* siempre se autopolinizan, se obtuvieron datos muy altos de % de plántulas inmigrantes. Por ejemplo, en la población 6 A (aislamiento alto) el 100% de las plántulas fueron inmigrantes y el menor porcentaje de inmigrantes fue de 56.6% para la población 2 A (aislamiento alto) Bajo este supuesto y al tomar en cuenta el nivel de aislamiento mínimo, el porcentaje de inmigrantes, mostró una tendencia no significativa ( $P= 0.30$ ) a reducirse conforme aumentó la distancia de aislamiento mínima, (Fig 3.6).

Por otro lado, al considerar el supuesto de que las plantas de *T. recurvata* presentan polinización cruzada, se obtuvieron porcentajes de plántulas inmigrantes mucho menores que los obtenidos bajo el supuesto de autopolinización. Por ejemplo, en la población 2 A (con un nivel de aislamiento alto) sólo el 10 % de las plántulas fueron inmigrantes, siendo la población 1 B (nivel de aislamiento bajo) la que presentó el mayor porcentaje de plántulas inmigrantes (50

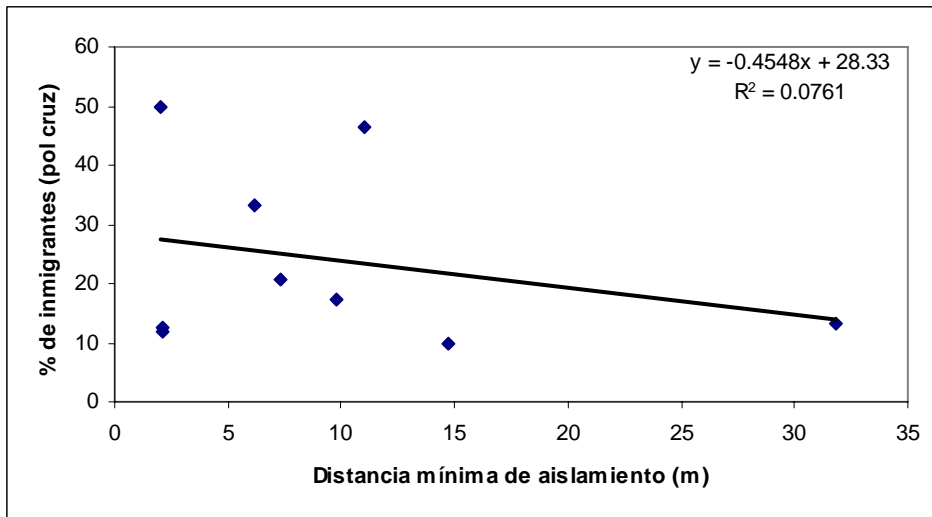
%). A su vez, la población 6 A (con un nivel de aislamiento alto) presentó también un porcentaje alto (46.6 %) de inmigrantes (Tabla III.14). Bajo el supuesto de polinización cruzada, y al tomar en cuenta el nivel de aislamiento mínimo se observó que el porcentaje de inmigrantes presentó una ligera tendencia hacia una correlación negativa entre ambas variables, pero ésta no fue significativa ( $P= 0.47$ ) (Fig 3.7).

**Tabla III.14** Porcentaje de plántulas inmigrantes detectadas en cada población de *T. recurvata* estudiada, según el supuesto de autopolinización y polinización cruzada. Se presentan las poblaciones con su nivel de aislamiento; baja (B), intermedia (I) o alta (A), de acuerdo con la clasificación de la Tabla II.1 y con base en las distancias mínimas de aislamiento. AU= Supuesto de autopolinización, PC = Supuesto de polinización cruzada.

<b>Pob. y nivel de aislamiento</b>	<b>% de plántulas inmigrantes (AU.)</b>	<b>% de plántulas inmigrantes (PC.)</b>	<b>Distancia mínima de aislamiento (m)</b>
1 B	96	50	2
9 B	82.3	11.7	2.1
11 B	75	12.5	2.1
4 I	80.5	33.3	6.2
8 I	91.6	20.8	7.3
10 I	65.5	17.2	9.8
6 A	100	46.6	11
2 A	56.6	10	14.7
5 A	64.4	13.3	31.8



**Figura 3.6** Relación entre el porcentaje de plántulas inmigrantes (de acuerdo al supuesto de autopolinización) y la distancia mínima de aislamiento de las poblaciones de *T. recurvata* estudiadas. La correlación entre ambas variables no fue significativa ( $P=0.30$ ).



**Figura 3.7** Relación entre el porcentaje de plántulas inmigrantes (de acuerdo al supuesto de polinización cruzada) y la distancia mínima de aislamiento de las poblaciones de *T. recurvata* estudiadas. La correlación entre ambas variables no fue significativa ( $P=0.47$ ).



## Capítulo IV

### Discusión

#### *V.1 Variación genética intra-poblacional*

En este trabajo se analizaron cuatro loci de microsatélites, pero uno de ellos tuvo que ser excluido del análisis, debido a problemas en la amplificación, por lo que se trabajó únicamente con tres loci de microsatélites. Otros trabajos llevados a cabo con especies de plantas y que buscan evaluar la variación y estructura genética han utilizado desde dos y hasta 10 loci de microsatélites (Sarhou et al., 2003; Galeuchet et al., 2005; Ishihama et al., 2005; Otero et al., 2005; Ramírez-Krauss, 2006). En particular, en trabajos realizados con plantas epífitas se han utilizado entre tres y seis loci de microsatélites (Boneh et al., 2003; Walser et al., 2005; García-Morales, 2007). De esta manera, el número de loci de microsatélites utilizados en este trabajo se encuentra dentro del intervalo que se considera aceptable, pues a partir de ellos puede obtenerse información clara e inequívoca con respecto a la variación genética de las poblaciones estudiadas, debido a que los microsatélites suelen ser altamente variables. Así, a pesar de que sólo se trabajó con tres loci, se obtuvieron resultados interesantes que permiten abordar de manera efectiva los objetivos planteados.

En general, la variación genética encontrada en *T. recurvata* con estos tres loci de microsatélites fue elevada a pesar de ser (de acuerdo con Soltis et al., 1987) una especie autógena, sobre todo cuando se compara con la diversidad genética encontrada en otros trabajos con bromelias y/o epífitas en términos de variables como  $N_a$ ,  $N_e$ ,  $H_o$  y  $H_e$  (Tabla IV.1).

En este trabajo, el número de alelos por locus ( $N_a$ ) fue de 11.6, uno de los valores más altos encontrados al comparar con otras especies de epífitas y bromelias, cuyos valores van desde 1.1 alelos para *T. recurvata* con isoenzimas, hasta 7.6 en *Lobaria pulmonaria*, un líquen epífita (Tabla IV.1). Sin embargo, nótese que la mayoría de los trabajos resumidos en la Tabla IV.1 se realizaron con isoenzimas, que son mucho menos variables que los microsatélites.

Según Hamrick y Godt (1989), al trabajar con isoenzimas se esperarían valores de número de alelos por locus ( $N_a$ ) de alrededor de 1.3 en poblaciones de especies que se autopolinizan, y de 1.7 en especies anemócoras. Los resultados de Soltis et al. (1987) para *T. recurvata* (con isoenzimas) muestran valores más bajos para esta variable ( $N_a= 1.1$ ). Para otras especies del género se han encontrado valores relativamente más altos ( $N_a = 1.86$  alelos para

*Tillandsia achyrostachys* – González-Astorga et al., 2004), aunque en este caso, la especie mencionada es polinizada por aves (Tabla IV.1) La variación genética (en términos de  $N_a$ ) encontrada en *T. recurvata* con microsatélites es considerablemente alta ( $N_a= 11.6$ ). Estos resultados confirman los de García-Morales (2007), quien trabajó con esta misma especie y encontró un promedio de 11.5 alelos por locus. A su vez, en otras especies de la familia Bromeliaceae, usando microsatélites, Boneh et al. (2003) encontraron 4.2 y 2.3 alelos por locus (en *Tillandsia fasciculata* y *Guzmania monostachya*, respectivamente), mientras que en *Pitcairnia geyskesii* se reportó un promedio de 7.4 alelos por locus (Sarhou et al., 2003). Sin embargo, los datos para estas tres especies provienen de una sola población para cada una; probablemente la variación será mucho mayor al muestrear más poblaciones.

El tipo de patrones de variación genética que documentan Hamrick y Godt (1989) son sumamente valiosos, pues permiten encontrar parámetros de comparación y proponer hipótesis sobre las causas que determinan la estructura de la variación genética encontrados en la naturaleza. Sin embargo, aún no hay estudios equivalentes con microsatélites en los que, como es bien sabido, el número de alelos por locus es mucho mayor del que se observa al trabajar con isoenzimas.

**Tabla IV.1.** Diversidad genética encontrada en diferentes especies de epífitas y bromelias.

Taxón	*	Háb	Sist repr	Disp sem	Marc	Num loci	% loci pol	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>
<i>Pleopeltis</i> (helechos)	1	E	Fc		Iso	9	62	2.3	-	0.181	0.189
<i>Tillandsia recurvata</i>	2	E	Au	Anem	Iso	19	3.77	1.1	1.18	0.0	0.151
<i>Tillandsia ionantha</i>	2	E	Pc	Anem	Iso	16	16.6	1.4	1.09	0.064	0.088
<i>Tillandsia achyrostachys</i>	3	E	Pc / Clonal	Anem	Iso	17	59.4	1.86	-	0.127	0.210
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	4	S	Pc / Clonal	Anem	Iso	10	63.3	2.21	-	0.185	0.183
<i>Aechmea magdalenae</i>	5	T	Au / Clonal	Zooc	Iso	18	24.1	1.3	1.13	0.099	0.084
<i>Aechmea Mexicana</i>	6	T	Au	-	Iso	10	48.75	1.7	0.19	0.054	0.157
<i>Aechmea tuitensis</i>	7	S	Sexual / clonal	-	Iso	9	77.8	2.4	1.19		0.14
<i>Tolumnia variegata</i>	8	E	Pc	-	Iso	12	77	2.5	1.43	0.18	0.21
<i>Lobaria pulmonaria</i>	9	E	Sexual/ Aseual	propagulo	Micr	6	-	7.6	4.2	-	-
<i>Tillandsia recurvata</i>	10	E	Au / Pc	Anem	Micr	4	33	11.5	5.15	0.774	0.788
<i>Tillandsia recurvata</i>	11	E	Au / Pc	Anem	Micr	3	25	11.3	4.44	0.668	0.736

Simbología: E: epífita, T: terrestre, S: saxícola. Fc= fertilización cruzada, Pc: polinización cruzada, Au: autopolinización. Clonal: propagación clonal, Anem: anemocoria, Zooc: zoocoria. Iso: isoenzimas, Micro: microsatélites. N<sub>a</sub>: número de alelos por locus, N<sub>e</sub>: número de alelos efectivos. H<sub>o</sub>: heterocigosis observada, H<sub>e</sub>: heterocigosis esperada. Nm: número de migrantes por generación.

\* Referencias:

- 1 Hooper y Haufler (1997)
- 2 Soltis et al. (1987)
- 3 González-Astorga et al. (2004)
- 4 Sarthou et al. (2001)
- 5 Murawski y Hamrick (1990)
- 6 Izquierdo (1995)
- 7 Izquierdo y Piñero (2000)
- 8 Ackerman y Ward (1999)
- 9 Walser et al. (2005)
- 10 García-Morales (2007)
- 11 Este trabajo.

Cuando se analizó la variación en términos del número promedio de alelos efectivos ( $N_e$ ), se encontró que *T. recurvata* presentó el valor más alto en esta variable cuando se compara con otras especies de bromelias y epífitas (Tabla IV.1), aunque cabe señalar que la mayor parte de estos trabajos se realizaron con isoenzimas. También se encontraron valores ligeramente mayores para las plántulas ( $N_e = 4.25$ ) que para los adultos ( $N_e = 3.7$ ). A su vez, el  $N_e$  promedio que se encontró en este trabajo coincide con los valores reportados por García-Morales (2007) para *T. recurvata* ( $N_e$  prom= 5.15). Sin embargo, el número de alelos privados (*i.e.*, que sólo se encuentran en una población) reportados por García-Morales (2007) fue de 13 (de un total de 45 alelos), mientras que los encontrados en este trabajo fueron menos (4 de 35, para el análisis que incluyó a todos los individuos muestreados por población). Dos de estos alelos privados se encontraron en la población 4 I, y los otros dos en la 5 A que son, de entre las poblaciones estudiadas, las distribuidas más al norte (junto con la 6 A). Además, estas dos poblaciones tuvieron un nivel de aislamiento intermedio y alto, respectivamente (Tabla II.2). El hecho de que sea precisamente en poblaciones relativamente aisladas en las que encontramos los cuatro alelos privados sugiere que, en efecto, nuestra medida de nivel de aislamiento sí refleja una cierta limitación en el contacto genético que mantienen con otras poblaciones.

Otra medida frecuentemente utilizada para analizar la variación genética al interior de las poblaciones es la heterocigosidad. En este trabajo, tanto la heterocigosidad promedio observada como la esperada fueron altas. Por ejemplo, cuando se incorporó en el análisis al conjunto de todos los individuos muestreados,  $H_o$  prom fue de 0.668, mientras que  $H_e$  prom fue de 0.736. Sin embargo, en el trabajo de García-Morales (2007) se encontraron niveles ligeramente mayores de heterocigosidad ( $H_o$  prom = 0.774,  $H_e$  prom = 0.788). La diferencia entre mis resultados y los de García-Morales (2007) consiste en que este último encontró una heterocigosidad muy alta para el microsatélite 4 (TillCT15,  $H_o=0.87$ ;  $H_e=0.69$ ), debido a que para este locus observó varios alelos privados en algunas de las poblaciones que estudió.

Para otras especies de bromelias, utilizando isoenzimas se encontraron heterocigosidades muy pequeñas. Por ejemplo para *T. achyrostachys* que presenta polinización cruzada se encontró una  $H_o = 0.127$  y una  $He = 0.210$  (González-Astorga et al., 2004), mientras que para la bromelia *Aechmea mexicana*, una especie que se autopoliniza, se encontró una  $H_o = 0.054$  y una  $He = 0.157$  (Izquierdo, 1995) (Tabla IV.1). En las revisiones de Loveless y Hamrick (1984) y de Hamrick y Godt (1989) se reporta que entre las especies vegetales que se

autopolinizan se presentan valores de  $H_e$  de entre 0.07 y 0.13, mientras que en especies con semillas anemócoras los valores de  $H_e$  fluctúan de 0.12 a 0.20. Estos datos corresponden a trabajos realizados con isoenzimas, por lo que es imposible compararlos con los obtenidos en *T. recurvata* con microsatélites. Pero Soltis et al. (1987), trabajando con 19 loci de isoenzimas en *T. recurvata*, efectivamente encontraron valores de  $H_o = 0.0$  y de  $H_e = 0.01$  (Tabla IV.1).

Un aspecto que vale la pena resaltar con respecto a nuestros resultados de  $H_o$  y  $H_e$  es la diferencia que se observó entre adultos y plántulas: se obtuvo una mayor heterocigosidad promedio entre los adultos ( $H_o = 0.736$ ) que entre las plántulas ( $H_o = 0.635$ ). Este resultado es un indicio de que podría existir una selección activa que favorece a los heterócigos, de tal manera que los heterócigos tienen una mayor probabilidad de llegar al estado adulto; consecuentemente entre los adultos habrá una mayor representación relativa de heterócigos (Jain y Allard, 1960; Clegg y Allard, 1973; Kahler et al., 1975; Hedrick, 1998). Otro aspecto notable en nuestros resultados fue el hecho de que, en general, la  $H_o$  difirió significativamente de la  $H_e$ , mostrando menores valores de heterocigosis observada que de heterocigosis esperada (es decir, se encontró un déficit de heterócigos). Sólo en muy pocos casos se observó lo contrario: en los locus 3 y 4 cuando se incluyó sólo a los adultos, se observó un ligero exceso de heterócigos (Tabla III.2). Esto implica que la mayoría de las poblaciones de *T. recurvata* no están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto se podría explicar por la acción de alguna fuerza evolutiva, como la selección o el apareamiento no azaroso. El déficit de heterócigos podría deberse a una alta frecuencia de autopolinización (como lo sugiere Soltis et al. 1987), lo que efectivamente constituye una forma de apareamiento no aleatorio. Los valores de  $F_{IS}$  también sugieren que hay un déficit de heterócigos pues, en general, esta variable tuvo valores positivos. De nuevo, fue notable la diferencia entre adultos y plántulas: para los adultos, dos de los tres loci analizados presentaron un exceso de heterócigos (*i.e.*,  $F_{IS}$  negativas, Tabla II.14), mientras que para las plántulas, los tres loci mostraron un déficit de heterócigos (*i.e.*,  $F_{IS}$  positivas, Tabla III.15). Como habíamos discutido anteriormente, esta diferencia en los valores de  $F_{IS}$  en los diversos estadios del ciclo de vida de *T. recurvata*, sugiere que posiblemente haya selección favorable de los genotipos heterócigos durante los estadios tempranos, los cuales podrían estar sobreviviendo en mayor proporción para pasar a la fase adulta.

En un estudio con la avena silvestre (*Avena barbata*), Clegg y Allard (1973) encontraron que los valores de  $F$  van decreciendo desde el estado plántula al estado adulto en cada uno de

los tres loci de isoenzimas que utilizaron; esto indica que hay una mayor proporción de heterócigos en el estado adulto que entre las plántulas, lo que los autores atribuyen a una ventaja de los heterócigos: la capacidad de supervivencia de los heterócigos desde el estado de plántula hasta el estado adulto es mayor que la de los homócigos. En el mismo sentido, Jain y Allard (1960) analizaron los cambios en las frecuencias genóticas por varias generaciones en una población de cebada, cuyo sistema de apareamiento es predominantemente por autopolinización. Estos autores observaron que la proporción de heterócigos no decreció a la tasa esperada bajo los niveles observados de autocruza. Este resultado se atribuye precisamente a una ventaja de los heterócigos que, de acuerdo con los autores, ha evolucionado en especies autóгамas, pues resulta un mecanismo eficiente que mantiene la variabilidad genética en ausencia de entrecruza. Así, cuando hay una ventaja de los heterócigos, se podría observar un efecto equivalente al de un incremento en la tasa de entrecruza, manteniendo de esta manera cierto nivel heterocigosidad en las poblaciones.

En un estudio con la palma *Astrocaryum mexicanum* utilizando isoenzimas, Eguiarte et al. (1992) encontraron un exceso de heterócigos tanto en individuos adultos ( $F$  prom = - 0.41) como en semillas ( $F$  prom = - 0.19), siendo este exceso significativamente más alto en los adultos que en las semillas. Esto indica que es probable un incremento en la supervivencia de los individuos heterócigos desde el estadio de semillas hasta el estadio de adulto reproductivo, por lo que se sugiere una fuerte selección a favor de los heterócigos.

En otro trabajo pero con *Cecropia obtusifolia*, una especie de árbol tropical pionero y dióico, Alvarez-Buylla et al. (1996) encontraron mediante el uso de isoenzimas, que hay un cambio en la estructura genética a través de los diferentes estadios del ciclo de vida de esta especie, observando un decremento en los valores de  $F_{IS}$  desde el estadio de plántula hasta el adulto (desde  $F_{IS} = 0.029$  en las plántulas, hasta  $F_{IS} = -0.083$  en los adultos). Los autores comentan que el incremento en la proporción de heterócigos a través del ciclo de vida de esta especie podría deberse a la selección en favor de genotipos heterócigos particulares o a la selección en contra de individuos homócigos.

En los trabajos anteriores se encontraron valores de  $F_{IS}$  que decrecen desde el estado plántula hasta el estado adulto, a partir de lo cual los autores proponen una ventaja de los heterócigos. En el presente trabajo con *T. recurvata* no se presentó un exceso de heterócigos en las plántulas, pero sí se observó una tendencia hacia un exceso de heterócigos en los adultos, por

lo que es posible pensar que existe cierto nivel de selección a favor de los heterocigos entre estas dos fases del ciclo de vida, probablemente por una sobrevivencia diferencial. Por otro lado, esta presión de selección podría variar espacio-temporalmente, favoreciendo a ciertos genotipos en algunos años y bajo ciertas condiciones ambientales.

#### ***IV.2 Variación genética inter-poblacional***

Las variables que se utilizaron en este trabajo que hacen referencia a la variación genética entre poblaciones fueron los estadísticos  $F$  de Wright, así como la  $Nm$  a partir del método de alelos privados, la  $M$ , y el AMOVA a partir de la  $R_{ST}$ .

Con respecto a la  $F_{IS}$  se observa, en general, un déficit de heterocigos de los individuos con respecto a las subpoblaciones (promedio de la  $F_{IS} = 0.12$ ), para el análisis que incluyó a todos los individuos muestreados. Aunque al subdividir las poblaciones en estadios, sólo se encontró un exceso de homocigos en las plántulas,  $F_{IS} = 0.16$ , mientras en los adultos un exceso de heterocigos,  $F_{IS} = -0.02$ , pero no significativo. Los valores de  $F_{IT}$ , que fueron positivos en todas las poblaciones y para todos los loci (tanto cuando se incluyeron a todos los individuos, como cuando se dividió entre adultos y plántulas), indican también un déficit de heterocigos, pero en este caso entre los individuos con respecto a todo el conjunto de las poblaciones (*i.e.* a nivel de la especie en la región esta estudio). Lo anterior seguramente está determinado por el sistema de cruce que presenta la especie (autogamia), que lleva a altos niveles de endogamia, tanto al interior de las poblaciones como a nivel de la especie.

Sin embargo, es muy probable que las poblaciones de *T. recurvata* también presenten cierto nivel de polinización cruzada, pues la tasa de entrecruzamiento ( $t = 1-f / 1+f$ , que varía entre 0 y 1; Hedrick 2000) presentó valores intermedios (para las plántulas,  $t = 0.72$ ). De hecho, como los valores de  $F_{IT}$  fueron mayores que los de  $F_{IS}$ , se puede concluir que la endogamia es más drástica a nivel de toda la región, y no tanto al interior de cada una de las poblaciones. Sin embargo, como se mencionó antes, la probable selección favorable hacia los heterocigos que se refleja en un exceso de heterocigos entre los adultos, contrarrestaría de alguna manera los efectos de la endogamia, restableciendo así cierto nivel de heterocigosidad (Jain y Allard, 1960).

García-Morales (2007), quien trabajo con microsatélites en *T. recurvata*, también reporta valores negativos de  $F_{IS}$  y positivos de  $F_{IT}$ . El autor sugiere, por lo tanto, que la autocruza no tiene un efecto tan importante sobre la pérdida de variabilidad a nivel de las poblaciones locales, aunque sí a nivel de especie. Nótese, sin embargo, que García-Morales (2007) analizó solamente

individuos adultos, por lo que la tendencia que encontró hacia un exceso de heterócigos en ese estadio del ciclo de vida puede tener que ver con el fenómeno de selección que ya se discutió con anterioridad.

Con respecto a los valores de  $F_{ST}$  que encontramos en este trabajo, puede concluirse que la diferenciación genética entre poblaciones es más bien baja ( $F_{ST} \approx 0.09$ ), tanto cuando se analizaron todos los individuos en conjunto, como para las plántulas. Esto podría sugerir que la dispersión de semillas entre las poblaciones de *T. recurvata* es bastante extensiva, llevando a una homogenización de las mismas. El hecho de que entre las plántulas (*i.e.* que provienen más directamente de la dispersión reciente de semillas) encontremos valores más bajos de  $F_{ST}$  (*i.e.* de 0.09) que entre los adultos ( $F_{ST} = 0.13$ ) muestra, de acuerdo con Balloux y Moulin (2002), que la estructuración poblacional es diferente dependiendo de si se muestrea antes o después de que ocurra la dispersión de semillas. Así, en *T. recurvata* existe un nivel de estructuración mayor entre los adultos, *i.e.* antes de que ocurra la dispersión de semillas.

En el estudio previo realizado con *T. recurvata*, se encontró una  $F_{ST} = 0.08$  (García-Morales, 2007). Los valores ligeramente mayores que se encontraron en el presente estudio probablemente están relacionados con el hecho de que la distancia geográfica entre las poblaciones fue mayor (máxima de 18 km; en el estudio de García-Morales la distancia máxima fue de 13 km). Sin embargo, es posible que otros factores estén involucrados (como por ejemplo, el tamaño de muestra, que fue menor en el presente estudio, si se toma en cuenta sólo a los adultos), pues la distancia geográfica no mostró una correlación con la distancia genética, ni en el presente estudio (Fig. 3.4), ni en el de García-Morales (2007).

Comparando nuestros resultados de  $F_{ST}$  con los obtenidos en otros trabajos con especies epífitas y bromelias, encontramos que en la mayoría de ellos presentan valores de  $F_{ST}$  altos (con isoenzimas). Esto se puede explicar por los sistemas reproductivos y la intensidad del flujo génico entre las poblaciones de estas especies (Tabla.IV. 2).

Así para algunas especies de bromelias que se autopolinizan o tienen propagación vegetativa como *Aechmea magdalenae* presentó una alta  $F_{ST} = 0.356$  (Murawski y Hamrick, 1990), mientras que en *A.mexicana* se encontró una diferenciación extremadamente alta, con una  $F_{ST} = 0.615$  (Izquierdo, 1995). Incluso Soltis et al. (1987) trabajando con *T. recurvata* documentó una de las  $F_{ST}$  más altas ( $F_{ST} = 0.906$ ) encontradas para las especies de bromelias (Tabla.IV. 2).



Para el caso de las especies que presentan fertilización cruzada, la diferenciación genética entre poblaciones es menor que en las especies que presentan autogamia. Tal es el caso de los helechos epífitos del género *Pleopeltis*, que presentan una  $G_{ST} = 0.048$  (Hooper y Haufler, 1997), debido a que existe un elevado flujo génico entre sus poblaciones ( $Nm = 3.9$  a  $7.6$ ). Para la orquídea *Tolumnia variegata*, que presenta polinización cruzada, también se encontró una diferenciación genética baja, con una  $F_{ST} = 0.11$  (Ackerman y Ward, 1999) (Tabla.IV. 2). También en *Tillandsia ionantha*, que presenta polinización cruzada y sus semillas son dispersadas por viento, se encontró una diferenciación baja ( $F_{ST} = 0.043$ ; Soltis et al., 1987).

Los valores promedio de  $F_{ST}$  que se obtuvieron en este trabajo sugieren que el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de *T. recurvata* es de bajo a moderado. La homogeneidad genética entre las poblaciones seguramente se debe a que los niveles de flujo génico vía dispersión de semillas son elevados. Por otro lado, el flujo génico vía dispersión de polen podría tener algún efecto importante dada la tasa de entrecruza antes referida que se encontró en esta especie ( $t = 0.72$ ) y que sugiere que se presentan eventos frecuentes de polinización cruzada.

**Tabla IV.2.** Valores de diferenciación genética y flujo génico encontrados en diferentes especies de epífitas y bromelias

Taxón *	Háb	Sist rep	Disp sem	Mar	F <sub>IS</sub>	F <sub>ST</sub> / G <sub>ST</sub>	Nm	
<i>Pleopeltis</i> (helechos)	1	E	Fc		Iso	Cerca de cero	0.048	3.9 a 7.6
<i>Tillandsia recurvata</i>	2	E	Au	Anem	Iso	1.0	0.906	
<i>Tillandsia ionantha</i>	2	E	Pc	Anem	Iso	0.056	0.043	
<i>Tillandsia achyrostachys</i>	3	E	Pc / Clonal	Anem	Iso	0.433	0.391	0.46
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	4	S	Pc / Clonal	Anem	Iso	-0.003	0.322	0.23
<i>Aechmea magdalenae</i>	5	T	Au / Clonal	Zooc	Iso	0.179	0.356	0.43
<i>Aechmea Mexicana</i>	6	T	Au	-	Iso	0.643	0.615	0.18
<i>Aechmea tuitensis</i>	7	S	Sexual / clonal	-	Iso	0.631	0.196	0.810
<i>Tolumnia variegata</i>	8	E	Pc	-	Iso	-	0.11	1.34
<i>Lobaria pulmonaria</i>	9	E	Sexual/ Aseual	propagulo	Micr	-	-	0.42 a 2.28
<i>Tillandsia recurvata</i>	10	E	Au / Pc	Anem	Micr	-0.072	0.08	4.77
<i>Tillandsia recurvata</i>	11	E	Au / Pc	Anem	Micr	0.117	0.095	2.75

E: epífita, T: terrestre, S: saxicola. Fc: fertilización cruzada, Pc: polinización cruzada, Au: autopolinización. Clonal: propagación clonal, Anem: anemocoria, Zooc: zoocoria. Iso: isoenzimas, Micr: microsatélites. Na: número de alelos por locus, Ne: número de alelos efectivos. H<sub>o</sub>: heterocigosis observada, H<sub>e</sub>: heterocigosis esperada. Nm: número de migrantes por generación.

\* Referencias:

- 1 Hooper y Haufler (1997)
- 2 Soltis et al. (1987)
- 3 González-Astorga et al. (2004)
- 4 Sarthou et al. (2001)
- 5 Murawski y Hamrick (1990)
- 6 Izquierdo (1995)
- 7 Izquierdo y Piñero (2000)
- 8 Ackerman y Ward (1999)
- 9 Walser et al. (2005)
- 10 García-Morales (2007)
- 11 Este trabajo.

En otros estudios con metapoblaciones de especies vegetales se han encontrado diversos valores de  $F_{ST}$  de los que encontramos en *T. recurvata*. Por ejemplo, en una metapoblación de *Silene tatarica*, una planta perenne que crece a las orillas de los ríos de Finlandia, se encontraron valores de  $F_{ST}$  que oscilan desde 0.29 a 0.43, indicando un elevado nivel de diferenciación entre poblaciones locales, que los autores explican con base en los reducidos eventos de dispersión a larga distancia (Tero et al., 1996). En contraste, en una metapoblación de la planta perenne *Silene dioica*, cuyas poblaciones locales que se distribuyen en un archipiélago en el norte de Suecia, se observaron valores de  $F_{ST}$  de 0.06 para las poblaciones más jóvenes, y de 0.03 entre las poblaciones más viejas (Giles y Goudet, 1997). Los autores explican la mayor diferenciación de las poblaciones jóvenes, en comparación con la que se da entre poblaciones viejas por el hecho de que en las primeras se hace patente, en alguna medida, el efecto de fundador, mientras que entre las viejas ya ha habido flujo génico que ha ido homogenizando a las poblaciones. Por último, en la metapoblación de *Silene alba* se encontraron valores de  $F_{ST}$  intermedios, pero también mayores para las poblaciones jóvenes (0.20) que para las más antiguas (0.13), ofreciendo la misma explicación que para *S. dioica* (Mc Cauley et al., 1995).

Para las poblaciones de *T. recurvata* estudiadas no se conocía la edad desde la colonización, aunque en estudios posteriores podría estimarse con base, por ejemplo, en el tamaño del árbol (*i.e.*, se esperaría que los árboles más grandes han estado colonizados por más tiempo, Bernal et al., 2006). Sin embargo, sí se observaron ligeras diferencias en la  $F_{ST}$  entre las plántulas y los adultos, como se mencionó anteriormente. La diferenciación genética entre las poblaciones de *T. recurvata* a distintas escalas espaciales se estudió a partir del AMOVA que se llevó a cabo con base en la  $R_{ST}$ . Contrario a lo esperado, el porcentaje de variación entre grupos (*i.e.*, entre el grupo del norte, el central y el del sur) fue bajo, sugiriendo una ausencia de estructura genética en este nivel jerárquico. El porcentaje de variación que se presentó entre las poblaciones (dentro de los grupos) fue del 19%, mientras que el mayor porcentaje de variación se encontró entre los individuos, dentro de las poblaciones (85.74%). Esto implica que las poblaciones están compuestas por una mezcla de genotipos diferentes, probablemente de diversos orígenes. La fuerza evolutiva que puede explicar este patrón es, de nuevo, un elevado flujo génico a través de una dispersión muy intensa de semillas entre poblaciones.

Si el flujo génico fuera limitado, se esperaría que una parte importante de la variación se presentara entre los grupos (*e.g.*, el del norte con respecto al del centro, o el del norte con respecto al del sur, etc.), pues son las unidades que muestran una mayor distancia geográfica entre ellas. Esto mostraría la existencia de una cierta estructuración espacial. Sin embargo, los resultados sugieren que ésta no se presenta, cuando menos a esta escala, lo cual se asemeja a lo reportado para otras metapoblaciones de plantas (Tero et al., 2003) o para otras epífitas (Walser et al., 2005), en las que el mayor porcentaje de variación se presenta al interior de las poblaciones, y no entre grupos. El trabajo de García-Morales (2007) también obtuvo el mismo resultado con *T. recurvata*, aunque este autor trabajó con un intervalo muy diferente de distancias geográficas. Aunque la estructuración puede ocurrir a diferentes escalas, y con base en la biología de las especies se pueden encontrar diferentes patrones, los autores de estos trabajos sugieren que la escala a la que cada investigador define a las poblaciones locales, así como el tipo de reproducción y el modo de dispersión que presentan las diferentes especies, son algunos de los principales determinantes de la manera en la que se distribuye la variación genética entre los distintos niveles jerárquicos espaciales.

Confirmando el mismo patrón que se obtuvo con otros estimadores de diferenciación genética entre las poblaciones de *T. recurvata* estudiadas, los valores de  $Nm$ , de  $M$  y de las distancias genéticas de Nei ( $D$ ) obtenidos en este trabajo sugieren que la dispersión entre poblaciones es alta y, a la vez, sigue patrones complejos, pues aparentemente puede darse tanto a distancias cortas como largas. No existe un aislamiento por distancia, pues la distancia genética no se correlacionó con la distancia geográfica entre poblaciones. Así, los resultados obtenidos no permiten identificar un patrón claro en el flujo génico entre poblaciones.

La aparentemente elevada dispersión de semillas de *T. recurvata* que se presenta entre poblaciones distantes posiblemente se deba a las corrientes de aire locales, que pueden llegar a ser intensas en la época de dispersión de semillas (*i.e.*, febrero-marzo). En el área de estudio, los vientos corren generalmente de norte a sur, por lo que es probable que las semillas provenientes de poblaciones norteñas (por ejemplo, la población 6) sean dispersadas en dirección sur, alcanzando distancias de dispersión elevadas. Esto explicaría el hecho de que el número estimado de migrantes entre poblaciones tan lejanas como la 6 y la 8 (separadas por ca. 18 km) sea tan alto ( $M= 17.8$  migrantes por generación, Tabla III.18).

De acuerdo con Bernal (2006), no se ha determinado con precisión la distancia de dispersión que pueden alcanzar las semillas de *T. recurvata*. En un experimento en el que se intento medir dicha distancia, ella pudo cuantificar el destino de sólo 6% de las semillas liberadas; de este experimento concluyó que sólo el 1% de la semillas liberadas alcanza una distancia de aproximadamente 7 m; el resto de las semillas encontradas por Bernal (2006) permanecieron en el árbol de origen, lo cual, tomando en cuenta que la forma de las curvas de dispersión es generalmente leptocúrtica, la llevó a concluir que la dispersión de semillas es restringida. Nótese, sin embargo, que Bernal (2006) no encontró el 94% de las semillas liberadas en su experimento, las cuales probablemente alcanzaron distancias muy grandes. El hecho de que las curvas de dispersión generalmente sean leptocúrticas (Willson, 1993) no nos permite concluir que no haya eventos de dispersión a muy larga distancia, los cuales podrían explicar el patrón de baja diferenciación genética entre las poblaciones de *T. recurvata* estudiadas. Como lo sugiere Silvertown (1991), el alcance de “la cola” de la curva de dispersión es una de esas interrogantes que permanecen en nuestro conocimiento ecológico, y que podría explicar muchos fenómenos que ocurren más allá del nivel espacial de las poblaciones locales.

#### ***IV.3 Análisis de paternidad***

Como hemos visto en las secciones anteriores, la dispersión de semillas de *T. recurvata* parece ser muy intensa y variable. Sin embargo, los datos a partir de los cuales se llegó a esta conclusión (*i.e.*, la distancia genética de Nei, la  $F_{ST}$ , y los valores de  $Nm$  y de  $M$ ) fueron resultado de estimaciones de la dispersión por medio de métodos indirectos. Éstos han sido los más comúnmente utilizados por los genetistas, en vista de lo complicado que resulta realizar estimaciones directas de este proceso (Silvertown, 1991; Cain et al., 2000; Wang y Smith, 2002).

El análisis de paternidad por exclusión que se llevó a cabo en este trabajo tenía la intención precisamente de llevar a cabo una estimación directa de la inmigración en las poblaciones estudiadas de *T. recurvata*. Debido al tipo de muestreo realizado y al tipo de datos de los que disponíamos, no fue posible determinar la fuente de la que provienen los migrantes para verificar si las poblaciones locales de *T. recurvata* surgen a partir de un “pool” de migrantes, o de un “pool” de propágulos (*sensu* Whitlock y McCauley, 1990). Sin embargo, sí fue posible estimar el porcentaje, del número total de plántulas establecidas en cada población, que provenían de padres que no se encontraban en esa población local.

Algunos de los análisis de paternidad por exclusión se han realizado con encinos (Down y Ashley, 1996) y pinos (Schuster y Mitton, 2000) en los que se ha podido diferenciar el genotipo materno del paterno, para así estimar la magnitud y la distancia de dispersión tanto de semillas como de polen. Asimismo, al conocer el genotipo materno y el de la progenie, también es posible estimar la distancia promedio de la dispersión efectiva del polen, según la propuesta de Smouse et al. (2001), quienes plantean el modelo “Two-Gener”. Sin embargo, la forma de nuestro muestreo, por los objetivos que se perseguían, no permitió entrar en este nivel de detalle, además de que los algoritmos del modelo mencionado sólo pueden aplicarse a especies dióicas, o en general, a especies en las que es posible diferenciar los alelos de origen materno de los de origen paterno.

El análisis de paternidad por exclusión que realizamos, a pesar de que no estuvo basado en el uso de algoritmos y programas de cómputo elaborados, es sólido e inequívoco, pues se basa en las leyes mendelianas de la herencia, como lo mencionan Jones y Ardren (2003). En este caso, el bajo número de loci analizado ( $n=3$ ) y el limitado número de adultos y plántulas de cada población, permitió llevar a cabo este análisis de manera directa, al comparar los genotipos de padres y plántulas de de cada población.

Como era de esperarse, los porcentajes de plántulas inmigrantes que se obtuvieron fueron más altos cuando se tomó en cuenta el criterio de autopolinización, que cuando se utilizó el de polinización cruzada. Pero contrario a lo esperado, no se observó una relación significativa entre el porcentaje de inmigrantes y el nivel de aislamiento de las poblaciones, aunque la tendencia mostró que a un mayor nivel de aislamiento corresponden valores ligeramente menores de individuos inmigrantes. Sin embargo, la variabilidad de los datos fue enorme, pues hubo poblaciones con un nivel de aislamiento alto en las que el porcentaje de plántulas inmigrantes fue también sumamente elevado (por ejemplo, la población 6 A, en la que el 100% de las plántulas resultaron ser inmigrantes bajo el criterio de autopolinización). Por tal motivo y tomando en cuenta los puntos anteriores, podemos nuevamente concluir que la dispersión de semillas de *T. recurvata* entre poblaciones locales es sumamente intensa y variable.

Además del nivel de aislamiento, otros de los factores que podrían afectar la inmigración de semillas a una población local de *T. recurvata*, podrían ser la arquitectura, tamaño e identidad específica del forofito, la textura de la corteza, las corrientes de aire locales, la densidad de la vegetación de las zonas aledañas, así como la presencia de irregularidades en el terreno, tales

como cárcavas, barrancas o arroyos, los cuales podrían modificar el flujo del aire, como ocurre en otras plantas epífitas anemócoras (Benzing, 1978a, Benzing, 1981; García-Morales, 2007; Valdivia, 1977).

El alto porcentaje de migrantes que se evidenció en nuestros resultados es uno de los factores que explica la persistencia de la metapoblación de *T. recurvata* en la zona de estudio, pues la dispersión de semillas es la fuerza que cohesiona a las poblaciones locales en una metapoblación (Levins, 1969; Olivieri et al., 1995; Ims y Yoccoz, 1997) y permite el mantenimiento de las mismas, dando lugar a fenómenos de colonización capaces de contrarrestar los efectos de la extinción local, manteniendo un balance entre colonizaciones y extinciones.

Una pregunta que queda aún en el aire con respecto a nuestro sistema metapoblacional es la unidad espacial que podría ser útil para concebir a una población local. Desde el punto de vista ecológico, la unidad adecuada parece ser el árbol colonizado, pues es el hábitat colonizable que aparece (al nacer los árboles) y desaparece (cuando éstos mueren) a través del tiempo. Sin embargo, y confirmando la sugerencia de García-Morales (2007), la dispersión de semillas parece ser tan elevada, que un conjunto de árboles colonizados parecen estar funcionando como una unidad genética (aunque no como una unidad demográfica, Bernal, 2006). Probablemente el tipo de metapoblación de la que estamos hablando sería una “población a manera de parches” o poblaciones en mosaico (*i.e.*, *patchy population*, sensu Harrison, 1991). Sin embargo, aún en este caso, queda claro que el adquirir una visión metapoblacional en un sistema como este permite evaluar una serie de procesos ecológicos que definitivamente tienen un efecto sobre la dinámica de ocupación del espacio de *T. recurvata*, por encima del nivel poblacional.

Finalmente, sería deseable contar con mayor información sobre la biología reproductiva de *T. recurvata*, con el objeto de evaluar los niveles de autogamia y polinización cruzada que se presentan. Para esto, sería fundamental realizar experimentos controlados de polinización, lo cual definitivamente no será fácil, tomando en cuenta la morfología floral de esta especie. Además, es importante estimar la distancia de dispersión de polen para tener mejores datos sobre la biología reproductiva de esta especie y poder discernir la contribución de la dispersión de polen y de la dispersión de semillas al elevado flujo génico que se estimó entre las poblaciones locales.

#### ***IV.4 Conclusiones***

1. Los resultados de este trabajo muestran que *T. recurvata* a pesar de ser una especie mayoritariamente autógena, presenta un nivel de variación genética considerablemente alto en los loci de microsatélites analizados, mucho mayor que el reportado anteriormente mediante el uso de isoenzimas. De esta manera, podemos ver que el uso de marcadores moleculares altamente variables como son los microsatélites, es una herramienta con un nivel de resolución muy elevado, por lo que pueden ser utilizados para abordar el estudio de procesos ecológicos como la dispersión de semillas.
2. Las 9 poblaciones de *T. recurvata* estudiadas mostraron desviaciones con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto se observó tanto en las poblaciones completas como al separarlas en adultos y plántulas. Además, los índices de fijación indicaron una tendencia hacia un exceso de heterocigotos entre los adultos y un déficit en las plántulas. Esta diferencia en la heterocigosidad en los diversos estadios del ciclo de vida de *T. recurvata*, sugiere la existencia de una selección favorable de los genotipos heterocigotos durante los estadios tempranos teniendo así una mayor probabilidad de llegar a la fase adulta.
3. Se observó un bajo nivel de diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas de *T. recurvata*, lo que parece estar determinado, en gran medida, por una alta dispersión de semillas entre poblaciones. La intensa dispersión de semillas y la probable selección de heterocigotos son fuerzas que posiblemente contrarrestan el efecto de la autogamia, homogenizando a las poblaciones y manteniendo cierto nivel de variación genética. La diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas no se correlacionó con la distancia geográfica entre ellas.
4. La inmigración de semillas a las poblaciones locales es muy elevada (57% a 100%) y no parece estar limitada por el nivel de aislamiento de la población local (árbol colonizado), al menos en los intervalos de distancias estudiadas (2 a 31.8 m de aislamiento).
5. Al ser la dispersión de semillas tan intensa entre las poblaciones locales de *Tillandsia recurvata*, probablemente estaríamos hablando de una metapoblación tipo “poblaciones en mosaico” o “patchy population” (*sensu* Harrison, 1991) en la que un conjunto de poblaciones locales (árboles) parecen estar funcionando como una unidad genética, aunque no como una unidad demográfica,



## Bibliografía

- Ackerman, J. y Ward, S. 1999. Genetic variation in widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential?. *Systematic Botany* 24: 282-291.
- Aguirre-Planter, E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre, X. (Eds). *Ecología molecular*. Pp. 49-61.
- Balloux, F. y Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.
- Benzing, D.H. 1978a. Germination and early establishment of *Tillandsia circinnata* Schlecht. (Bromeliaceae) on some of its hosts and other supports in southern Florida. *Selbyana* 5: 95-106.
- Benzing, D.H. 1978b. The life history profile of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae) and the rarity of extreme epiphytism among the angiosperms. *Selbyana* 2: 325-337.
- Benzing, D.H. 1981. Bark surfaces and the origin and maintenance of diversity among angiosperm epiphytes: a hypothesis. *Selbyana* 5: 248-255.
- Benzing, D.H. 1989. The evolution of epiphytism. En: Vascular plants as epiphytes. Lüttge, U. (Ed) pp. 15-39. Springer-Verlag. Berlin.
- Benzing, D.H. 1990. Vascular epiphytes. General biology and related biota. Cambridge University Press. USA.
- Benzing, D.H. y A. Renfrow. 1971. The significance of photosynthetic efficiency to habitat preference and phylogeny among Tillandsioid Bromeliads. *Botanical Gazette* 132: 19-30.
- Benzing, D.H. y D.W.Ott. 1981. Vegetative reduction in epiphytic Bromeliaceae and Orchidaceae: its origin and significance. *Biotropica* 13: 131-140.
- Bernal, R. 2006. Estrudio matapoblacional de *Tillandsia recurvata* L. en el Valle de Tehuacan, Puebla. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 169 pp.
- Bernal, R., Valverde, T. y Hernández-Rosas, L. 2005. Habitat preference of the epiphyte *Tillandsia recurvata* (Bromeliaceae) in a semi-desert environment in Central México. *Canadian Journal of Botany* 83: 1238-1 274.
- Bohrer, G., Nathan, R., Volis, S. 2005. Effects of long-distance dispersal for metapopulation survival and genetic structure at ecological time and spatial scales. *Journal of Ecology* 93: 1029-1040.
- Boneh, L., Kuperus, P. y Van Tienderen, P.H. 2003. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. *Molecular Ecology Notes* 3: 302-303.
- Brown, J.H. y Kodric-Brown, A. 1977. Turnover rates in insular biogeography: effect of immigration on extinction. *Ecology* 58: 445-449.
- Brown, J.H. 1971. Mammals on mountaintops: none equilibrium insular biogeography. *The American Naturalist* 105: 467-478.

- Bullock, J.M. y Clarke, R.T. 2000. Long distance seed dispersal by wind: measuring and modeling the tail of curve. *Oecologia* 124: 506-521.
- Burke, T., Rainey, W.E. y White, T.J. 1992. Molecular variation and ecological problems. En: Berry, R.J., Crawford, T.J. y Hewitt, G.M. (Eds). *Genes in Ecology*. Blackwell Science. Pp. 229-254.
- Cain, M.L., Milligan, B.G. y Strand, A.E. 2000. Long distance dispersal in plant populations. *American Journal of Botany* 87: 1217-1227.
- Cain, A.J y Provine, W.B. 1992. Genes and ecology in history. En: Berry, R.J., Crawford, T.J. y Hewitt, G.M. (Eds). *Genes in Ecology*. Blackwell Science. Pp. 3-28.
- Carrillo, A., I. 2006. Distribución especial de clones de *Ferocactus robustus*: consecuencias sobre la reproducción sexual. Tesis de maestría. Instituto de Ecología. UNAM. México. 71pp.
- Clegg, M.T. y Allard, R.W. 1973. Viability versus fecundity selection in the slender wild oat, *Avena barbata* L. *Science* 181: 667-668.
- Crone, E.E., Doak, D. y Pokki, J. 2001. Ecological influences on the dynamics of a field vole metapopulation. *Ecology* 82: 831-843.
- Cruza, M. 1998. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology* 79: 400-412.
- Cruzan, B.M. 2001. Population size and fragmentation thresholds for maintenance of genotypic diversity in the herbaceous *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution* 55: 1569-1580.
- Dávila, A.P., Villaseñor, R.J.L., Medina, R., Ramírez, R., Salinas, A., Sánchez-Ken, J., y Tenorio, P. 1993. Listados florísticos de México X. Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlán. Instituto de Biología, UNAM. México.
- Dieckmann, U., O' Hara, O. y Weisser, W. 1999. The evolutionary of dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 88-90.
- Dow, B. y Ashley, M. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5: 615-627.
- Excoffier, L., Laval, G. y Scheneider, S. 2005. Arlequin V. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*: 1: 47-50.
- Fuentes, M.A. y Kuperman, M.N. 1999. Cellular automata and epidemiological models with spatial dependence.
- Galeuchet, D.J., Perret, C. y Fischer, M. 2005. Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculi* L., in a fragmented landscape. *Molecular Ecology* 14: 991-1000.
- García-Morales, E. 2003. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. Tomo 68: 128.

- García-Morales, E. 2007. El uso de microsatélites en el análisis de la estructura genética de una metapoblación de *Tillandsia recurvata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 80 pp.
- García-Suárez, M., V. Rico-Gray, y H. Serrano. 2003. Distribution and abundance of *Tillandsia* ssp. (Bromeliaceae) in the Zapotitlán Valley, Puebla, México. *Plant Ecology* 166: 207-215.
- Giles, B.E. y Goudet, J. 1997. A case study of genetic structure in a plant metapopulation. En: Hanski, I y Gilpin, M (Eds). *Metapopulation Biology: ecology, genetics and evolution*. Academic Press. pp 429-454.
- Gilmartin, A.J. y G. K. Brown. 1986. Cladistic test of hypotheses concerning evolution of xerophytes and mesophytes within *Tillandsia* Subg. *Phytarrhiza* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 73: 387-397.
- Gilpin, M.E. y Diamond, J.M. 1976. Calculation of immigration and extinction curves from the species-area-distance relation. *Proceedings of the National Academic Sciences USA* 73: 4130-4134.
- Golubov, J. y Ortega, J. 2007. Los análisis de paternidad, ¿para qué nos sirven?. En: Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre, X. (Eds). *Ecología molecular*. Pp. 163-181.
- Gómez-Pompa, A. 1971. Posible papel de la vegetación secundaria en la evolución de la flora tropical. *Biotropica* 3: 125-135.
- González-Astroga, J., Cruz-Angón, A., Flores-Palacios, A. y Vovides, A.P. 2004. Diversity and genetic structure of the mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 94: 545-551.
- Haig, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- Hamrick, J.L. y Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. En: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. y Weir, B.S. (Eds.) *Plant population genetics, breeding and germoplasm resources*. Sunderland, MA: Sinauer. Pp. 43-63.
- Hamrick, J.L., Linhart, Y., y Mitton, J. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annu. Rev.Ecol.Syst.* 10: 173-200.
- Hanski, I. 1991. Single-species metapopulation dynamics: concepts, models and observations. *Biological Journal of the Linnean Society* 42: 17-38.
- Hanski, I. 1998. Metapopulation dynamics. *Nature* 396: 41-49.
- Hanski, I. 1999. *Metapopulation ecology*. Oxford , University Press. USA.
- Hanski, I. y Simberloff, D. 1997. The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. En: “Metapopulation biology. Ecology, genetics and evolution”. San Diego California. Academic Press. 551 pp.

- Hanski, I., Kuussaari, M. y Nieminen, M. 1994. Metapopulation structure and migration in the butterfly *Melitea cinxia*. *Ecology* 75: 747-762.
- Harrison, S. 1991. Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biological Journal of the Linnean Society* 42: 73-88.
- Hartl, D. L. y Clarck, A.G. 1997. Principles of genetics. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. 542 pp.
- Hedrick, P.W. 1998. Maintenance of genetic polymorphism: Spatial selection and self-fertilization. *The American Naturalist*. 152: 145-150.
- Hedrick, P.W. 2000. Genetics of population. Sudbury, Massachusetts, Jones and Bertlet Publishers. 553 pp.
- Hernández-Rosas, L. 2003. Patrón de germinación y establecimiento de plántulas de *Tillandsia recurvata*: una contribución al estudio de su dinámica metapoblacional. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 71pp.
- Higgins, S. y Richardson, D. 1999. Predicting plant migration rates in a changing world: the role of long-distance dispersal. *The American Naturalist* 153: 464-475.
- Horvitz, C.C. y Schemske, D.W. 1986. Seed dispersal and environmental heterogeneity in a Neotropical herb: a model of population and patch dynamics. En: Estrada, A. y Fleming, T.H. (Eds). Frugivores and seed dispersal. Junk. Dodrecht. Pp: 169-186.
- Hooper, E. y Haufler, C. 1997. Genetic Diversity and breeding system in a Group of neotropical epiphytic ferns (*Pleopeltis*; Polypodiaceae). *American Journal of Botany* 84: 1664-1674.
- Hughes, C. 1998 Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology* 79: 383-399.
- Husband, B.C. y Barrett, S.C. 1996. A metapopulation perspective in plant population biology. *Journal of Ecology* 84: 461-469.
- Ims, R.A. y Yacoz, N.C. 1997. Studyng in metapopulations emigration: emigration, migration and colonisation. En : Hanski, I. y Gilpin, M (Eds). Metapopulation biology: ecology, genetics and evolution. Academic Press. Pp. 247-265.
- Ishihama, F. Veno, S., Tsumura, Y., y Washitani, I. 2005. Gene flow and inbreeding depresión inferred from fine- scale genetic structure in an endangered heterostylous perennial, *Primula sieboldii*. *Molecular Ecology* 14: 983-990.
- Izquierdo, L.Y. 1995. Estructura y variación genética en cuatro especies de *Aechmea* (Bromeliaceae) en México: *A. mexicana* (Baker). *A. lueddemanniana* (K.Koch) Grong. Ex Mez in Engl., Pflanzenr. *A. macvaughii* L. Bl Smith y *A. tuitensis* (P. Mgaña y E. Lott.). Tesis de doctorado. Centro de Ecología. UNAM.

- Izquierdo, L.Y. y Piñero, D. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Beomeliaceae). *Aust. J. Bot.* 48: 645-650.
- Jain, S.K. y Allard, R.W. 1960. Population studies in predominantly self-pollinated species, I. Evidence for heterozygote advantage in a closed population of barley. *Genetics* 46: 1371-1377.
- Jarne, P. y Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- Jiménez-Lobato, V. y Valverde, T. 2006. Population dynamics of the shrub *Acacia bilimeki* in a semi-desert region in Central México. *Journal of Arid Environments* 65: 29-45.
- Jones, A. y Ardren, W. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12: 2511-2533.
- Kahler, A.L., Clegg, M.T., Allard, R.W. 1975. Evolutionary changes in the mating system of an experimental population of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proceedings of the National Academic Sciences USA* 72: 943-946.
- Kimura, M. y Weiss, G. H. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561-576.
- Krebs, C. 1995. Ecología: estudio de la distribución y la abundancia. Ed. Harla México. D.F. 753 pp.
- Kress, W.J. 1989. The systematic distribution of vascular epiphytes: En Vascular plants as epiphytes. Lüttge, U (Ed). Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. Pp 234-261.
- Latta, R.G. y Mitton, J.B. 1997. A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in Lamber Pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* 146: 1153-1163.
- Levins, R. 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America* 15: 237-240.
- Levins, R. 1970. Extinction. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 2: 75-106.
- Loveless, M.D. y Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann Rev Syst* 15: 65-95.
- Lüttge, U. 1989. Vascular epiphytes: Setting the scene. En Lüttge, U (Ed) Vascular plants as epiphytes. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. Pp 1-14.
- Madison, M. 1977. Vascular epiphytes: Their systematic occurrence and salient features. *Selbyana* 2: 1-13.
- McCauley, D.E., Raveill, J., Antonovics, J. 1995. Local founding events as determinants of genetic structure in a plant metapopulation. *Heredity* 75: 630-636.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: Windows program for analysis of allozyme and molecular population genetic data.

- Muir, G. y Schlötterer, C. 2005. Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology* 14: 549-561.
- Murawski, D. y Hamrick, J.L. 1990. Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. *American Journal of Botany* 77: 1201-1208.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press. 512 pp.
- Olivieri, I., Michalakis, Y. y Gouyon, P.H. 1995. Metapopulation genetics and the evolution of dispersal. *The American Naturalist* 146: 221-228.
- Otero-Arnaiz, A., Casas, A., Hamrick, J. y Cruse-Sanders, J. 2005. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Molecular Ecology* 14: 1603-1611.
- Ouborg, N.J., Piquot, Y. y Van Groenendael, M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87: 551-568.
- Parker, P., Snow, A., Schug, M., Booton, G. y Fuerst, P. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Perry, J.N. y González-Andujar, J.L. 1993. Dispersal in a metapopulation neighbourhood model of an annual plant with a seedbank. *Journal of Ecology* 81: 453-463.
- Ramírez-Krauss, I. 2006. Consecuencias del sistema de cruce sobre la variación genética en *Datura lanosa*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología, UNAM. 46 pp.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP V. 1.2: population genetics software for tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Ritland, C. y Ritland, K. 2000. DNA – fragment markers in plants. En: Baker, A. (Ed). *Molecular methods in ecology*. Pp. 208-234.
- Rzedowski, G.C y Rzedowski, J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México Pátzcuaro, Michoacán, CONABIO. 1406pp.
- Sarthou, C., Boisselier-Dubayle, M.C., Lambourdiere, J. y Samadi, S. 2003. Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes* 3: 221-223.
- Sarthou, C., Samadi, S. y Boisselier-Dubayle. 2001. Genetic structure of saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany* 88: 861-868.

- Schuster, W. y Mitton, J. 2000. Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Heredity* 84: 348-361.
- Scribner, K. y Pearce, J. 2000. Microsatellites: Evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. En: Baker, A (Ed). *Molecular Methods in Ecology*. pp. 235-273.
- Selkoe, K. y Toonen, R. 2006. Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Silvertown, J. 1991. Dorothy's dilemma and the unification of plant population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 346-348.
- Sjögren, G. 1991. Distribution and extinction patterns within a northern metapopulation of the pool frog, *Rana lessonae*. *Ecology* 75: 1357-1367.
- Slatkin, M. 1977. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical population biology* 12: 253-262.
- Slatkin, M. 1985a. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393-430.
- Slatkin, M. 1985b. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Smith, J.A.C. 1989. Epiphytic Bromeliads. En: Lüttge, U (Ed). *Vascular plants as epiphytes* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. Pp 109-138.
- Smouse, P., Dyer, R., Westfall, D. y Sork, V. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* 55: 260-271.
- Soltis, D.E., Gilmartin, A.M., Rieseberg, L. y Gardner, S. 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *Tillandsia recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 74: 531-537.
- Sork, V.L., Nason, J., Campbell, D.R. y Fernandez, J.F. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 219-224.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.
- Tero, N., Aspi, J., Siikamäki, P., Jakalaniemi, A. y Tuomi, J. 2003. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Molecular Ecology* 12: 2073-2085.
- Valdivia, Q.P. 1977. Estudio botánico y ecológico de la región del Río Uxpanapa, Veracruz. Las epífitas. *Biótica* 2: 55-81.

- Valiente-Banuet, A., Casa, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Del Coro, M., Villaseñor, J. L. y Ortega, J. 2000. La vegetación del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Botánica* 67: 24-74.
- Valverde, T. 1999. Las metapoblaciones en la naturaleza. ¿Realidad o fantasía? *Revista Ciencias* 56-73.
- Valverde, T. y Silvertown, J. 1997. A metapopulation model for *Primula vulgaris*, a temperate forest understorey herb. *Journal of Ecology* 85: 193-210.
- Walser, J. D., Holderegger, R., Gugerli, F., Hoebee, S.E. y Scheneidegger, C. 2005. Microsatellites reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. *Molecular Ecology* 14: 457-467.
- Wang, C.B. y Smith, T.B. 2002. Closing the seed dispersal loop. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 379-385.
- Weir, B.S. y Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Williams, B.L., Brown, J. y Paige, K. 2003. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Molecular Ecology* 12: 11-20.
- Willson, M.F. 1993. Dispersal mode, seed shadows, and colonization patterns. *Vegetatio* 107/108: 261-280.
- Witlock, M.C. y McCauley, D.E. 1990. Some population genetic consequences of colony formation and extinction: genetic correlations within founding groups. *Evolution* 44: 1717-1724.
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. 1940. Breeding structure of populations in relation to speciation. *The American Naturalist* 74: 232-248.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Young, A., Boyle, T. y Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 413-148.
- Zane, L., Bargelloni, L. y Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zotz, G. 1995. How Fast Does an Epiphyte Grow?. *Selbyana* 16: 150-154.



## Apéndice I.

### Protocolo (modificado) de extracción de ADN con Kit de extracción BIORAD

Las modificaciones que se realizaron del protocolo original consistieron en aumentar la cantidad de tejido vegetal de 0.01g a 0.03g hasta 0.05g (en el caso de los individuos adultos), mientras que para las plántulas el peso varió desde 0.001 a 0.013g. Además, el volumen de las soluciones utilizadas se duplicó únicamente para los individuos adultos.

#### *Lisis celular*

Se molió el tejido foliar de *T. recurvata*, en un mortero con nitrógeno líquido hasta quedar un polvo blanco. Éste se colocó en un tubo Ependorf de 1.5 ml al que se le adicionaron 600  $\mu$ l y 300 $\mu$ l (para individuos adultos y pequeños respectivamente) de solución de lisis, agitándolos para crear una mezcla homogénea e incubándolos a 65°C por 45 minutos en un termobloque.

#### *Tratamiento con RNAasa*

Los tubos se sacan del termobloque para adicionarles 6  $\mu$ l y 3  $\mu$ l (para adultos y pequeños respectivamente) de la solución de RNAasa (Rnase A Solution, mg/ml), los cuáles se mezclaron por inversión 25 veces y se incubaron nuevamente a 65°C por 45 minutos en el termobloque.

#### *Precipitación de proteínas*

Una vez que termina el tiempo de incubación con la RNAasa, los tubos se sacan del termobloque y se dejan enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se añaden 200  $\mu$ l y 100  $\mu$ l (para individuos adultos y pequeños respectivamente) de solución precipitadora de proteínas, los tubos se mezclan en el vórtex durante 20 segundos (hasta formar una espuma abundante) y se centrifuga a 14000 rpm durante 3 minutos. El precipitado debe formar un pelet compacto (desechos celulares). En caso de que no este compacto, volver a vortexear e incubar la muestra en hielo por 5 minutos y posteriormente centrifugar de nuevo.

#### *Precipitación de ADN*

Colocar el sobrenadante (que contiene el ADN) en un tubo limpio y agregar 600  $\mu$ l y 300  $\mu$ l (para individuos adultos y pequeños respectivamente) de isopropanol al 100%. Los tubos se mezclan por inversión (50 veces) y se centrifugan a 14000 rpm por un minuto. El sobrenadante se tira cuidando de no tirar el pelet (ADN) y se deja escurrir el tubo boca abajo sobre una toalla absorbente. Posteriormente, se agrega 600  $\mu$ l y 300  $\mu$ l (para individuos adultos y pequeños respectivamente) de etanol al 70 % y se mezcla el tubo por inversión varias veces para lavar el pelet de ADN. Centrifugar posteriormente a 14000 rpm por un minuto, desechar el sobrenadante con cuidado para no títar el pelet de ADN. Dejar secar el tubo boca arriba durante 15 minutos.

#### *Hidratación del ADN*

Finalmente se añaden 50  $\mu$ l de solución de hidratación, y dejar incubar a 65 °C por 15 minutos o toda la noche a temperatura ambiente.

**Apéndice II.**  
**Condiciones de amplificación de microsatélites para *Tillandsia recurvata*.**

Las reacciones de PCR se realizaron a través de una mezcla base (Master Stock - tabla 11.1) y a partir de ésta se preparó una mezcla por muestra (Master mix - tabla 11.2)

**Tabla A11.1** Master Stock. Se muestra las cantidades utilizadas por reacción y por 100 reacciones.

Reactivo	[Original]	[Final]	Cantidad(µl)	x 100
MgCl <sub>2</sub>	30mM	3.0 mM	1.2	120
Buffer	10X	1x	1.2	120
dNTP	2.5mM	0.2mM	1	100
dH <sub>2</sub> O			1	100
Total			4.4	

**Tabla A11.2** Master Mix. Preparada a partir de la master stock (MS), mostrándose las cantidades utilizadas por reacción.

Reactivo	[Original]	[Final]	Cantidad(µl)
MS			4.4
Primer F	10µM	1.0µM	1.2
Primer R	10µM	1.0µM	1.2
Taq	5u/µl	1u	0.2
DNA			1
dH <sub>2</sub> O			4.5
Total			12.5

**Tabla A11.3** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación tres loci de microsatélites de *T. recurvata*. El nombre de cada locus hace referencia a la especie (Till), al motivo que conforma el microsatélite y al número de veces que se repite ese motivo. F= cadena sentido “forward”, R= cadena antisentido “reverse”. T° = temperatura (°C) de alineamiento de los oligonucleótidos. Producto esperado = tamaño del producto esperado en pares de bases (pb).

Locus	Secuencia de los oligonucleótidos	T°	Motivo	Producto esperado
Primer 3 TillGA23	F: TGC-GTA-AAG-GGA-ATT-AGG-GTT-AG R: CAT-ATT-CTC-CCG-CCC-TTA-TC	59	GA23	165
Primer 4 TillCT15	F: TTC-GCC-TTC-CTC-ATT-CAA-GTA-T R: TAG-AGG-GGC-CGG-GGC-TTT-AC	60	CT15	144
Primer 23 TillGT22	F:GAA-GGA-GAC-CGG-TAT-AA R:GAA-TCA-AAG-GTT-TCG-TGA-TA	51	GT22	174

**Tabla A11.4** Ciclos empleados en el termociclador para todos los pares de oligonucleótidos.

<b>Número de pasos</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo</b>
1. denaturalización inicial	95	5 min
35 ciclos de:		
2. desnaturalización	92	45 seg
3. alineamiento	según el primer	45 seg
4. extensión	72	1:30 min
5. extensión final	72	10 min

### Apéndice III.

#### Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% y tinción con plata.

Primero se prepara 250 ml de stock de poliacrilamida 6% a partir de los siguientes reactivos:

- 37.5 ml de poliacrilamida de RAPID GEL 40%.
- 105 g de Urea
- 25 ml de TBE 10X pH 8.3

En un vaso de precipitado agregar 80 ml de H<sub>2</sub>O y la Urea. Disolver con un agitador. Calentar ligeramente para acelerar la disolución de la urea. Posteriormente, agregar el TBE 10X pH 8.3. Agregar la poliacrilamida y mezclar bien. Aforar a 250 ml y guardar en refrigeración (4°C).

#### *Preparación del gel de poliacrilamida*

Se deben usar dos vidrios, uno donde se va a pegar el gel (chico) y otro donde no se debe de pegar (grande). Ambos vidrios deben lavarse cuidadosamente con jabón, posteriormente con agua destilada y finalmente con alcohol con la finalidad de que no queden residuos sobre las superficies, secarlos con una toalla absorbente y colocarlos en posición horizontal sobre algún tipo de base.

En un tubo Ependorf de 2.5 ml agregar 1332 µl de Etanol al 96 o 100%, 332 µl de ácido acético al 10 % y 6 µl de Bind Silane. Dejar caer esta solución en una cara del vidrio donde se pegará el gel (vidrio chico) desde el extremo superior y posteriormente con una toalla absorbente extender homogéneamente la solución. Dejar secar entre 10 a 15 minutos.

Al vidrio grande (donde no se pega el gel) dejar caer unas gotas en la parte superior de Super Rain pinauto (tratamiento acondicionador para vidrios), extender con una toalla absorbente de manera homogénea y dejar secar de 10 a 15 minutos.

Una vez secos ambos vidrios, colocar los separadores de 0.4 mm en los extremos del vidrio chico y colocar el vidrio grande encima, de tal manera que las caras que fueron tratadas con las diferentes soluciones queden una frente a la otra sin tocarse. Sujetar ambos vidrios por los extremos con broches para que no se separen.

Por otro lado, se necesita polimerizar la poliacrilamida con Persulfato de Amonio (APS) al 10% y TEMED (BioRad), para ello se requiere que en otro recipiente (un envase con boquilla larga y angosta) agregar: 60 ml de Poliacrilamida al 6%, 180 µl de APS y 50 µl de TEMED, mezclar muy bien y verter la solución de poliacrilamida entre los dos vidrios de tal manera que se rellene completamente el espacio entre ellos y evitando que se formen burbujas. Colocar el peine pero en posición invertida para formar una superficie plana donde posteriormente se harán los pozos donde se colocarán las muestras de PCR. Sujetar el peine con los vidrios por medio de tres broches y dejar polimerizar de 30 a 35 minutos.

Una vez polimerizada la poliacrilamida, retirar el peine. Colocar el gel en una cámara de electroforesis vertical, llenar con buffer TBE 1X pH 8.3, limpiar los excesos de poliacrilamida y colocar el peine pero ahora con los dientes hacia abajo, insertándolos en la poliacrilamida (2–3 mm aprox.). El gel debe precorrer a 1300 Volts durante 15 minutos antes de cargar las muestras, para eliminar los excesos de urea. Posteriormente, con una pipeta, limpiar cada uno de los pozos (que contienen restos de gel) con el mismo buffer de la cámara.

Agregar a cada muestra 5 µl o medio volumen de buffer de carga (loading de dos frentes). Para preparar la escalera (10 pb) se necesita: 2 µl de escalera y 8µl loading. Tanto las muestras como la escalera se desnaturalizaron a 94 °C por 7 min.

Colocar en los extremos y al centro del gel (dependiendo del número de muestras a cargar) 3µl de escalera y entre ellas 6.8 µl de muestra por separado en cada pozo. Correr a 1300 Volts durante 3: 30 horas.

Al terminar el tiempo de corrida, sacar el gel de la cámara y con la ayuda de una espátula separar los vidrios. El gel debe quedar pegado en el vidrio chico, mientras que el vidrio grande debe permanecer limpio sin rastros de gel adheridos.

#### *Tinción con plata*

Nota: Siempre utilizar agua fría y destilada.

- Fijación: Colocar el vidrio con el gel en una charola y agregar 1L de ácido acético al 10 % frío y dejar agitando 35 minutos.
- Enjuague: Pasar el ácido acético a otro recipiente (se utilizará posteriormente). Agregar 1L de agua fría y dejar agitando 5 minutos.
- Impregnación con plata: Tirar el agua y agregar la solución de plata (1g de Nitrato de plata, 1L de H<sub>2</sub>O y 1500 µl de Formaldehído al 37%). Dejar de 20 a 23 minutos agitando.
- Enjuague: Retirar la solución de plata (ver indicaciones para su deshecho, pues es tóxica). Agregar agua fría, enjuagar rápidamente el gel (8 a 10 seg) y tirarla.
- Agregar la solución reveladora (30 g de Carbonato de Sodio, 1L de H<sub>2</sub>O, 1500 µl de Formaldehído al 37% y 1000 µl de Tiosulfato de Sodio. Agitar hasta ver bandas.
- Solución de paro: Una vez que se visualizan las bandas, tirar la solución reveladora y rápidamente agregar la solución de paro (ácido acético utilizado al inicio de la tinción), agitar por 10 minutos. Al finalizar, tirar el ácido acético y agregar un poco de agua por 5 minutos. Sacar el gel de la charola y dejarlo secar toda la noche.
- Leer las bandas.

## Apéndice IV

### Tablas de frecuencias alélicas observadas de los tres loci de microsatélites

**Tabla AIV.1** Frecuencias alélicas para cada población para el locus 3

Alelo	135	137	139	141	143	145	147	149	151	153	155	157	159	161
Población 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.132	0.279	0.059	0.059	0.162	0.279	0.000	0.000	0.000
Población 9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.032	0.064	0.085	0.043	0.074	0.255	0.298	0.106	0.021
Población 11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.232	0.518	0.071	0.054	0.000	0.036	0.054	0.036	0.000
Población 2	0.000	0.000	0.369	0.417	0.000	0.000	0.071	0.024	0.036	0.012	0.012	0.036	0.024	0.000
Población 8	0.000	0.000	0.013	0.000	0.013	0.013	0.038	0.205	0.167	0.038	0.141	0.269	0.103	0.000
Población 10	0.000	0.000	0.033	0.000	0.022	0.022	0.033	0.000	0.033	0.044	0.300	0.389	0.122	0.000
Población 4	0.019	0.047	0.047	0.009	0.009	0.142	0.047	0.113	0.142	0.142	0.113	0.085	0.066	0.019
Población 5	0.000	0.000	0.000	0.015	0.015	0.082	0.075	0.119	0.179	0.246	0.179	0.075	0.015	0.000
Población 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.200	0.100	0.150	0.050	0.125	0.175	0.125	0.050

**Tabla AIV.2** Frecuencias alélicas para cada población para el locus 4

Alelo	140	142	144	146	148	150	152	154
Población 1	0.000	0.029	0.265	0.368	0.338	0.000	0.000	0.000
Población 9	0.000	0.090	0.690	0.200	0.020	0.000	0.000	0.000
Población 11	0.000	0.000	0.221	0.632	0.147	0.000	0.000	0.000
Población 2	0.000	0.155	0.512	0.321	0.012	0.000	0.000	0.000
Población 8	0.000	0.026	0.167	0.269	0.397	0.141	0.000	0.000
Población 10	0.000	0.207	0.707	0.087	0.000	0.000	0.000	0.000
Población 4	0.047	0.094	0.462	0.311	0.085	0.000	0.000	0.000
Población 5	0.015	0.154	0.228	0.353	0.154	0.015	0.044	0.037
Población 6	0.000	0.050	0.325	0.350	0.225	0.050	0.000	0.000

**Tabla AIV.3** Frecuencias alélicas para cada población para el locus 23

Alelo	166	168	170	172	174	176	178	180	182	184	186	188	190
Población 1	0.000	0.000	0.000	0.015	0.221	0.176	0.044	0.029	0.176	0.118	0.132	0.029	0.059
Población 9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060	0.350	0.260	0.180	0.090	0.010	0.020	0.030
Población 11	0.000	0.017	0.017	0.050	0.083	0.133	0.267	0.267	0.050	0.000	0.033	0.000	0.083
Población 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.131	0.238	0.333	0.250	0.024	0.012	0.012	0.000	0.000
Población 8	0.000	0.000	0.013	0.013	0.026	0.115	0.333	0.090	0.256	0.077	0.064	0.013	0.000
Población 10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.054	0.076	0.098	0.163	0.326	0.217	0.000	0.054
Población 4	0.009	0.009	0.000	0.000	0.113	0.255	0.396	0.113	0.085	0.000	0.009	0.009	0.000
Población 5	0.007	0.075	0.067	0.015	0.007	0.060	0.231	0.366	0.164	0.007	0.000	0.000	0.000
Población 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.150	0.150	0.200	0.150	0.075	0.075	0.000	0.025	0.175

## Apéndice V

### Tablas de diversidad genética locus por locus para cada población separándolas por poblaciones locales completas, adultos y plántulas.

**Tabla AV.1** Resultados del locus 3 para cada una de las poblaciones completas (adultos y plántulas) de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	34	7	4.817	0	0.412*	0.792	0.492
9 B	50	10	5.381	0	0.702*	0.814	0.148
11 B	34	7	2.981	0	0.786*	0.665	-0.121
2 A	42	9	3.136	0	0.976*	0.681	-0.423
8 I	39	10	5.675	0	0.769*	0.824	0.079
10 I	46	9	3.810	0	0.733*	0.738	0.017
4 I	53	14	9.538	2	0.585*	0.895	0.355
5 A	68	10	6.345	0	0.866*	0.842	-0.020
6 A	20	9	7.143	0	0.850*	0.860	0.037

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg ( $P < 0.001$ )

**Tabla AV.2** Resultados del locus 4 para cada una de las poblaciones completas (adultos y plántulas) de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	34	4	3.120	0	0.676*	0.679	0.019
9 B	50	4	1.906	0	0.260*	0.475	0.461
11 B	34	3	2.127	0	0.676 <sup>ns</sup>	0.530	-0.220
2 A	42	4	2.568	0	0.952*	0.611	-0.552
8 I	39	5	3.587	0	0.769*	0.721	-0.054
10 I	46	3	1.820	0	0.587 <sup>ns</sup>	0.451	-0.293
4 I	53	5	3.040	0	0.434*	0.671	0.362
5 A	68	8	4.387	2	0.529*	0.772	0.321
6 A	20	5	3.524	0	0.600*	0.716	0.187

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg ( $P < 0.001$ )

ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg

**Tabla AV.3** Resultados del locus 23 para cada una de las poblaciones completas (adultos y plántulas) de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	34	10	6.682	0	0.529*	0.850	0.394
9 B	50	8	4.244	0	0.380*	0.764	0.510
11 B	34	10	5.538	0	0.800*	0.819	0.041
2 A	42	7	4.027	0	1.000*	0.752	-0.320
8 I	39	10	4.776	0	0.641*	0.791	0.202
10 I	46	8	4.961	0	0.630*	0.798	0.221
4 I	53	9	3.920	0	0.509*	0.745	0.325
5 A	68	10	4.382	0	0.657*	0.772	0.156
6 A	20	8	6.667	0	0.750*	0.850	0.143

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg ( $P < 0.001$ )

**Tabla AV.4** Resultados del locus 3 para cada una de las poblaciones, incluyendo sólo a los adultos de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $A_p$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$A_p$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	8	3	2.723	0	0.125 *	0.633	0.825
9 B	16	9	4.785	0	0.750 *	0.791	0.084
11 B	10	6	3.333	0	1.000*	0.700	-0.385
2 A	12	6	3.064	2	1.000*	0.674	-0.451
8 I	15	5	4.128	0	0.933*	0.758	-0.199
10 I	17	3	2.439	0	0.765 *	0.590	-0.268
4 I	17	9	7.506	2	0.882*	0.867	0.012
5 A	23	8	5.781	0	0.913*	0.867	-0.082
6 A	5	7	5.556	0	1.000 <sup>ns</sup>	0.820	-0.111

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg (P<0.001)

ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg

**Tabla AV.5** Resultados del locus 4 para cada una de las poblaciones, incluyendo sólo a los adultos de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $A_p$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$A_p$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	8	3	2.510	0	0.875 *	0.602	-0.400
9 B	16	3	1.547	0	0.438 <sup>ns</sup>	0.354	-0.207
11 B	10	2	1.835	0	0.700 <sup>ns</sup>	0.455	-0.500
2 A	12	2	2.000	0	1.000*	0.500	-1.000
8 I	15	5	3.814	0	0.933*	0.738	-0.233
10 I	17	3	1.841	0	0.588 <sup>ns</sup>	0.457	-0.260
4 I	17	5	4.281	0	0.765*	0.766	0.033
5 A	23	5	3.699	0	0.609*	0.730	0.187
6 A	5	4	3.333	0	0.200 *	0.700	0.765

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg (P<0.001)

ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg

**Tabla AV.6** Resultados del locus 23 para cada una de las poblaciones, incluyendo sólo a los adultos de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $A_p$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$A_p$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	8	6	4.129	0	0.750 <sup>ns</sup>	0.758	0.023
9 B	16	5	3.084	0	0.313*	0.676	0.560
11 B	10	6	3.226	0	0.800 <sup>ns</sup>	0.690	-0.108
2 A	12	5	3.000	0	1.000 *	0.667	-0.467
8 I	15	8	4.286	0	0.733*	0.767	0.078
10 I	17	7	5.026	0	0.471*	0.801	0.437
4 I	17	9	4.940	1	0.471*	0.798	0.435
5 A	23	6	3.550	0	0.870*	0.718	-0.189
6 A	5	5	4.545	0	1.000 <sup>ns</sup>	0.780	-0.176

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg (P<0.001)

ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg



**Tabla AV.7** Resultados del locus 3 para cada una de las poblaciones, incluyendo sólo a las plántulas de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	26	7	5.344	0	0.500*	0.813	0.401
9 B	34	10	5.384	0	0.677*	0.814	0.184
11 B	24	7	2.623	0	0.667 <sup>ns</sup>	0.619	-0.049
2 A	30	8	3.130	0	0.967*	0.681	-0.406
8 I	24	10	5.818	0	0.667*	0.828	0.215
10 I	29	9	4.585	0	0.714 *	0.782	0.104
4 I	36	13	8.498	2	0.444*	0.882	0.507
5 A	45	9	5.814	0	0.841*	0.828	-0.004
6 A	15	8	6.522	0	0.800*	0.847	0.089

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg (P<0.001)

ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg

**Tabla AV.8** Resultados del locus 4 para cada una de las poblaciones, incluyendo sólo a las plántulas de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	26	4	3.219	0	0.615 *	0.689	0.127
9 B	34	4	2.102	0	0.176*	0.524	0.672
11 B	24	3	2.032	0	0.667 <sup>ns</sup>	0.508	-0.231
2 A	30	4	2.655	0	0.933*	0.623	-0.484
8 I	24	4	2.837	0	0.667 *	0.648	-0.008
10 I	29	3	1.803	0	0.586 <sup>ns</sup>	0.445	-0.301
4 I	36	4	2.432	0	0.278*	0.589	0.538
5 A	45	7	4.530	2	0.489*	0.779	0.382
6 A	15	5	3.435	0	0.733 <sup>ns</sup>	0.709	0.000

\* Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg (P<0.001)

ns = no hay una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg

**Tabla AV.9** Resultados del locus 23 para cada una de las poblaciones, incluyendo sólo a las plántulas de *T. recurvata*.  $N$  = número de individuos analizados por loci,  $N_a$  = número de alelos presentes,  $N_e$  = número efectivo de alelos,  $Ap$  = alelos privados,  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $F_{IS}$  = índice de fijación.

Pob. y nivel de aislamiento	$N$	$N_a$	$N_e$	$Ap$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$
1 B	26	7	5.803	0	0.462*	0.828	0.458
9 B	34	8	4.578	0	0.412*	0.782	0.485
11 B	24	10	6.780	0	0.800*	0.853	0.087
2 A	30	7	4.186	0	1.000*	0.761	-0.299
8 I	24	6	3.301	0	0.583*	0.697	0.184
10 I	29	8	4.462	0	0.724*	0.776	0.084
4 I	36	5	2.935	0	0.528*	0.659	0.213
5 A	45	10	4.610	1	0.545*	0.783	0.314
6 A	15	7	5.488	0	0.667*	0.818	0.218

\*Desviación de las proporciones de Hady-Weinberg (P<0.001)

## Apéndice VI

### Ejemplo de los resultados del análisis de paternidad para la población 1.

En la parte superior de la tabla se presentan los genotipos de los potenciales padres, y en la parte inferior los genotipos de la progenie o plántulas. Los números en cursivas indican los genotipos de las plántulas que no comparten con los individuos adultos en los diferentes locus, por lo que se consideran individuos externos a la población, considerando tanto el criterio de autopolinización (AU) como de polinización cruzada (PC).

INDIV	AU	PC	Primer 3	Primer 4	Primer 23
<b>Adulto</b>					
<b>1</b>			147	145	144 144 182 176
<b>2</b>			147	147	148 146 176 172
<b>3</b>			147	147	148 146 188 188
<b>4</b>			147	147	148 146 182 182
<b>5</b>			155	155	148 146 176 174
<b>6</b>			155	155	148 146 182 180
<b>7</b>			155	155	148 146 182 180
<b>8</b>			145	145	148 146 182 176
<b>Plántula</b>					
<b>1</b>			147	147	144 144 176 174
<b>2</b>	*	*	<i>149</i>	<i>149</i>	<i>146 146 174 174</i>
<b>3</b>	*		<i>155</i>	<i>153</i>	<i>146 146 182 174</i>
<b>4</b>	*	*	<i>151</i>	<i>151</i>	144 144 <i>174 174</i>
<b>5</b>	*		147	145	144 144 <i>178 174</i>
<b>6</b>	*	*	<i>151</i>	<i>151</i>	<i>146 144 190 182</i>
<b>7</b>	*	*	<i>149</i>	<i>149</i>	148 146 <i>190 182</i>
<b>8</b>	*		147	145	144 144 <i>178 174</i>
<b>9</b>	*		<i>155</i>	<i>153</i>	148 146 <i>176 176</i>
<b>10</b>	*	*	<i>153</i>	<i>153</i>	148 146 <i>184 184</i>
<b>11</b>	*	*	<i>155</i>	<i>153</i>	148 148 <i>186 184</i>
<b>12</b>	*	*	<i>153</i>	<i>153</i>	148 146 <i>184 184</i>
<b>13</b>	*		155	155	148 148 <i>174 174</i>
<b>14</b>	*	*	155	155	148 146 <i>186 186</i>
<b>15</b>	*		155	155	148 148 <i>174 174</i>
<b>16</b>	*		147	145	<i>144 142 174 174</i>
<b>17</b>	*	*	147	145	<i>144 142 186 186</i>
<b>18</b>	*		147	147	<i>146 144 186 182</i>
<b>19</b>	*		147	145	<i>146 144 176 176</i>
<b>20</b>	*	*	<i>155</i>	<i>153</i>	148 146 <i>190 190</i>
<b>21</b>	*	*	<i>143</i>	<i>143</i>	<i>146 144 186 184</i>
<b>22</b>	*		155	153	148 146 <i>176 176</i>
<b>23</b>	*		155	153	148 146 <i>182 182</i>
<b>24</b>	*	*	155	153	148 146 <i>186 184</i>
<b>25</b>	*	*	147	145	144 144 <i>186 178</i>
<b>26</b>	*		147	147	148 146 <i>184 176</i>

Para el criterio de autopolinización, se encontró 96% de individuos externos.

Para el criterio de polinización cruzada, se encontró 50% de individuos externos.