



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

“FILOGEOGRAFÍA DE *Pseudoeurycea leprosa*  
(CAUDATA: PLETHODONTIDAE) EMPLEANDO  
ADN MITOCONDRIAL (CITOCROMO B)”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(SISTEMÁTICA)**

P R E S E N T A

BIOL. JUAN CARLOS WINDFIELD PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GABRIELA PARRA OLEA

MÉXICO D. F.

AGOSTO, 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMENTOS**

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.  
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca asignada con número de registro 189013. Al apoyo financiero y beca parcial del proyecto PAPIIT-UNAM IN211808 y SEP-CONACYT No. 50563 a cargo de la Dra. Gabriela Parra Olea.

### Comité Tutorial

Dra. Gabriela Parra Olea  
Dra. Gloria Vázquez Domínguez  
Dr. Gerardo Pérez Ponce de León.

## **AGRADECIMENTOS**

A la Dra. Gabriela Parra Olea por apoyarme de manera profesional y personal para descubrir el interesante mundo de las salamandras y confiarme algo tan valioso como sus publicaciones, tejidos y ejemplares que tienen un valor incalculable.

A la Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez por sus valiosas aportaciones al documento, al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León por sus comentarios y alentadores consejos. A los revisores externos: Dra. Blanca Estela Hernández Baños y Dr. Daniel Piñero Dalmau por su tiempo y sus sugerencias.

A la M. en C. Laura Márquez por su incondicional apoyo en el laboratorio de Biología Molecular.

A David Buckley e Iñigo Martínez por tener siempre tiempo disponible a mis preguntas sobre los análisis de datos, especialmente con los programas Beast y Mesquite. Al Dr. Gerardo Salazar y Lidia por estar siempre dispuestos a darme un consejo o prestarme un libro.

A mis amigos Ruth Percino (gracias Peyo fueron súper divertidos todos esos viajes y muy ameno el tiempo en el lab.), Edna González (Cabeza hinchada eres un ejemplo de éxito ante la adversidad), Noemí Percino (Noemicita, definitivamente gracias por compartir tu casa, platos gatos, y vecinos, etc., de todo ello sin duda tu amistad es lo más bonito), A Paty Frías por ser una excelente compañera de estudio y en campo y a Gabriel Barrios por su ayuda en el trabajo de campo.

Agradezco a China y a Hans (el maestrísimo de la cheve fresca y burbujeante) y que siempre están atentos a mis avances y a Edgar Arana cuya amistad es un honor y un placer.

En forma especial agradezco a Jesús Fernández Fernández por su generosa amistad y la maestra Carmen Corona por haberme formado durante mi estancia en el Dto. de Agrobiología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Sin duda, me orientaron adecuadamente para continuar en la Biología.

A Cintia Peña, Rodolfo Pérez, Mónica la de la Mac-Televisión, Martín Vilchis, Norberto Martínez por sus múltiples éxitos musicales de laboratorio como “la mesa que más extraiga” y “a ella le gusta la proteinaza”, y en su momento, al frente frepo que se volvió trasero. A Chino, Chiquín y compañía y demás gente del cubículo de estudiantes.

A todos ellos, muchas gracias.

Con amor para:

Patricia Salinas Nava  
Maricruz Windfield Salinas  
Ivan Windfield Salinas

Mis padres Elvira y Carlos

Mis suegros David Salinas y a Doña Luci

Por impulsarme siempre a salir adelante y valorar a la familia.

“Las salamandras son organismos sumamente interesantes,  
discretamente me indican como fue su evolución,  
para luego continuar en la humedad”

J.C.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	viii
<b>ABSTRACT</b>	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Diversidad de pletodóntidos en México	1
1.2 Declive de poblaciones y efecto de la fragmentación en pletodóntidos terrestres	3
1.3 Estudios filogeográficos de pletodóntidos terrestres	6
<b>2. ÁREA DE ESTUDIO.</b>	12
<b>3. ANTECEDENTES</b>	14
<b>4. OBJETIVOS</b>	16
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
5.1 Obtención de datos de colecciones	17
5.2 Trabajo de campo	17
5.3 Protocolos de laboratorio	20
5.4 Alineamiento de secuencias	21
5.5 Análisis de la información	21
5.5.1 Reconstrucción filogenética	22
5.5.2 Análisis de diversidad nucleotídica y estructura genética	23
5.5.3 Dinámica histórica de la población	27
5.5.4 Tiempo de divergencia	29
5.5.5 Evaluación de hipótesis de fragmentación genética	31
5.5.6 Tamaño efectivo de la población	33
<b>6. RESULTADOS</b>	33
6.1 Análisis filogenético	34
6.2 Análisis genético	40
6.3 Dinámica histórica de la población	42
6.3.1 Red de haplotipos	42
6.3.2 Distribución mismatch y pruebas de neutralidad	49
6.3.3 Estimaciones con coalescencia	51
6.4 Estimaciones del tiempo de divergencia	54
6.5 Evaluando hipótesis de fragmentación genética	55
6.6 Tamaño efectivo de la población	55
<b>7. DISCUSIÓN</b>	58
7.1 Aloenzimas y ADNmt	59
7.2 Variación genética y filogenia	60
7.3 Dinámica histórica de la población	63
7.4 Tiempo de divergencia	72
7.5 Biogeografía	75
7.6 Filogeografía de otras especies en la zona	81
7.7 Evaluando hipótesis de fragmentación genética	84
7.8 Unidades para la conservación	85
7.9 Declive de salamandras terrestres en ANP del centro de México	90
<b>8. CONCLUSIONES</b>	92
<b>9. LITERATURA CITADA</b>	95
<b>ANEXOS</b>	103

## FIGURAS

Figura 1. Delimitación de la Faja Volcánica Transmexicana. Se muestran los tres sectores principales en que se divide.	13
Figura 2. Mejor árbol construido con los datos de electroforesis de siete poblaciones de <i>P. leprosa</i> y una población de <i>P. longicauda</i> (tomado de Lynch et al. 1983).	15
Figura 3. Localidades muestreadas a lo largo de la Faja Volcánica Transversal (localidades 1-23) y Sierra Madre del Sur (localidad 24).	19
Figura 4. Gráficas de saturación de las secuencias (no corregidas) en transiciones y transversiones en primeras, segundas y terceras posiciones contra estimaciones de diferencias por pareja obtenidas con Kimura 2 parámetros para la misma clase de sustituciones.	34
Figura 5. Árbol consenso estricto de Máxima Parsimonia para 31 haplotipos	37
Figura 6. Árbol de Máxima Verosimilitud estimado con el modelo de sustitución TIM+I para 31 haplotipos.	38
Figura 7. Red de haplotipos ubicado en la geografía. Se empleo el programa TCS a un nivel de confianza del 95%. Los círculos negros significan haplotipos inexistentes o no encontrados en este trabajo.	44
Figura 8. Reconstrucción de NCPA. <b>I</b> ) Manual. La inferencia para el cladograma total fue fragmentación <b>II</b> ) Automatizada. La inferencia fue colonización a gran distancia o antigua fragmentación. Las letras denotan los haplotipos encontrados.	45
Figura 9. Resultados de las pruebas de Mantel para los clados detectados en la filogenia	48
Figura 10. Gráficas de distribución pareada (mismatch).	50
Figura 11. Patrones del parámetro de crecimiento exponencial ( $g$ ) para los principales linajes de <i>P. leprosa</i> obtenidos con el programa <b>FLUCTUATE</b> (Kuhner 1998).	52
Figura 12. Gráficas generadas por inferencia Bayesiana “ <b>Skyline</b> ” para los principales linajes de <i>P. leprosa</i> a una tasa de mutación por sitio por millón de años de 0.004 equivalente a 8% de divergencia entre dos secuencias por millón de años.	53
Figura 13. Árboles de genes en árboles de poblaciones. <b>A</b> ) Hipótesis nula. <b>B</b> ) Mejor hipótesis alternativa estimada con el criterio “Minimize Deep Coalescence Tree Species”.	56
Figura 14. Gráficas de $N_e$ para clados detectados en la filogenia.	57
Figura 15. <b>A</b> ) Skyline plot generada para estimar el TMRCA entre <i>P. leprosa</i> y su grupo hermano <i>P. firscheini</i> . Como resultado de la profunda divergencia entre ambas especies, se genera un efecto de incremento poblacional <b>B</b> ) Modelo de crecimiento poblacional exponencial típico inferido a nivel intrapoblacional. <b>C</b> ) Modelo de varios cuellos de botella que Skyline plot es incapaz de inferir con un sólo gen.	71
Figura 16. Principales episodios evolutivos de la Faja Volcánica Transmexicana. <b>A</b> ) Arco del Mioceno medio y tardío <b>B</b> ) Episodio máfico del Mioceno tardío.	77
Figura 17. Principales episodios evolutivos de la Faja Volcánica Transmexicana. <b>A</b> ) Arco del Mioceno medio y tardío <b>B</b> ) Episodio máfico del Mioceno tardío. En círculos pequeños con borde blanco se señalan los registros actuales de <i>P. leprosa</i> .	78
Figura 18. Mapa que muestra los principales eventos geológicos que han afectado la porción este del sector oriental. Se muestra la ubicación de los principales linajes de <i>P. leprosa</i> .	79
Figura 19. Distribución actual de la especie nueva de Tres Mogotes, <b>B</b> ) Distribución potencial.	86

## CUADROS

Cuadro 1.	Divergencia y polimorfismo para diferencias sinónimas y no sinónimas.	40
Cuadro 2.	Diversidad genética por linaje identificado en el análisis filogenético.	40
Cuadro 3.	Análisis de varianza molecular (AMOVA).	41
Cuadro 4.	Inferencias demográficas a partir del Análisis de Clados Anidados realizada de modo manual (Templeton 2004) y automatizada (Panchal 2007) en <i>Pseudoeurycea leprosa</i> .	43
Cuadro 5.	Valores de confiabilidad (SSD y HRI) para la distribución mismatch ( $\alpha = 0.05$ ) donde $\diamond$ =Significativo = la población <b>no</b> esta en expansión. Para Fs de Fu y D de Tajima = $Prob. F_s simulada \leq F_s observada$ = * Significativo = La población experimentó una expansión.	49
Cuadro 6.	Estimaciones del tiempo de divergencia en millones de años (Ma) para los clados de <i>P</i> .	54
Cuadro 7.	Número de migrantes <i>N<sub>m</sub></i> calculado en el programa MIGRATE.	57
Cuadro 8.	Algunas de las especies endémicas a la FVT que cuentan con tiempos de divergencia respecto a sus especies hermanas de acuerdo con Wiens et al. (2007).	86

## RESUMEN

*Pseudoeurycea leprosa* es una salamandra terrestre que habita en los bosques de pino y pino-encino en las montañas ubicadas en la Faja Volcánica Transmexicana (FVT). Actualmente, la distribución de esta especie se encuentra fragmentada en diversas poblaciones. El objetivo del presente trabajo es describir los patrones filogeográficos y los procesos que han influido en la distribución de *P. leprosa* empleando 103 secuencias parciales de 687 pb del gen mitocondrial citocromo *b*. El muestreo se realizó en 23 poblaciones ubicadas en la FVT y una en la Sierra Madre de Sur (SMs). Los análisis filogenéticos realizados fueron Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, con los que se ubica a la población de la SMs como la más basal del grupo. Los niveles de divergencia entre la población de la SMs y las de la FVT es de 5.2%, valor similar al encontrado entre diferentes especies del género *Pseudoeurycea*. Considerando que los organismos de la población de la SMs alcanzan la madurez reproductiva a un tamaño menor que otras poblaciones de *P. leprosa*, el uso de microhábitat (bromelias) que es inusual en *P. leprosa* y la ubicación periférica de la población, nos permite suponer que se trata de una nueva especie. Al interior del grupo *P. leprosa* se identificaron dos clados principales: el *Clado I* incluye poblaciones que se encuentran en el centro y este de la FVT y el *Clado II* está conformado por poblaciones ubicadas en la porción norte de la FVT. También se identificó un haplotipo ancestral basal a ambos clados en una localidad del norte. La divergencia genética encontrada entre ambos clados y el haplotipo ancestral son similares a las encontradas a nivel intraespecífico en especies del género *Pseudoeurycea*, que son morfológicamente uniformes y utilizan nichos similares. La dinámica histórica de la población fue estimada para cada uno de los clados de *P. leprosa* empleando

sumarios estadísticos, análisis de clados anidados y coalescencia. Se encontró que ninguno de los linajes ha pasado por una expansión reciente (segunda mitad del Pleistoceno). Sólo para el *Clado I* se identificó una expansión antigua previa a los pulsos glaciales que se han registrado en la FVT. Un largo periodo de inactividad volcánica en la porción oriental de la FVT y su reciente evolución geológica están estrechamente relacionados con el patrón de diferenciación genética encontrado en *P. leprosa*. Se determinaron tres eventos importantes en la historia evolutiva de la especie. La fragmentación de la población de Tres Mogotes (SMs) respecto al grupo *P. leprosa* hace 3.3 Ma. La separación de las poblaciones del *Clado I* respecto al *Clado II* hace 2 Ma y la separación del *Clado I* en dos subclados hace 1.1 Ma. El grado de aislamiento entre las poblaciones del *Clado I* respecto a las del *Clado II* permiten identificarlas como Unidades Evolutivas Significativas. Los Parques Nacionales actualmente protegen a las poblaciones del *Clado I*, que presentan una diversidad genética baja. La mayor diversidad se encuentra fuera de las áreas naturales protegidas. Los bajos números poblacionales encontrados y el alto grado de fragmentación del hábitat indican la necesidad de enfocar los esfuerzos de conservación en las poblaciones del norte de *P. leprosa*.

## ABSTRACT

*Pseudoeurycea leprosa* is a terrestrial salamander that inhabits in pine and pine-oak forest in mountains located along the Transmexican Volcanic Belt (TVB). Currently, the distribution of this species is fragmented into several populations. The objective of this work is to describe phylogeographic and the processes that have influenced in the distribution *P. leprosa* by using 103 partial sequences of 687 bp of the mitochondrial gene cytochrome *b* corresponding to 23 populations located along the TVB and one from the Sierra Madre del Sur (SMs). The phylogenetic analyses based on methods of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian inference indicate that the population of the SMs is the most basal of the *P. leprosa* group. The levels of divergence of this population (5.2%) with respect to the other are similar to those found between other species of *Pseudoeurycea*. Its peripheral location and the microhabitat where they live in (bromeliads), is unusual for *P. leprosa*, as well as the reproductive maturity reached at smaller size allow us to propose that it represents a new species. Within the *P. leprosa* group, we identified two main clades. *Clade I* includes populations that are located in the center and east of the TVB and *Clade II* is conformed by populations located in the northern portion of the TVB. An ancestral haplotype basal to both clades found in the north was identified. The genetic divergence levels found between both clades and the ancestral haplotype are similar to those found at intraspecific level in species of the *Pseudoeurycea* group that are morphologically similar and use similar niches. The historical dynamics of the population was considered for each one of the lineages of *P. leprosa* by using summary statistical, nested clade analyses and coalescence. No lineages have

experienced a recent expansion (upper Pleistocene). Only in Clade *I* an old expansion was identified that took place prior to the glacial pulses that have been registered in the TVB. A long period of volcanic inactivity in the Eastern portion of the TVB and its recent geologic evolution are closely linked with the pattern of genetic differentiation in *P. leprosa*. Three important events in the evolutionary history of the species were determined. The fragmentation of the population of Tres Mogotes (SMs) with respect to the *P. leprosa* group approximately 3,3 Myr ago. The separation of the populations of Clade *I* with respect to Clade *II* occurred 2.0 Myr ago, and the separation of Clade *I* in two subclades may have occurred 1,1 Myr ago. The level of isolation between the populations of Clade *I* with respect to those of Clade *II* allowed us to identify them as different Evolutionary Significant Units. National Parks at the moment only protect populations of Clade *I* which show low genetic diversity. Most of the genetic diversity lies outside of the natural protected areas. The low population numbers found and the high degree habitat fragmentation in the region indicate that conservation should be focused on the northern populations of *P. leprosa*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Diversidad de pletodóntidos en México

México es el quinto país en riqueza de anfibios a nivel mundial (357 especies). De acuerdo con la Unión Mundial para la Naturaleza (IUCN 2007), el total de especies existentes en México equivale al 54% de las aproximadamente 660 especies de anfibios reportadas para toda Mesoamérica, siguiendo en número Panamá (198), Costa Rica (190), Guatemala (135), Honduras (99), Nicaragua (67), Belice (36) y El Salvador (36).

La riqueza de anfibios mexicanos actualmente se encuentra formada por 3 órdenes, 14 familias y 43 géneros (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004). El orden Anura (231 especies) y el orden Gymnophiona (2 especies) representan el 4% y el 1.1% de ranas, sapos y cecílicos del mundo. La mayor riqueza de especies se encuentra en el orden Caudata (128 especies) representando el 23% del número total de salamandras en el planeta. En México hay representantes de 4 familias: Ambystomatidae, Plethodontidae, Salamandridae y Sirenidae, siendo la familia Plethodontidae la que contiene el mayor número de géneros (12) y especies (113). De los pletodóntidos, el grupo más diverso es el género *Pseudoeurycea*, el cual se distribuye desde Sonora y Chihuahua hasta Guatemala. A la fecha cuenta con 50 especies descritas, de las cuales 46 se encuentran sólo en México, tres se han localizado tanto en México como en Guatemala y sólo una es endémica a Guatemala.

De manera general, la diversidad de especies de México se explica porque el país presenta un relieve sumamente heterogéneo donde factores como clima, altitud, latitud,

historia biogeográfica y disturbios naturales han propiciado la existencia de una amplia variedad de hábitat, principal generador de la diversidad tanto de especies de salamandras como de otros anfibios (García-París et al. 2000). Las salamandras tropicales de la tribu Bolitoglossini (familia Plethodontidae) han experimentado grandes diversificaciones que parecen estar relacionadas con factores físicos tales como la temperatura. Las pendientes montañosas actúan como gradientes ecológicos y como generadores de diversidad, lo que sugiere que la variación geográfica promueve la formación de especies alopátricas. La combinación de características biológicas de estas salamandras, su complejidad biológica, diversidad ecológica y ambiental han contribuido a la diversificación de las salamandras tropicales, jugando un papel crítico en la riqueza de especies y afectando los procesos de extinción, especiación y dispersión. Wiens et al. (2007) señalaron que el lapso de tiempo que los bolitoglossinos han permanecido en un hábitat colonizado, ha dado como resultado una mayor riqueza de especies, simplemente porque ha pasado el tiempo suficiente para que la especiación ocurra. De esta forma, se considera que los anfibios de la familia Plethodontidae, y en especial las especies del género *Pseudoeurycea*, son grupos representativos de diversidad y endemismo de especies que han colonizado por muchos años los hábitat de México (aprox. 42 millones de años para bolitoglossinos y 30 millones de años para *Pseudoeurycea*, Weins et al. 2007), siendo los bosques de niebla y bosques templados del centro y sur de México que se localizan entre 1000 y 2800 msnm los que albergan una alta diversidad de especies de salamandras (Wake et al. 1992). Estos bosques son hábitat que presentan tasas de evaporación reducidas, conservando la humedad la mayor parte del año, lo cual se relaciona con la presencia de troncos caídos, piedras y suelos porosos, que son lugares idóneos para las salamandras de hábitos terrestres.

## 1.2 Declive de poblaciones y el efecto de la fragmentación en pletodóntidos terrestres

La diversidad de anfibios de México contrasta con el fuerte declive en las poblaciones de éstos, así como la reducción de su distribución e incremento en la tasa de extinción de los mismos (Blaustein et al. 1994). Lo anterior se debe a factores de origen antropogénico como pérdida de hábitat, lluvia ácida y contaminantes ambientales, cambio climático, radiación ultravioleta, introducción de especies invasivas y la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, cuya infección causa severos problemas de mortalidad en anfibios. La fragmentación del hábitat impacta en la abundancia de las poblaciones, altera patrones de movimiento (Brooker y Brooker 2002) y genera pérdida de diversidad genética de las poblaciones aisladas reduciendo su viabilidad (Harrison y Bruna 1999, Davies et al. 2001).

Las poblaciones grandes tienden a tener mayores niveles de heterocigosidad con respecto a las poblaciones pequeñas. Las poblaciones que han pasado por cuellos de botella sufren una reducción de heterocigosidad y con ello el potencial para adaptarse a nuevas condiciones ambientales (Saunders et al. 1991, Laroche y Durand 2004). Las poblaciones pequeñas tienden a sufrir con mayor rapidez los efectos de la estocasticidad demográfica (cambios en la supervivencia y éxito reproductivo para un número finito de individuos), estocasticidad ambiental (como consecuencia de un cambio en los parámetros del hábitat y las poblaciones de los competidores, depredadores, parásitos y enfermedades), catástrofes naturales (incendios, inundaciones, etc. que ocurren de manera aleatoria en el tiempo) y estocasticidad genética (resultando en cambios de la frecuencia de genes debido a efecto fundador, fijación al azar o deriva génica y

endogamia) con la consecuente posibilidad de extinguirse (Shaffer 1981, Simberloff y Cox 1987). De esta forma, en el marco de las medidas de conservación se hace necesario conocer la estructura de la población, especialmente en paisajes fragmentados donde el riesgo de las poblaciones aisladas se incrementa conforme la fragmentación avanza.

Un ejemplo en salamandras del efecto negativo de estos factores se ha documentado en *Aneides aeneus*, especie que se distribuye en las montañas altas del este de Estados Unidos y cuyas poblaciones se monitorearon en los años 70's. En los 90's fueron evaluadas nuevamente encontrando un declive en la abundancia de las poblaciones de un 98%. Esto fue atribuido a pérdida de hábitat, colecta excesiva, enfermedades epidémicas (*Chytridiomycosis*) y cambio climático (Corser 2001). Condiciones de decremento en la abundancia de poblaciones de pletodóntidos también se han registrado en México. La abundancia poblacional encontrada en los 90's fue menor a la encontrada a mediados de los 70's y 80's por Wake y Lynch (1976) y Lynch (1983), siendo la modificación de hábitat la causa principal (Parra-Olea et al. 1999, 2005a). La conversión acelerada del bosque a pastoreo para agricultura y ganado en México es la principal amenaza (Parra-Olea et al. 2005), pues causa la destrucción de hábitat y la extinción de poblaciones de las salamandras terrestres de bosques templados que presentan una alta filopatría y ámbito hogareño pequeño (Blaustein et al. 1994), una limitada capacidad de dispersión, tendencia a mostrar requerimientos de hábitat especializados (Wake et al. 1992), susceptibilidad a la desecación y por ende alta dependencia de hábitat frescos y húmedos.

Por otra parte, los efectos de fragmentación de hábitat con diferentes tamaños del remanente y diferentes grados de aislamiento han sido evaluados en varias especies de anfibios (Kolozsvary y Swihart 1999). La respuesta de estas especies a la fragmentación difiere entre ellas tanto como su historia de vida y su ecología. Por ejemplo, *Hyla versicolor* y *Bufo americanus* presentan una distribución amplia a pesar de la fragmentación de los bosques que habitan, mientras que *Ambystoma* depende de la presencia de arroyos en el interior del remanente. Si el microhábitat (arroyo) permanece, sus poblaciones no se ven tan afectadas. Sin embargo, en salamandras terrestres como *Plethodon cinereus* se ha encontrado una fuerte relación con el tamaño del área del fragmento, lo que afecta tanto la abundancia de la población como su viabilidad.

Un estudio realizado por DeMaynadier y Hunter (1998) sobre el efecto de borde en áreas boscosas indica que a diferencia de los anuros, las salamandras (*P. cinereus*) son más sensibles a la tala, hecho apoyado cuantitativamente al comparar las poblaciones de salamandras de bosques talados y bosques maduros intactos. Patrones similares se han observado en *Plethodon elongatus* (Hartwell 1990), *Batrachoseps wrighti* (Nussbaum 1983) y *Batrachoseps attenuatus* que en este último caso es hasta diez veces más abundante en bosques antiguos que en bosques jóvenes que se están regenerando (Cooperrider et al. 2000). Este patrón confirma la estrecha relación entre el estado sucesional del bosque y la densidad de especies de salamandras, es decir números elevados de salamandras se encuentran en bosques antiguos con sistemas complejos y estructurados (Davic y Welsh 2004). Otro ejemplo sobre el efecto de la fragmentación de hábitat en salamandras terrestres lo encontramos en *Plethodon vehiculum*, cuyas poblaciones fueron reducidas hasta un 70% debido a la tala de los bosques y a un decremento en la disponibilidad de humedad en el microhábitat (Dupuis et al. 1995).

Un análisis reciente en salamandras del género *Pseudoeurycea* señala que el aumento gradual de la temperatura conlleva a la desaparición de hábitat húmedos; por ello, el cambio climático constituye una amenaza importante para esta fauna en un plazo relativamente corto (50 años aproximadamente, Parra-Olea et al. 2005a). Los efectos del cambio climático son significativos sobre el rango de distribución, comportamiento y extinciones locales. Así las especies sólo tienen tres opciones que pueden evitar el declive de sus poblaciones: tener plasticidad, desplazarse o evolucionar (Jackson y Overpeck 2000). Reusch y Wood (2007) consideran que debemos emplear herramientas moleculares que nos permitan conocer la arquitectura genética bajo el panorama del cambio climático global para proponer mejores estrategias de conservación.

### 1.3 Estudios filogeográficos de pletodóntidos terrestres

El estudio de la sistemática y de los patrones de estructura genética entre poblaciones empleando herramientas moleculares, se ha realizado desde la época de los años 60's con el análisis de aloenzimas (Martínez-Solano et al. 2007). Concretamente, para pletodóntidos, durante los años 70's y 80's los estudios de aloenzimas permitieron revelar patrones que eran enmascarados en los análisis morfológicos (Wake 2006). Por ejemplo, fue posible determinar que las especies nominales estaban conformadas por complejos de especies (e. g. *Batrachoseps* en California, USA y *Thorius* en Oaxaca, México) (Yanev 1978, 1980, Hanken 1980). Las distancias genéticas encontradas entre una especie nueva y una especie ya descrita considerada cercana, así como la diferenciación morfológica entre éstas, permiten definir con mayor certeza su estatus taxonómico (Lynch et al. 1983, Papenfuss et al. 1983). También se hicieron

estimaciones de estructura genética, flujo génico entre poblaciones fragmentadas, cálculo de patrones históricos a través del polimorfismo de proteínas en más de 20 especies de pletodóntidos (Larson et al. 1984) y mediciones de distancia genética y su relación con la geografía (Wake y Yanev 1986).

Estos trabajos que emplean aloenzimas, más un intenso trabajo morfológico realizado en los grupos de la familia Plethodontidae (Regal 1966, Wake 1967, Lombard y Wake 1976, 1977 y 1986), conformaron la base para analizar los patrones de evolución morfológica desde la perspectiva de la genética de poblaciones, usando los datos moleculares para examinar la estructura (variación proteínica). Con ello se pudo concluir que casi todos los pletodóntidos presentan altos niveles de fragmentación genética aun cuando las características morfológicas sean uniformes. Las poblaciones conespecíficas en algunos casos son tan distintas a nivel de proteínas, que el intercambio genético pudo haber ocurrido millones de años atrás. La especiación a menudo no está correlacionada con cambios morfológicos, por lo que poblaciones genéticamente homogéneas pueden ser polimórficas (Wake y Larson 1987).

De manera paralela, en la misma década se consolida el conocimiento generado sobre la molécula de ADN mitocondrial animal (ADNmt; Avise et al. 1979). A diferencia de las aloenzimas (que son codificadas por genes nucleares y que se segregan y recombinan durante cada generación de reproducción sexual), la molécula de ADNmt no es recombinante, evoluciona de manera rápida (Brown et al. 1979), se hereda por vía materna y es ampliamente polimórfica a nivel intraespecífico (Avise y Lansman 1983; Brown 1983). De esta forma, el pedigrí de una especie constituye una filogenia intraespecífica (matriarcal) y los genes transmitidos a través de este pedigrí proporcionan información acerca de su historia hereditaria. Esta historia registrada en el

ADNmt puede estar distorsionada si los machos difieren de las hembras en características filogeográficas relevantes, tal como la varianza en el número de la progenie o en la capacidad de dispersión (Takahana y Slatkin 1984; Takahana y Palumbi 1985). Así, para finales de los 80's quedan constituidas las bases de la filogeografía (Avice 1987). Bajo esta premisa, se retoma nuevamente para el análisis de especies de plelodóntidos que en estudios previos presentaron variación genética (de aloenzimas) en sus poblaciones.

Uno de los primeros trabajos filogeográficos fue el de Moritz et al. (1992) con el complejo *Ensatina eschscholtzii* empleando ADNmt (citocromo *b*). Los resultados de este estudio no coincidieron con los encontrados por Wake y Yanev (1986) con aloenzimas, pues algunos grupos eran monofiléticos con ADNmt pero no con genes nucleares. Esta incongruencia ocurre debido a la naturaleza hereditaria (clonal-maternal), por tanto el ADNmt presenta un tamaño efectivo pequeño que puede estar fuertemente diferenciado geográficamente, mientras que en los genes nucleares esto no ocurre. Esta incongruencia puede ser alta si las hembras se dispersan mucho menos que los machos. Así, en taxa antiguos y geográficamente subdivididos, los análisis filogeográficos pueden revelar grupos monofiléticos discretos de ADNmt (categoría filogeográfica 1 en Avice 1987). Sin embargo, el límite entre especies no se puede establecer sólo con estos datos, pues los grupos pueden estar unidos por flujo génico nuclear (Moritz et al. 1992). Staub et al. (1995) demostraron que en los patrones de crecimiento y movimiento de hembras y machos para *Ensatina eschscholtzii* existen diferencias de desplazamiento entre sexos (de hasta 120 m para machos y 60 m para hembras), lo que puede explicar las diferencias entre ADNmt y aloenzimas. En 1997 se retoma nuevamente el complejo *Ensatina*, incrementado el número de muestras para aloenzimas a 49 poblaciones y el

número de secuencias del gen citocromo *b* para 80 poblaciones, además del análisis morfológico. Wake (1997) señala que el criterio morfológico, de aloenzimas y ADN que es empleado para delimitar especies, en este complejo, no coincide con la geografía. Otro estudio con aloenzimas en el género *Thorius* resultó en la identificación de cinco especies nuevas para localidades en los estados de Puebla y Veracruz y una estructura que coincide entre distancias genéticas y distancias geográficas (Hanken 1998).

En el año 2000 aparece el primer trabajo que formalmente incluye un apartado filogeográfico con miembros de la familia Plethodontidae: La publicación de García-París et al. (2000) con salamandras de Costa Rica muestra que los datos resultantes de ADNmt (citocromo *b*) concuerdan con los obtenidos con aloenzimas. En ese mismo año Wake y Jockusch publican un trabajo sobre la delimitación de especies en salamandras plethodóntidas de California. Los resultados obtenidos de los complejos *Ensatina* y *Batrachoseps* ilustran la dificultad de tomar decisiones taxonómicas ya que, a pesar de contar con información obtenida a partir de aloenzimas, ADNmt y morfología, estos datos no concuerdan entre sí. Más tarde Jockusch et al. (2001) y Jockusch y Wake (2002) realizan un intenso muestreo en varias de las especies del género *Batrachoseps* encontrando una fuerte estructura filogeográfica en algunas de ellas. Los clados mayores encontrados con ADNmt concuerdan con los resultados de aloenzimas. Los patrones de variación de aloenzimas parecen reflejar patrones recientes y actuales entre poblaciones, mientras que el ADNmt parece reflejar una historia más profunda, lo que permite inferir una historia filogenética del género además de proporcionar una visión de cómo las salamandras se diversifican y se forman nuevas especies. En el año 2004 se publican dos trabajos para estimar la historia poblacional de las especies *Plethodon elongatus* (Mahoney 2004) y *Plethodon vandykei* (Carstens et al. 2004). Los resultados

de ambos trabajos muestran la importancia de analizar los datos, empleando técnicas de genética de poblaciones como filogenéticas para probar hipótesis. Por ejemplo, los árboles filogenéticos son útiles para probar hipótesis relacionadas con una antigua estructura genética que puede estar presente en los datos filogeográficos. De igual forma, no es posible construir topologías apropiadas para probar hipótesis relacionadas con eventos recientes como una expansión después del Pleistoceno, estas hipótesis sólo pueden ser probadas bajo el marco de la genética de poblaciones y pruebas estadísticas basadas en métodos de coalescencia (Carstens et al. 2004). Esta forma de analizar los datos ponen de manifiesto la gran cantidad de información filogeográfica y de nuevos métodos que se ha acumulado durante 12 años, después de que Moritz et al. (1992) publicaran su trabajo.

Finalmente, tres importantes trabajos realizados recientemente muestran la importancia de la filogeografía y el uso de genes nucleares y mitocondriales en poblaciones de pletodóntidos terrestres:

a) *Pruebas de hipótesis filogeográficas y biogeográficas*

Peralta-García (2006) realiza un estudio del género *Batrachoseps* en la península de Baja California, México, empleando ADNmt (gen citocromo *b*) y un número amplio de muestras (111). Utiliza análisis cladísticos y de filogeografía para proponer hipótesis sobre las relaciones filogenéticas e hipótesis biogeográficas que expliquen la configuración actual del género, exponiendo la utilidad del gen citocromo *b*.

b) *Linajes filogeográficos, de especies y su conservación*

Rissler et al (2006) identifican unidades filogeográficas con ADNmt dentro del rango de especies de pletodóntidos, así como en otros anfibios y reptiles. Estas unidades revelan nuevas áreas de endemismo importantes para la conservación de linajes. Hacen énfasis en la conservación de la historia evolutiva, la cual es esencial para entender los patrones filogeográficos de las especies, ya que son una pequeña representación de un linaje. Desafortunadamente, los programas de conservación actualmente no incluyen la formación de linajes.

c) *Corroboración de patrones encontrados con aloenzimas, genes mitocondriales y nucleares*

Martínez-Solano et al. (2007) incluyen secuencias del gen mitocondrial citocromo *b* como de otros tres genes (16S, *cox1*, *nad4*) y un gen nuclear (RAG-1) para estudiar la historia evolutiva de la especie *Batrachoseps attenuatus*. Los clados observados con ADNmt no fueron recuperados con el gen nuclear ni tampoco con aloenzimas; de esta forma se descarta la idea de una especiación críptica y se corrobora la eficacia de las aloenzimas como indicador de flujo génico reciente entre poblaciones o como detector de límites entre especies de pletodóntidos.

En resumen, los métodos filogeográficos (ADNmt) son una potente herramienta que, sumada a la información que proporcionan los genes nucleares (incluyendo aloenzimas), permiten tener un panorama sobre la historia antigua y reciente de la especie bajo estudio, que en el caso de las salamandras terrestres de México se conoce relativamente poco a nivel de la genética de poblaciones. Esta falta de conocimiento hace difícil generar propuestas de conservación efectivas o definir qué poblaciones

necesitan atención urgente para su subsistencia. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es realizar un análisis filogeográfico de *Pseudeurycea leprosa*, especie que resulta de gran interés por su asociación a los bosques de alta montaña del sector oriental de la Faja Volcánica Transmexicana de México y que, debido principalmente a la tala no controlada, su distribución se encuentra fragmentada.

## 2. ÁREA DE ESTUDIO

La Faja Volcánica Transmexicana (FVT) está delimitada entre 19° y 21° latitud norte y tiene un rango de elevación que va de los 1500 a los 3000 msnm. Las características principales de la FVT son: su actividad volcánica, su fallamiento activo y su elevado flujo térmico. De acuerdo con Demant (1982), Ferrari (2000) y Gómez-Tuena (2005) la FVT se puede dividir en tres sectores geológicos: Oriental, Central y Occidental (Fig.1). Cada una de estas zonas tienen diferencias notables en cuanto a edad, tipo de vulcanismo y composición química. También se observan diferencias de la porción norte al sur ya que, en términos generales, las rocas de la porción norte de la FVT son más antiguas que las de la porción sur, por tanto el intemperismo y la erosión han actuado intensamente, dando como resultado irregularidades mayores del relieve que se manifiestan en la profundización de valles y barrancas con fuertes pendientes (Velasco de León et al. 2007).

La mayoría de las poblaciones de *P. leprosa* se distribuyen en el sector Oriental. Este sector se encuentra ubicado geográficamente desde el Estado de México al poniente hasta el estado de Veracruz al oriente; presenta grandes elevaciones con fuertes pendientes (estratovolcanes) como el Cofre de Perote, Pico de Orizaba, Popocatepetl e Iztaccíhuatl, presentándose con mayor nivel de erosión los ubicados en la parte norte y centro (Sierra de Tlaxco y Volcán La Malinche). También existen pequeños volcanes, calderas y domos generalmente asociados como en la caldera de los Humeros en el estado de Puebla y diatremas o axalapaxcos en la cuenca de Oriental, cuyo rasgo principal es un cono de poca altura y un lago en el centro como resultado de la actividad freatomagmática. En la porción sur se encuentran estructuras muy jóvenes formadas por cenizas volcánicas y derrames de lava como el Popocatepetl con

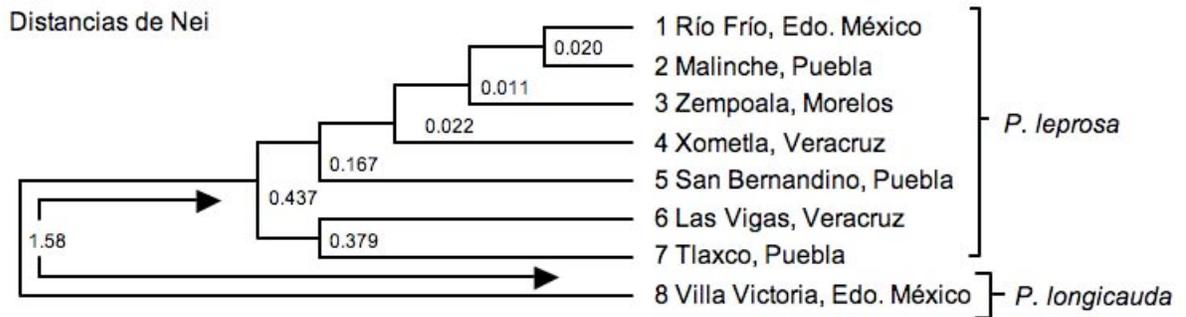
actividad volcánica registrada desde los últimos 2000 años. Una población se ubica fuera de la FVT en la Sierra Madre del Sur.



**Fig. 1.** Delimitación de la Faja Volcánica Transmexicana. Se muestran los tres sectores principales en que se divide (tomado de Gómez-Tuena 2005).

### 3. ANTECEDENTES

Existen hasta ahora dos trabajos de sistemática molecular que incluyen muestras de *Pseudoeurycea leprosa*. Lynch et al. (1983) presentan un estudio basado en electroforesis de proteínas sobre algunas poblaciones de *Pseudoeurycea*, que habitan en la región Oriente de la Faja Volcánica Transmexicana. Los autores analizaron muestras de siete poblaciones de *P. leprosa*, así como una muestra de *P. longicauda*, *P. robertsi* y *P. altamontana*. El objetivo del estudio fue establecer las diferencias genéticas y morfológicas de estas especies. Como resultado de estos análisis se describió *P. longicauda* como especie nueva. En cuanto a *P. leprosa*, el análisis de proteínas indica que las poblaciones están fragmentadas genéticamente (Distancia =  $D_N$ ; Nei 1973) de la siguiente forma: la población localizada 10 km al sur del Volcán de Orizaba es moderadamente divergente del grupo central (0.015 a 0.020  $D_N$ ). La población de Tlaxco, aproximadamente 60 km al norte del Volcán Malinche presenta un alto grado de diferenciación genética (0.389  $D_N$ ). Las poblaciones de Cofre de Perote (Las Vigas, Veracruz) también presentan diferencias respecto a las poblaciones centrales (0.240 a 0.261  $D_N$ ). La muestra de las Vigas es morfológicamente distinguible respecto a las poblaciones del centro. A pesar de la ausencia de una barrera fisiográfica o climática mayor entre el Pico de Orizaba y el Cofre de Perote, los distintivos genéticos de esta población son relativamente elevados (0.242  $D_N$ ) en comparación con las poblaciones de San Bernardino y Tlaxco (0.539  $D_N$ ) que presentan aislamiento de por medio (Fig. 2).



**Fig. 2.** Árbol de distancia ( $D_N$ ) construido con los datos de electroforesis de siete poblaciones de *P. leprosa* y una población de *P. longicauda* (modificado de Lynch et al. 1983).

El segundo trabajo fue realizado por Parra (2002), quien presenta una hipótesis de relaciones filogenéticas entre las especies del género *Pseudoeurycea* y taxa relacionados, basándose en secuencias de los genes mitocondriales 16S, Cyt *b* y ND4. El análisis incluye 27 especies de *Pseudoeurycea* y muestras de los géneros monotípicos *Lineatriton*, *Ixalotriton* y *Parvimolge*. Todos los análisis resultaron en que *Pseudoeurycea* es parafilético, sin embargo existe apoyo para tres clados. Uno de ellos es el grupo *P. leprosa*, el cual tiene un subclado que está formado por las dos poblaciones incluidas de *P. leprosa* y su grupo hermano *P. lynchi*.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Describir los patrones filogeográficos de *Pseudoeurycea leprosa* a lo largo de su rango de distribución empleando secuencias parciales del gen mitocondrial citocromo *b*.

### Objetivos específicos

- Conocer la estructura genética de *P. leprosa*.
- Evaluar la correlación entre distribución geográfica y patrones genéticos.
- Identificar unidades evolutivas a nivel genético.
- Estimar tiempos de divergencia de clados principales.
- Identificar poblaciones en riesgo de conservación.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención de datos de colecciones

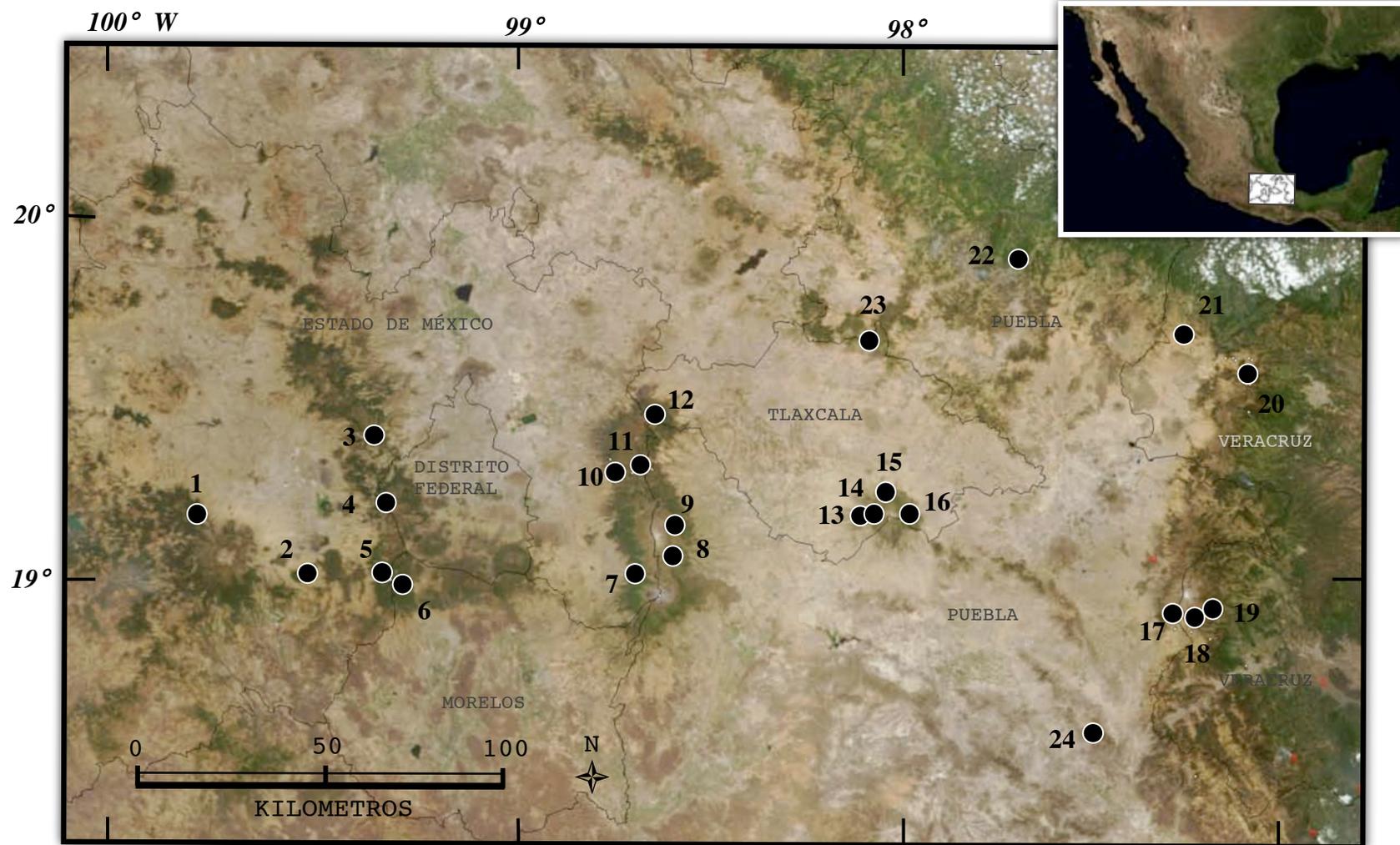
Se realizaron dos tipos de consulta: en Internet de las principales colecciones internacionales y visita a las colecciones nacionales con el objetivo de establecer las localidades donde se han colectado ejemplares de *P. leprosa*.

### 5.2 Trabajo de campo

La elección de las localidades en el presente estudio se basó en los resultados obtenidos a partir de las bases de datos de colecciones científicas, en publicaciones y áreas de distribución publicadas en Internet (INFONATURA, CAS, CM, FMNH, GMNH, KU, LACM, LSUMZ, MCZ, MVZ, ROM, TCWC, TNHC, UCM, USNM, UAT, MZFC, CNAR, IPN, UATx. Los acrónimos y el número de ejemplares depositados en cada colección se presentan en el anexo I). El criterio principal fue tener el mayor número de localidades posibles que formaran ya sea parte de un continuo de bosque o que estuvieran aisladas. La distancia mínima para considerar que una localidad era diferente a otra fue de al menos 3 km dado que, en general las salamandras pletodóntidas presentan una alta filopatría (Blaustein et al. 1994). Por ejemplo, el rango máximo de movimiento para *Ensatina eschscholtzii* (Plethodontidae) fue de un desplazamiento de 120 m en machos (Staub 1995). Se decidió obtener 5 muestras de tejido (cola, hígado o intestino) como mínimo por localidad para el análisis genético. Se realizaron transectos en zig zag para buscar ejemplares principalmente en barrancas húmedas, bajo y dentro de troncos podridos, entre la corteza de árboles caídos y tocones, bajo hojarasca y bajo

piedras. Cada transecto abarco de 3 a 12 km dependiendo de la accesibilidad del área y la cantidad de ejemplares encontrados.

Las localidades donde se obtuvo el número de muestras deseado en la primera búsqueda, ya no fueron visitadas nuevamente. Las localidades donde se colectó menos de cinco ejemplares fueron visitadas nuevamente hasta tratar de completar el número deseado de muestras. En algunos casos como Tlaxco, Tlaxcala (una muestra) o La Marquesa, Edo. Méx. y Zacualtipan, Hidalgo (donde se reporta la presencia) se visitaron de dos hasta cinco veces en diferentes épocas sin éxito, encontrando únicamente ejemplares de *Chiropterotriton* sp. y *P. cephalica*. Finalmente, se seleccionaron 24 localidades dentro del área de distribución de *P. leprosa* (Anexo II), mismas que fueron visitadas de junio de 2002 a marzo de 2005, principalmente durante la época de lluvias. Se emplearon muestras de las 24 localidades (N=103; Fig. 3), de las cuales seis son las mismas que las empleadas en el estudio de aloenzimas de Lynch et al. (1983). Únicamente para la población de San Bernardino, Puebla (que sería la séptima en el trabajo de Lynch et al. (1983) no obtuvimos ejemplares.



**Fig. 3.** Localidades muestreadas a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana (localidades 1-23) y Sierra Madre del Sur (localidad 24).

1. Nevado de Toluca, 2. Texcalyacac, 3. Desierto de los Leones, 4. Parque Nacional Ajusco, 5. 8.5 oeste km de Santa Marta, 6. Parque Nacional Lagunas de Zempoala, 7. Parque Nacional Popocatepetl, 8. Calpan Parque Nacional Iztaccíhuatl, 9. Atzompa Parque Nacional Iztaccíhuatl, 10. Llano Grande Parque Nacional Zoquiapan, 11. Río Frío Parque Nacional Zoquiapan, 12. Nanacamilpa, 13. Poniente del Parque Nacional Malinche, 14. Poniente del Parque Nacional Malinche población 2, 15. Norte del Parque Nacional Malinche, 16. Oriente del Parque Nacional Malinche, 17. Texmalaquilla, 18. Texmola, 19. Xometla 20. Las Vigas 21. Carretera a Teziutlán 22. Tlatlauquitepec, 23. Tlaxco, 24. Tres Mogotes.

### 5.3 Protocolos de laboratorio.

Para obtener las secuencias del gen mitocondrial citocromo *b* se realizó el siguiente procedimiento:

- a) Extracción de ADN genómico a partir de tejido (hígado o cola) por digestión con proteinasa K y siguiendo la técnica de fenol-cloroformo (Sambrook et al. 1989).
- b) Amplificación del gen citocromo *b* utilizando el oligo “forward” MVZ15 (GAA CTA ATG GCC CAC ACW WTA CGN AA) y “reverse” MVZ 16 (AAA TAG GAA RTATCA YTC TGG TTT RAT; Moritz et al. 1992). Las condiciones de amplificación a través la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron realizadas en un volumen de 25 µl, con los siguientes parámetros: 94 °C por 3 minutos, la alineación del oligo a 50 °C por un minuto, extensión de la cadena a 72 °C por un minuto, se regresa al paso dos por 38 ciclos, una extensión final a 72 °C por 4 minutos y termina con una temperatura final de enfriamiento de 4 °C. El producto se corrió en un gel de agarosa al 1% con buffer 5x TBE y su subsecuente tinción con Bromuro de Etidio para hacer las visualizaciones bajo la luz UV. Se usaron controles negativos para verificar que no hubiera contaminación.
- c) Purificación de productos de PCR. Se empleó el protocolo de limpieza con etanol frío al 70%.
- d) Reacción de secuenciación. Esta fue realizada con BigDye Kit (Applied Biosystems, Inc.; Foster City, CA) con 10 ng de producto de PCR en 10 volúmenes de agua bidestilada.

e) Purificación de la reacción de secuenciación. Se emplearon las columnas de SEPHADEX en las cuales se filtró la reacción de secuenciación.

g) Análisis de muestras en secuenciador automático, las muestras fueron leídas en el secuenciador automático ABI 3100. El gen citocromo *b* fue secuenciado en las direcciones 5' y 3'.

#### 5.4 Alineamiento de secuencias

Las secuencias de cada muestra (*forward* y *reverse*) fueron alineadas con el programa **SEQUENCHER v.4.5**; Gene Codes Corp. 2005) con un índice de ensamble mínimo de 80%, posteriormente cada secuencia completa (687 pb) fue alineada con el resto y los electroferogramas fueron cotejados visualmente para detectar posibles errores. Se realizó la traducción a proteínas en **MACCLADE v.4.05** OS X Classroom (Maddison y Maddison 2002) seleccionando el código genético para vertebrados para determinar la presencia de pseudogenes y codones de terminación. Asimismo, se revisó con este mismo programa cada uno de los cambios en primeras, segundas, terceras posiciones, transiciones y transversiones y se verificó su legitimidad con el electroferograma de la muestra. No se presentaron indels y por tanto el alineamiento no fue ambiguo.

#### 5.5 Análisis de la información

Considerando que el citocromo *b* es un gen codificante de proteínas, se empleó una prueba para conocer la saturación de bases de los datos antes de realizar los análisis de filogenia. Esta prueba consistió en contrastar en una gráfica las distancias de las secuencias no corregidas “*P*”

*versus* distancias corregidas por el modelo Kimura-2 (1980) para cada posición del codón. Esto fue hecho de manera separada por posición y para transiciones y tranversiones para conocer si algún tipo de sustitución presentaba saturación (Fig. 4). Los puntos en las gráficas que caen sobre la línea  $Y=X$  tienen los mismos números de cambio por tanto no han sufrido mutaciones múltiples, los puntos que caen por debajo de la línea  $Y=X$  indican cambios múltiples. La saturación se alcanza cuando la divergencia de la secuencia no continúa en incremento a pesar de que se utilicen estimaciones corregidas.

### 5.5.1 Reconstrucción filogenética

Los árboles filogenéticos fueron reconstruidos empleando los métodos de Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) y la inferencia Bayesiana (BA). Para cada análisis se editó la matriz de datos empleando una secuencia representante de cada haplotipo (las secuencias repetidas y caracteres no informativos fueron excluidos). Los análisis de MP y de MV fueron implementados en el programa **PAUP\* 4.0d81** (Swofford 2002). Para el análisis heurístico de MP se emplearon las siguientes opciones: los árboles iniciales por *step-wise addition*, la adición de las secuencias con 1000 replicas al azar y el método TBR (tree-bisection-reconnection). El apoyo relativo de los nodos fue evaluado usando *bootstrapping* (bs, Felsenstein 1985) empleando 1000 pseudoreplicas bootstrap con TBR branch swapping para MP y 100 para MV. Se empleó el programa **MODELTEST v.3.7** (Posada y Crandall 1998) para encontrar el modelo de sustitución de bases de ADN así como los parámetros estimados que mejor se ajustaran a nuestros datos (no se incluyó el grupo externo). Dada la dependencia de Máxima Verosimilitud de un modelo explícito de evolución de secuencias, es conveniente saber en que

momento se puede rechazar un modelo seleccionado. La elección del modelo fue tomada después de medir el ajuste de los modelos a los datos observados comparando la verosimilitud de un árbol con el efecto del modelo sobre los datos  $L_{\max} - L_{\text{tree}}$  para ello se uso Likelihood Ratio Test.

La inferencia Bayesiana (BA) fue implementada usando **MRBAYES v.3.1** (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Debido a que el modelo TIM+I no se encuentra especificado en **MRBAYES v.3.1**, se empleó **MRMODELTEST v.2.2** (Nylander 2004) y se siguió el criterio AIC para seleccionar el mejor modelo que fue el de Hasegawa, Kishino y Yano (1985; HKY). Para correr el análisis se emplearon los parámetros default. Una cadena fría y tres cadenas calientes a temperaturas default de 0.2 fueron las empleadas en el análisis de Cadenas de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC) iniciadas con árboles al azar por 1,000,000, 2,000,000, 5,000,000 y 8,000,000 generaciones, mismas que fueron muestreadas cada 100 generaciones. Se descartaron 3000 árboles considerados como burn-in una vez que se revisó la estabilidad de las cadenas importando el archivo de salida (.p) en el programa **TRACER v.1.4**. Las probabilidades posteriores fueron calculadas después de que el algoritmo MCMC comenzó a converger. Para asegurar que el análisis no fué atrapado en un área local óptima, se corrió tres veces de manera independiente y las topologías de los tres análisis fueron comparadas para ver su congruencia.

#### 5.5.2 Análisis de diversidad nucleotídica y estructura genética

Las muestras de poblaciones de *P. leprosa* fueron combinadas en dos grupos para los análisis subsecuentes. El primer grupo (*Clado I*; Fig. 5) incluye muestras que se distribuyen a lo largo

de la Faja Volcánica Transmexicana (FVT). El segundo grupo (*Clado II*) presenta muestras del norte de la FVT. Estos grupos fueron formados con base en su distribución geográfica y similitud genética.

Los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), diversidad haplótípica ( $h$ ) y el número de sitios polimórficos (segregantes) fueron calculados con el programa **ARLEQUIN 2.000** (Schneider et al. 2000).

La estructura de la población fue revisada a través de un Análisis de Varianza Molecular (**AMOVA**; Excoffier et al. 1992), implementado en el programa **ARLEQUIN v.2.000** (Schneider et al. 2000). Este análisis divide la varianza total en componentes aditivos organizados jerárquicamente: dentro de poblaciones, entre poblaciones dentro de grupos y entre grupos. Los resultados del **AMOVA** permiten conocer el grado de significancia de la diferenciación genética existente entre los componentes. Se calcularon las diferencias pareadas ( $\Phi$ ) entre las poblaciones. Los valores de  $\Phi$  fueron evaluados con 1023 permutaciones. Las poblaciones fueron agrupadas de acuerdo a los clados identificados (*Clado I*, *Clado II*, subclado Centro y subclado Este). Se realizaron tres **AMOVA** para diferentes niveles de agrupamiento.

La distribución espacial de la variabilidad genética fue examinada con el Análisis Filogeográfico de Clados Anidados (**NCPA**, Templeton et al. 1995). Debido a los recientes debates sobre la efectividad del método (Knowles y Maddison 2002, Templeton 2004 y Petit 2007) en este estudio ejecutamos el **NCPA** siguiendo las dos formas actualmente disponibles:

la construcción manual y de forma automatizada implementada en el programa **ANeCA v.1.0** (Panchal y Beaumont 2007).

En la construcción manual, primero se generó una red de haplotipos empleando el estadístico de parsimonia con un nivel de confianza de 0.95, implementado en el programa **TCS 1.2.1** (Clement et al. 2000). El anidamiento de haplotipos se realizó de acuerdo con las reglas de Templeton (1987) para agrupar los haplotipos de manera jerárquica hasta que el cladograma completo fue incluido en una estructura anidada. El estado de punta o interior fue inferido a partir de la posición de cada haplotipo en la red. Para probar los efectos de eventos históricos poblacionales (rango de expansión, colonización o fragmentación) se analizó la estructura anidada de los haplotipos con el programa **GEODIS v. 2.5** (Posada et al. 2000). Se calculó la distancia geográfica promedio de los haplotipos al centro de cada clado, llamada distancia de clado ( $D_c$ ), esta distancia mide la distribución espacial del clado. También se estimó la distancia del clado anidado ( $D_n$ ) que cuantifica que tan lejos se ubica un haplotipo (o clado) con respecto a aquellos haplotipos (o clados) con los cuales se ha anidado (Templeton 2004). La correspondencia de los clados internos y externos con respecto a la estructura del clado anidado para todos los haplotipos y su relación con la distancia geográfica fue determinada a través de 10,000 permutaciones, obteniendo de esta manera la significancia estadística para aceptar o rechazar la hipótesis nula de no asociación geográfica. Para interpretar los resultados se usó la clave de inferencia de Templeton (2004) actualizada hasta noviembre 11 de 2005 (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>) de las asociaciones estadísticamente significativas entre los clados y la distancia geográfica.

En la versión automatizada del **NCPA** la primer etapa es generar la red de haplotipos empleando **TCS v1.18** a partir de un archivo *nexus* que incluye en la etiqueta de cada individuo un número que señala la localidad a la que corresponde. Este número en otro archivo especifica la información geográfica como tamaño de la muestra, latitud, longitud y radio de cada localidad muestreada y áreas habitables no muestreadas en el área de estudio. La latitud y la longitud se escriben en grados decimales y el radio se especifica en km. El radio mide el área del ámbito hogareño. La segunda etapa es ejecutar el algoritmo de anidamiento que requiere el archivo *graph* generado en **TCS** y el archivo que contiene la información geográfica. El algoritmo de anidamiento entonces reconstruye la red de haplotipos y crea un perfil de la distribución de la población. Siguiendo las reglas descritas en Panchal y Beaumont (2007), el algoritmo de anidamiento crea un diseño anidado jerárquico (clados). A partir de este diseño, se crean cuatro archivos de salida. El primero es el archivo de entrada para **GEODIS v2.2** (Posada et al. 2000), el segundo archivo es también un archivo de entrada para Geodis pero la información geográfica esta dada en forma de una matriz de distancias (en km). El tercer archivo es una representación del diseño anidado en sintaxis GML (el formato usado por TCS para escribir el archivo *graph*). El cuarto archivo contiene un resumen del diseño de anidamiento. El archivo de anidamiento provee los números de identificación de cada haplotipo/clado y el orden en que cada haplotipo/clado fue anidado, permitiendo verificar el diseño del anidamiento. La tercera etapa calcula los estadísticos de distancia con **GEODIS v2.2** y su significancia a través de la permutación. Y la última etapa es la interpretación automatizada de la clave de inferencia que requiere los archivos de entrada y salida de **GEODIS v2.2**, el diseño anidado GML y el archivo de información geográfica. La clave de inferencia automatizada produce dos archivos de salida. El primero es un resumen de la

distribución de la población, la distancia estadística y su significancia. El segundo archivo de salida contiene una serie de preguntas seguido de la inferencia de cada clado.

Se empleó la prueba de Mantel (Mantel 1967) para evaluar un posible escenario de aislamiento por distancia en los diferentes linajes de *P. leprosa* obtenidos durante los análisis filogenéticos. La matriz de distancia geográfica (en km) entre las muestras fue generada con el programa **GEODIS v.2.5** (Posada et al. 2000). La matriz de distancia genética (corregida con MV) fue generada en **PAUP\* 4.0d81** (Swofford 2002). La prueba de Mantel se realizó con el software **GENALEX v.6.1** (Peakall y Smouse 2006) con 999 permutaciones para estimar la probabilidad de una correlación con un índice de confianza del 95%. Martínez-Solano et al. (2006) mencionan la importancia de analizar visualmente las gráficas obtenidas, ya que bajo el modelo poblacional *Stepping-stone*, los escenarios de aislamiento por distancia reflejan un equilibrio entre migración, flujo génico y deriva génica. Por tanto las gráficas proporcionan información sobre el papel que juegan la deriva y el flujo génico sobre la distribución espacial de la variabilidad genética.

### 5.5.3 Dinámica histórica de la población

Se implementó un análisis de las diferencias pareadas de las secuencias (mismatch) en el programa **ARLEQUIN v.2.000** (Schneider et al. 2000). Este análisis permite hacer inferencias de eventos demográficos antiguos, debido a que los cambios poblacionales tienden a dejar marcas reconocibles en los patrones de diversidad nucleotídica (Rogers y Harpending 1992). La genealogía de una población en crecimiento constante o en equilibrio se espera que tenga ramas largas y profundas y las mutaciones que ocurren en esas ramas pueden ser compartidas

por diversos linajes que pueden resultar en una distribución irregular de las diferencias pareadas de las secuencias (distribución multimodal). Por otro lado, la genealogía de una población que ha tenido un crecimiento sustancial tiene ramas largas terminales y las mutaciones que ocurren en esas ramas (podrían ser muchas) generalmente específicas a un linaje representadas en una distribución unimodal. De esta manera las diferencias pareadas en las secuencias contienen información acerca de la historia de la población.

El ajuste de los datos al modelo de sitios infinitos y la prueba de neutralidad de McDonald-Kreitman para evaluar selección entre los clados principales al comparar la proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas fueron calculados en **DNASP 4.20.2 (Rozas et al. 2003)**. La prueba neutralidad de Fu (1997) y la  $D$  de Tajima (1989) fueron realizadas en cada uno de los grupos identificados. Los resultados de estas pruebas son complementarios con el análisis mismatch, ya que si hay un valor negativo estadísticamente significativo, éste es considerado como una señal de expansión poblacional reciente. Las pruebas fueron ejecutadas con 10,000 réplicas en **ARLEQUIN v.2.000** (Schneider et al. 2000).

Se utilizó el programa **FLUCTUATE** (Kuhner et al. 1998) para estimar el tamaño poblacional en los diferentes linajes encontrados en *P. leprosa*. El tamaño poblacional esta representado por la tasa exponencial de crecimiento ( $g$ ) y el valor de  $\Theta$  ( $4N_e\mu$  para una población diploide). El método genera estimaciones de máxima verosimilitud del parámetro de  $g$  y su desviación estándar y es más sensible al cambio demográfico ya que valores bajos o negativos de  $g$  indican si el tamaño de la población esta disminuyendo. En el caso de los métodos de distribución pareada dicha estimación puede fallar debido a que se confunde la influencia de la

estructura genealógica. Así, una población se considera en expansión si  $g > 3 \text{ SD}$  (Lessa et al. 2003), ya que el método tiene un ligero sesgo a incrementar la estimación de  $\Theta$  debido a la correlación de los parámetros (Kuhner et al. 1998). Se emplearon 10 cadenas cortas de 1000 generaciones y 10 cadenas largas de 20,000 generaciones con un valor inicial de  $g = 0$ . Se realizaron 50 corridas adicionales con diferentes números de semilla para corroborar la consistencia en los datos.

#### 5.5.4 Tiempo de divergencia

Se empleó la prueba de Likelihood Ratio Test (LRT) para conocer si la variación genética entre los taxa del grupo *P. leprosa* tenía una tasa de evolución constante (reloj molecular global). El likelihood ratio statistic ( $\Delta$ ) es la proporción de verosimilitud entre la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) y la hipótesis nula ( $H_0$ ). Siguiendo la fórmula:

$$2\Delta = L_1 \text{ sin reloj} - L_0 \text{ con reloj}$$

Donde  $L_1$  es la máxima verosimilitud de  $H_1$ , y  $L_0$  es la máxima verosimilitud de  $H_0$ . En el caso de estas hipótesis (que se consideran anidadas),  $2\Delta$  se distribuye de manera similar a una Chi-cuadrada ( $X^2$ ). Los grados de libertad ( $n-2$ , donde  $n$  es el número de secuencias empleadas en el análisis) constituyen la diferencia en el número de parámetros de las dos hipótesis. El árbol de verosimilitud (que incluye las 103 secuencias y no tiene grupo externo) fue obtenido con el programa **GARLI v.0.951** (Zwickl y Balhoff 2006) empleando los parámetros default. El árbol se enraizó en el programa **TREEVIEW ppc v.1.6.6**. (Roderic 1996), seleccionando la secuencia de Tres Mogotes (que en los análisis filogenéticos presenta una posición basal y

tiene la mayor divergencia genética) y posteriormente fue importado junto con la matriz de caracteres a **PAUP\* 4.0d81** (Swofford 2002) donde se ejecutó la prueba LRT.

El análisis de inferencia Bayesiano implementado en **BEAST 1.4.6** (Drummond y Rambaut 2007) fue empleado para estimar el tiempo al ancestro común más reciente (TMRCA) en los subclados identificados de ADNmt, los clados y para todo el grupo *P. leprosa* empleando una matriz de datos (103 secuencias) sin grupo externo. También se empleó una secuencia de *P. firscheini* en un análisis adicional para conocer el TMRCA entre *P. leprosa* y su grupo hermano. Mueller (2006) reportó en pletodóntidos una de las varianzas más grandes (entre 0.003 a 0.008/sitio/millón de años) para el gen citocromo *b* respecto a la tasa de evolución molecular en comparación con otros genes mitocondriales. Por tanto, para cubrir los rangos encontrados por Mueller (2006), los tiempos de divergencia y sus intervalos de credibilidad se escogió un modelo de reloj molecular relajado (Log normal no correlacionado, Drummond et al. 2006) y **no** se empleó una tasa de sustitución fija sino que se le especificó en el *Prior Mean Rate* una distribución normal de 0.005 por sitio por millón de años (equivalente a 1% de divergencia entre dos secuencias por millón de años) y una varianza de 0.001 que abarca de 0.003 a 0.008 sustituciones/sitio/millón de años (0.6% a 1.6% por millón de años). Adicionalmente se realizó un análisis fijando la tasa a 0.007/sitio/millón de años (1.4% de divergencia entre dos secuencias por millón de años) para probar si bajo el escenario de una tasa de sustitución relativamente rápida, eventos geológicos y climáticos recientes (pleistocénicos) pudieron estar involucrados en la historia filogenética de la especie. Para cada tasa de mutación se empleó el modelo de evolución de secuencias TIM + I (especificado manualmente en el archivo XML generado por el programa **BEAUTY**) y el modelo de coalescencia Bayesiano **Skyline** con diez grupos y en el caso del *Clado II* que cuenta con sólo

seis secuencias se emplearon cinco grupos. Los análisis se realizaron con 30 millones de generaciones, muestreando cada 1000 con varias corridas para optimizar los factores de algunas funciones a *priori* que marca el programa. La convergencia y estabilidad de los parámetros fue revisado empleando **TRACER 1.4** (Rambaut y Drummond 2007).

#### 5.5.5 Evaluación de hipótesis de fragmentación genética

En el trabajo de Lynch et al. (1983) basado en el análisis de aloenzimas, se encontraron distancias genéticas muy grandes entre las poblaciones del Cofre de Perote (21) respecto al Pico de Orizaba (19), a pesar de que actualmente no existe evidencia climática, geográfica o de distancia (70 km) que constituyan una barrera (Fig. 3). Distancias genéticas grandes también fueron reportadas para la población de Tlaxco (23) respecto al grupo central Malinche (15) que se encuentra a solo 50 km (15), donde las condiciones climáticas y de vegetación para ambas localidades son similares. Con base en estas premisas y para conocer las relaciones genéticas entre los linajes del norte (Cofre de Perote y Tlaxco) respecto a las poblaciones centrales (Malinche y Pico de Orizaba), se plantearon las siguientes hipótesis:

- a)  $H_0$ : Ha existido una fragmentación reciente (cientos/miles de años) entre las poblaciones del norte (21 y 23) respecto a las del grupo central (15 y 19) y la alta divergencia genética se debe a la retención de haplotipos ancestrales.
  
- b)  $H_1$ : La fragmentación de la poblaciones del norte respecto a las del centro ha sido antigua y, a pesar de la cercanía geográfica, entre estas poblaciones, no han estado en contacto por mucho tiempo (millones de años).

Estas hipótesis se probaron empleando el análisis de *árboles de genes* vs. *de árboles de poblaciones* usando el programa **MESQUITE v.2.0.1** (Maddison y Maddison 2007). El programa utiliza coalescencia para discernir entre topologías de árboles de genes dentro de árboles de poblaciones. Para la ejecución del programa, se incluyó la matriz de datos y un árbol de genes de Máxima Verosimilitud obtenido con el programa **GARLI v.0.951** (Zwickl y Balhoff 2006). Una vez cargada la matriz y el árbol, se incluyeron todas las secuencias de ADNmt y estas fueron organizadas en cinco grupos principales. El grupo del centro constituido por poblaciones poco diferenciadas (localidades 1 a la 16 en Fig. 3), el grupo del este (localidades 17 a 19), el grupo del noreste (20-21), el grupo norte (22 y 23), y la población de Tres Mogotes (24) no incluida en el trabajo de Lynch et al. (1983). Se generó una asociación entre el bloque de poblaciones y el bloque de secuencias y se estimaron las posibles topologías. La búsqueda y elección de la mejor hipótesis se realizó empleando el criterio “*Minimize Deep Coalescens Species Tree*” que mide la discordancia entre el árbol de genes y el árbol de poblaciones, asumiendo que esta discordancia se debe a un sorteo de linajes incompleto.

### 5.5.6 Tamaño efectivo de la población.

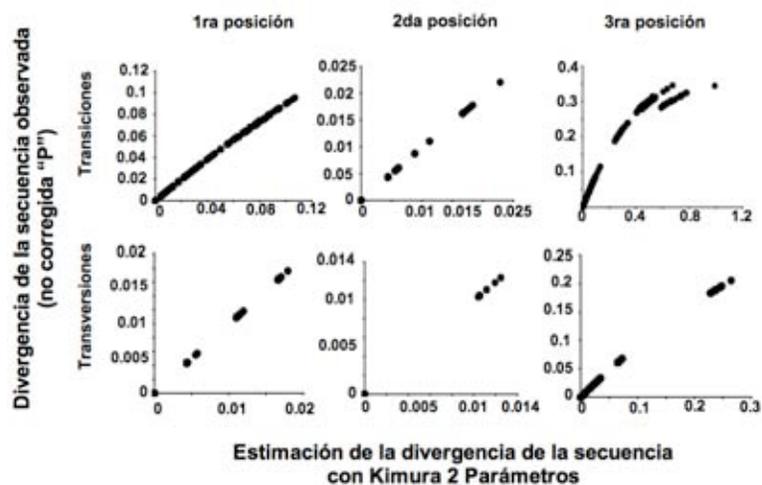
Se estimó el tamaño efectivo de la población ( $\theta = 2\mu N_F$ ) y la tasa de migración ( $M = 2m N_F$ ) para las poblaciones del norte respecto a las del centro y este con el programa **MIGRATE 2.1.3** (Beerli y Felsenstein 2001). El programa emplea una prueba de verosimilitud (likelihood ratio test) junto con la teoría de coalescencia para evaluar los parámetros. Asimismo, emplea el análisis de Cadenas de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC) para hacer la búsqueda a través de la genealogía. Se suponen tamaños constantes efectivos para cada población y también permite tamaños diferentes, 10 cadenas cortas con 5,000 genealogías muestreadas por cada una y tres cadenas largas con 50,000 genealogías muestreadas por cada una. Los parámetros de calentamiento fueron los default (2.0.) y se repitieron 12 corridas para verificar la consistencia de los resultados.

## 6. RESULTADOS

Se obtuvieron 103 secuencias de 687 pb del gen mitocondrial citocromo *b* (cyt *b*). Sesenta y dos caracteres fueron variables de los cuales 61 fueron filogenéticamente informativos. Se determinó la presencia de un total de 31 haplotipos únicos. No hubo inserciones ni deleciones. La composición de nucleótidos presenta mayor proporción A-T (A 0.28, T 0.35, C 0.22 y G 0.15). El 92% de todas las mutaciones fueron transiciones y el 8% fueron transversiones. El 85% de los cambios ocurrieron en la tercera posición del codón, las mutaciones de las primeras y segundas posiciones presentan cambios de 13% y 2%, respectivamente. Los resultados de las distancias no corregidas “*P*” versus distancias obtenidas con el modelo Kimura-2 (Kimura, 1980) para cada posición de codón mostraron que las relaciones son

lineales para las primeras y segundas posiciones en transiciones. La tercera posición en transiciones esta ligeramente desviada del patrón linear, sin embargo se considera bajo el nivel de saturación de las bases (Fig. 4), por tanto se dio el mismo peso a todos los cambios.

La divergencia ( $P$ ) entre los haplotipos de *P. leprosa* varió entre 0.146% y 5.205%. La divergencia ( $P$ ) de las secuencias entre el grupo externo (*P. firscheini*) y el grupo interno varió entre 6.63% y 8.51% (Anexo III).



**Fig. 4.** Gráficas de saturación de las secuencias (no corregidas) en transiciones y transversiones en primeras, segundas y terceras posiciones contra estimaciones de diferencias por pareja obtenidas con Kimura 2 parámetros para la misma clase de sustituciones.

### 6.1 Análisis filogenético

La búsqueda heurística de MP identificó 4128 árboles igualmente parsimoniosos ( $L = 227$  pasos; índice de consistencia = 0.55; índice de retención = 0.64). El consenso estricto de esos árboles y los valores de apoyo de Bootstrap (bs) para los nodos se muestran en la figura 5. En este análisis se identificaron dos clados principales para el grupo *P. leprosa*, los cuales fueron

denominados *Clado I* y *Clado II*; la monofilia de los clados tuvieron apoyo de bajo a moderado (bs = 57 para el *Clado I*; y bs = 77 para el *Clado II*). La distancia genética (corregida MV) entre los clados *I* y *II* fue de 2.3% entre las poblaciones de Tlaxco (23) y Atzompa (9) hasta 3.4% entre las localidades de Las Vigas (20) y Río Frío (11) [Anexo III].

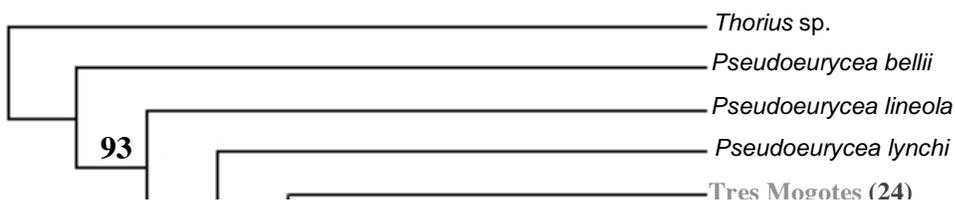
Las muestras del *Clado I* se distribuyen ampliamente en el centro y este del sector Oriente de la Faja Volcánica Transmexicana (FVT). La distribución geográfica de las poblaciones del clado abarcan aproximadamente 280 km en línea recta (dirección oeste-este) desde la localidad de Nevado de Toluca (1) en el Estado de México hasta Xometla (19) en el estado de Veracruz (Fig. 3). Las distancias genéticas (corregidas MV) dentro del *Clado I* van de 0 a 1.7% (entre el Nevado de Toluca [1] y Xometla, Veracruz [19]).

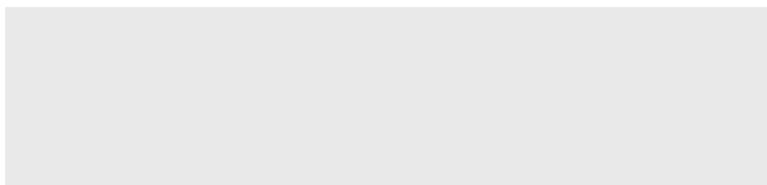
El *Clado I* esta conformado a su vez por dos subclados con valores de apoyo bajos. Por una parte el subclado Este conformado por las poblaciones Texmalaquilla, Texmola y Xometla (17, 18 y 19) en los límites de los estados de Puebla y Veracruz con un valor de apoyo bajo (bs = 69) y una divergencia de 0.14 a 0.43% entre las muestras. El subclado Centro tiene un valor de apoyo bajo (bs = 60) y se caracteriza por la no resolución dado que forma una politomia. La divergencia entre las secuencias al interior del clado varía de 0.14 a 0.87%.

El *Clado II* esta conformado por las poblaciones que se distribuyen en la región norte del sector Oriental de la FVT, y abarca aproximadamente unos 100 km en línea recta (dirección este-oeste) desde la localidad de las Vigas (20) en Veracruz hasta la Sierra de Tlaxco (23) en el límite de los estados de Tlaxcala y Puebla (Fig. 3). Los valores de apoyo son moderados para el *Clado II* (bs = 77) y las relaciones entre los haplotipos al interior del clado no

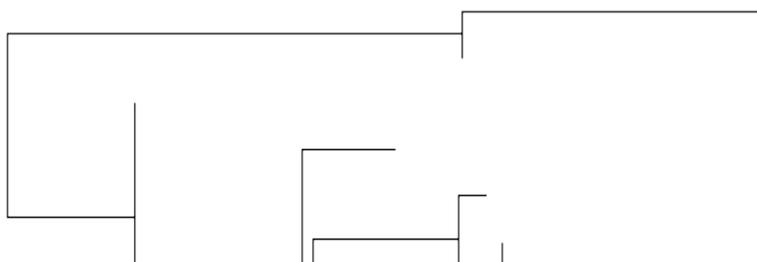
corresponden con su distribución geográfica ya que los haplotipos (*ab* y *af*) de Tlatlauquitepec (23), se agrupan cada uno en subclados diferentes (Fig. 5). La menor distancia genética es de 0.2% y ocurre dentro de la población de Las Vigas (20) y la distancia genética más grande es de 2.7% entre Tlatlauquitepec (22) y Las Vigas (20) y entre los haplotipos de Tlatlauquitepec (*ab* y *af*).

El análisis también revela que hay dos haplotipos basales a los clados *I* y *II*. El haplotipo Y presente en la localidad de Las Vigas (20) y en Teziutlán (21) tiene una divergencia máxima de 3.2% con respecto a los haplotipos *ac* y *ad* de Las Vigas (20). El haplotipo Z presente en la localidad de Tres Mogotes (24) está ubicado 110 km al sur de Las Vigas, es la única localidad que queda fuera de la FVT, es la población más basal a todo el grupo y presenta una distancia genética máxima de 5.2% respecto al *Clado II*.

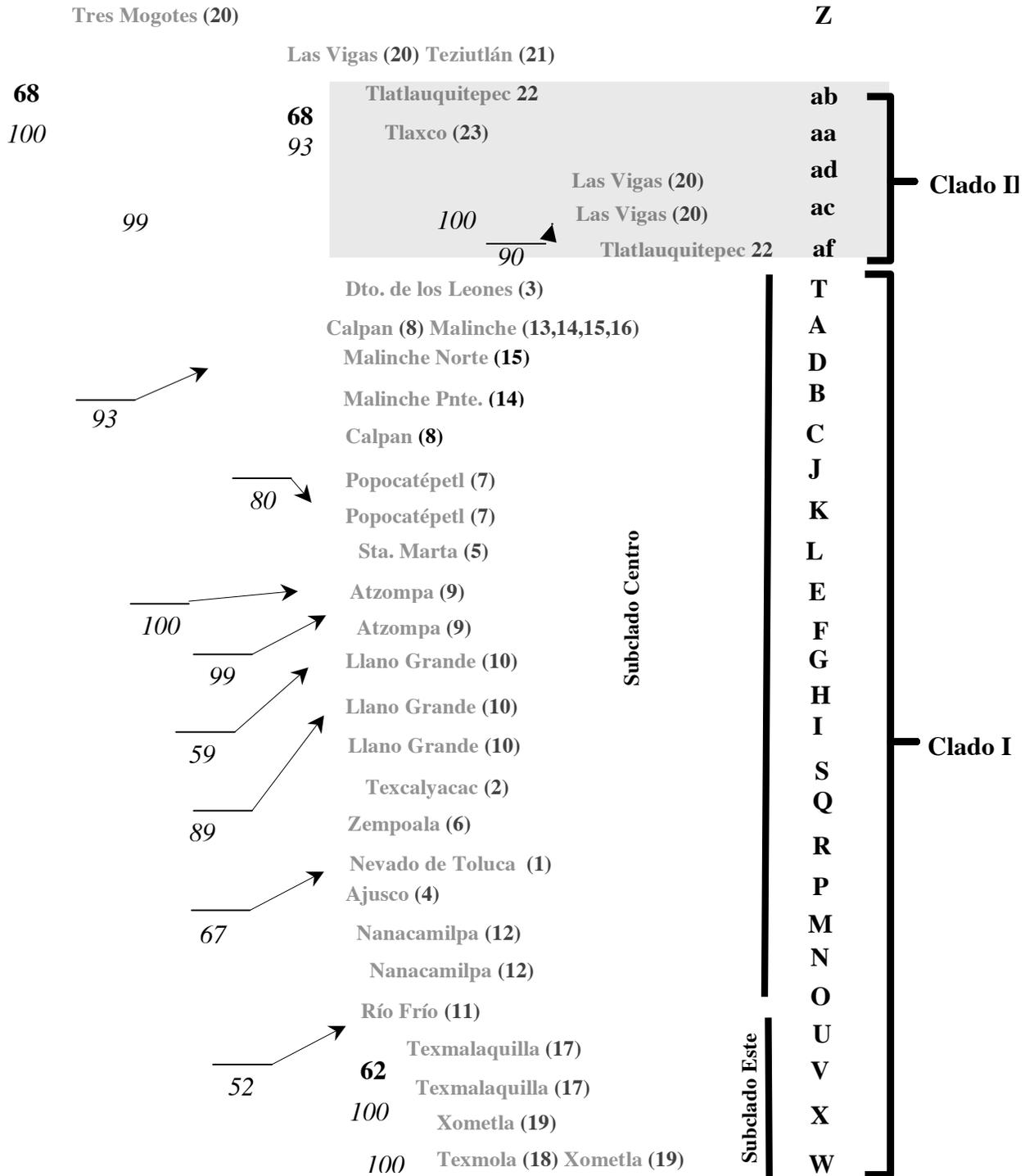




**Fig. 5.** Árbol de consenso estricto (Máxima Parsimonia) para 31 haplotipos ( $L= 227$  pasos;  $IC=0.55$ ;  $IR = 0.64$ ). Los valores de apoyo de Bootstrap se muestran en la parte superior de los las ramas. Para cada haplotipo se señala la localidad donde se encontró y se le asignó una/s letra/s para identificarlo, misma/s que se muestran a la derecha. Los números en el paréntesis están relacionados con el mapa de la Fig. 3.



**Y**



**Fig. 6.** Árbol de Máxima Verosimilitud estimado con el modelo de sustitución TIM+I para 31 haplotipos. Arriba de las ramas se indican los valores de Bootstrap de ML. Por debajo de las ramas se indican las probabilidades posteriores del análisis Bayesiano. Los números en el paréntesis están relacionados con el mapa de la Fig. 3.

El resultado de la prueba Hierarchical Likelihood Ratio Tests (hLRTs) indicó el modelo de Tamura y Nei + Sitios Invariables + distribución Gama (TrN+I+G) como el más adecuado.

Mientras que por el Criterio de Información Akaike (AIC) fue seleccionado el Modelo Transicional + Sitios Invariables (TIM+I). De ambos modelos, se escogió el modelo TIM+I para realizar los análisis debido a que en la prueba de Likelihood Ratio Test fue el modelo con mejor ajuste. El análisis de Máxima Verosimilitud generó un árbol único. Se recuperaron los mismos clados principales que en MP y la principal diferencia entre ellos fueron cambios mínimos en la posición de las ramas internas dentro de cada clado. Los análisis de Bootstrap muestran un apoyo bajo al *Clado II* (bs = 68) y al subclado Este (bs = 62) mientras que el resto de los grupos tuvo valores menores al 50% (Fig. 6).

Las cuatro corridas independientes del análisis Bayesiano (1000, 2000, 5000 y 8000 generaciones) convergieron en estimaciones similares. La verosimilitud después del “burn-in” no presenta cambios significativos entre las generaciones de una misma corrida. La topología resultante es similar al análisis de MV recuperando los mismos clados. Se observó un apoyo alto de probabilidades posteriores (PP) en el árbol de consenso de 5000 árboles para la posición del haplotipo *Z* (PP = 100) de la localidad de Tres Mogotes, la posición del haplotipo ancestral *Y* (PP = 99) de la localidad de Las Vigas, el *Clado I* (PP = 100), un subclado del *Clado II* (PP = 100) conformado por tres haplotipos (*ad*, *ac* y *af*) y el subclado Este (PP = 100). Las probabilidades posteriores de los nodos recuperados se muestran en la figura 6.

## 6.2 Análisis genético

No se encontraron sitios con más de un cambio al comparar todas las secuencias, con lo cual los datos se ajustan al modelo de sitios infinitos. El resultado de la prueba de neutralidad de McDonald-Kreitman muestra ausencia de selección (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Divergencia y polimorfismo para diferencias sinónimas y no sinónimas.

	<i>Clado I vs Clado II</i>		subclado Centro vs subclado Este	
	Divergencia	Polimorfismo	Divergencia	Polimorfismo
Sinónimos	<b>1</b>	34	<b>2</b>	15
No sinónimos	<b>0</b>	8	<b>0</b>	5

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y haplotípica ( $h$ ) varió entre 0.002/0.750 en el subclado Este y 0.017/0.933 para el *Clado II* (Cuadro 2). La diversidad haplotípica para todo el grupo fue alta (0.939). Se encontró un total de 8.88% sitios polimórficos (segregantes).

**CUADRO 2.** Diversidad genética por linaje identificado en el análisis filogenético.

Linaje ADNmt	N	No. de haplotipos	Diversidad haplotípica ( $h$ )	Sitios polimórficos (S)	Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )
<i>Clado I</i>	92	24	0.926 (0.013)	29	0.006 (0.003)
Subclado Centro	84	20	0.913 (0.016)	23	0.004 (0.002)
Subclado Este	8	4	0.750 (0.139)	3	0.002 (0.001)
<i>Clado II</i>	5	5	0.933 (0.121)	22	0.017 (0.010)
Toda la distribución	103	31	0.939 (0.011)	61	0.010 (0.005)

La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

**CUADRO 3.** Análisis de varianza molecular (AMOVA).

ANÁLISIS	G.L.	V (%)	<i>Physt</i>	<i>P</i>	<i>vs</i>	<i>Fst</i>	<i>P</i>	
AMOVA 1	Entre grupos ( <i>Clado I</i> , <i>Clado II</i> )	1	74.09	$\Phi_{ST}=0.965$	0.000	>	$F_{ST}=0.719$	0.000
	Entre poblaciones dentro de grupos	20	22.49	$\Phi_{SC}=0.868$	0.000	>	$F_{SC}=0.728$	0.000
	Dentro de poblaciones	76	3.42	$\Phi_{CT}=0.740$	0.000	>	$F_{CT}=-0.033$	0.712
AMOVA 2	Entre Grupos del <i>Clado I</i> (subclado Centro y subclado Este)	1	61.19	$\Phi_{ST}=0.970$	0.000	>	$F_{ST}=0.744$	0.000
	Entre poblaciones dentro de grupos	17	35.81	$\Phi_{SC}=0.922$	0.000	>	$F_{SC}=0.749$	0.000
	Dentro de poblaciones	73	3.00	$\Phi_{CT}=0.611$	0.000	>	$F_{CT}=-0.017$	0.679
AMOVA 3	Entre poblaciones dentro de un solo grupo: el <i>Clado II</i> .	2	29.39	$\Phi_{ST}=0.293$	0.168	>	$F_{ST}=0.214$	0.289
	Dentro de poblaciones.	3	70.61	----	----			
	Índices específicos por población al interior del <i>Clado II</i> :							
	Tlaxco			$\Phi_{ST}=0.679$		=	$F_{ST}=0.642$	
	Tlatlauquitepec			$\Phi_{ST}=0.596$		>	$F_{ST}=0.091$	
	Las Vigas			$\Phi_{ST}=-0.036$		<	$F_{ST}=0.153$	

Valor de  $P < 0.05$

G.L. = Grados de libertad.

Subíndices: ST = muestra/total; SC = muestra/grupos; CT = grupos/total

Se indica la existencia de flujo reciente si  $\Phi_{ST}$  es **mayor que**  $F_{ST}$ ; flujo génico antiguo si  $\Phi_{ST}$  es **menor que**  $F_{ST}$  o ausencia de flujo si  $\Phi_{ST}$  es **igual que**  $F_{ST}$ .

Los resultados del AMOVA sugieren que la mayor parte de la varianza se encuentra entre grupos (74.09%) y entre las poblaciones dentro de grupos (22.49%) sólo para el *Clado II* la varianza se encuentra dentro de poblaciones (70.30%) [Cuadro 3]. En general para todos los grupos se encontró flujo génico reciente excepto para la población de Las Vigas que mostró evidencia de flujo génico antiguo. La población de Tlaxco que aparece sin flujo génico se debe a que sólo se tiene colectada una muestra.

### 6.3 Dinámica histórica de la población

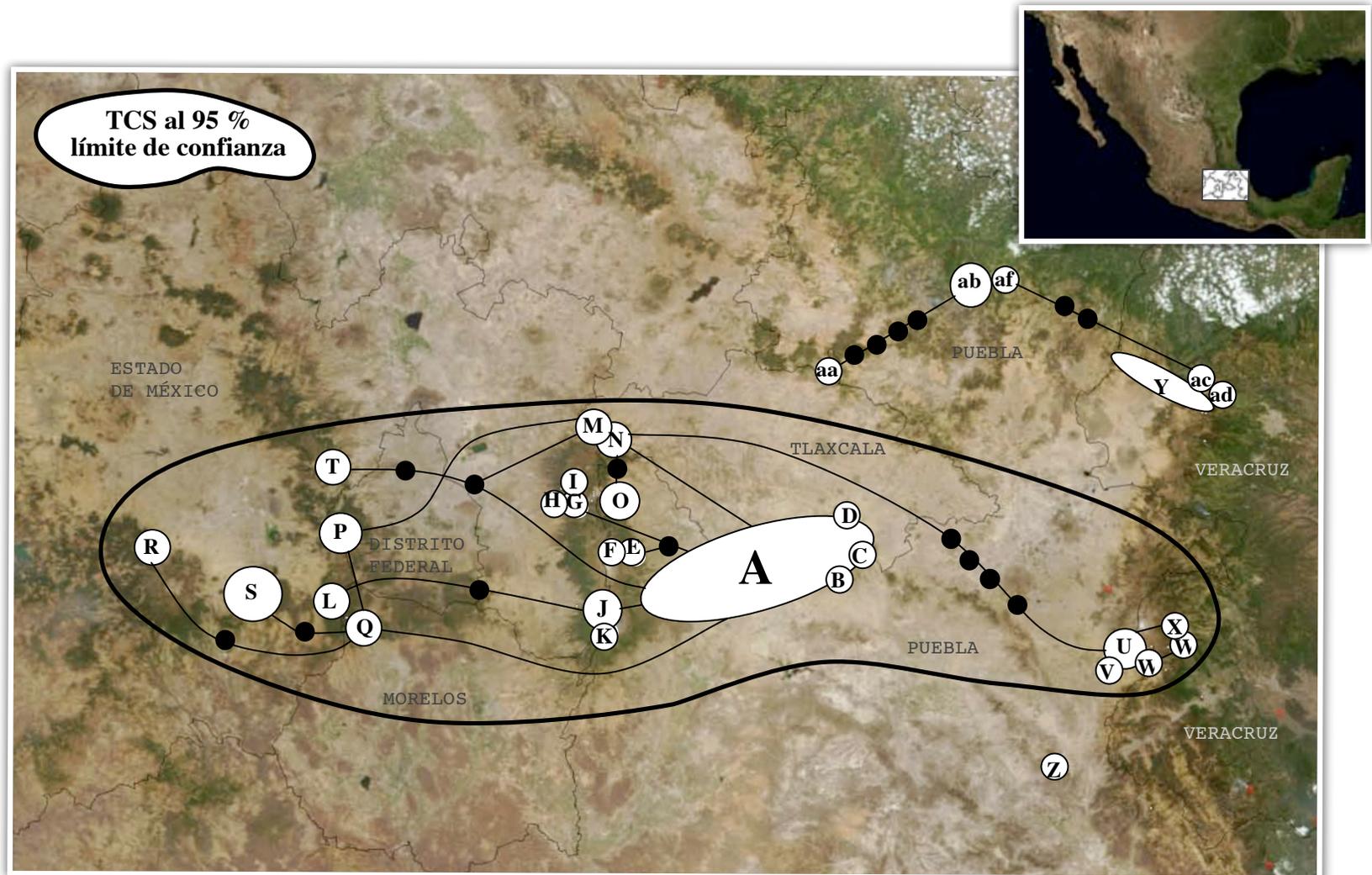
### 6.3.1 Red de haplotipos

Considerando un límite de confianza de 95% para el algoritmo de parsimonia (Templeton et al. 1987), de los 31 haplotipos identificados para todo el grupo de *P. leprosa* solamente 24 haplotipos (de 19 localidades) del *Clado I* pudieron ser conectados. Los cinco haplotipos del *Clado II* (*aa*, *ab*, *ac*, *ad* y *af*), el haplotipo ancestral (*Y*) de las localidades de Las Vigas, Teziutlán, Tlatlauquitepec y Tlaxco ubicados en la porción norte de la distribución de *P. leprosa* y el haplotipo de la localidad de Tres Mogotes (*Z*) ubicado en el sureste, quedaron fuera del límite de confianza del 95% (Fig. 7). Todos los haplotipos del grupo *P. leprosa* se unen formando una sola red cuando el límite de confianza se disminuye al 90%, pero al hacer el análisis de todo el grupo, los resultados son los mismos a los obtenidos con un límite de 95% de confianza para los haplotipos del *Clado I* y no son significativos para los haplotipos del *Clado II* ni para los haplotipos más basales *Y* y *Z*. Los 24 haplotipos del *Clado I* fueron conectados por 14 haplotipos inferidos (no observados). En la construcción manual, un total de 12 clados paso-1 fueron identificados, de los cuales siete contienen más de un haplotipo observado (cinco clados paso-1 presentaron un solo haplotipo). El cladograma quedó completamente anidado en el clado paso-4 que incluyó todos los haplotipos del *Clado I*. La red de haplotipos fue concordante con los análisis filogenéticos estimados. Los clados anidados 3-1 y 3-2 correspondieron exactamente a los clados del Centro y del Este identificados en las reconstrucciones filogenéticas (Fig. 8 I). Los haplotipos del clado anidado 3-1 (subclado Centro en la filogenia) se distribuyeron ampliamente ocupando 19 localidades desde el Parque Nacional Malinche en los límites entre Tlaxcala y Puebla hasta las faldas del Parque Nacional Nevado de Toluca. Los haplotipos del clado anidado 3-2 (subclado Este en la

filogenia) quedaron confinados a tres localidades en las faldas del Parque Nacional Pico de Orizaba y presentaron diferencias de hasta cinco pasos mutacionales respecto al clado 3-1. Tres clados anidados presentaron asociaciones geográficas significativas como resultado de la prueba de contingencia. La amplia distribución geográfica de los haplotipos del clado 2-5 y 3-1 dio como resultado “*colonización a gran distancia*” e incluyó haplotipos de la porción oeste y centro de toda la distribución. Esta inferencia se correlaciona con la pobre distribución del haplotipo más común, designado como “A”, que fue encontrado únicamente en 19 individuos de cinco localidades ubicadas en las montañas Iztaccíhuatl y Malinche en el clado Centro. La red de haplotipos mostró que los terminales de los clados se distribuyen más ampliamente en la geografía que el haplotipo ancestral (A) sugiriendo ampliación del rango de distribución. Fragmentación alopátrica fue el patrón inferido para explicar la distribución de todos los haplotipos en el cladograma total (Cuadro 4, Anexo IV).

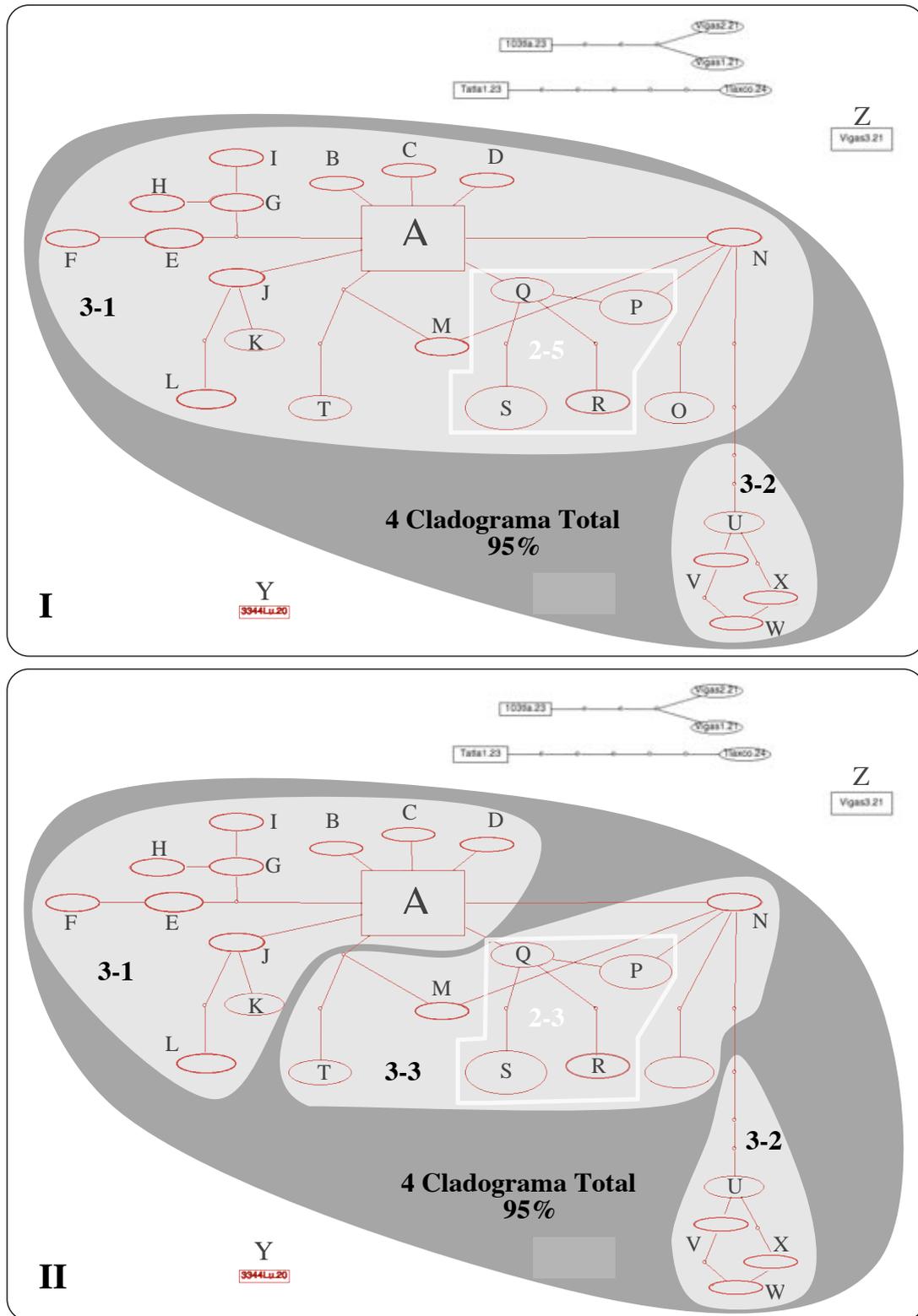
**CUADRO 4.** Inferencias demográficas a partir del Análisis de Clados Anidados realizada de modo manual (Templeton 2004) y automatizada (Panchal 2007) en *Pseudoeuerycea leprosa*.

	Clado	X <sup>2</sup> Significativa	Guía de inferencia	Patrón inferido
<b>Modo Manual</b>	1-8	13	1-2	Estado indeterminado de Interior/punta
	2-2	9	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	2-3	10	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	2-4	11	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	2-5	56	1-2-3-5-15-21 si	Colonización a gran distancia
	3-1	420	1-2-11-12-13 si	Colonización a gran distancia
	Cladograma Total	92	1-19 no	Fragmentación alopátrica
<b>Modo Automatizado</b>	1-10	13	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	2-1	9	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	2-2	10	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	2-3	56	1-19-20-2-11-12-13-14-no	Colonización a gran distancia y/o antigua fragmentación no necesariamente excluyentes
	2-4	7	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	2-5	9	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	3-1	79	1-19-20-no	Inadecuado muestreo geográfico
	3-3	76	1-2-10	Estado indeterminado de Interior/punta
	Cladograma Total	184	1-2-11-12-13-14-no	Colonización a gran distancia y/o antigua fragmentación no necesariamente excluyentes



**Fig. 7.** Red de haplotipos ubicado en la geografía. Se empleó el programa TCS a un nivel de confianza del 95%. Los círculos negros significan haplotipos faltantes.

**A.** Parque Nacional Malinche-Parque Nacional Iztaccíhuatl (8, 13, 14, 15 y 16); **B.** Poniente del Parque Nacional Malinche (14); **C.** Calpan Parque Nacional Iztaccíhuatl (8); **D.** Norte del Parque Nacional Malinche (15); **E-F.** Atzompa Parque Nacional Iztaccíhuatl (9); **G-H-I.** Llano Grande Parque Nacional Zoquiapan (10); **J-K.** Parque Nacional Popocatepetl (7); **L.** 8.5 oeste km de Santa Marta (5); **M-N.** Nanacamilpa (12); **O.** Río Frío Parque Nacional Zoquiapan (11); **P.** Parque Nacional Ajusco (4); **Q.** Parque Nacional Lagunas de Zempoala (6); **R.** Nevado de Toluca (1); **S.** Texcalyacac (2); **T.** Desierto de los Leones (3); **U-V.** Texmalaquilla (17); **W.** Texmola (18); **W-X.** Xometla (19); **Y-ac-ad.** Las Vigas (20); **Y.** Carretera a Teziutlán; **ab-af.** Tlatlauquitepec; **aa.** Tlaxco; **Z.** Tres Mogotes.



**Fig. 8.** Reconstrucción de NCPA. **I)** Manual. La inferencia para el cladograma total fue fragmentación **II)** Automatizada. La inferencia fue colonización a gran distancia o antigua fragmentación. Las letras denotan los haplotipos encontrados. Las redes y sus respectivos anidamientos se ven a detalle en el anexo IV.

En la reconstrucción automatizada realizada por el programa **ANeCa v1.0** (Panchal and Beaumont 2007), un total de 17 clados paso-1 fueron identificados, de los cuales cinco contuvieron más de un haplotipo observado (11 clados paso-1 presentaron un solo haplotipo y un clado no contiene haplotipos). La red de haplotipos concuerda en parte con los clados estimados en la filogenia. Los clados 3-1 y 3-2 constituyeron el clado del Centro y el clado 3-3 al clado del Este (Fig. 8 II). Tres clados anidados presentaron asociaciones significativas, la inferencia para el clado 2-3 indicó colonización a gran distancia. El clado 3-1 (diferente en cuanto a número de haplotipos incluidos respecto al clado 3-1 de la construcción manual), presentó fragmentación alopátrica. El patrón inferido para el cladograma total fue colonización a gran distancia o fragmentación pasada (no necesariamente excluyentes; Cuadro 4, Anexo IV).

Las diferencias encontradas en el NCPA se deben principalmente a la forma en que se rompen los ciclos (reticulaciones). Como el proceso de evolución no puede crear estas reticulaciones, entonces uno o algunos de los enlaces son falsos y no se conoce cuál es el verdadero. Por lo tanto, se deben seguir una serie de criterios para romperlos, para lo que Pfenninger y Posada (2002) señalan tres criterios: a) Criterio de frecuencia: los haplotipos se conectan a los de mayor frecuencia que a los haplotipos únicos. b) Topológico: los haplotipos se conectan con mayor probabilidad a haplotipos interiores que a haplotipos terminales y c) Geográfico: los haplotipos se conectan con mayor probabilidad a haplotipos de la misma localidad que a los haplotipos distantes. En el anidamiento manual se emplearon estos criterios para romper la reticulación entre los haplotipos A, T M y N. El haplotipo más frecuente fue el A, que es interior, el más alejado fue T y éste se unió con A y con M. Los haplotipos M y N pertenecen a la misma localidad, así que la unión se rompió entre T y M. El programa **ANeCA** rompió

la reticulación en el enlace de M y N (que son de la misma población) y agrupó el haplotipo M con el T (que son geográficamente distantes) en el clado 2-1; ello modificó todo el anidamiento y, como consecuencia, se generaron tres clados nivel 3 en lugar de los dos generados en la fase manual (Fig. 7). Ello ocasionó una diferencia en el número de inferencias (tres en la manual y dos en la automatizada).

Las pruebas de Mantel empleadas para evaluar la asociación geográfica y genética y para conocer la relación entre flujo génico y deriva (denotado por el valor de  $R^2$ ), resultaron no significativas para tres de las cuatro pruebas realizadas en los diferentes linajes (Fig. 9). El *Clado I* presentó una asociación significativa ( $P > 0.001$ ) entre la geografía y la variabilidad genética. El *Clado II* reveló un patrón de equilibrio entre flujo génico y deriva ( $R^2 = 0.01$ ) con distancias genéticas muy grandes (hasta 3.5%). El subclado Centro presentó el mismo patrón de equilibrio ( $R^2 = 0.01$ ) pero con distancias genéticas pequeñas (1%). El subclado Este presentó valores no significativos ( $R^2 = 0.60$ ).

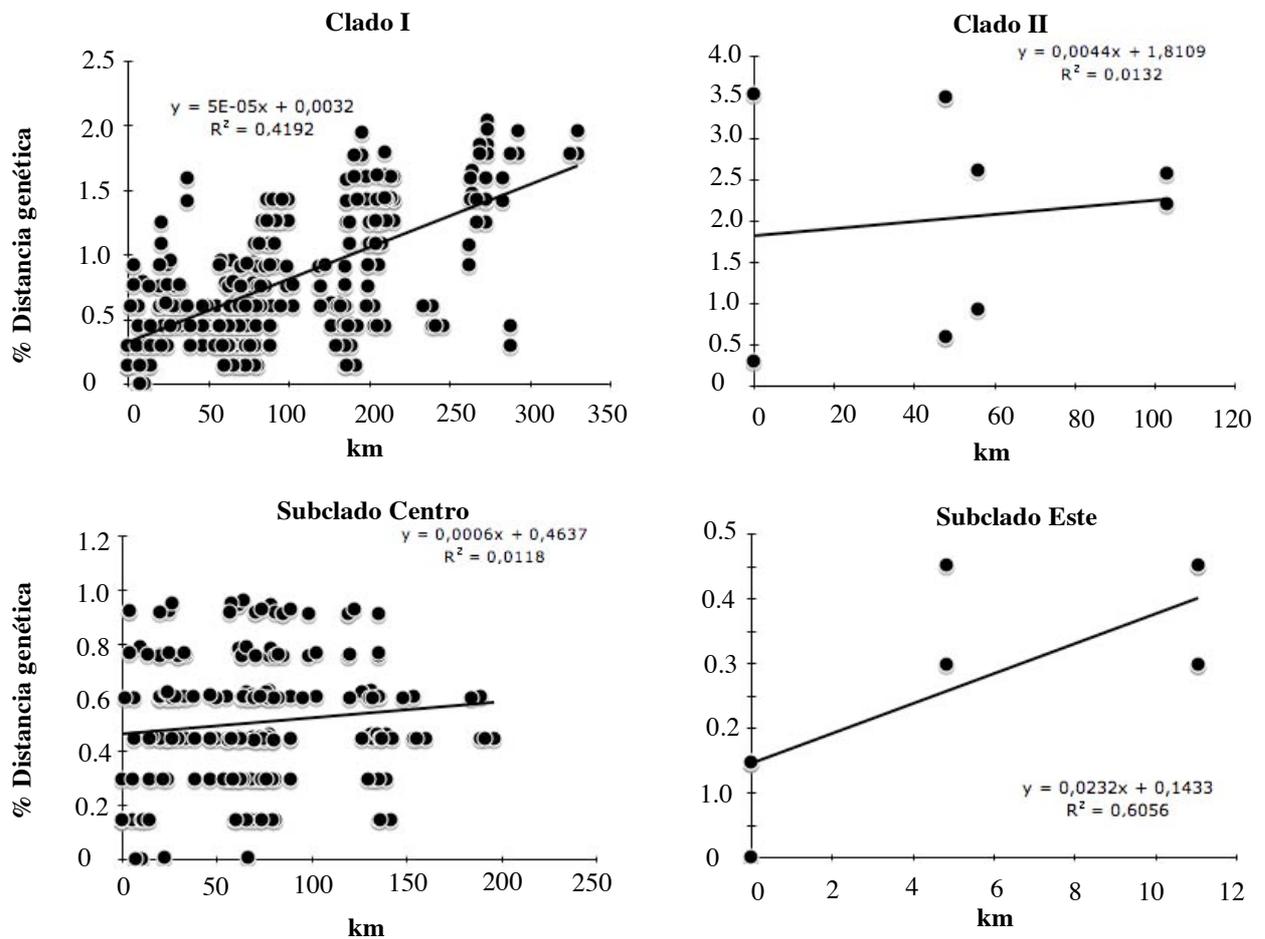


Fig. 9. Resultados de las pruebas de Mantel para los clados detectados en la filogenia.

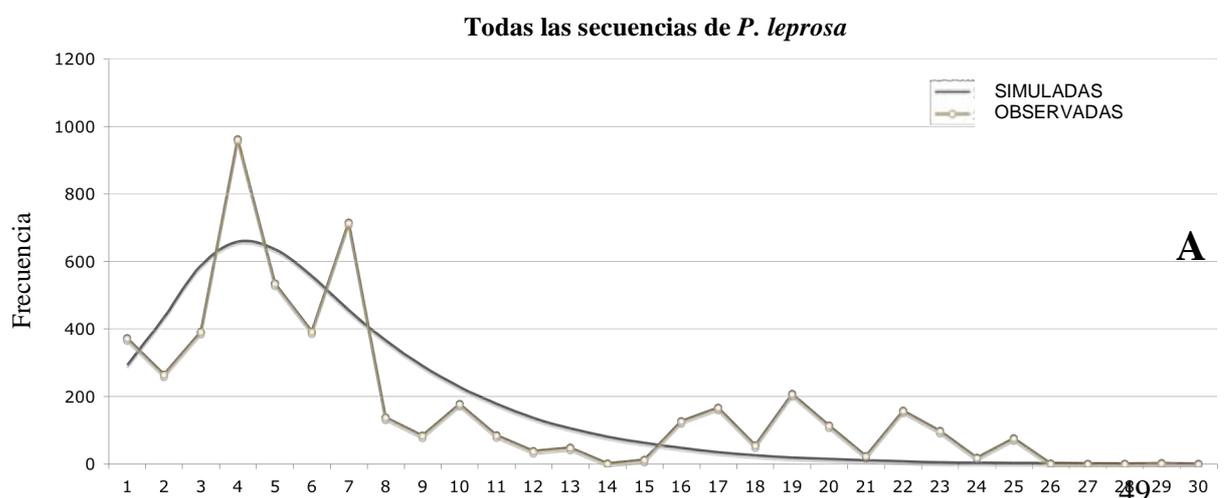
### 6.3.2 Distribución mismatch y pruebas de neutralidad

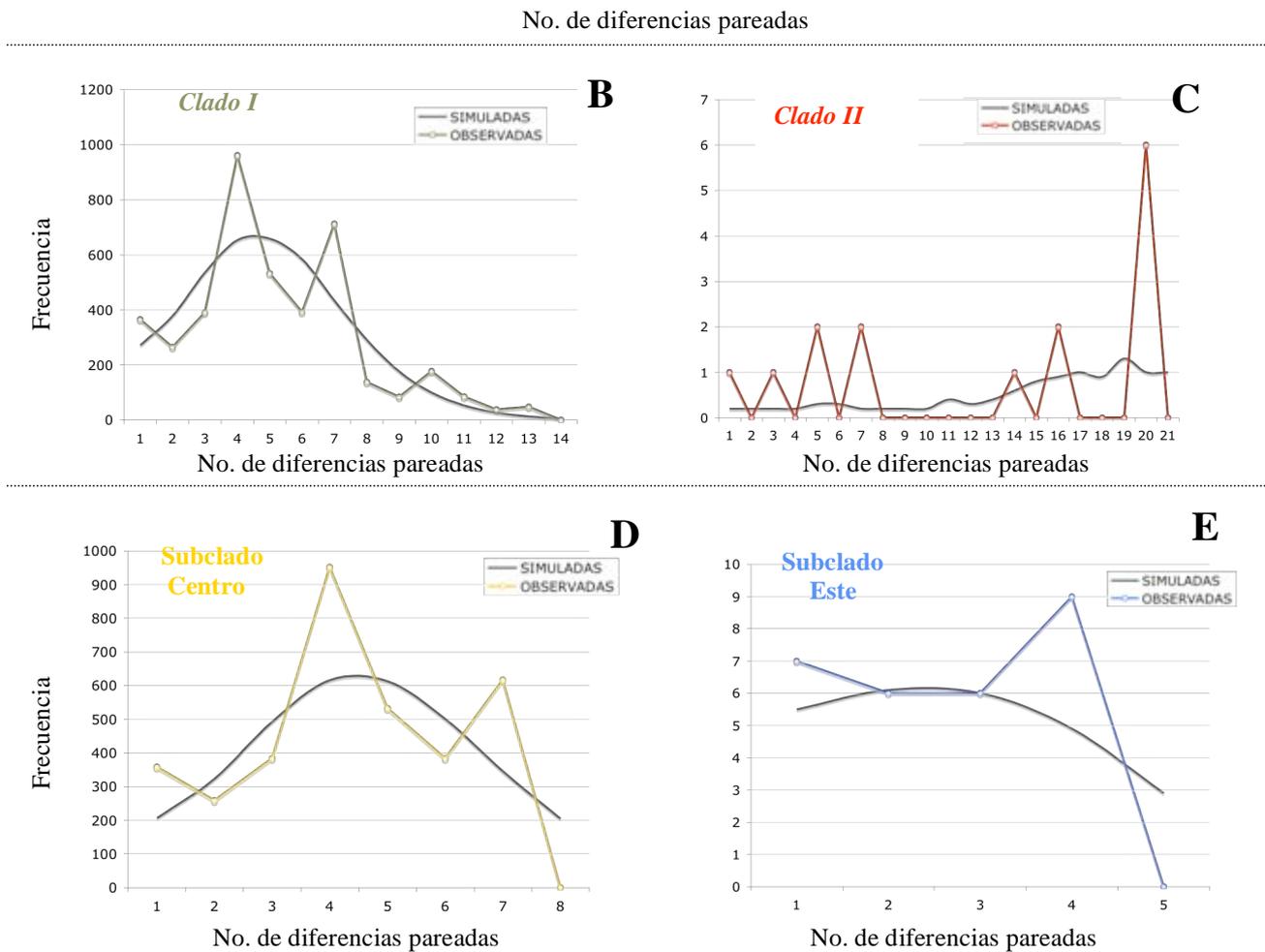
Las gráficas de distribución mismatch en general fueron multimodales para el grupo *P. leprosa* (Fig. 10A) así como para todos los linajes. Los valores de probabilidad (*P*) de la

suma de la desviación cuadrada (SSD) y el “Harpending’s Raggedness Index” (HRI) fueron significativos para casi todos los grupos (Cuadro 5). En todos los casos, las curvas de la distribución mismatch sobrepasaron los intervalos de confianza a cualquier valor de  $P$  (alfa 0.01, 0.05 ó 0.1), lo que sugiere que ningún linaje examinado se encuentra en expansión (Fig. 10). La distribución mismatch del *Clado I* (Fig. 10 B) presenta un menor número de curvas (tres) sin muchas diferencias (mutaciones) en comparación con el *Clado II* (Fig. 10 C) que presenta múltiples curvas y diferencias profundas. El subclado Centro y el subclado Este presentan el menor número de curvas (Figs. 10 D y 10 E). La prueba  $D$  de Tajima generó resultados similares para estos grupos (ningún valor fue significativo). El estadístico  $F_s$  de  $F_u$  resultó en valores negativos estadísticamente significativos para el *Clado I* y el subclado Centro.

**Cuadro 5.** Valores de confiabilidad (SSD y HRI) para la distribución mismatch ( $\alpha = 0.05$ ) donde  $\diamond$ =Significativo = la población **no** esta en expansión. Para  $F_s$  de  $F_u$  y  $D$  de Tajima = *Prob.  $F_s$  simulada*  $\leq$   *$F_s$  observada*) = \* Significativo = La población experimentó una expansión.

Linaje	SSD	P	HRI	P	$F_s$ de $F_u$	D Tajima
<i>Clado I</i>	0.01	0.04 $\diamond$	0.05	0.03 $\diamond$	-6.865 (0.015)*	-0.831 (0.230)
Subclado Centro	0.02	0.02 $\diamond$	0.08	0.01 $\diamond$	-5.748 (0.038) *	-0.826 (0.232)
Subclado Este	0.01	0.04 $\diamond$	0.05	0.03 $\diamond$	-0.283 (0.346)	1.600 (0.970)
<i>Clado II</i>	0.16	0.01 $\diamond$	0.44	0.1	1.110 (0.622)	1.495 (0.964)
Población total	0.01	0.14	0.04	0.04 $\diamond$	-6.040 (0.080)	-1.271 (0.086)



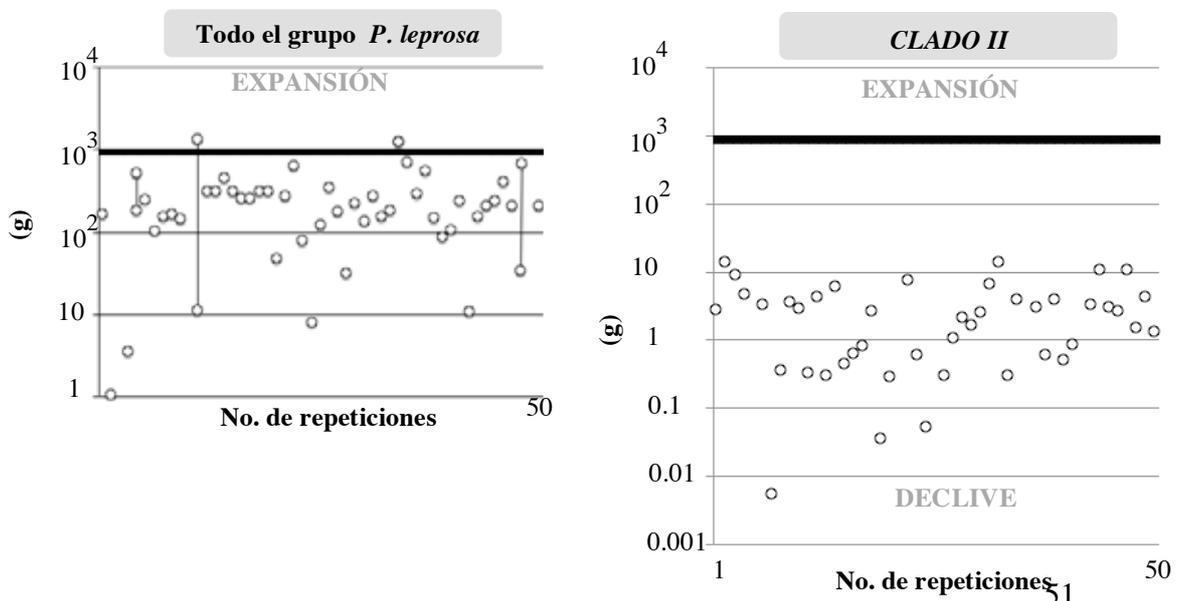


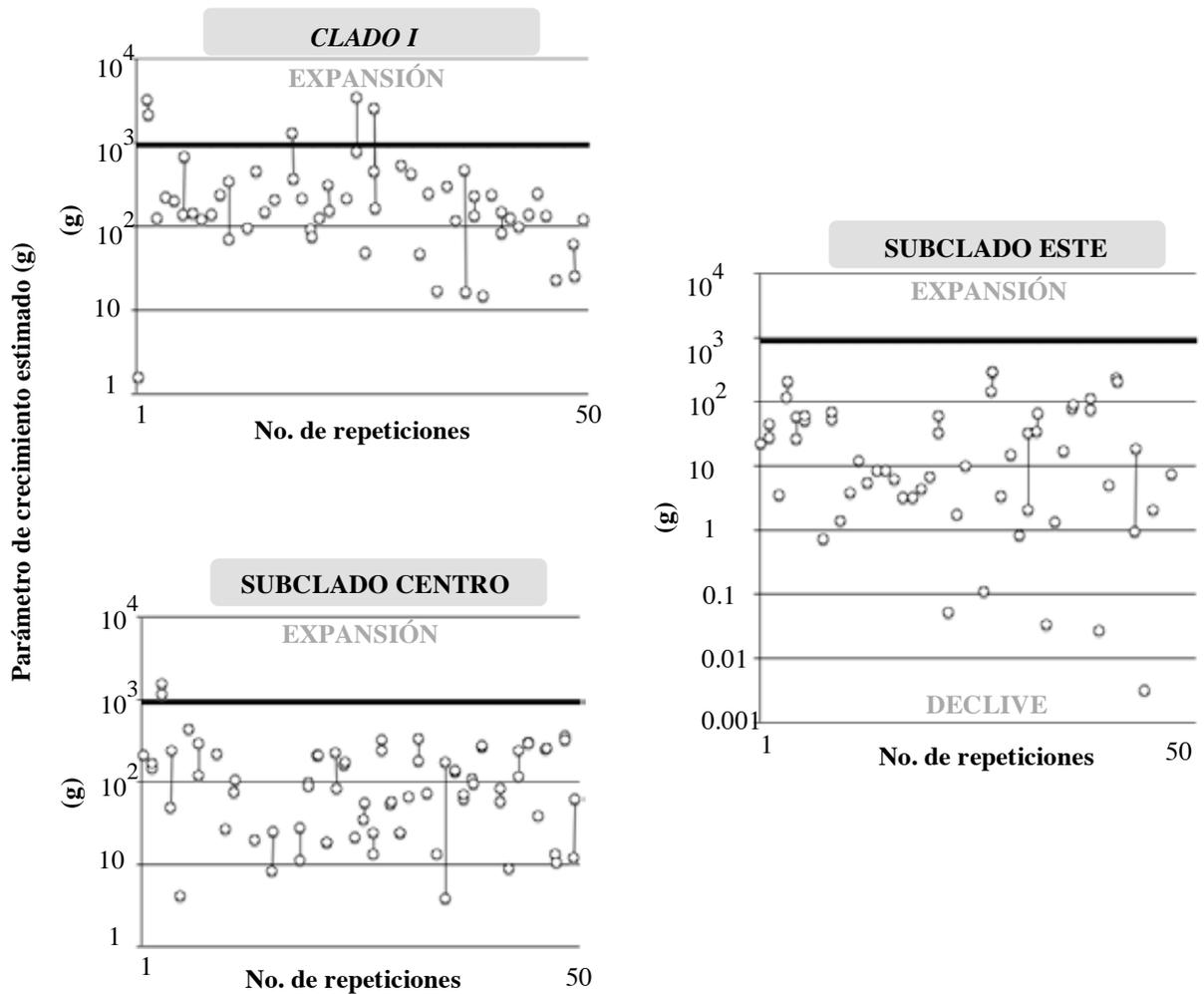
**Fig. 10.** Gráficas de distribución pareada (mismatch).

### 6.3.3 Estimaciones con coalescencia

Las estimaciones con base en el método de coalescencia implementado en el programa **FLUCTUATE v.1.4** (Kuhner et al. 1998) para detectar cambios demográficos históricos (expansión) no resultaron significativos para ninguno de los linajes de *P. leprosa* (Fig. 11). Los resultados obtenidos para todo el grupo *P. leprosa* no indican crecimiento poblacional significativo ( $g < 3$  SD) con el 99% de las repeticiones por debajo de la línea

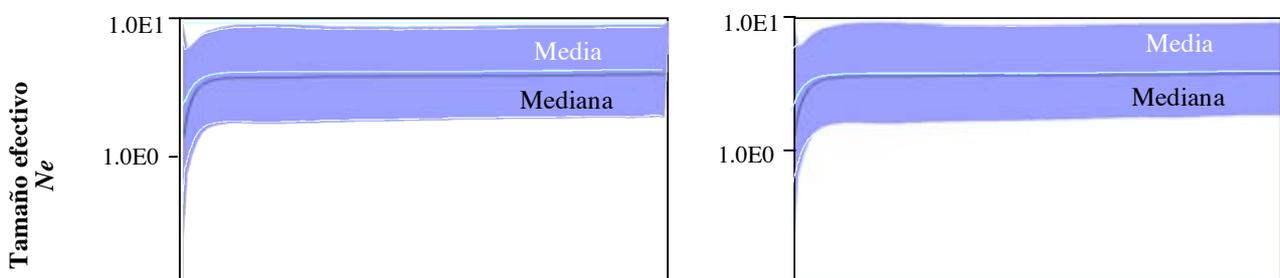
de expansión. El *Clado I* presentó algunos valores de verosimilitud que caen sobre la línea de expansión de la población ( $g > 3$  SD). Estos valores representan el 8% del total de las repeticiones y todos ellos tienen una varianza grande (los círculos unidos representan el máximo y el mínimo de la verosimilitud estimada y la línea que los une es la varianza asociada). El resto (92%) de las repeticiones caen por debajo de la línea de significancia para detectar expansión poblacional. El *Clado II* presentó un patrón de estabilidad de la población con el mayor número de repeticiones (60%) cercanos a la línea de equilibrio (señalada en la gráfica con el número 1). El 17% de las repeticiones cayeron por debajo de la línea de equilibrio y el 23% son valores negativos (no mostrados en la gráfica). Los valores negativos o muy pequeños son considerados como señal de reducción del tamaño poblacional (Kuhner et al. 1998). El subclado Centro presenta el 99% de las repeticiones cayeron por debajo de la línea de expansión. El subclado Este presenta la mayor varianza. La mayor parte del número de repeticiones (70%) de este clado cayeron por debajo de la línea de expansión. El 10% de las repeticiones presentaron una ligera tendencia hacia la zona de declive con valores muy pequeños y el 20% de las repeticiones fueron negativas (no mostradas en la gráfica) [Fig. 11].

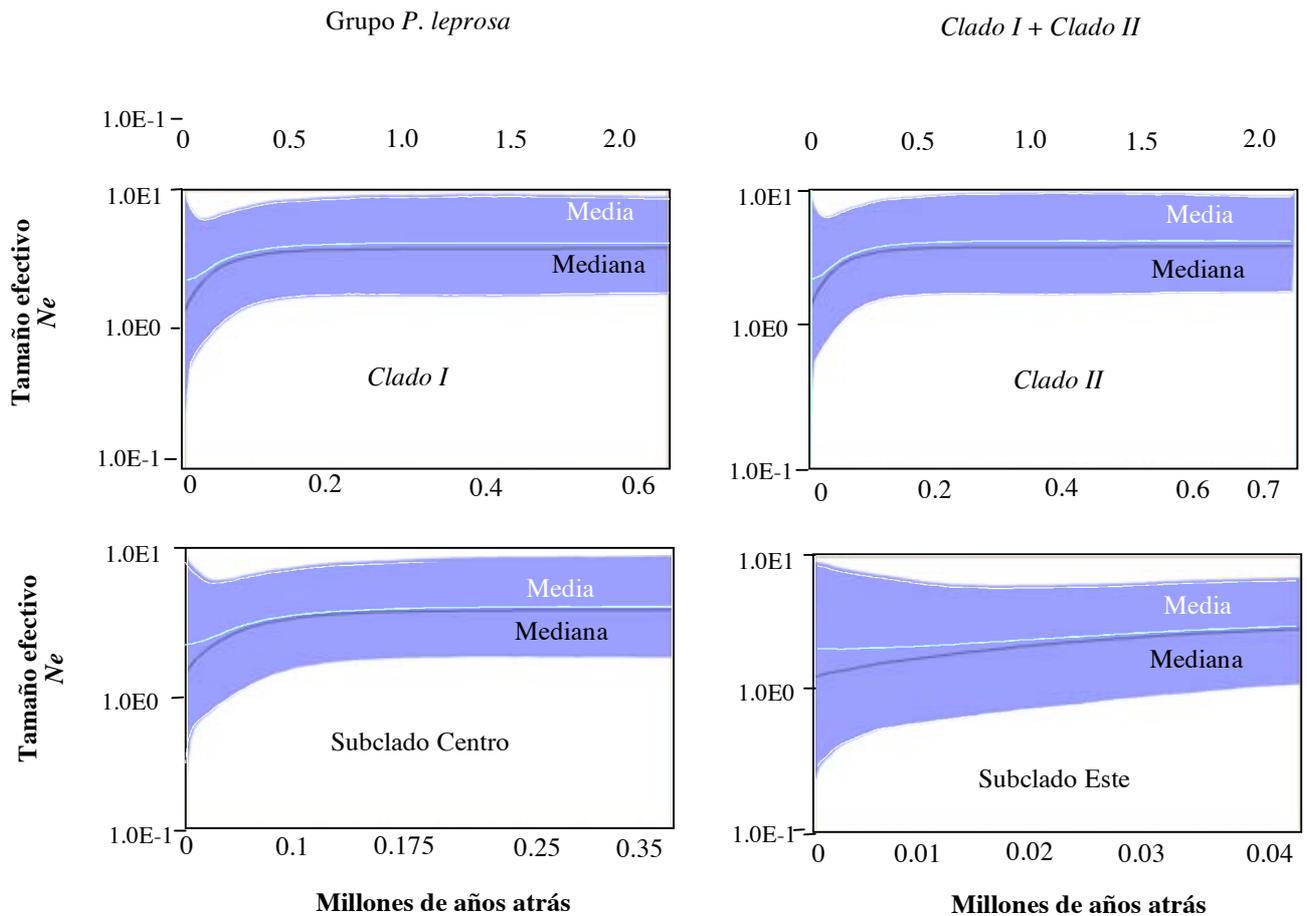




**Fig. 11.** Patrones del parámetro de crecimiento exponencial ( $g$ ) para los principales linajes de *P. leprosa* obtenidos con el programa **FLUCTUATE** (Kuhner 1998). Las estimaciones se repitieron 50 veces para cada grupo. Los puntos por encima de  $10^3$  (barra negra) son considerados significativos =  $g < 3$  SD = expansión de la población.

Las reconstrucciones de la demografía histórica empleando inferencia bayesiana (Skyline) mostraron escenarios similares para todos los clados (Fig. 12). Se aprecian tamaños poblacionales constantes a través del tiempo que decrecen en tiempos recientes. Este detrimento poblacional comienza hace 150 mil años y esta estimación no varía si consideramos una tasa de mutación lenta (4% de divergencia), una tasa media (8%) o una tasa rápida (1.6%).





**Fig. 12.** Gráficas generadas por inferencia Bayesiana “Skyline” para los principales linajes de *P. leprosa* a una tasa de mutación por sitio por millón de años de 0.004, equivalente al 8% de divergencia entre dos secuencias por millón de años.

#### 6.4 Estimaciones del tiempo de divergencia

Las relaciones de coalescencia hacia el ancestro común más reciente (TMRCA) de *P. leprosa* respecto a su grupo hermano *P. firscheini*, considerando una tasa de mutación media de 8% de divergencia, fue de 13.56 Ma. Todas las poblaciones de *P. leprosa* convergen a 4.8 Ma. Las 19 poblaciones del *Clado I* mostraron un tiempo de coalescencia de 1.7 Ma, mientras que las cuatro poblaciones que constituyen el *Clado II* presentan un tiempo de ancestría más profundo (2.6 Ma). Una segunda estimación empleando una tasa fija de sustitución a 1.4% de divergencia redujo el tiempo al TMRCA de *P. leprosa* respecto a su grupo hermano a 6.224 Ma. Lo mismo sucede con los clados al interior del grupo. Los tiempos al TMRCA de los linajes restantes

estimados con dos modelos de sustitución (el determinado por **MODELTEST v.3.7** y por **MRMODELTEST v.2.2**) y con la tasa de sustitución fija a 1.4% de divergencia se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Estimaciones del tiempo de divergencia en millones de años (Ma) para los clados de *P. leprosa*. Se presentan valores con un intervalo de confianza del 95%.

Linaje	MODELO HKY		MODELO TIM+I		Tasa fija (rápida)
	Media 8%	95% CI	Media 8%	95% CI	Media 1.4%
<i>Pseudoeuryclea leprosa</i> + <i>P. firscheini</i>	13.556	5.896-23.143	-	-	6.224
<i>Pseudoeuryclea leprosa</i>	4.868	2.196-8.140	5.086	2.260-8.503	3.371
Clado I + Clado II + haplotipo Y	4.496	2.030-7.653	4.637	2.038-7.913	3.11
Clado I + Clado II	4.361	1.955-7.599	4.294	1.911-7.379	2.035
Clado I	1.715	0.627-3.046	1.728	0.606-3.158	1.14
Clado II	2.687	0.735-5.485	2.758	0.625-5.820	1.34
Subclado Centro	0.933	0.368-1.645	1.006	0.373-1.810	0.547
Subclado Este	0.432	0.057-0.951	0.424	0.044-0.939	0.263

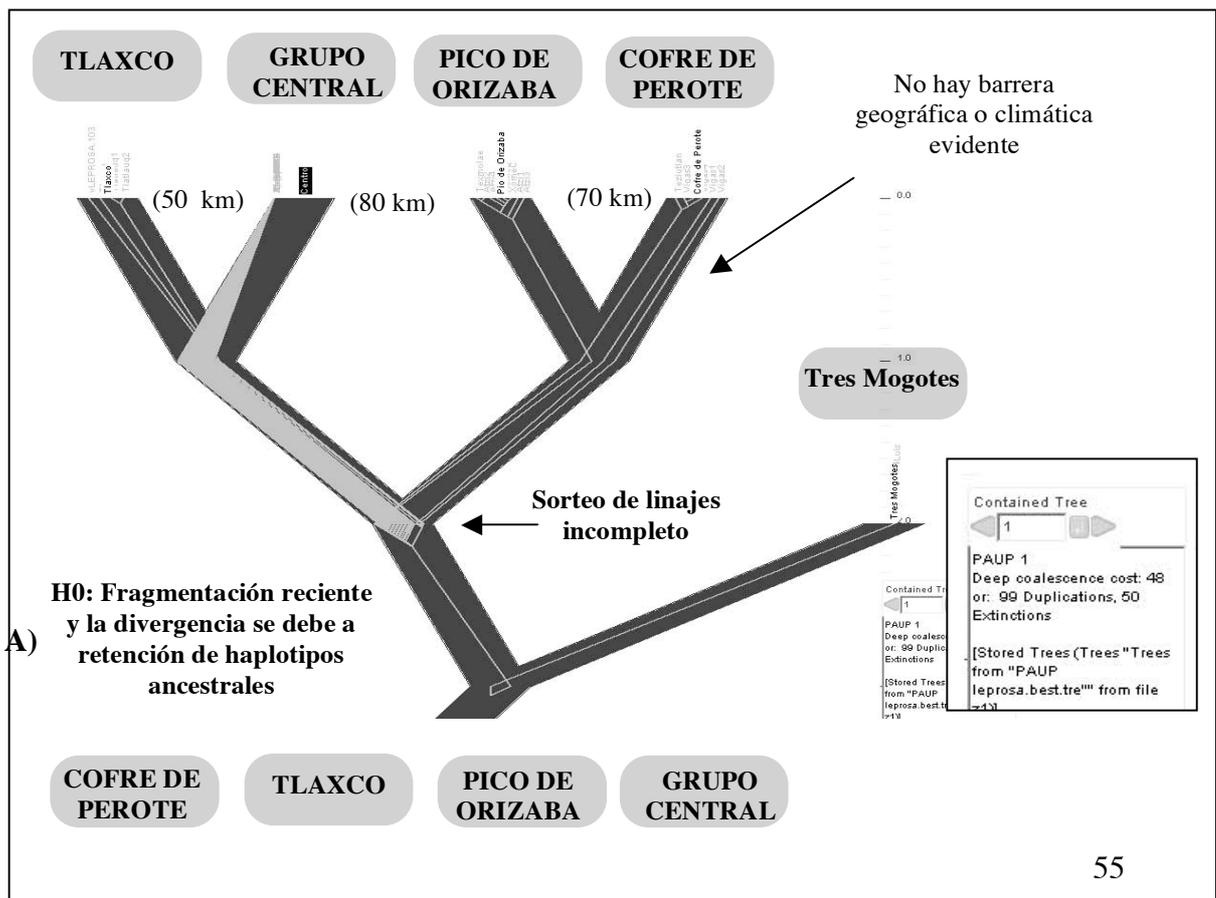
### 6.5 Evaluando hipótesis de fragmentación genética

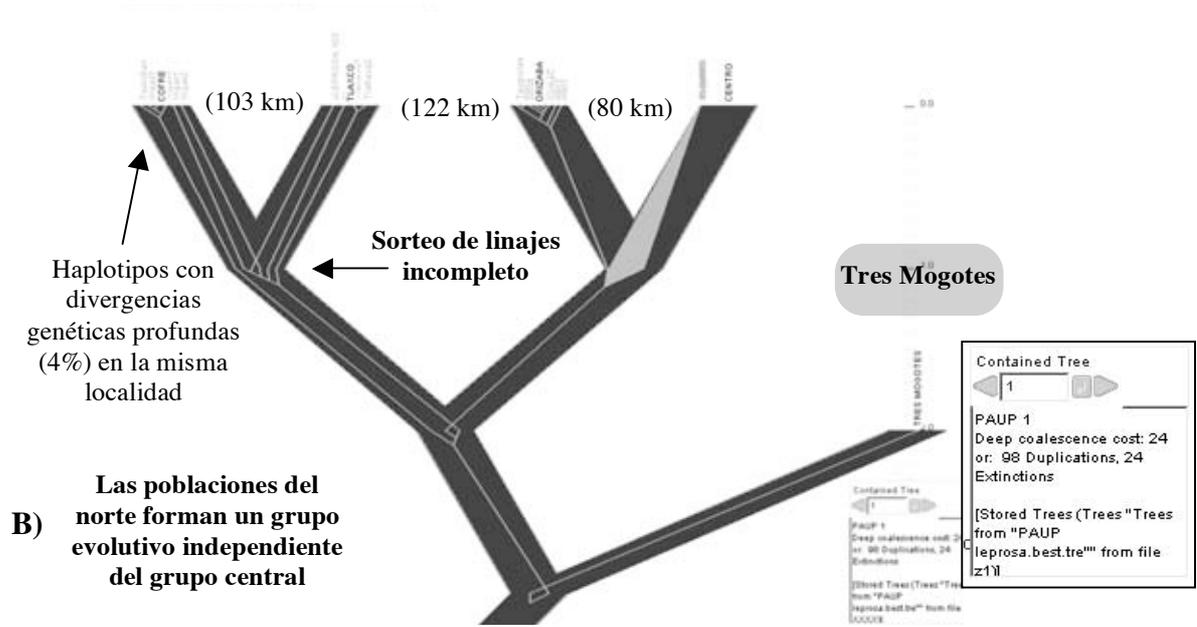
Un total de 105 *árboles de genes* vs. *de árboles de poblaciones* fueron generados en el programa **MESQUITE v. 2.01** (Maddison y Maddison 2007). Estos árboles constituyen todas las posibles hipótesis de relación genética-geográfica incluyendo la hipótesis nula. Los resultados del análisis mostraron que la hipótesis que mejor explica la relación entre los cuatro grupos (menor costo coalescente) es la que considera a dos grandes grupos aislados (Fig. 13). En el grupo que comprende poblaciones del Cofre de Perote y de Tlaxco se puede ver un sorteo de linajes incompleto, el cual corresponde al *Clado II* en la filogenia. También se puede observar que el grupo del Cofre de Perote tiene una alta divergencia resultado de la separación desde la raíz del grupo. Respecto a la región del pico de Orizaba y el grupo central donde las divergencias son menores, éstas no

presentan sorteo de linajes. La población de Tres Mogotes permanece basal a ambos grupos.

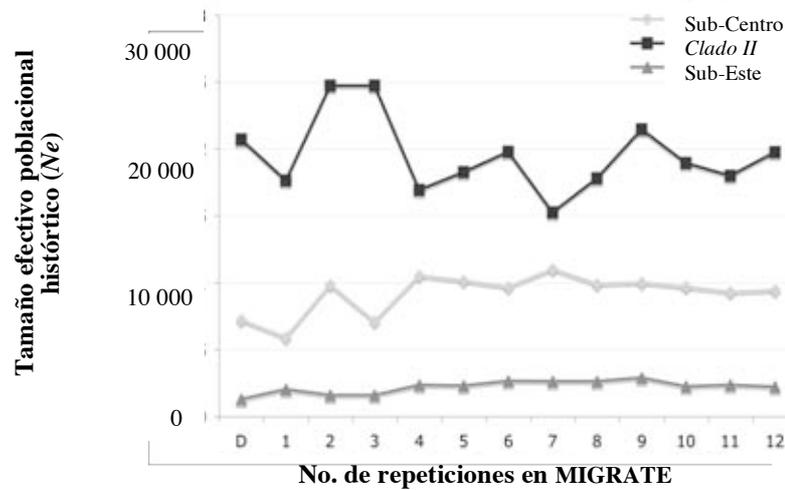
### 6.6 Tamaño efectivo de la población

Los valores de  $N_e$  histórico estimados con el programa **MIGRATE 2.1.3** (Beerli y Felsenstein 2001) para los principales clados encontrados en la filogenia fue el siguiente: el valor del *Clado II* fue el más elevado (aprox. 20 000), seguido del valor del subclado Centro (aprox. 5000) y finalmente en valor más pequeño se obtuvo para el subclado Este (aprox. 2000; Fig. 14). Se observó también que la proporción de migrantes ocurre de manera asimétrica en dirección del subclado Centro hacia el subclado Este y del subclado Centro hacia el *Clado II* (Cuadro 7). No se observó señal de migrantes entre las poblaciones del Cofre de Perote (inmersas en el *Clado II*) y las del Pico de Orizaba (subclado clado Este).





**Fig. 13.** Árboles de genes en árboles de poblaciones. **A)** Hipótesis nula. **B)** Mejor hipótesis alternativa estimada con el criterio “Minimize Deep Coalescence Tree Species”.



**Fig. 14.** Gráficas de  $N_e$  para clados detectados en la filogenia.

**Cuadro. 7.** Número de migrantes  $Nem$  calculado en el programa MIGRATE.

Theta	$Nem$		Subclado Este	Clado II
	Hacia	Desde		
0.01097	Subclado Centro	-	0	0
0.01667	Subclado Este	103.3691	-	0
0.00611	Clado II	44.3691	0	-

## 7. DISCUSIÓN

*Pseudoeurycea leprosa* es uno de los pocos ejemplos de salamandras pletodóntidas con amplia distribución en México; las únicas otras dos especies con amplia distribución son *P. bellii* y *P. cephalica*. El resto de especies de pletodóntidos presentan una distribución considerablemente menor y en muchos de los casos únicamente se le conoce para la localidad tipo. La especie *P. leprosa* fue una de las primeras en describirse (Cope 1869), y representa a la especie tipo del género *Pseudoeurycea* (ver Anexo V). Sin embargo, es hasta años recientes cuando se intenta conocer la historia natural de la especie generándose información sobre alimentación, reproducción (Uribe et al. 1999, Bille 2000), uso de microhábitat, estructura de edades (García-Vázquez et al. 2005) y especies que la parasitan (Falcón et al. 2007). Esos estudios han sido confinados a las poblaciones del centro (Malinche e Iztaccíhuatl), quedando fuera las que presentan divergencia más notable como Las Vigas, Tlatlauquitepec, Tlaxco y Tres Mogotes. A pesar de ese esfuerzo, aún no se tiene información sobre de la historia natural de *P. leprosa* como el número de puestas al año, cuidado parental, longevidad de los organismos y etapa reproductiva. Esta información es indispensable para hacer estimaciones de tiempos de divergencia tomando en cuenta el tiempo generacional. Por tal motivo, los datos relacionados con el tiempo de divergencia de este estudio quedan como hipótesis a probar.

## 7.1 Aloenzimas y ADNmt

Los resultados de ADNmt son consistentes con la variación genética encontrada por Lynch et al. (1983) para *P. leprosa* en su estudio de aloenzimas. Las poblaciones de Río Frío, La Malinche, Xometla y Zempoala fueron genéticamente muy cercanas (subclado Centro en este trabajo) y la población de Xometla fue mucho más variable con respecto a las otras tres (subclado Este). Estas cuatro poblaciones fueron llamadas por Lynch et al. (1983) el grupo “Core” (manejado como *Clado I* en este trabajo). De igual forma las poblaciones de Las Vigas y Tlaxco fueron las que mayor grado de diferenciación genética presentaron en el estudio de Lynch et al. (1983), lo que concuerda con lo encontrado en este estudio. Desafortunadamente, para efectos de comparación no contamos con la población de San Bernardino ubicada a 40 km al sur de Xometla (Clado Este), la cual se ubica en una posición intermedia en la topología resultante del uso de aloenzimas construida con el método de Fitch-Margoliash (Fig. 2). Sin embargo sí se obtuvo una muestra de la localidad de Tres Mogotes ubicada también al sur del Pico de Orizaba y cuya posición en el cladograma resultó ser la más basal, a diferencia de la posición de San Bernardino que tiene una mayor similitud con las poblaciones del Centro. Considerando que las aloenzimas son consistentes con los resultados aquí obtenidos con ADN mitocondrial, entonces la población de Tres Mogotes tendría una divergencia genética nuclear mayor a la de las poblaciones del norte (Tlaxco y Vigas).

## 7.2 Variación genética y filogenia

De los principales linajes encontrados en *P. leprosa*, la población de Tres Mogotes fue la más divergente (5.2%). Los niveles de divergencia encontrados en la población de Tres Mogotes respecto al resto del grupo *P. leprosa* son comparables a los registrados entre especies como *P. gigantea* y *P. naucampatepetl*, con 4.9% (K2p; Parra-Olea et al. 2001). Divergencias un poco más grandes las encontramos entre *P. ruficauda* y *P. unguidentis* con 6.7% y *P. papenfussi* y *P. smithi* con 6.9%. Sin embargo, estos patrones no son el umbral para determinar los límites entre especies ya que es frecuente encontrar divergencias altas al interior de las especies del género *Pseudoeurycea* (Parra-Olea 2002). A nivel morfológico y de hábitat, la población de Tres Mogotes podría ser distinta debido a su ubicación pues se localiza en la periferia de la distribución. Recientemente se han colectado organismos adultos (identificados por la glándula del mentón) de esta población y son considerablemente más pequeños de longitud hocico-cloaca que organismos adultos de otras poblaciones. El hábitat que ocupan es un bosque de encino prácticamente aislado entre vegetación xerófila cercano al Valle de Tehuacán, encontrándoseles en bromelias, un microhábitat arborícola no registrado para *P. leprosa* (Canseco-Márquez com. pers.). El resto de las poblaciones de *P. leprosa* no presentan características morfológicas que las distinguen entre sí (Lynch et al. 1983); todos los organismos son terrestres y suelen encontrarse en bosques de oyamel, pino, asociaciones de pino-encino o solamente encino. Con base en lo anterior, se sugiere que la población de Tres Mogotes se considere una especie nueva.

Las divergencias encontradas en *P. leprosa* en este estudio fueron de hasta un 3.2% (entre haplotipo *Y* y haplotipos de la misma población). Estos resultados son

comprables con los encontrados en otras especies del género *Pseudoeurycea*, por ejemplo: *P. ruficauda* presenta 2.8% de divergencia (sin corregir) entre dos poblaciones ubicadas a 7 km una de otra (Parra-Olea 2004).

Se han observado casos extremos de alta divergencia a nivel intrapoblacional en *P. smithi* con 5.5% ( $K2p$ ) de divergencia entre dos poblaciones de ubicadas a 25 km una de la otra (Parra-Olea 2005b). La divergencia ( $K2p$ ) entre poblaciones de *P. cephalica* es de 13% a 16%. Este patrón se presenta también en otras especies de pletodóntidos a nivel intrapoblacional, como *Batrachoseps attenuatus* con 9.5% (Martínez-Solano et al. 2007) o *Batrachoseps mayor* con 11.28% (Peralta-García 2006). Estos valores se consideran por arriba del estándar para niveles intraespecíficos (Martínez-Solano et al. 2007) y para algunos casos como *P. cephalica* se trata de complejo de especies en los cuales aún no se ha trabajado la sistemática (Parra-Olea com. pers.).

De forma contraria, existen especies como *P. altamontana* y *P. robertsi* con sólo 0.5% de divergencia o de *P. juarezi* y *P. saltator* con 0.7%. Estos valores pequeños ocurren en especies cuya morfología y hábitos han permitido diferenciarlas. A pesar de que *P. robertsi* y *P. altamontana* son genéticamente similares y su distribución es relativamente cercana, ésta no se sobrepone. Lynch et al. (1983) señalan que estas dos últimas especies podrían sinonimizarse lo cual no ocurre debido a que se distinguen por color y por las proporciones del tamaño del cuerpo. Respecto a *P. juarezi* y *P. saltator*, éstas se distribuyen en la misma zona solo que una vive en bromelias sobre árboles y otra es completamente terrestre. En suma, se observan dos patrones de diversificación en el género *Pseudoeurycea*, aquellas que se han separado recientemente y que presentan bajos niveles de divergencia pero que morfológica y ecológicamente son

distinguibles, ocupando nichos distintos, y aquellas que se mantienen morfológicamente estables, ocupando el mismo nicho ecológico y cuyas diferencias genéticas son muy altas.

Los árboles filogenéticos obtenidos de este trabajo fueron todos congruentes con la posición basal de la población de Tres Mogotes y el haplotipo *Y* de Las Vigas, así como en la generación de los *Clados I y II* y los subclados Centro y Este al interior del *Clado I*. Respecto a la politomia presentada en el subclado Centro, es importante mencionar que es una politomia molecular de un árbol de un gen (y no una politomia de especies), con lo cual la politomia no refleja periodos de especiación rápida o simultánea, sino que muestra las relaciones entre un juego de secuencias cuyos nucleótidos están históricamente ligados (Slowinski 2001). Existen dos clases de politomias, las politomias “verdaderas” que resultan cuando tres o más genes muestreados coalescen a un solo gén en un organismo ancestral, y las politomias “aparentes” que se presentan en las ramas de un árbol de un gén temporalmente finito. Aunque existen diversas metodologías para distinguir entre politomias “verdaderas” y “aparentes”, una característica principal para distinguir una politomia “verdadera” de una “aparente” es tener una señal diferente de cero en la longitud de la rama empleando diferentes genes. Por tal razón, Hudson (1990) menciona que la probabilidad de que estas politomias verdaderas ocurran es muy pequeña y por lo general las politomias moleculares tienden a ser politomias “aparentes”. La politomia del subclado Centro corresponde a un solo gen (citocromo *b*) por lo que no podemos probar si es una politomia “verdadera”. Sin embargo, Weisrock et al. (2005) mencionan que en salamandras pletodóntidas el patrón de ramificación del ADNmt es poco probable que presente politomias generadas por la multifurcación del gen (verdaderas) y en su lugar es más probable que reflejen el tiempo

de cladogénesis (aparentes), con lo cual podemos suponer que la politomia del clado centro es una politomia molecular “aparente” que refleja el corto periodo de tiempo en que se han separado las poblaciones de *P. leprosa*. Razón por la cual se hace necesario emplear metodologías con mayor resolución temporal correspondientes al campo de la genética de poblaciones.

### 7.3 Dinámica histórica de la población

El NCPA es un método muy empleado en filogeografía (Petit 2007) y también ha sido muy criticado (Petit 2008). En un inicio las críticas se centraron en la clave de inferencia, porque las interpretaciones no son el resultado de un modelo analítico, no tiene un soporte estadístico y no proporciona un índice de confianza para ninguna de sus inferencias. Por lo tanto, no se sabe con qué frecuencia éstas son incorrectas (Knowles y Maddison 2002, Hey y Machado 2003). El NCPA se ha venido mejorando (Templeton 2004) y recientemente ha surgido la versión automatizada (Panchal y Beaumont 2007), lo que ha permitido hacer simulaciones y evaluar la frecuencia de falsos positivos. Los resultados de las simulaciones muestran que el NCPA falla en el 75% de los casos, principalmente en los escenarios de flujo génico restringido con aislamiento por distancia y continuo rango de expansión. Petit (2007) recomienda que el NCPA se deje de utilizar hasta que haya sido evaluado y mejorado. Garrick et al. (2008) señalan que el NCPA podría ser útil para generar hipótesis que se pueden corroborar con evidencia de otros métodos y el empleo de más genes que puedan ayudar a reconstruir la historia de la especie. Petit (2008) sugiere que las hipótesis podrían ser probadas empleando simulaciones adecuadas de esos múltiples loci y que, hasta que esto no se pruebe, el NCPA debería quedar como un método en duda y recomienda que las revistas de alta

reputación desaprueben el uso del NCPA que utiliza un solo locus. Templeton (2008) señala que el NCPA genera mayoritariamente falsos negativos (no reconoce un evento) más que falsos positivos (infiere un evento que no existe o existió). Templeton (2008) evaluó el NCPA empleando diseños de muestreo y eventos evolutivos reales y menciona que la elevada tasa de falsos positivos es un artefacto de los supuestos no reales generados y/o un error en la novedosa implementación del NCPA de Panchal y Beaumont (2007). Templeton (2008) recomienda no usar los programas de Panchal y Beaumont (ANeCa; 2007) hasta que solucionen la elevada tasa de falsos positivos. Beaumont y Panchal (2008) argumentan que la automatización es confiable y que la alta incidencia de los falsos positivos no es una consecuencia de la implementación sino del archivo de salida generado por **GEODIS** (Posada et al. 2000). Beaumont y Panchal (2008) consideran que la hipótesis obtenida con NCPA no es fiable y en su lugar, nuevos métodos alternativos basados en inferencia bayesiana y de verosimilitud representan el futuro de los análisis filogeográficos. En suma, las principales diferencias entre ambos métodos son: la rapidez de analizar grandes cantidades de datos del modo automatizado permitiendo la simulación y consistencia en la interpretación de la clave de inferencia. A diferencia del modo manual que permite la posibilidad de tomar decisiones para romper reticulaciones al incluir información de la especie, lo que no ocurre cuando se trabajan con datos ficticios (como las simulaciones) porque no hay información adicional de la especie que permita discernir donde romper una unión.

Los datos con *P. leprosa* empleando ambos métodos demuestran que una diferencia en el diseño causada por el rompimiento de una unión puede tener consecuencias en cuanto al número de clados y esto puede influir en el número de inferencias y escenarios históricos que pudieran estar actuando o han actuado a través del área geográfica de la

población. En este trabajo, el resultado obtenido por el método manual se considera el más adecuado y se discute como sigue: la fragmentación alopátrica sugerida para el *Clado I*, con base en la divergencia y las estimaciones de coalescencia obtenidas con BEAST, pudo haber ocurrido hace menos de un millón de años, después de la formación de los grandes conos monogenéticos. El aislamiento por distancia (detectado en la prueba de Mantel) y las principales oscilaciones glaciales en la FVT posiblemente pronunciaron aún más este evento. La alta diversidad haplotípica y una baja diversidad nucleotídica es una condición que se atribuye a una expansión del tamaño poblacional después de un periodo de tamaño pequeño (Grant y Bowen 1998). La prueba de Fu mostró un valor significativo lo que indicó un crecimiento poblacional rápido, ello a causa de la retención de nuevas mutaciones (Avice 1984). Esta expansión debió de ocurrir de manera previa a la fragmentación, ya que los análisis de distribución mismatch rechazaron la expansión reciente (gráfica multimodal). Asimismo, la prueba *D* de Tajima (1989) mostró un valor negativo estadísticamente no significativo. Simonsen et al. (1995) señalan que cuando la prueba *D* de Tajima da resultados negativos no significativos se debe a que la expansión no es reciente ya que sólo una evidencia fuerte (que incluya al menos 50 muestras) generaría un valor negativo con significancia estadística (lo que indica una expansión reciente). Sin embargo, esta hipótesis debe considerarse con cautela pues las condiciones son completamente diferentes a las realizadas por Simonsen et al. (1995). Las estimaciones basadas en coalescencia, obtenidas con el método de Kuhner (1998), que permiten detectar expansión reciente, no dieron resultados significativos.

La forma en que las oscilaciones climáticas en la FVT afectaron a las poblaciones de *P. leprosa* se describe a continuación: durante el Pleistoceno se registraron cinco eventos

glaciales en los volcanes Pico de Orizaba, Malinche, Iztaccíhuatl y Nevado de Toluca (Vázquez-Selem y Heine 2004). El *Nexcoalango* fue el primer evento glacial que ocurrió hace 195 000 años y se caracterizó por un descenso de hielo hasta los 3000 m constituyendo los llamados valles glaciados. No hay evidencia de una influencia Wisconsiniana previa a 20 000 años atrás; el primer pulso fue llamado *Hueyatlaco 1* y permaneció entre 17 500 y 20 000 años atrás seguido de *Hueyatlaco 2*, cuyos límites descendieron a los 3 400 y 3 500 m respectivamente. *Mipulco 1* ocurrió hace 12 000 años y alcanzó los 3800 m. *Mipulco 2* es el último evento glacial y ocurrió hace aproximadamente 8300 años (registrado en La Malinche y Nevado de Toluca), a una altitud de  $4,420 \pm 120$  m (Castillo-Rodríguez et al. 2007). Durante esta última parte del Pleistoceno la vegetación constituida por bosques templados (de coníferas y encinos) en el centro de México se encontraba entre los 1000 (Tricart, 1985) y 700 m (Lozano-García et al 2005), por debajo del límite actual con un descenso de la temperatura entre 5 y 9 °C, pudiéndose establecer el límite entre los pastos alpinos (con datos de polen) y el bosque (*Pinus hartewii*) para el Nevado de Toluca y La Malinche, en una altitud de 3100 msnm.

Durante el inicio del Holoceno se registra la existencia de condiciones más húmedas que las del Pleistoceno y que las actuales (Metcalf 2006). Se obtuvo evidencia de variaciones altitudinales de vegetación con datos palinológicos de los límites entre pastizal de páramo y el bosque en el FVT. Estos datos indican que hace 6500 y 6000 años hubo una expansión de bosque, mismo que fue reemplazado nuevamente por pastizales cuando el clima se volvió más seco hace aproximadamente 5000 años. Condiciones de humedad son determinadas hace 3000 años y hace 2000 se registra nuevamente un enfriamiento. Los resultados del análisis Bayesiano Skyline indican un

declive de la población estimada en 150 000 años para todos los linajes de *P. leprosa*, independientemente de la tasa de sustitución. Este resultado es posterior a la glaciación más fuerte llamada *Nexcoalango* (195 000 años atrás). Melcafe (2006) señala que las condiciones de temperatura del último periodo interglaciar (mediados del Pleistoceno) fueron más húmedas en el centro-este de la FVT que a finales del Pleistoceno, lo que permitiría explicar una posible expansión previa a *Nexcoalango* (detectada por la prueba de Fu para el *Clado I* y el subclado Centro en caso de que esta hubiese ocurrido). La variación altitudinal de la vegetación encontrada en cada uno de los periodos glaciales podría indicar que la distribución de *P. leprosa* pudo verse afectada de forma negativa durante los periodos de máximo descenso de la temperatura. Sin embargo, este tipo de variación en el límite de la vegetación se considera un efecto de sensibilidad climática y por tanto se ha señalado que los valles de menor altitud del FVT (tienen una antigüedad máxima de 1 millón de años) parecen ser más estables climáticamente tanto en el Pleistoceno como en el Holoceno (Melcafe 2006). Por tanto, es posible sugerir que los haplotipos encontrados con ADN mitocondrial en el *clado I* se originaron durante el Pleistoceno (basado en la divergencia genética) y obtuvieron su configuración actual durante el Holoceno.

Las inferencias de colonización a gran distancia obtenida para los clados anidados 2-5 y 3-1 podrían ser un artefacto del diseño de muestreo considerando la biología de la especie. Lynch et al. (1983) señalan que durante intensos periodos de lluvia indudablemente las áreas de bosque que hoy en día están separadas, se encontraban conectadas e inclusive el bosque de coníferas permaneció en el Valle de México hasta tiempos históricos recientes cuando grupos humanos de las comunidades locales empezaron a desmontar el área. La deforestación de las faldas fue completada en el

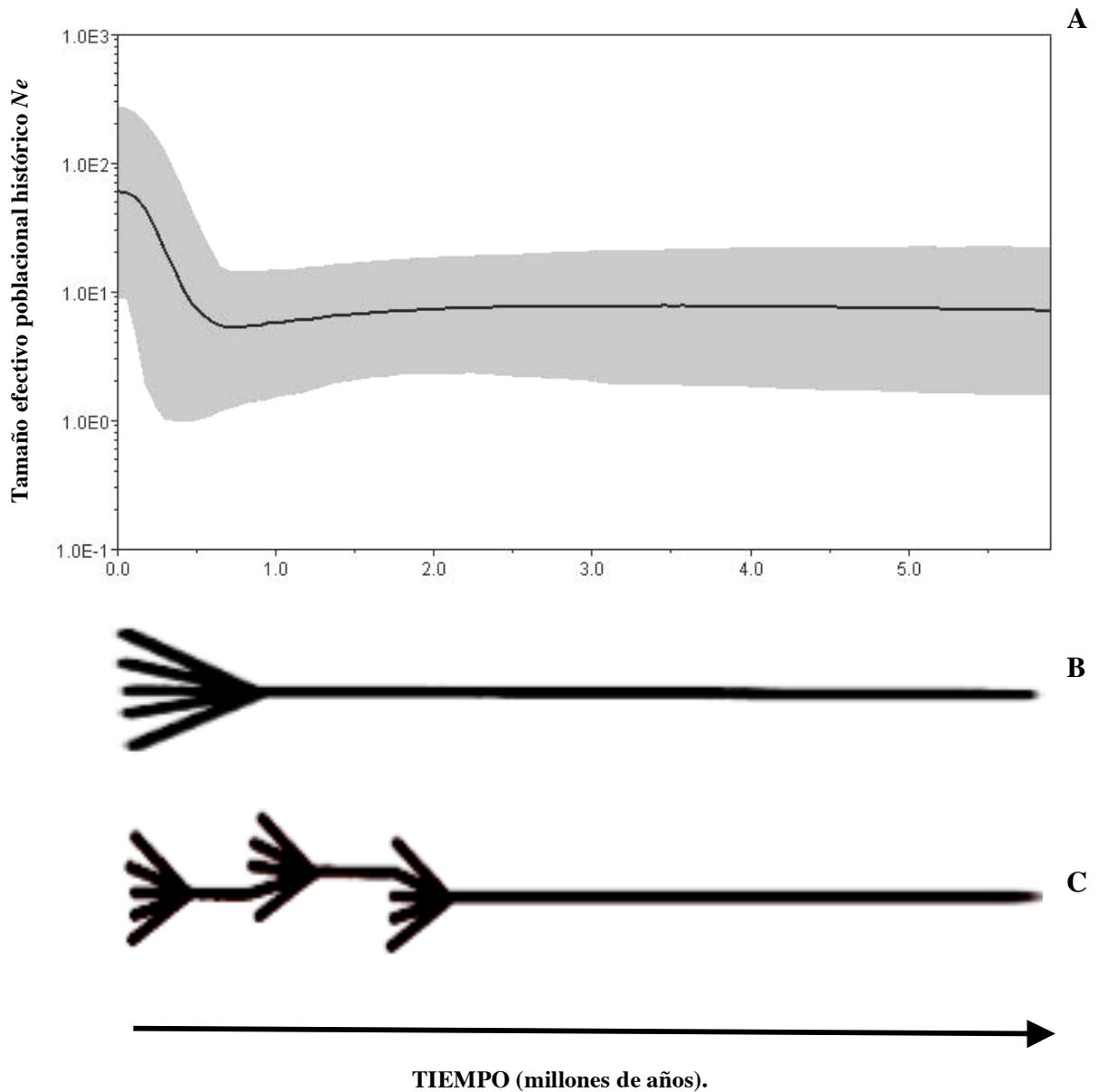
siglo XVI cuando Hernán Cortés inicio el México moderno. Por lo tanto, la separación de las poblaciones de *P. leprosa* en esta área corresponde a un evento muy reciente. Desafortunadamente nuestros datos no permiten poner a prueba esta hipótesis debido a que el ADNmt presenta una estructura filogeográfica muy marcada (Moritz et al. 1992) y no necesariamente el aislamiento mitocondrial indica un aislamiento nuclear en *P. leprosa* a este nivel de detalle. Así, existe la posibilidad de intercambio genético reciente (Holoceno). Respecto al tiempo en que los humanos comenzaron a desmontar el área, datos recientes de registros de polen no arbóreo correspondiente a finales del Holoceno (hace 1500 años aprox.) fueron encontrados en sedimento lacustre en el Valle de México, mismos que están correlacionados con la deforestación humana (Lozano-García et al. 2005) y evidencia arqueológica de una expansión de la población humana que inició hace 1500 años hasta el año 600 de nuestra era (Sugiura 2000).

Los haplotipos que no pudieron ser analizados con el NCPA se localizan en la región más al norte y ésta constituye el área más antigua (10 Ma), pues se consolidó durante la primera etapa de formación de la FVT. Conocida como Sierra de Huamantla-Tlaxco, tiene su continuación bordeando a la Cuenca de Oriental hacia el este con el Cofre de Perote. Un grupo de llanos y lomeríos separan a los haplotipos de *P. leprosa* del *Clado I* con respecto a los del *Clado II*. Partiendo del estado de Hidalgo con los llanos de Apan y Pie grande conectan con los llanos del centro de Tlaxcala ubicados al sur de la Sierra de Tlaxco, extendiéndose al este para dar paso al extenso llano de Huamantla constituido por suelos arenosos y pastizales cuyo clima hoy día se considera prácticamente árido. Este llano es la prolongación de la Cuenca de Oriental y, constituye una verdadera barrera biogeográfica para las poblaciones del *Clado I* con respecto a las del *Clado II*.

El *Clado II* presentó la mayor varianza dentro de las poblaciones y la diversidad haplotípica y nucleotídica más alta de todos los linajes, lo que sugiere contacto secundario entre linajes alopátricos previamente diferenciados, o la presencia de una población grande y estable con una larga historia evolutiva (Grant y Bowen 1998). La hipótesis de un tamaño efectivo poblacional alto concuerda con la evolución de la FTV en dirección norte a sur basada en evidencias obtenidas del análisis de rocas, grado de erosión e intemperismo; siendo la parte norte la más antigua y con un periodo largo de inactividad volcánica. Puesto que el intemperismo y la erosión han actuado intensamente, han dado como resultado irregularidades mayores del relieve que se manifiestan en la profundización de valles y barrancas con fuertes pendientes (Velasco de León et al. 2007), por lo cual es factible suponer la existencia de un tamaño efectivo poblacional alto que se encontraba en condiciones de relieve variadas y aunado a la alta filopatría de la especie, se pudo dar lugar a la retención de haplotipos ancestrales. Posiblemente, este hecho, perduró por un largo periodo de tiempo ya que no hay pruebas de expansión reciente o antigua para este clado y que finalmente terminó con el declive poblacional hace 150 000 años (resultados del análisis bayesiano).

Las estimaciones con coalescencia (parámetro de crecimiento  $g$ ; Kuhner 1998) para todos los linajes no indican expansión, estos resultados coinciden con los encontrados para fauna tropical por Lessa (2003) en los que no encuentra expansión poblacional durante segunda mitad del Pleistoceno. Respecto al análisis bayesiano Skyline plot, las estimaciones realizadas para todo el grupo *P. leprosa* y para cada uno de los subclados resultaron similares, siempre un tiempo estable y recientemente un declive de las poblaciones. Drummond (2008) señaló recientemente que el análisis Skyline presenta

serias limitaciones y problemas de precisión al tratar de recuperar la dinámica poblacional con principal énfasis en detectar cuellos de botella. Sus resultados indican que aunque se incremente el número de secuencias (probaron hasta 500 secuencias) de un solo gen, el método es incapaz de reconstruir historias poblacionales complejas (p. e. en especies que han pasado por dos cuellos de botella seguidas de una rápida sucesión). En estos casos el método es preciso al reconstruir la parte más reciente (de crecimiento o detrimento poblacional) pero la historia poblacional antes del primer cuello de botella es pobremente reconstruida (Fig. 15). De forma contraria, al emplear un menor número de secuencias de cada gen pero un mayor número de genes, la reconstrucción es mucho más exacta. *Pseudoehrlichia leprosa* es una especie con una dinámica poblacional compleja y en este caso el método no puede detectar los posibles cuellos de botella con el gen empleado. Datos de genes múltiples pueden ayudar a evidenciar estos procesos. Otra forma de evidenciar un proceso, es forzar a que el método Skyline se comporte en expansión adicionando un grupo externo, que presente suficientes mutaciones para que se genere una rama larga y al llegar al tiempo en que las secuencias de *P. leprosa* coalescen, la gráfica Skyline se comporta en expansión y nos indica el tiempo en que esta pudo haber ocurrido. Esta prueba fue realizada con la tasa más rápida del gen citocromo *b* en que en caso de haber existido una expansión nos da un estimado en millones de años de cuando pudo haber ocurrido (Fig. 15 A y B).



**Fig. 15.** A) Skyline plot generada con el programa Beast para estimar el TMRCA entre *P. leprosa* y su grupo hermano *P. firscheini*. Como resultado de la profunda divergencia entre ambas especies, se genera un efecto de incremento poblacional **B**) Modelo de crecimiento poblacional exponencial típico inferido a nivel intrapoblacional. **C**) Modelo de varios cuellos de botella que Skyline plot es incapaz de inferir con un sólo gen.

#### 7.4 Tiempo de divergencia

Obtuvimos tres tiempos de divergencia para *P. leprosa*. Los primeros dos fueron estimados con dos modelos de sustitución diferentes. El modelo TIM +I que fue determinado por **MODELTEST v.3.7** (Posada y Crandall 1998) aplicado en el análisis de Verosimilitud y el modelo HKY determinado por **MRMODELTEST v.2.2** (Nylander 2004) y que fue aplicado en el análisis Bayesiano. Ambos bajo la premisa de una distribución normal con un rango de 0.6% a 1.6% por millón de años y sin usar una tasa de sustitución fija. Los resultados en las estimaciones temporales de los diferentes linajes en *P. leprosa* con esta metodología, no varían por más de 200 000 años de diferencia estimando el tiempo al TMRCA de *P. leprosa* respecto a su grupo hermano en 13.5 Ma. Estas estimaciones resultan adecuadas cuando no se conoce con certeza la velocidad a la que el marcador está cambiando o no se tiene forma de calibrar el reloj molecular (por ejemplo la falta de registro fósil como sucede en bolitoglossinos tropicales). Sin embargo, cuando se tiene un margen de variación tan grande como sucede con el gen citocromo *b* (que va de 0.4% a 1.6%, Mueller 2002), difícilmente se pueden hacer correlaciones entre el tiempo de divergencia y eventos geológicos porque la diferencia entre una tasa baja y una tasa alta puede llegar a ser hasta de 7 millones de años. Situación desalentadora si consideramos que los estratovolcanes de la Faja Volcánica Transmexicana se formaron tan solo en el último millón de años y por tanto el poder de resolución con citocromo *b* queda confinado a estimaciones muy generales. Esta variación no puede reducirse al aumentar el número o longitud de las secuencias y por tanto la profundidad del árbol de genes, con un solo gen, se convierte en un pobre indicador de cuando las poblaciones han comenzado a divergir. Esta condición es conocida como varianza estocástica del gen. Otro aspecto a considerar es que el genoma

mitocondrial se hereda vía materna como una unidad (Avice 2000), lo que significa que a pesar de que todas las topologías de los genes mitocondriales fueran concordantes, éstas podrían ser erróneas para reconstruir la historia de la especie (Wiens 2008). Esto puede generarse cuando existen diferencias marcadas entre sexos como una mayor dispersión de machos y una mayor filopatría en hembras (caso reportado en pletodóntidos; Staub et al. 1995).

Debido a la problemática anterior una tercera estimación fue empleada utilizando una tasa de mutación fija a 1.4% con un reloj relajado que da una estimación de *P. leprosa* respecto a su grupo hermano *P. firscheini* de 6.2 Ma. La estimación es concordante con lo obtenido por Wiens et al. (2007) con el gen nuclear RAG-1 para la divergencia entre estas dos especies. Estos autores estimaron tiempos de divergencia para 137 especies de salamandras tropicales (bolitoglossinos), entre las que destacan 41 especies del género *Pseudoeurycea* incluida *P. leprosa*. La filogenia fue hecha con análisis bayesianos e incluyó el gen citocromo *b* y el gen 16s (sub unidad ribosomal ARN). La edad de la raíz fue calculada con el gen nuclear RAG-1 empleando el método penalizado de verosimilitud implementado en r8s (Sanderson 2002), que funciona como un reloj molecular relajado (permite diferentes tasas de evolución a través del árbol) y 11 puntos de calibración. Sus análisis identifican tres posibles edades para la raíz de bolitoglossinos tropicales (que dependen de la edad usada en todas las salamandras) de 39, 49 y 55 Ma. Para estimar los tiempos de divergencia emplearon un tiempo de raíz de 49 Ma. Así el tiempo de la raíz para el género *Pseudoeurycea* se estima en 30 Ma y la separación de *P. leprosa* respecto a su grupo hermano *P. firscheini* es aproximadamente 6 Ma. De esta forma realizamos estimaciones al interior de los diferentes linajes de *P. leprosa*

empleando esta tasa de mutación rápida para citocromo *b* y discutimos los resultados con otras especies.

Se identificaron tres eventos principales en la historia evolutiva de *P. leprosa*. El primer evento es una fragmentación antigua que da como resultado una división entre la población de Tres Mogotes y el resto del grupo *P. leprosa*, esta división probablemente ocurrió a mediados del Plioceno (hace 3.3 Ma). El segundo evento ocurre a finales del Plioceno (hace 2 Ma) con la separación entre en *Clado I* y el *Clado II*. Y finalmente el tercer evento involucra la fragmentación del *Clado I* en los subclados Centro y Este hace 1.1 Ma.

El subclado Centro y Este presentan TMRCA pequeños de 0.54 y 0.26 Ma respectivamente, lo que indica que el subclado centro es más antiguo que el subclado Este. La formación del *Clado II* es de 1.3 Ma. Al comparar los tiempos de diversificación de las especies del género *Pseudoeurycea* encontramos que unas pocas especies se originan en el Mioceno (e. g. *P. scandens*, *P. cephalica* o *P. galeanae*). La mayoría (aprox. 30 especies), incluyendo a *P. leprosa*, se originaron durante el Plioceno y sólo algunas como *P. saltator* y *P. juarezi* en el Pleistoceno. El tiempo que ha tomado la formación los *Clados I* y *II* en *P. leprosa* no es suficiente para llegar a conformar especies diferentes, a pesar de que en el género se presenten fenómenos de diferenciación morfo-ecológicas y de baja divergencia genética como el caso de *P. saltator* y *P. juarezi*. El tiempo que ha pasado entre la población de Tres Mogotes (3.3 Ma) y el resto de las poblaciones de *P. leprosa* es similar al estimado para *P. rex* - *P. expectata*, *P. anitae* - *P. cochranae*, *P. melanomolga* - *P. gadovii* y *P. longicauda* respecto a *P. altamontana* que son especies que se pueden diferenciar morfológicamente unas de otras.

## 7.5 Biogeografía

La evolución geológica de la Faja Volcánica Transmexicana de acuerdo con Gómez-Tuena et al. (2005) ocurrió en cuatro episodios:

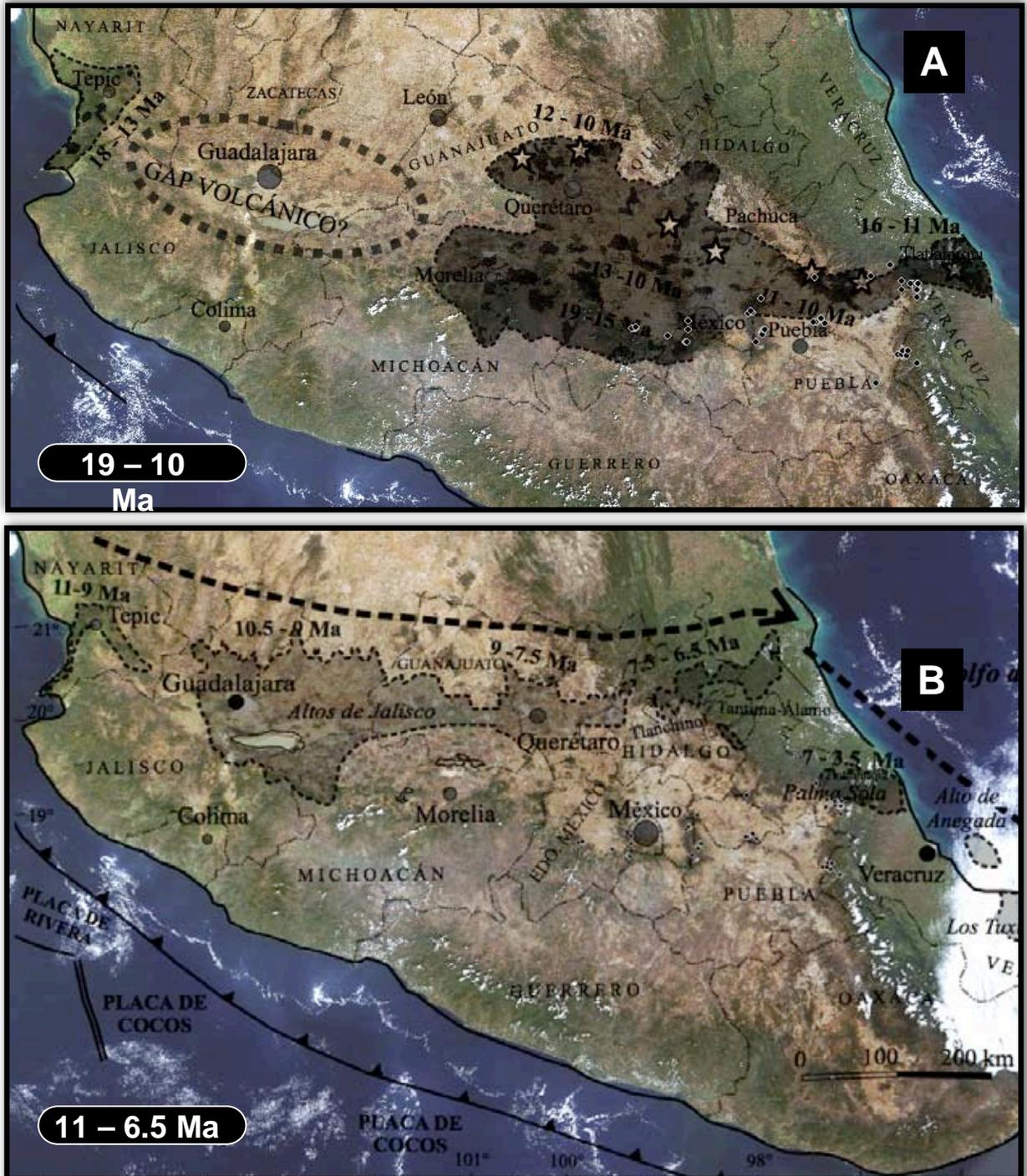
1) **19-10 Ma:** Arco del Mioceno medio y tardío comienza en el Centro de México entre la longitud de Morelia y Querétaro y las costas del Golfo de México, formando las Sierras de Mil Cumbres y Angangueo (Michoacán) y las áreas de Tenancingo y Malinalco (México). Después entre 13 y 10 Ma el vulcanismo forma estratovolcanes en Querétaro-Guanajuato (Palo Huérano, La Joya y Zamorano), en Puebla (Cerro Grande), México-Distrito Federal (Sierra de Guadalupe) e Hidalgo (campo volcánico de Apan) [Fig. 16 A].

2) **11-6 Ma:** Episodio máfico del Mioceno tardío: Se ubica de costa a costa, al norte del Arco anterior. Se forman mesetas con edades de 11 a 8.9 Ma en las costas de Nayarit y Noroeste de Tepic, de 11 a 8 Ma en los Altos de Jalisco, entre 9 y 7 Ma en Querétaro y el Pathé en Hidalgo y en la costa de Álamo (Veracruz) con edades entre 7.5 y 6.5. La parte Oriental (donde actualmente se distribuye *P. leprosa*) permanece sin actividad (Fig. 16 B).

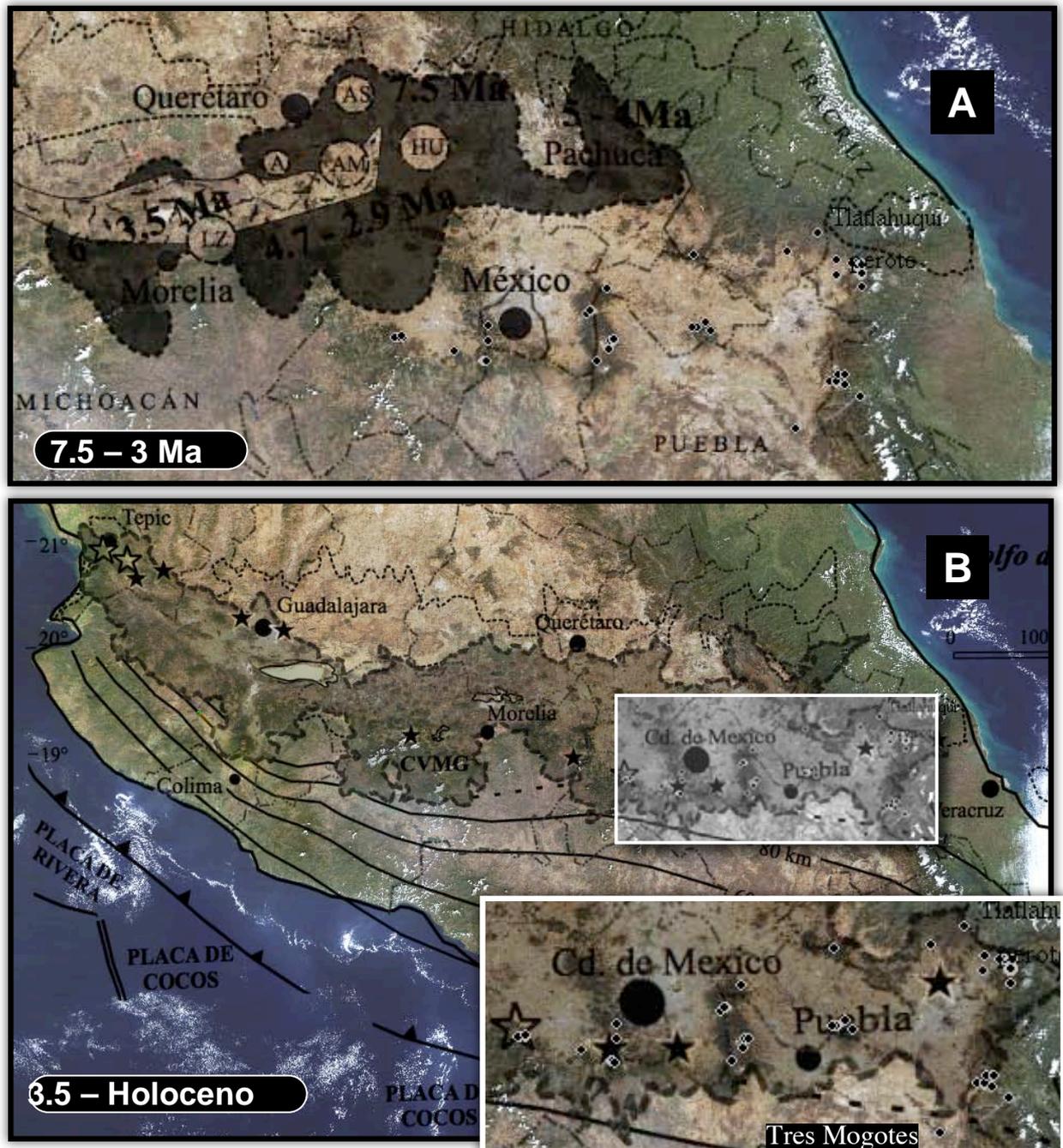
3) **7.5-3 Ma:** Episodio silíceo al final del Mioceno y vulcanismo bimodal del Plioceno temprano. En la parte Central hay grandes calderas. El vulcanismo bimodal se caracteriza por rocas del Mioceno tardío con rocas del Plioceno Temprano, y se presenta en regiones como Zacapu y Laguna de Cuitzeo (Michoacán), y Pachuca (Hidalgo). En este periodo el sector Oriental continúa su actividad volcánica (Fig. 17 A).

4) **3.5 Ma-Holoceno:** Arco del Plioceno tardío-Cuaternario: El vulcanismo silíceo y bimodal es remplazado por un arco andesítico-basáltico del Plioceno Medio al Plioceno Tardío. Al occidente se forman campos de volcanes monogenéticos como Mascota, Los Volcanes, San Sebastián y Atenguillo. Durante el Cuaternario en el Centro se forma el campo volcánico Michoacán Guanajuato- desde hace 2.8 Ma. En la región Zitácuaro-Valle de Bravo hay conos del Pleistoceno al Holoceno. En la porción Oriental el vulcanismo se restablece hace 3.7 Ma formando la Sierra de las Cruces y algunos centros alrededor de Apan. La mayor actividad se lleva a cabo en el Cuaternario, periodo en que se forman los conos monogenéticos de la Sierra Chichinautzin y Apan al Oriente del Estado de México se desarrolla la Sierra Nevada (Cerro Tláloc, Iztaccíhuatl y Popocatepetl) y más al oriente el volcán La Malinche y el alineamiento del Pico de Orizaba-Cofre de Perote, todos ellos con menos de un millón de años. Esta actividad afectó a las poblaciones de *P. leprosa* excepto a la población de Tres Mogotes que se encuentra en la región Puebla-Tehuacán, cuyo basamento es premiocénico (Paleoceno). Fig. 17 B.

Durante un periodo de 6 millones de años no hay actividad volcánica en la porción oeste del sector Oriental y solo hace 3.8 Ma (a finales del Plioceno y principios de Pleistoceno) cuando la mayor actividad eruptiva comienza para esta zona con el origen de la Sierra de las Cruces y el surgimiento del volcán Ajusco, que a mediados del Pleistoceno presenta su mayor actividad volcánica, y finalmente la actividad termina con el periodo de erupción del volcán Chichinautzin a finales del Pleistoceno y principios del Holoceno (Osete et al. 2000).

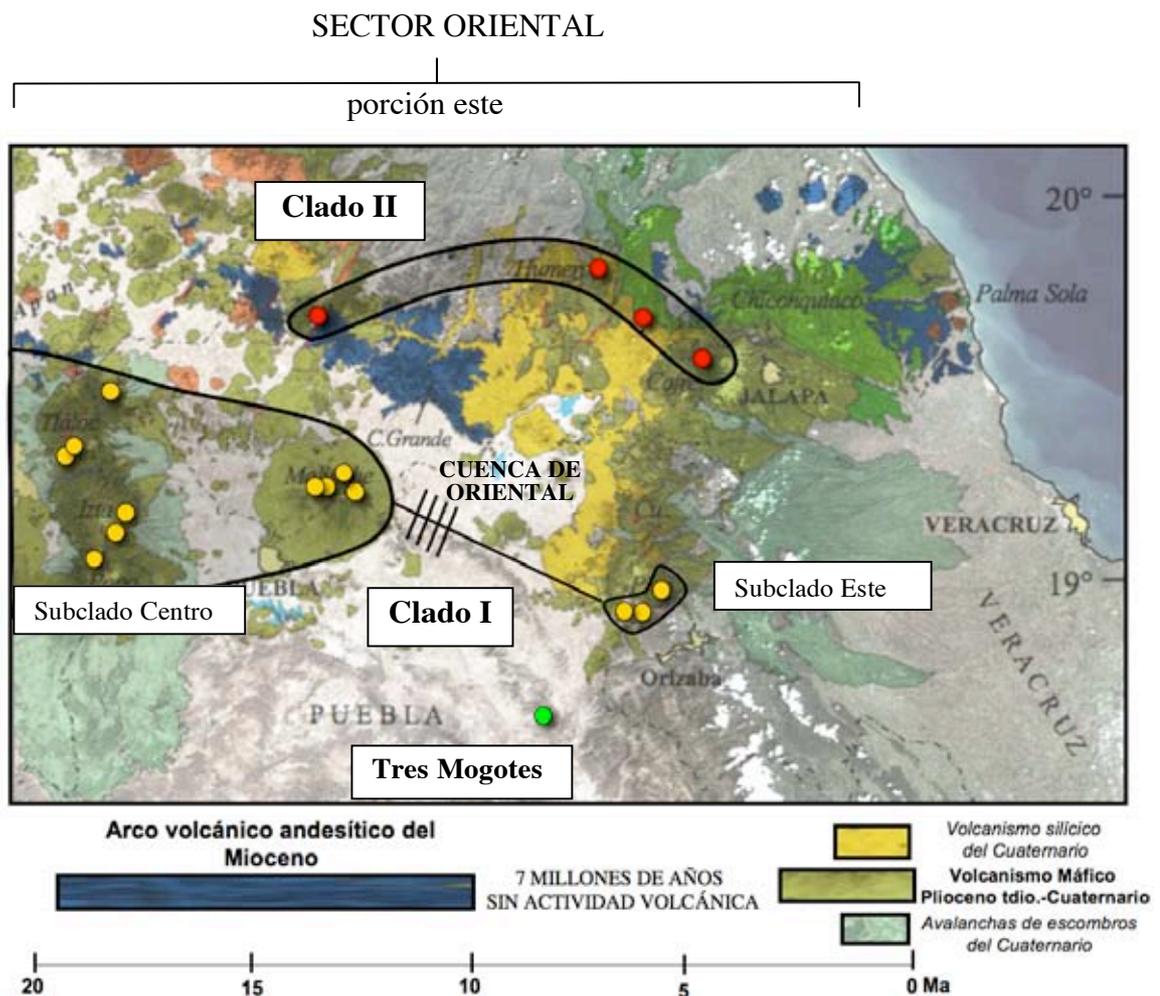


**Fig. 16.** Principales episodios evolutivos de la Faja Volcánica Transmexicana. A) Arco del Mioceno medio y tardío B) Episodio máfico del Mioceno tardío. En círculos pequeños con borde blanco se señalan los registros actuales de *P. leprosa*.



**Fig. 17.** Principales episodios evolutivos de la Faja Volcánica Transmexicana. **A)** Arco del Mioceno medio y tardío **B)** Episodio máfico del Mioceno tardío. En círculos pequeños con borde blanco se señalan los registros actuales de *P. leprosa*.

La porción este del sector Oriental permaneció sin actividad volcánica por un periodo de 7 Ma hasta la formación de la Cuenca de Oriental y los Axalapascos, que tienen una antigüedad de 1.8 Ma; está constituye una verdadera barrera climática y geográfica en entre las dos poblaciones (norte y centro) de *P. leprosa*. Mientras que la parte del Pico de Orizaba y Cofre de Perote se ha formado en el último millón de años (Fig. 18).



**Fig. 18.** Mapa que muestra los principales eventos geológicos que han afectado la porción este del sector Oriental. Se señala la ubicación de los principales linajes de *P. leprosa*.

Flores-Villela y Canseco-Márquez (2007) reportaron la presencia de 29 especies de pletodóntidos en la FVT (una del género *Bolitoglossa*, seis de *Chiropterotriton*, una de

*Parvimolge*, 15 de *Pseudoeurycea* y cinco de *Thorius*) de las cuales 15 son endémicas a la zona. Wiens et al. (2007) estimaron los tiempos de divergencia para varias de estas especies. Aquellas endémicas a la FVT tienen como mínimo 4 millones de años (Ma), y las especies que presentan una distribución fuera de la FVT tienen tiempos de divergencia mayores de hasta 14 Ma (Cuadro 8). Esto significa que estas especies, incluyendo *P. leprosa*, se formaron antes de la actividad volcánica más importante ocurrida en el sector Oriental y que sus poblaciones fueron fragmentadas cuando ésta actividad volcánica inició.

**Cuadro 8.** Algunas de las especies endémicas a la FVT que cuentan con tiempos de divergencia respecto a sus especies hermanas de acuerdo con Wiens et al. (2007).

<b>Especie registrada en la FVT</b>	<b>Distribución</b>	<b>Especie Hermana (EH)</b>	<b>Distribución de EH</b>	<b>Tiempo de divergencia</b>
<i>Chiropterotriton orculus</i>	Endémica a FVT	<i>C. dimidiatus</i>		6 Ma
<i>Pseudoeurycea altamontana</i>	Endémica a FVT	<i>P. robertsi</i>	Endémica a FVT	2 Ma
<i>P. gadovii</i>	Endémica a FVT	<i>P. melanomolga</i>	Endémica a FVT	4 Ma
<i>P. longicauda</i>	Endémica a FVT	<i>P. robertsi</i> <i>-P. altamontana</i>	Endémica a FVT	3.5 Ma
<i>C. orculus</i>	Endémica a FVT	<i>C. dimidiatus</i>	No endémica a FVT	6 Ma
<i>P. leprosa</i>	Endémica a FVT	<i>P. firscheini</i>	Fuera de FVT cerca de Tres Mogotes	6 Ma
<i>Chiropterotriton lavae</i>	No endémica FVT	<i>C. orculus</i> - <i>C. dimidiatus</i>	Ambas en el FVT	8 Ma
<i>P. lynchi</i>	No endémica FVT	<i>P. nigromaculata</i>	No endémica a FVT	7.5 Ma
<i>P. naucampatepetl</i>	No endémica FVT	<i>P. naucampatepetl</i>	No endémica a FVT	4.5 Ma
<i>P. lineola</i>	No endémica a FVT	Grupo <i>P. leprosa</i>	-	13 Ma
<i>P. cephalica</i>	No endémica a FVT	<i>P. galeanae</i>	Fuera de FVT	14 Ma

Mucho se ha escrito sobre la enorme diversidad de especies que alberga la Faja Volcánica Transmexicana y de su basta heterogeneidad ambiental (casi 30 tipos de climas diferentes), además de que ahí se concentra casi la cuarta parte de la

herpetofauna mexicana (249 de 1165 especies) y sobre todo de la notable cantidad de microendemismos como en el caso de los ambistomátidos que poseen el endemismo más elevado, seguido de los pletodóntidos (Canseco-Márquez y Flores Villela 2007). Respecto al grupo de los ambistomátidos, actualmente presentan problemas de diferenciación genética y morfológica debido a su reciente formación en el sector Oriental que no va más allá del Pleistoceno (1.6 Ma), por lo que en este sentido la FVT sí contribuye como generador de diversidad. Los pletodóntidos son el segundo grupo en nivel de endemismo. El origen de este endemismo en la FVT se debe principalmente a especies que lograron sobrevivir al vulcanismo pues la formación de especies ocurre en millones de años.

#### 7.6 Filogeografía de otras especies en la zona

Se han realizado varios trabajos filogeográficos que incluyen especies pertenecientes a la Faja Volcánica Transmexicana. Por ejemplo, el de Mateos et al. (2002) con biogeografía histórica y filogeografía de peces del género *Poeciliopsis*; Spellman y Klicka (2007) con la filogeografía del ave *Sitta carolinensis*; Rojas-Soto et al. (2007) con la filogeografía y patrones de diferenciación del ave *Toxostoma curvirostre*, Mejía-Madrid et al. (2007) con la filogeografía de una especie de nematodo parásito de peces de los cuerpos lacustres del centro de México y el de Domínguez-Domínguez (en prensa) con el pez *Zoogoneticus quitzeensis*.

Sin embargo, existen dos trabajos filogeográficos de especies terrestres de baja movilidad y que fueron realizados en la zona de distribución de *P. leprosa*, lo que permite comparar y discutir nuestros resultados. En primer lugar se encuentra el trabajo

de Demastes et al. (1992), realizado con *Cratogeomys merriami* empleando ADNmt citocromo *b* (1133 pb). Esta especie se distribuye prácticamente en las mismas localidades que *Pseudoeurycea leprosa*. Los análisis filogenéticos incluyeron cinco muestras de *Cratogeomys merriami* de las localidades del sur de la Ciudad de México, Hidalgo, Las Vigas y Cofre de Perote y, aunque marcan la distribución de esa especie en el Pico de Orizaba, esta muestra no fue incluida en el análisis. Sus resultados indican una divergencia alta entre las poblaciones de Hidalgo, Las Vigas y Cofre de Perote con respecto a la región central (Valle de México), lo que coincide con el patrón encontrado con *Pseudoeurycea leprosa*. En el 2005 Hafner et al. (2005) definen el estatus taxonómico de *Cratogeomys merriami* y los análisis incluyen 23 muestras de las localidades de Estado de México, Morelos, sur y norte de Tlaxcala, sur y norte de Puebla, Las Vigas, Cofre de Perote. El resultado fue una nueva categorización taxonómica de *Cratogeomys merriami* separando a la especie en tres diferentes. Los autores no discuten en ningún momento los patrones geográficos, climáticos o genéticos que pudieran haber ocasionado la separación de estas especies. Las especies fueron definidas con base en variación cromosómica, caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos y por ADNmt.

Al comparar los resultados del trabajo anterior con lo encontrado para *P. leprosa* aparece una semejanza importante donde la población de tuzas del norte de Tlaxcala (ahora *C. perotensis*) se encuentra a una distancia menor de su contraparte en la porción sur de ese estado (ahora *C. merriami*); este es un patrón similar de diferenciación genética encontrado entre las poblaciones del norte de Tlaxcala (Tlaxco) para *P. leprosa* con respecto a la porción central (Malinche).

Por otra parte, el trabajo realizado por Harris et al. (2000), empleando citocromo *b* (848 pb) en roedores de la especie *Peromyscus furvus* que habita en la Sierra Madre Oriental (SMOr), FVT y Sierra de Oaxaca, señalan que existe una población con una alta divergencia en relación a las otras siete poblaciones muestreadas. Esta población, conformada por 12 individuos, ocupa una posición basal en el clado y corresponde a la región de Oaxaca (que no ha sufrido vulcanismo). Sugieren que esta divergencia posiblemente ocurrió en tiempos del Pleistoceno temprano. La siguiente población más antigua se encuentra en la parte más norteña de la distribución en la SMOr (que también ha permanecido estable) y poblaciones con bajas divergencias se encuentran en la porción este del sector Oriental en la FVT, donde parece haber existido una recolonización. Este patrón resulta concordante con la distribución de las poblaciones de *P. leprosa*. La población de *P. leprosa* en Tres Mogotes queda fuera del FVT con una alta divergencia. El resto de las poblaciones de la FVT presentan una divergencia menor y la porción Este (Pico de Orizaba) es nuevamente colonizada en tiempos recientes. De esta forma la intensa actividad volcánica en la porción este del sector Oriental en la FVT ha jugado un papel importante en la eliminación de poblaciones previas al surgimiento de la actividad volcánica y nuevamente ha habido una recolonización. Carrasco-Núñez et al. (2006) hacen mención de que la actual cadena volcánica Cofre de Perote – Pico de Orizaba se ha formado sobre condiciones inestables y como consecuencia por gravedad, se han colapsado grandes edificios volcánicos. El basamento de rocas tiene una configuración irregular que genera los colapsos en dirección hacia la costa del Golfo. El colapso ha generado voluminosas avalanchas. Se han identificado grandes colapsos de magnitud catastrófica del volcán Pico de Orizaba, Las Cumbres y Cofre de Perote. Algunas de las avalanchas han alcanzado el Golfo de México atravesando hasta 120 km de longitud. La inestabilidad de los edificios

volcánicos se debe a la intensa alteración hidrotermal, fracturas y cambios topográficos abruptos. Los colapsos se han registrado desde tiempos históricos, aunque no se ha encontrado relación entre el colapso y la actividad volcánica. Por lo tanto, es razonable considerar viable la posibilidad de que poblaciones antiguas de *P. leprosa* pudieran haber habitado la región Cofre de Perote – Pico de Orizaba en tiempos previos a la actividad volcánica, aunque quizás éstas desaparecieron debido al colapso de los edificios volcánicos, quedando aislada la población de Las Vigas. Los datos parecen indicar que el Pico de Orizaba fue recolonizado por la expansión del *Clado I*.

#### 7.7 Evaluando hipótesis de fragmentación genética

Actualmente el rango altitudinal de *P. leprosa* es de los 2200 msnm hasta los 3400. Las regiones de FVT con menor elevación se localizan a 2250 msnm. El tipo de vegetación y clima que se presenta hoy día en muchos de esos sitios no son adecuados para que *P. leprosa* sobreviva. Sin embargo, de acuerdo con los datos geológicos y climáticos, es posible que durante el Plioceno *P. leprosa* se distribuyera ampliamente, quedando separada en primer lugar la población de Tres Mogotes y subsecuentemente la población del norte (Tlaxco, Tlatlauquitepec, Teziutlán y Las Vigas) y del Centro (Malinche hasta el Nevado de Toluca y del Pico de Orizaba). La separación de las poblaciones del norte respecto a las del centro es antigua (dos millones de años). Por ello, es posible considerar que el grupo que dio origen al *Clado I* y al *Clado II* se haya extinto.

Estos datos respaldan la hipótesis alternativa obtenida con el análisis de *árboles de genes* vs. *de árboles de poblaciones* para distinguir entre escenarios de fragmentación

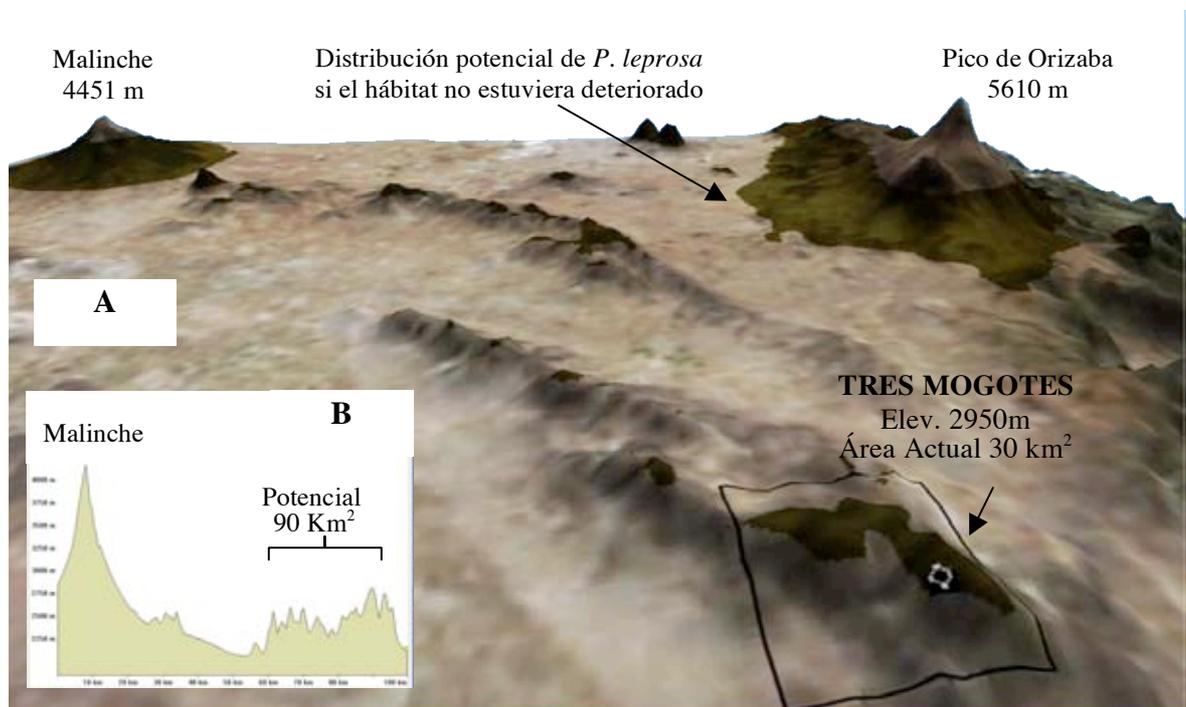
histórica y reciente. La hipótesis considera a dos grupos profundamente aislados (norte y centro) con menor costo coalescente. Los resultados son completamente concordantes con la divergencia de aloenzimas y los eventos geográficos encontrados entre las poblaciones del norte respecto a las poblaciones centrales. El apoyo de esta hipótesis representa prácticamente la mitad del costo en coalescencia con respecto a la hipótesis de fragmentación reciente de las poblaciones del norte respecto a las poblaciones centrales. Maddison y Maddison (2002) señalan que la validación de la hipótesis es completamente dependiente de la resolución del árbol de genes y que el impacto en la genealogía depende de la magnitud del evento (e. g. el grado y tiempo de un cuello de botella).

Respecto a las poblaciones del norte, el gran tamaño efectivo detectado con el programa **MIGRATE 2.1.3** (Beerli y Felsenstein 2001), y la presencia de haplotipos ancestrales son indicadores de estabilidad poblacional por largo tiempo. Su separación se considera reciente debido a que existe sorteo de linajes incompleto. Las relaciones entre las poblaciones del grupo del centro (Pico de Orizaba y grupo central) coalescen en tiempos más cortos y el tamaño efectivo es pequeño indicando que su origen es reciente, no se detectó sorteo de linajes, lo que sugiere una fragmentación inmediatamente después de haberse establecido.

## 7.8 Unidades para la conservación

Es factor determinante identificar especies y unidades dentro de especies que permitan dirigir de forma certera esfuerzos para su manejo, monitoreo y que además faciliten la

aplicación de reglas para conservar los taxa y su hábitat. La categoría de nueva especie para la población de Tres Mogotes es idónea, ya que se inserta en este tipo de criterio. El estatus para esta especie confinada a una sola localidad, con aproximadamente 30 km<sup>2</sup> (Fig. 19 A), la colocaría en el estatus de especie Críticamente Amenazada (menos de 100 km) bajo los lineamientos de la IUCN, y aunque el hábitat fuera el adecuado en toda la cordillera, ésta ocuparía un área de 90 km por lo que no cambiaría su situación (Fig. 19 B). Es importante señalar que esta localidad no es un área natural protegida como en el caso de La Malinche y Pico de Orizaba.



**Fig. 19.** A) Distribución actual de la especie nueva propuesta de Tres Mogotes, B) Distribución potencial.

El *Clado I* y el *Clado II* constituyen cada uno un grupo de organismos que ha sido aislado por tiempo suficiente uno del otro y que muestran divergencia genética. Bajo la visión de Ryder (1986), cada uno de esos grupos puede ser considerado una ESU (Unidad Evolutivamente Significativa). Una ESU es aquella entidad cuyos haplotipos

de ADN mitocondrial son recíprocamente monofiléticos y difieren significativamente en frecuencias de alelos nucleares (Moritz 1994). Este concepto de ESU se considera útil para el reconocimiento y conservación de poblaciones conespecíficas, ya que su protección implica la permanencia de las poblaciones en tiempo evolutivo. Los *Clados I* y *II* no son dos poblaciones continuas sino grupos de poblaciones fragmentadas, cada una con tamaño diferentes que debido a los requerimientos de hábitat (humedad, temperatura, altitud, etc.), así como a las características propias de *P. leprosa* (baja vagilidad, alta filopatría, entre otras), estas poblaciones se encuentran aisladas. Además cada una tiene tamaños poblacionales y tamaños efectivos diferentes y presiones ambientales y antropogénicas variadas, pues algunas se encuentran en Parques Nacionales y otras fuera de ellos. Por lo tanto, no es posible establecer para cada ESU una estrategia de conservación única. El análisis de la información genética en cada una de estas poblaciones aisladas parece ser la mejor opción para generar un diagnóstico de conservación al menos para *P. leprosa*. De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los recursos Naturales (IUCN), una especie puede clasificarse como *Críticamente Amenazada*, *Amenazada* o *Vulnerable* si el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) disminuye de 50, 250 o 1000 respectivamente (IUCN 2000). Para evitar la extinción a corto plazo el tamaño efectivo no debe disminuir de 50 y a largo plazo no debe disminuir de 500 (Franklin 1980). Lynch et al. (1995) han señalado que tamaños efectivos poblacionales de 1000 son altamente vulnerables a la extinción por endogamia en una escala de tiempo de aproximadamente 100 generaciones. El riesgo se incrementa si se presenta estocasticidad poblacional (variación al azar en las tasas de nacimiento, mortalidad y género entre individuos), variación temporal por factores ambientales críticos (e. g. cambio climático) o por problemas genéticos (depresión por endogamia, acumulación de mutaciones deletéreas

y pérdida de variación adaptativa). Por estas razones estimar el  $N_e$  es uno de los parámetros fundamentales relevantes en la genética de la conservación. El tamaño efectivo se puede estimar por métodos directos contabilizando el número de organismos (hembras, machos, juveniles, viejos, en edad reproductiva, etc.) y por métodos indirectos (genéticos). Waples (1991) identificó tres tipos de métodos indirectos para estimar  $N_e$ : los que estiman cuellos de botella y  $N_e$  actual o reciente (ambos con microsatélites) y los que estiman  $N_e$  histórico (secuencias de ADNmt). Las estimaciones de  $N_e$  histórico permiten hacer especulaciones sobre actuales niveles de diversidad genética (neutral), pero su uso hacia la conservación de la especie debe considerarse con cautela debido a su sensibilidad de error en la tasa de mutación, a la sensibilidad con que se pueden violar los supuestos de neutralidad y no inmigración y a que las condiciones de equilibrio asumidas pueden tomar miles o millones de generaciones. Los resultados de  $N_e$  histórico para *P. leprosa* con citocromo *b* del presente trabajo nos muestran tamaños efectivos poblacionales (entre 10 000 y 20 000) para los clados *I* y *II*. Los problemas genéticos podrían aparecer en poblaciones con variación genética mínima (tamaños efectivos pequeños) y con débil o prácticamente ningún intercambio migratorio con otras poblaciones.

Considerando que los resultados de ADNmt concuerdan con el análisis de aloenzimas (Lynch et al. 1983) podríamos esperar tamaños menores de  $N_e$  para las poblaciones actuales. Una reducción a corto plazo de las poblaciones con bajo  $N_e$  podría incrementar el efecto de la deriva e imposibilitar la adaptación y con ello disminuir la longevidad de la población. Michalski y Durka (2007) indican que factores históricos como la colonización han influenciado en el hecho de que poblaciones periféricas de especies que presentan una fuerte estructura genética exhiban baja diversidad genética y altos

coeficientes de endogamia. Los resultados de este trabajo sugieren el empleo de otro tipo de marcadores (como microsatélites) y metodologías (frecuencia de alelos y de heterocigóticos) para conocer con certeza la situación actual de cada una de las poblaciones, especialmente en el *Clado I* que son las que presentan prácticamente un haplotipo por población.

Respecto a las poblaciones de *Clado II*, el bajo número de ejemplares encontrados y el grado de fragmentación del hábitat ocasionada por factores antropogénicos como cambios de uso de suelo (en Teziutlán y Tlatlauquitepec), manejo forestal con desmontes e introducción de especies diferentes de pino con fines comerciales (principalmente en Tlaxco) han ocasionado el declive de las poblaciones. Pertoldi (2007) señala que, aunque las poblaciones tengan una gran variación genética, ésta es irrelevante cuando encaran la extinción debido a problemas antropogénicos. Dentro del *Clado II*, la población de *P. leprosa* que se encuentra en peor estado es la de Tlaxco (pob. 23), pues a pesar de búsquedas intensivas en repetidas ocasiones sólo se encontró un ejemplar, mientras que otras especies como *Chiropterotriton* sp. se encontraron en números relativamente elevados (más de 10) en la corteza de tocones en bosque ralo. Asimismo, *P. cephalica* fue encontrada bajo trocos grandes en zona de transición entre matorral y bosque.

Parra-Olea et al. (1999) señalan que la región de Las Vigas (pob. 20) es un lugar que alberga una fauna de salamandras grande y compleja formada por cinco especies simpátricas de salamandras pletodóntidas: *Chiropterotriton chiropterus*, *P. leprosa*, *P. melanomolga*, *P. cephalica*, y *P. naucampatepetl*. Parra-Olea et al. (2001) señalan que hubo un declive alarmante en la abundancia de salamandras en la década de los 80's del

siglo XX ya que algunas de éstas especies se encontraban en grandes números (mas de 100 por día de colecta) con anterioridad. Actualmente, *P. naucampatepetl* se considera extinta y aunque las otras cuatro especies están todavía presentes, son muy poco abundantes (menos de 20).

Desafortunadamente, la situación actual del hábitat en esa zona es precaria, quedando un remanente de bosque de Abetos (*Abies*) con bosque secundario y arbustos, mismo que ha sido talado de forma extensiva. Siete años han pasado desde la publicación de Parra-Olea et al. (2001), donde se mencionó que la alta diversidad de esta región se encontraba en peligro debido a actividades humanas, cuyo efecto probablemente repercutiría en la desaparición de algunas especies aun sin ser descritas. Es claro que para la política de conservación en México el conocimiento que se genera y publica, así sea una revista de prestigio, recibe poca o ninguna atención y peor aún no se ejecuta ninguna acción de conservación que frene un poco la presión sobre estas especies. Nuevamente en este trabajo se recalca la importancia de proteger lugares como Las Vigas antes de que la riqueza de nuestro país se siga perdiendo a una tasa desmedida.

#### 7.9 Declive de salamandras terrestres en ANP del centro de México.

En un escenario en donde en este momento los Parques Nacionales representaran un hábitat adecuado para las poblaciones de *P. leprosa*, tendríamos que ignorar las siguientes condiciones:

**Incendios provocados** en casi todos los parques después de la temporada de invierno con la finalidad de obtener nuevos brotes verdes de pasto “renuevo” y las cabras puedan comer. **Saqueo de suelo** con camiones para las festividades

*navideñas. Contaminación con basura debido a festejos en las capillas de los veneros de agua por los pobladores (en el lado poblano del Parque N. Iztaccíhuatl es muy común dejar los residuos como plásticos y vidrio “no lo recogen” este último también puede producir un incendio). Compactación de suelo por la permanencia de toros de lidia [en bosques de La Malinche]. Saqueo ilegal de árboles con motosierra (herramienta prohibida en ANP). Sobre ecoturismo de montaña debido a que la región más poblada de México es la zona centro [ p. e. más de 200 tiendas de campaña en las faldas del cerro Telapón durante el día del montañista en el Parque N. Zoquiapan] y de eventos electrónicos con camiones de gente para celebrar el día de la naturaleza coordinados por el Instituto de la Juventud en La Malinche, y Aperturas de caminos con maquinaria pesada de hasta 10m de ancho en el Pico de Orizaba para la construcción del súper telescopio e instalación de antenas microondas y establecimiento de torres de alta tensión por la CFE, etc.*

Aunado a lo anterior, la pobre representación (genética) de la especie *P. leprosa* que se encuentra protegida en los Parques Nacionales del centro de México (*Clado I*) también se ve amenazada por factores como el incremento de la radiación UV-B, enfermedades infecciosas, lluvia ácida, contaminantes ambientales y calentamiento global (Frías-Álvarez et al. 2008). De todos estos factores hasta ahora sólo se tiene información concreta sobre el efecto del cambio climático en bolitoglossinos. El cambio climático genera una modificación en el rango de distribución de las salamandras terrestres (o de su hábitat, como resultado de un incremento en la temperatura y pérdida de humedad). Esto puede provocar fragmentación de las poblaciones reduciendo el tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ), la variabilidad genética y el potencial evolutivo (Spielman et al.

2004). Para el caso de *P. leprosa* y el resto de salamandras de distribución simpátrica, se han encontrado que debido a su limitada vagilidad éstas enfrentan la pérdida de su hábitat y con ello desaparecen sus poblaciones. Así, para las salamandras terrestres de bosques templados, los rangos de hábitat limitados por el incremento de la temperatura se convierten en la principal amenaza, en un periodo muy corto (en 50 años se habrá reducido considerablemente el hábitat de la especie; Parra-Olea et al. 2005a) a pesar de que se encuentren en Áreas Naturales Protegidas.

*Pseudoeurycea leprosa* es la especie con la distribución más amplia y una de las que mejor han resistido los cambios históricos como vulcanismo y oscilaciones pleistocénicas y, en tiempos humanos, fragmentación y calentamiento global. Considero que esta especie es un excelente indicador de lo que puede suceder con las 18 especies de bolitoglossinos que viven en simpatría con *P. leprosa* y cuyo estatus para algunas de ellas es de **Peligro Crítico** como el caso de *P. naucampatepetl*.

Es conveniente entonces consolidar esfuerzos institucionales y gubernamentales en las regiones con alto índice de diversidad de especies, para generar conciencia de protección ambiental, e implementar una estrategia de uso renovable de los recursos naturales que contemple la integración de las poblaciones locales ya que finalmente en sus manos se encuentra la permanencia del bosque y de sus especies.

## 8. CONCLUSIONES

1.- La población de Tres Mogotes presenta características genéticas, morfológicas, de uso de hábitat y distribución geográfica que sugieren puede considerarse como una especie distinta de *P. leprosa*.

2.- Las distancias genéticas entre el *Clado I* y el *Clado II* no son tan grandes como sucede en muchas de las poblaciones del género *Pseudeurycea*. Además, no presentan una marcada diferenciación morfológica y ambos grupos son de hábitos terrestres. Por tanto, se considera que el estatus de especie para estos grupos es el adecuado.

3.- En comparación con el resto de los bolitoglossinos mexicanos que presentan una distribución restringida, *P. leprosa* se considera una especie de amplia distribución en la Faja Volcánica Transmexicana.

4.- El linaje del *Clado II* mantiene haplotipos ancestrales con grandes divergencias y además presenta sorteo de linajes incompleto debido a que sus poblaciones se han separado recientemente. El *Clado I* presenta haplotipos con poca divergencia, es decir reciente coalescencia. El *Clado I* y el *Clado II* han tenido una historia evolutiva independiente y antigua.

5.- Ninguno de los clados de *P. leprosa* se encuentra o ha pasado por una expansión reciente. La expansión probablemente ocurrió sólo para el *Clado I* hace más de un millón de años. Por ello la formación de la Faja Volcánica Transmexicana en el sector Oriental durante el último Ma y los cambios climáticos ocurridos a partir de los últimos

200 mil años han servido como detractores de la diversidad generada en los pasados 6 millones de años, fragmentando grupos y eliminando poblaciones de *P. leprosa* previamente establecidas.

6. Los Parques Nacionales protegen un grupo de poblaciones que tienen baja variabilidad genética y de origen reciente (*Clado I*). Por su parte, las poblaciones de *P. leprosa* ubicadas al norte de la FVT son aquellas que presentan una divergencia más profunda, alto grado de fragmentación de hábitat ocasionado por actividades humanas, bajos números poblacionales y quedan fuera de las áreas naturales protegidas. De esta forma, las acciones de conservación se deberían de enfocar en proteger el hábitat de las poblaciones del norte.

## ANEXO I

Instituciones nacionales y extranjeras que albergan ejemplares de *P. leprosa*.

ACRÓNIMO	NOMBRE	No.	AÑO DE ACTUALIZACIÓN
CAS	Department of Herpetology <b>California Academy of Sciences</b> Golden Gate Park, San Francisco CA 94118-4599 Jens V. Vindum JVindum «AT» CalAcademy.Org Phone: (415) 750-7037	73	AGOSTO-2000
CM	Section of Amphibians and Reptiles <b>Carnegie Museum of Natural History</b> 4400 Forbes Avenue Pittsburgh, PA 15213 Steve Rogers, Collection Manager rogerss «AT» carnegiemuseums.org	8	FEBRERO 2003
FMNH	Amphibians and Reptiles Field Museum of Natural History 1400 S. Lake Shore Dr Chicago, IL 60605-2496 Alan Resetar aresetar «AT» fmnh.org	872	SEPTIEMBRE-2000
GMNH	Georgia Museum of Natural History Natural History Bldg. University of Georgia Athens, GA 30602-1882 Liz McGhee emcghee «AT» arches.uga.edu	7	JUNIO-2001
KU	Division of Herpetology Museum of Natural History University of Kansas Lawrence, KS 66045-2454 John E. Simmons jsimmons «AT» ku.edu	101	JULIO-1995
LACM	Department of Ichthyology and Herpetology Natural History Museum of Los Angeles County 900 Exposition Blvd. Los Angeles, CA 90007 Jeff Seigel, Collection Manager jsiegel «AT» nhm.org	128	JULIO-2000
LSUMZ	Museum of Natural Sciences 119 Foster Hall Louisiana State University Baton Rouge, LA 70803 Jim McGuire, Curator of Herpetology jmcguire «AT» lsu.edu Phone: (225) 578-3081 Collection Database	79	OCTUBRE-1994
MCZ	Department of Herpetology Museum of Comparative Zoology Harvard University Cambridge, MA 02138 Jose P. Rosado JRosado «AT» MCZ.Harvard.Edu Phone: (617) 495-2496	122	JULIO-1994
MVZ	*Gymnophiona and Caudata sections Museum of Vertebrate Zoology 3101 Valley Life Sciences Bldg. University of California Berkeley, CA 94720 David B. Wake Collection Database	538	MARZO-2005

ROM	Centre For Biodiversity And Conservation Biology Royal Ontario Museum 100 Queen's Park Toronto, Ontario M5S 2C6 Canada	5	MARZO-2001
TCWC	Texas Cooperative Wildlife Collection Department of Wildlife and Fisheries Sciences Texas A&M University College Station TX 77843-2258 R. Kathryn Vaughan Herpetology Division Texas Memorial Museum University of Texas Austin, TX 78712 David Cannatella catfish «AT» mail.utexas.edu	28	JULIO-1994
TNHCE	Zoology Section University of Colorado Museum UCB 265 Boulder, CO 80309 Amphibians & Reptiles Mariko Kageyama, Collections Manager mariko.kageyama «AT» colorado.edu	2	JULIO-1994
UCM	Division of Amphibians and Reptiles National Museum of Natural History Smithsonian Institution Washington D.C. 20560	4	OCTUBRE-1999
USNM	Department of Biology UTA Box 19498 University of Texas at Arlington Arlington, TX 76019 Jonathan A. Campbell campbell «AT» uta.edu	156	MAYO-2001
UTA	Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México Apartado Postal 70-399 México D. F. 04510, MÉXICO Tel. +(5255) 56 22 48 25, 56 22 48 32 Fax +(5255) 56 22 48 28	14	JULIO-1994
MZFC	Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Copilco, Coyoacán A.P. 70-233 México, Distrito Federal. C.P. 04510 Tel(s). (01) 5550-5148 y 5622-9067 ext. 47839	30	-----
CNAR	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional Prol. de Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Casco de Santo Tomás 11340 México D.F. Tel. 5729 6000 Fax 5729 6000 ext 46205	158	-----
IPN	Universidad Autónoma de Tlaxcala Licenciatura en Biología Km 10.5 de la carretera San Martín Texmelucan, San Felipe Ixtacuixtla, Tlax. C.P. 90720	---	-----
UATx		35	-----

## ANEXO II

Localidades de colecta, y haplotipos encontrados para *P. leprosa*.

No.	Localidad	Latitud	Longitud	N	No H.	Haplotipos
1	Nevado de Toluca, Edo. México	19 11 37 N	99 50 53 W	4	1	R
2	Texcalyacatl, Estado de México	19 07 14 N	99 30 00 W	11	1	S
3	Dto. Leones. Distrito Federal	19 16 00 N	99 18 02 W	5	1	T
4	Ajusco. Distrito Federal	19 10 58 N	99 18 00 W	8	1	P
5	Santa Marta, Estado de México	19 03 41 N	99 19 17 W	3	1	L
6	Zempoala, Estado de México	19 03 12 N	99 18 35 W	5	1	Q
7	Popocatépetl, México	19 04 22 N	98 42 42 W	7	2	J, K
8	Calpan, Puebla	19 07 53 N	98 35 30 W	6	2	A, C
9	Atzompa, Puebla	19 10 50 N	98 33 35 W	4	2	E, F
10	Llano Grande Estado de Méx.	19 20 20 N	98 43 14 W	5	3	I, G, H
11	Río Frío, Estado de México	19 21 58 N	98 41 41 W	7	1	O
12	Nanacamilpa, Tlaxcala	19 28 49 N	98 35 46 W	4	2	M, N
13	Malinche Poniente, Tlaxcala	19 11 14 N	98 01 19 W	2	1	A
14	Malinche Poniente, Tlaxcala	19 15 28 N	98 05 42 W	4	2	A, B
15	Malinche Norte, Tlaxcala	19 16 37 N	98 02 40 W	5	2	A, D
16	Malinche Oriente, Tlaxcala	19 13 48 N	97 58 30 W	4	1	A
17	Texmalaquilla, Puebla	18 56 31 N	97 17 24 W	4	2	U, V
18	Texmola, Veracruz	18 56 08 N	97 14 40 W	1	1	W
19	Xometla	18 58 30 N	97 11 26 W	3	3	W, X
20	Vigas, Veracruz.	19 37 51 N	97 05 26 W	5	3	Z, ac, ad
21	Teziutlán, Veracruz	19 39 21 N	97 15 00 W	1	1	Y
22	Tlatlahuquitepec, Puebla	19 42 47 N	97 32 24 W	3	2	aa, af
23	Tlaxco, Tlaxcala	19 41 45 N	98 04 33 W	1	1	ab
24	Tres Mogotes, Puebla	18 39 28 N	97 29 24 W	1	1	Z

# ANEXO III

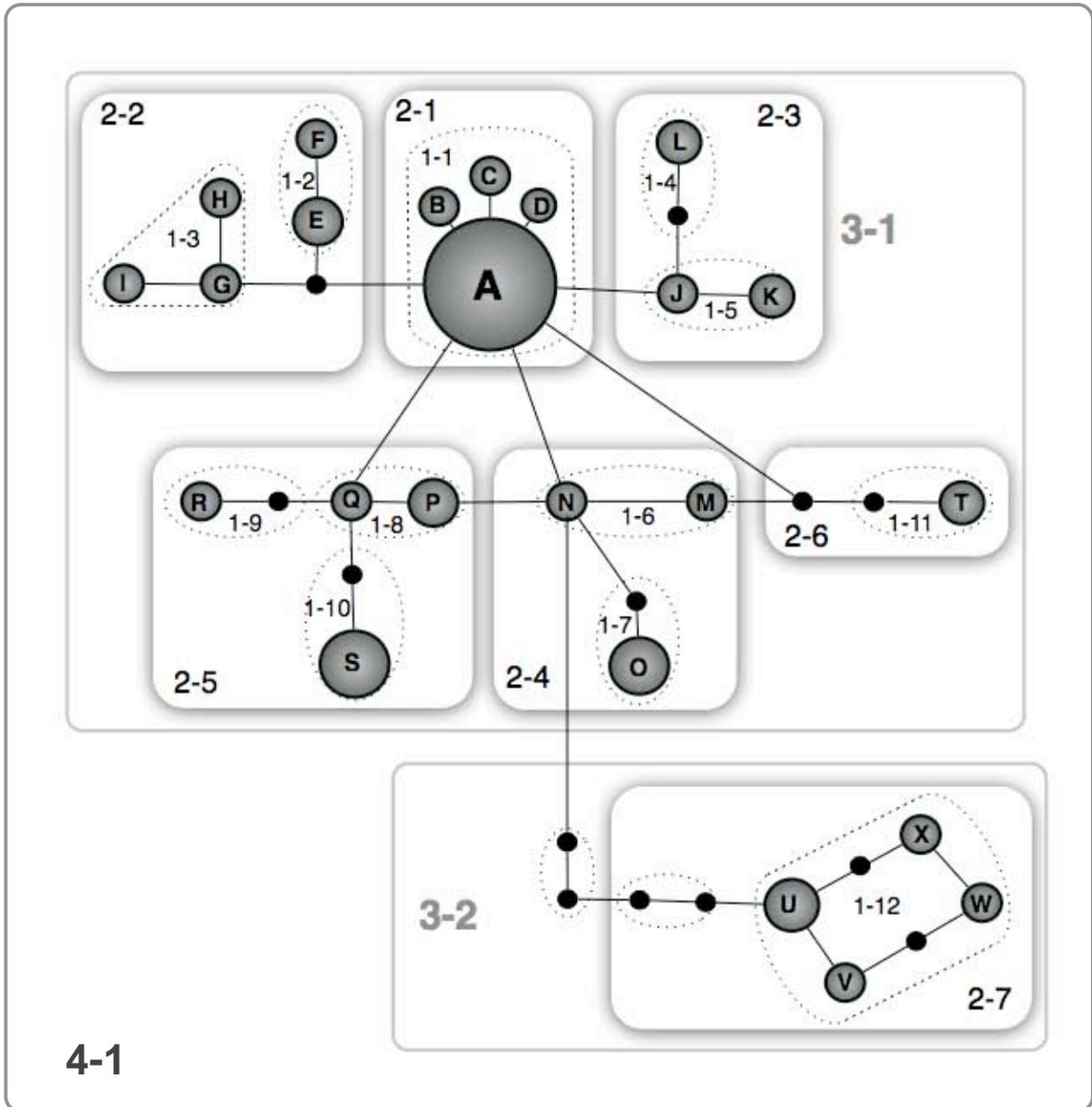
## distancia P sin corregir

	XomA	XomB	A8	A8	M.nor1	M.nor15	Majp0	Azo2	Azo4	Ajo1	lao1	lao1	lao2	lao4	Nan1	Nan2	Pap1	Pap0	Rte1	Mar1	Tex.caf	Cap0	Zemp1	Tad1	Vgs1	Vgs2	Tib0	Tic.c	Tib0	Vgs0	TremMgs	P.risc.heini	GE				
XomA	h1																																				
XomB	h2	0.146																																			
A8	h3	0.291	0.437																																		
A8	h4	0.437	0.291	0.146																																	
M.nor1	h5	1.164	1.310	0.873	1.019																																
M.nor15	h6	1.166	1.311	0.875	1.020	0.147																															
Majp0	h7	1.310	1.164	1.019	0.873	0.146	0.292																														
Azo2	h8	1.456	1.601	1.164	1.310	0.291	0.438	0.437																													
Azo4	h9	1.601	1.747	1.310	1.456	0.437	0.583	0.582	0.146																												
Ajo1	h10	1.164	1.310	0.873	1.019	0.291	0.438	0.437	0.582	0.728																											
lao1	h11	1.601	1.747	1.310	1.456	0.437	0.584	0.582	0.728	0.873	0.728																										
lao1	h12	1.310	1.456	1.019	1.164	0.437	0.583	0.582	0.437	0.582	0.728	0.873																									
lao2	h13	1.164	1.310	0.873	1.019	0.291	0.438	0.437	0.291	0.437	0.582	0.728	0.146																								
lao4	h14	1.310	1.456	1.019	1.164	0.437	0.583	0.582	0.437	0.582	0.728	0.873	0.291	0.146																							
Nan1	h15	1.019	1.164	0.728	0.873	0.146	0.293	0.291	0.437	0.582	0.146	0.582	0.582	0.437	0.582																						
Nan2	h16	1.164	1.310	0.873	1.019	0.291	0.439	0.437	0.582	0.728	0.291	0.437	0.728	0.582	0.728	0.146																					
Pap1	h17	1.310	1.456	1.019	1.164	0.146	0.292	0.291	0.437	0.582	0.437	0.582	0.582	0.437	0.582	0.291	0.437																				
Pap0	h18	1.456	1.601	1.164	1.310	0.291	0.438	0.437	0.582	0.728	0.582	0.728	0.728	0.582	0.728	0.437	0.582	0.146																			
Rte1	h19	1.310	1.456	1.019	1.164	0.437	0.586	0.582	0.728	0.873	0.437	0.873	0.873	0.728	0.873	0.291	0.437	0.582	0.728																		
Mar1	h20	1.601	1.747	1.310	1.456	0.437	0.584	0.582	0.728	0.873	0.728	0.582	0.873	0.728	0.873	0.582	0.437	0.582	0.291	0.437	0.873																
Tex.caf	h21	1.601	1.747	1.310	1.456	0.437	0.584	0.582	0.728	0.873	0.437	0.873	0.873	0.728	0.873	0.582	0.728	0.582	0.728	0.873	0.873																
Cap0	h22	1.310	1.456	1.019	1.164	0.146	0.292	0.291	0.437	0.582	0.437	0.582	0.582	0.437	0.582	0.291	0.437	0.291	0.437	0.582	0.582	0.582															
Zemp1	h23	1.310	1.456	1.019	1.164	0.146	0.292	0.291	0.437	0.582	0.146	0.582	0.582	0.437	0.582	0.291	0.437	0.291	0.437	0.582	0.582	0.291	0.291														
Tad1	h24	1.601	1.747	1.310	1.456	0.437	0.583	0.582	0.728	0.873	0.437	0.873	0.873	0.728	0.873	0.582	0.728	0.582	0.728	0.873	0.873	0.582	0.582	0.291													
Vgs1	h25	3.348	3.493	3.057	3.202	3.057	3.211	3.202	3.057	3.202	3.348	3.493	3.202	3.057	3.202	3.348	3.057	3.202	3.493	3.348	3.202	3.202	3.202	3.493													
Vgs2	h26	3.348	3.493	3.057	3.202	3.057	3.211	3.202	2.766	2.911	3.348	3.493	2.911	2.766	2.911	3.202	3.348	3.057	3.202	3.493	3.348	3.202	3.202	3.202	3.493	0.291											
Tib0	h27	3.348	3.202	3.057	2.911	3.057	3.212	2.911	3.057	3.202	3.348	3.493	3.202	3.057	3.202	3.348	3.057	3.202	3.493	3.348	3.202	3.202	3.202	3.493	0.582	0.582											
Tic.c	h28	2.916	3.062	2.625	2.771	2.624	2.776	2.770	2.333	2.478	2.915	3.061	2.478	2.333	2.478	2.769	2.915	2.770	2.917	3.061	3.062	2.769	2.770	2.770	3.061	2.186	1.894	2.186									
Tib0	h29	2.911	3.057	2.620	2.766	2.620	2.480	2.766	2.620	2.766	2.911	2.766	2.620	2.766	2.620	2.766	2.620	2.766	2.911	3.057	2.766	2.766	2.766	2.766	3.057	2.766	2.766	2.766	0.874								
Vgs3	h30	2.475	2.620	2.183	2.329	2.183	2.189	2.329	2.475	2.620	2.475	2.329	2.329	2.183	2.329	2.329	2.183	2.329	2.475	2.620	2.038	2.329	2.329	2.329	2.620	3.202	3.202	3.202	2.478	2.183							
TremMgs	h31	3.372	3.204	2.989	2.821	2.944	2.757	2.776	3.330	3.137	2.946	3.307	2.968	3.137	2.940	3.135	3.137	3.330	3.322	3.524	3.334	2.776	2.949	3.117	5.205	5.205	4.685	3.917	3.547	2.828							
P.FschH	GE	6.978	7.148	6.638	6.808	6.962	6.818	7.132	6.970	7.132	6.966	7.140	6.649	6.639	6.801	6.954	7.132	6.801	6.971	7.293	7.148	6.983	6.801	6.975	7.128	8.513	8.183	8.364	7.660	7.661	7.313	7.580					

## distancia corregida MV

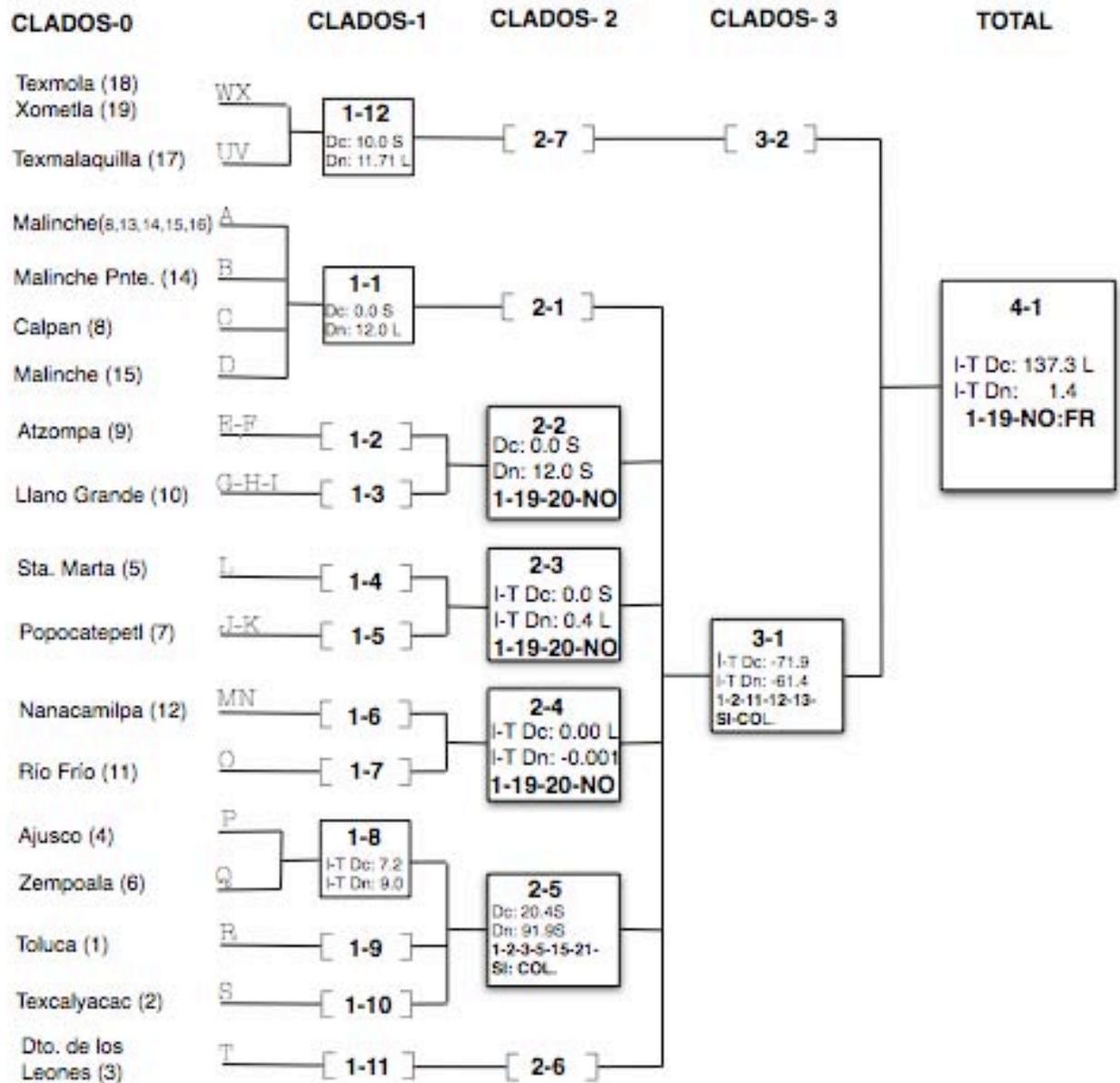
	XomA	XomB	A8	A8	M.nor1	M.nor15	Majp0	Azo2	Azo4	Ajo1	lao1	lao1	lao2	lao4	Nan1	Nan2	Pap1	Pap0	Rte1	Mar1	Tex.caf	Cap0	Zemp1	Tad1	Vgs1	Vgs2	Tib0	Tic.c	Tib0	Vgs0	TremMgs	P.risc.heini	GE					
XomA	h1																																					
XomB	h2	0.145																																				
A8	h3	0.295	0.446																																			
A8	h4	0.446	0.295	0.145																																		
M.nor1	h5	1.243	1.409	0.907	1.066																																	
M.nor15	h6	1.245	1.413	0.909	1.068	0.145																																
Majp0	h7	1.409	1.245	1.066	0.908	0.144	0.292																															
Azo2	h8	1.579	1.751	1.228	1.392	0.290	0.441	0.438																														
Azo4	h9	1.747	1.922	1.390	1.556	0.437	0.592	0.587	0.144																													
Ajo1	h10	1.233	1.398	0.900	1.058	0.291	0.443	0.439	0.590	0.742																												
lao1	h11	1.820	2.002	1.445	1.619	0.453	0.614	0.609	0.768	0.927	0.771																											
lao1	h12	1.409	1.579	1.066	1.228	0.437	0.592	0.587	0.438	0.587	0.742	0.927																										
lao2	h13	1.245	1.412	0.908	1.068	0.290	0.441	0.438	0.290	0.438	0.590	0.768	0.144																									
lao4	h14	1.409	1.579	1.066	1.228	0.437	0.592	0.587	0.438	0.587	0.742	0.927	0.290	0.144																								
Nan1	h15	1.072	1.235	0.745	0.902	0.144	0.293	0.291	0.440	0.590	0.143	0.613	0.590	0.440	0.590																							
Nan2	h16	1.243	1.410	0.907	1.067	0.293	0.446	0.443	0.595	0.748	0.291	0.454	0.748	0.595	0.748	0.590																						
Pap1	h17	1.409	1.579	1.066	1.228	0.144	0.292	0.290	0.438	0.587	0.439	0																										

## ANEXO IV

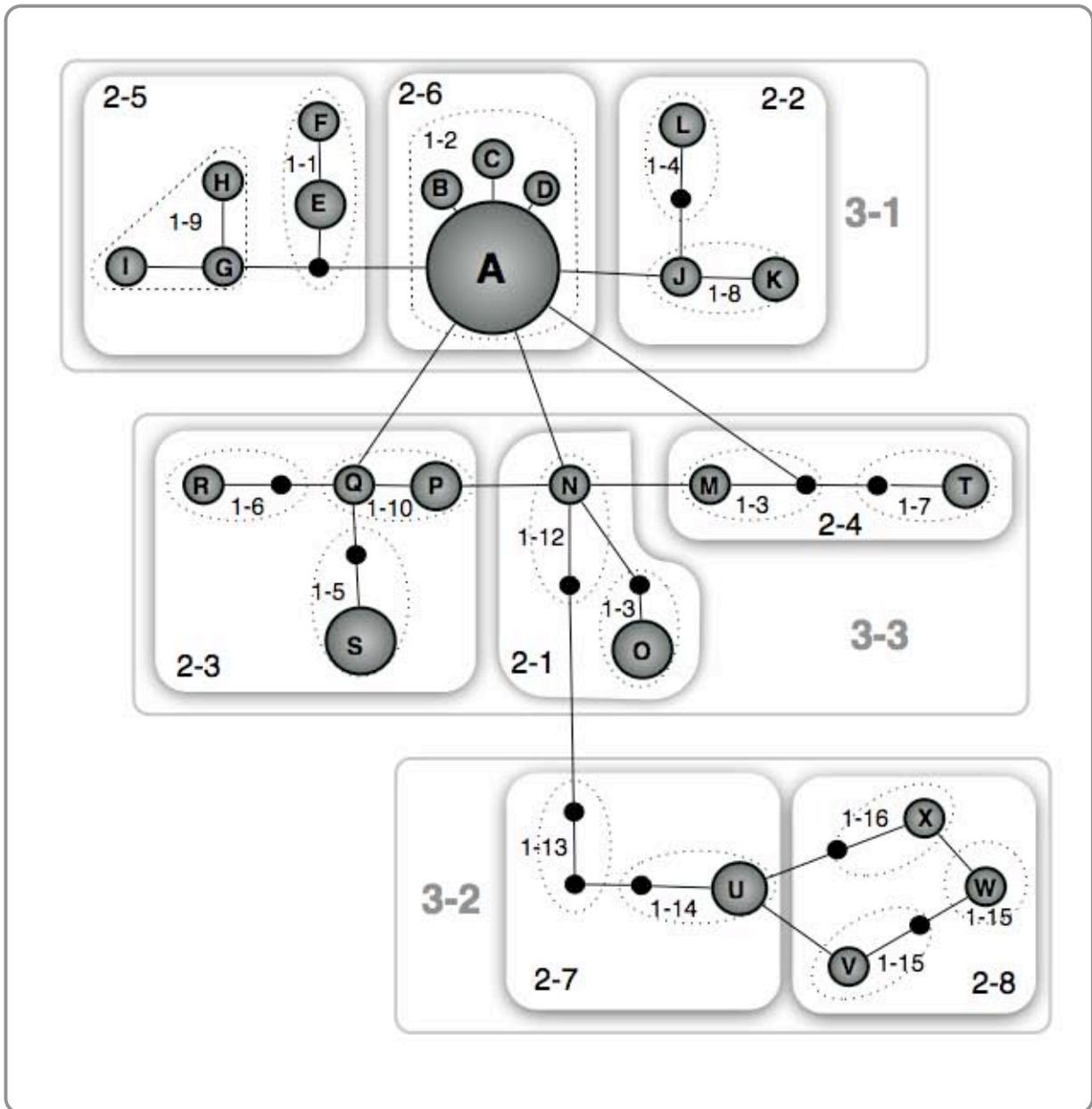


Reconstrucción de NCPA de modo Manual. Las letras denotan los haplotipos encontrados.

**A.** Parque Nacional Malinche y Parque Nacional Iztaccíhuatl (8, 13, 14, 15 y 16); **B.** Poniente del Parque Nacional Malinche (14); **C.** Calpan Parque Nacional Iztaccíhuatl (8); **D.** Norte del Parque Nacional Malinche (15); **E-F.** Atzompa Parque Nacional Iztaccíhuatl (9); **G-H-I.** Llano Grande Parque Nacional Zoquiapan (10); **J-K.** Parque Nacional Popocatepetl (7); **L.** 8.5 oeste km de Santa Marta (5); **M-N.** Nanacamilpa (12); **O.** Río Frío Parque Nacional Zoquiapan (11); **P.** Parque Nacional Ajusco (4); **Q.** Parque Nacional Lagunas de Zempoala (6); **R.** Nevado de Toluca (1); **S.** Texcalyacac (2); **T.** Desierto de los Leones (3); **U-V.** Texmalaquilla (17), **W.** Texmola (18); **W-X.** Xometla (19).

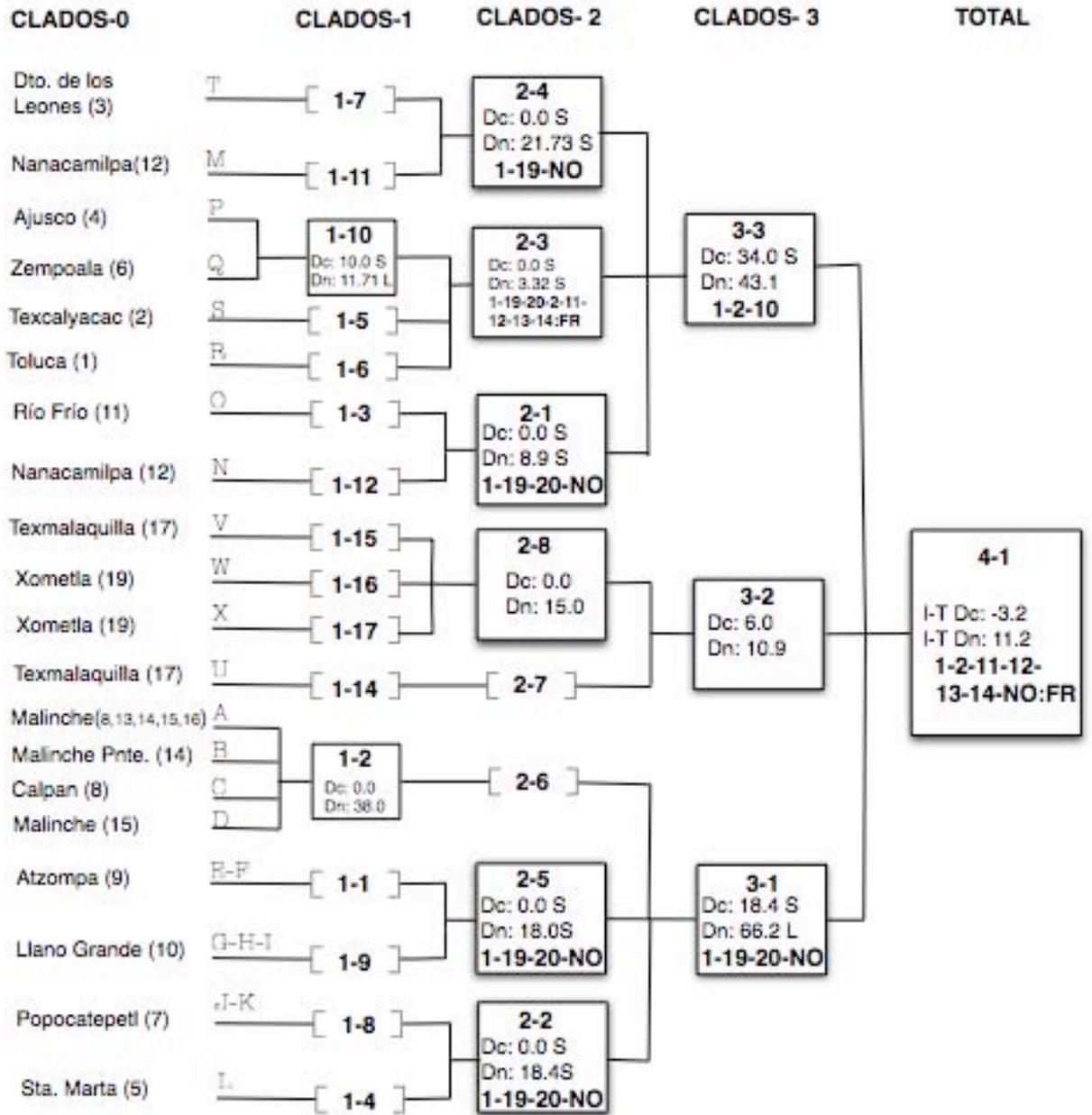


Resumen gráfico del anidamiento del NCPA de modo manual. Se indican valores estadísticamente significativos de Dc, Dn e I-T. Las distancias que son significativamente grandes o pequeñas están señaladas con una L o S respectivamente. Se muestra la guía de la clave de inferencia. COL = Colonización a gran distancia. FR = Fragmentación.



Reconstrucción de NCPA de modo Manual. Las letras denotan los haplotipos encontrados.

**A.** Parque Nacional Malinche y Parque Nacional Iztaccíhuatl (8, 13, 14, 15 y 16); **B.** Poniente del Parque Nacional Malinche (14); **C.** Calpan Parque Nacional Iztaccíhuatl (8); **D.** Norte del Parque Nacional Malinche (15); **E-F.** Atzompa Parque Nacional Iztaccíhuatl (9); **G-H-I.** Llano Grande Parque Nacional Zoquiapan (10); **J-K.** Parque Nacional Popocatepetl (7); **L.** 8.5 oeste km de Santa Marta (5); **M-N.** Nanacamilpa (12); **O.** Río Frío Parque Nacional Zoquiapan (11); **P.** Parque Nacional Ajusco (4); **Q.** Parque Nacional Lagunas de Zempoala (6); **R.** Nevado de Toluca (1); **S.** Texcalyacac (2); **T.** Desierto de los Leones (3); **U-V.** Texmalaquilla (17), **W.** Texmola (18); **W-X.** Xometla (19).



Resumen gráfico del anidamiento del NCPA de modo automatizado. Se indican valores estadísticamente significativos de Dc, Dn e I-T. Las distancias que son significativamente grandes o pequeñas están señaladas con una L o S respectivamente. Se muestra la guía de la clave de inferencia. COL = FR = Fragmentación.

## ANEXO V

### *Características de la especie*

Algunos de los siguientes datos de la especie fueron tomados de Uribe *et al.* (1999).

**Hábitat:** Se encuentra en áreas cubiertas por bosque de *Pinus*, *Pinus-Abies* o de *Pinus-Quercus*, son lugares templados y se caracterizan por ser húmedos o muy húmedos.

**Tamaño:** Mediano; con Longitud Hocico-Cloaca =  $44.7 \pm 6.4$  mm y Longitud Cola = 35.7 mm; las hembras son más grandes que los machos y de forma alargada, la cola y extremidades largas.

**Cabeza:** Ovalada vista desde arriba, hocico corto (3.7 mm) con los orificios nasales en la región anterior a los ojos, pequeños y separados uno del otro; la boca es grande, con 40 o más dientes maxilares-premaxilares a cada lado, pequeños, con la punta de color rojizo.

**Cuello:** Del mismo ancho que la cabeza.

**Cuerpo:** Largo, casi cilíndrico; con doce pliegues costales.

**Cola:** De menor longitud que el cuerpo; es de apariencia anillada porque en toda su extensión presenta surcos circulares; en su parte ventral presenta un canal longitudinal.

**Extremidades:** Cortas; los dedos no están ensanchados en su parte terminal y la membrana interdigital no incluye falanges de los dígitos medios de los pies.

**Parte dorsal:** Color café amarillento con puntos dispersos gris claro; en su parte lateral, es gris un poco más claro que los puntos y en su parte ventral es gris pálido. La región gular es de coloración más clara, blanquecina.

**Alimentación:** Esta constituida básicamente por coleópteros, dípteros, ortópteros, arácnidos, quilópodos y diplópodos.

**Reproducción:** Durante el verano se localizan poblaciones en las que se presentan crías, jóvenes y adultos. La actividad sexual se registra a fines de verano y principios de otoño.

**Taxonomía de *Pseudoeurycea leprosa***

En 1869 Edward Drinker Cope profesor de Zoología de Haverford College en Pensilvania, describió por vez primera a la especie *Spelerpes leprosus* basándose en dos especímenes (Sintipos) de la Familia Plethodontidae colectados en Orizaba, Veracruz, México (localidad tipo); actualmente, estos ejemplares están depositados en el United States National Museum of Natural History (USNM), Smithsonian Institution, Washington.

El género *Pseudoeurycea* fue propuesto 75 años más tarde (1944) por Edward H. Taylor, tomando como especie tipo del género a *Spelerpes leprosus*, al cual le asignó el nombre de *Pseudoeurycea leprosa*; de esta manera *S. leprosus* y los diez nombres propuestos a lo largo de esos 75 años, pasaron a ser una sinonimia y *Pseudoeurycea leprosa* queda como nombre válido de la especie con el siguiente arreglo taxonómico:

Clase **Anfibia** Linnaeus, 1758

Orden **Urodela** Latreille, 1825

Familia **Plethodontidae** Gray, 1850

Subfamilia **Plethodontinae** Gray, 1850

Género *Pseudoeurycea* Taylor, 1944

Especie *Pseudoeurycea leprosa* (Cope, 1869)

Sinónimos:

*Spelerpes leprosus* Cope, 1869; *Spelerpes laticeps* Brocchi, 1883; *Geotriton leprosus* Garman, 1884; *Geotriton laticeps* Garman, 1884; *Spelerpes orizabensis* Blatchley, 1893; *Spelerpes gibbicaudus* Blatchley 1893; *Oedipus leprosus* Duna 1918; *Eurycea leprosus* Noble 1921; *Oedipus orizabensis* Taylor, 1939; *Oedipus leprosus* Taylor, 1939; *Bolitoglossa leprosa* Taylor, 1941; *Pseudoeurycea leprosa*, Taylor 1944.

## 8. LITERATURA CITADA

- Avise, J. C. , J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham. T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews in Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, M .A. Harvard University Press.
- Avise, J. C. and R. A. Lansman. 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In *Evolution of Genes and Proteins*. ed. M. Nei. R. K. Koehn, pp. 147-64. Sunderland, Mass: Sinauer.
- Avise, J. C., G. Giblin-Davidson, J. Laerm, J. C. Patton, R. A. Lansman. 1979. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America* 76:6694-98.
- Avise, J. C., J. E. Neigel, and J. Arnold. 1984. Demographic influences on DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution* 20:99-105.
- Ballard, J. W. O., B. Chernoff and A. C. James. 2002. Divergence of mitochondrial DNA is not corroborated by nuclear DNA, morphology, or behavior in *Drosophila simulans*. *Evolution* 56:527-545.
- Beaumont, M. A. and M. Panchal. 2008. On the validity of nested clade phylogeographical analysis. *Molecular Ecology*. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03786.x
- Beerli, P. and J. Felsenstein. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America* 98:4563-4568.
- Bille, T. 2000. Dietary patterns of *Pseudoemyrcea leprosa* (Caudata, Plethodontidae) from Rio Frio, Mexico. *Alytes* 17(3-4):114-124.
- Blaustein, A. R., Wake D. B. and W. P. Sousa. 1994. Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8:60-71.
- Brooker, L. C. and Brooker M. G. 2002. Dispersal and population dynamics of the blue-breasted fairy-wren, *Malurus pulcherrimus*, in fragmented habitat in the Western Australian. *Wildlife Research* 29(3):225-234.
- Brown, W. M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In *Evolution of Genes and Proteins*, ed. M. Nei, R. K. Koehn. pp. 62-88. Sunderland, Mass: Sinauer.
- Brown, W. M., George, M. Jr., Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America* 76:1967-1971.
- Carrasco-Núñez, G., R. Díaz-Castellón, L. Siebert, B. Hubbard, M. F. Sheridan and S. Raúl Rodríguez. 2007. Multiple edifice-collapse events in the Eastern Mexican Volcanic Belt: The role of sloping substrate and implications for hazard assessment. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 158(1-2):151-176.
- Carstens, B. C., A. L Stevenson, J. D. Degenhardt and J. Sullivan. 2004. Testing nested phylogenetic and phylogeographic hypotheses in the *Plethodon vandykei* species group. *Systematic Biology* 53(5):781-792.
- Castillo-Rodríguez, M., J. López Blanco and D. Palacios. Multivariate analysis of the location of rock glaciers and the enviromental implications in a tropical volcano:

- La Malinche (Central Mexico). Suppl. Band, Zeitschrift für Geomorphologie 51(20):39-54.
- Clement, M., D. Posada, K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659.
- Cooperrider, A. R., F. Noss, Jr. H. H. Welsh, C. Carroll and W. Zielinski. 2000. Terrestrial fauna of redwood forests. In *The Redwood Forest: History, Ecology and Conservation*, ed. RF Noss, pp. 119–164. Covelo, CA: Island pp. 339.
- Corser, J. D. 2001. Decline of disjunct greeb salamander, *Aeneides aeneus*, populations in southern Appalachians. *Biological Conservation*. 97:119-126.
- Davic, R. D. and Jr. H. H. Welsh. 2004. On the ecological roles of salamanders. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 35:405-434.
- Davies, K. F., C. Gascon, and C. R. Margules. 2001. Habitat fragmentation: consequences, management, and future research priorities. In: Soule M. E. Orinas G. H. (eds) *Conservation Biology: research priorities for the nex decade*. Island Press, Washington pp. 81-97.
- Demant, A. 1982. Interpretación geodinámica del volcanismo del Eje Neovolcánico Transmexicano y sus problemas de interpretación. Universidad Nacional Autónoma de México. *Instituto de Geología* 5:217-222.
- Demastes, J. W., T. A. Spradling, M. S. Hafner, D. J. Hafner and D. L. Reed. 2002. Systematics and phylogeography of pocket gophers in the genera *Cratogeomys* and *Pappogeomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22(1):144-154.
- DeMaynadier, P. G. and M. L. Hunter, Jr. 1998. Effects of silvicultural edges on the distribution and abundance of amphibians in Maine. *Conservation Biology* 12:340-352.
- Domínguez-Domínguez, O., F. Alda, G. Pérez-Ponce de León, J. L. García-Garitagoitia and I. Doadrio. 2008. Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* (Beab, 1898) (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. In press.
- Drummond, A. J. and A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BioMed Central, Evolutionary Biology* 7:214.
- Drummond, A. J., S. Y. W. Ho, M. J. Phillips, A. Rambaut. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Public Library of Science, Biology* 4:699–710.
- Drummond, J. W. 2008. Reconstructing evolutionary bottlenecks using the coalescent. *Computational Biology and Evolution*. <http://bioinf.cs.auckland.ac.nz/index.php/2008/03/02/the-coalescent-for-bottlenecks/>.
- Dupuis, L. A., J. N. M. Smith and F. Bunnell. 1995. Relation of terrestrial-breeding amphibian abundance to tree-stand age. *Conservation Biology* 9(3):645-653.
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Falcón-Ordaz, J., J. C. Windfield-Pérez, B. Mendoza-Garfias, G. Parra-Olea and G. Pérez-Ponce de León. 2007. *Cosmocerca acanthurum* n. sp. (Nematoda: Cosmocercidae) in *Pseudoeurycea leprosa* and *Chiropterotrion orculus* from the Transmexican Volcanic Belt, Central Mexico, with a checklist of the helminth parasites of plethodontid salamanders. *Zootaxa* 1434:27-49.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.

- Ferrari, L., S. Conticelli, C. Petrone and P. manetii. 2000. Late Miocene mafic volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanc Belt. *Tectonophysiscs*, 318:161-185.
- Flores-Villela, O. y L. Canseco-Márquez. 2007. Riqueza de la herpetofauna pp. 407-420. En: Luna I., J. J. Morrone y D. Espinosa (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*. UNAM. México, D. F.
- Flores-Villela, O. y L. Canseco-Márquez. 2004. Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoológica Mexicana* 20(2): 115-144.
- Franklin, I. R. 1980. Evolutionary changes in small populations. In: *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective* (eds Soulé ME, Wilcox BA), pp. 135–149. Sinauer & Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Frías-Álvarez, Patricia, V. T. Vredenburg, M. Familiar-López, J. E. Longcore, E. González-Bernal, Georgina Santos-Barrera, L. Zambrano and G. Parra-Olea. 2008. Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *EcoHealth* 5:18-26.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics Society of America* 147(2):915-925
- García-París, M., D. A. Good, G. Parra-Olea and D. B. Wake. 2000. Biodiversity of Costa Rican salamanders: Implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(4): 1640-1647.
- García-Vázquez, U. O., M. G. Gutiérrez-Mayén, C. A. Hernández-Jiménez y V. Auriol-López. 2005. Estudio de la densidad poblacional y algunos aspectos ecológicos de *Pseudoeurycea leprosa* en el Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala, México. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 14(1):10-17.
- Garrick, R. C., R. J. Dyer, L. B. Beheregaray and P. Sunnucks. 2008. Babies and bathwater: a comment on the premature obituary for nested clade phylogeographic analysis. *Molecular Ecology* 17:1401–1403.
- Gene Codes. 2005. Sequencher. Version 4.5. Gene Codes Corporation. Ann Arbor. MI.
- Gómez-Tuena, A., M. T. Orozco Esquivel y L. Ferrari. 2005. Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. Volumen Conmemorativo del Centenario. *Temas Selectos de la Geología Mexicana*. Tomo LVII 3:227-285.
- Grant, W. S. and B. M. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity* 89(5):415-426.
- Hafner, M. S., J. E. Light, D. J. Hafner, S. V. Brant, T. A. Spradling and J. W. Demastes. 2005. Cryptic species in the Mexican pocket gopher *Cratogeomys merriami*. *Journal of Mammalogy* 86(6):1095-1108.
- Hanken, J. 1980. Morphological and genetic investigations of miniaturization in salamanders (Genus *Thorius*). Ph. D. Dissertation in Zoology, University of California, Berkeley.
- Hanken, J., and D. B. Wake. 1998. Biology of tiny animals: systematics of the minute salamanders (*Thorius*: Plethodontidae) from Veracruz and Puebla, Mexico, with descriptions of five new species. *Copeia* 1998:312-345.
- Harris, D., D. S. Rogers and J. Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia; Muridae) based on cytochrome *b* sequence data. *Molecular Ecology*. 9:2129-2135.

- Harrison, S. and E. Bruna. 1999. Habitat fragmentation and large scale conservation: what do we know for sure? *Ecography* 22:225-232.
- Hartwell, H. W. Jr. 1990. Relictual amphibians and old-growth forests. *Conservation Biology* 4(3):309-319.
- Hey, J. and C. A. Machado. The study of structured populations new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4: 535-543.
- Hudson, R. R. 1990. Gene genealogies and the coalescent processes. In *Oxford surveys in evolutionary biology* 7:1-44.
- IUCN 2007. Anfíbios de Mesoamérica están desapareciendo. <http://www.iucn.org/places/orma/noticias/13112002.htm>
- IUCN Species Survival Commission. 2000. IUCN Red List Categories and Criteria, Version 3.1. IUCN, Gland, Switzerland.
- Jackson, S. T. and Overpeck J. T. (2000). Responses of plant populations and communities to environmental changes of the late Quaternary Paleobiology. 26:194–220.
- Jockusch, E. L., and D. B. Wake. 2002. Falling apart and merging: diversification of slender salamanders (Plethodontidae: *Batrachoseps*) in the American West. *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 361-391.
- Jockusch, E. L., K. P. Yanev, and D. B. Wake. 2001. Molecular phylogenetic analysis of slender salamanders, genus *Batrachoseps* (Amphibia: Plethodontidae), from central coastal California with descriptions of four new species. *Herpetological Monographs* 15:54-99.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2):87-90.
- Kishino, H. M. and T. Yano T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- Knowles, L. L., Madisson W. P. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*. 12: 1541-1554.
- Kolozsvary, M. B. and R. K. Swihart. 1999. Habitat fragmentation and the distribution of amphibians: patch and landscape correlates in farm land. *Canadian Journal of Zoology*. 77(8): 1288-1299.
- Kuhner, M. K., Yamato, J., Felsenstein. 1998. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on coalescent. *Genetics Society of America* 149(1):429-434.
- Laroche, J. and J. D. Durand. Genetic structure fragmented populations of a threatened endemic percid of the Rhône river: *Zingel asper*. *Heredity* 92:329-334.
- Larson, A., D. B. Wake and K. P. Yanev. 1984. Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics Society of America* 106:293-308.
- Lessa, P. E., J. A. Cook and J. L. Patton. 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10331-10334
- Lombard, R. E., and D. B. Wake. 1976. Tongue evolution in the lungless salamanders, Family Plethodontidae. I. Introduction, theory and a general model of dynamics. *Journal of Morphology*. 148(3):265-286.

- Lombard, R. E., and D. B. Wake. 1977. Tongue evolution in the lungless salamanders, family Plethodontidae. II. Function and evolutionary. *Journal of Morphology* 153(1):265-286
- Lombard, R. E., and D. B. Wake. 1986. Tongue evolution in the lungless salamanders, family Plethodontidae. IV. Phylogeny of plethodontid salamanders and the evolution of feeding dynamics. *Systematic Zoology* 35:532-551.
- Lozano-García, S., S. Sosa-Nájera, Y. Sugiura y M. Caballero. 2005. 23,000 yr of vegetation history of the upper Lerma a tropical high altitude basin in Central México. *Quaternary Research* 64:70-82.
- Lynch, J. F., D. B. Wake and S. Y. Yang. 1983. Genetic and morphological differentiation in mexican *Pseudoeurycea* (Caudata: Plethodontidae), with a description of a new species. *Copeia* 884-894 .
- Lynch, M., J. Conery and R. Burger. 1995. Mutation accumulation and the extinction of small populations. *The American Naturalist* 146(4):489-518.
- Maddison, D. R. and W. P. Maddison. 2002. MacClade 4.05 OS X. Analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison 2007. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.01 <http://mesquiteproject.org>.
- Mahoney, M. J. 2004. Molecular systematics and phylogeography of the *Plethodon elongatus* species group: combining phylogenetic and population genetic methods to investigate species history. *Molecular Ecology* 13:149-166.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- Martinez-Solano, I., E. Jockusch and D. B. Wake. 2007. Extreme population subdivision throughout a continuous range: phylogeography of *Batrachoseps attenuatus* (Caudata: Plethodontidae) in western North America. *Molecular Ecology* 16:4335-4355.
- Martínez-Solano, I., J. Teixeira. D. Buckley and M. García-París. 2006. Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology* 15:3375-3388.
- Mateos, M., O. I. Sanjur and R. C. Vrijenhoek. 2002. Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Evolution* 56(5):972-984.
- McDonald, J. H. And M. Kreitman. 1991. Adaptative protein evolution at the ADH locus in *Drosophila*. *Nature* 351:652-654.
- Mejía-Madrid, H. H., E. Vázquez-Domínguez and G. Pérez-Ponce de León. 2007. Phylogeography and freshwater basins in central Mexico: recent history as revealed by fish parasite *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda). *Journal of Biogeography* 34:787-801.
- Metcalfe, S. E. 2006. Late Quaternary environments of the Northern deserts and Central Transvolcanic belt of Mexico. *Annals of Missouri Botanical Garden* 93: 258-273.
- Michalski, S. G. and W. Durka. 2007. High selfing and high inbreeding depression in peripheral populations of *Juncus atratus*. *Molecular Ecology* 16:4715-4727.
- Moritz, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Tree* 9(10):373-375.
- Moritz, C., C. J. Schneider, and D. B. Wake. 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology* 41:273-291.

- Mueller, R. L. 2006. Evolutionary rates, divergence dates, and the performance of mitochondrial genes in Bayesian Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology* 55(2):289-300.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70:3321-3323.
- Nussbaum, R. A. 1983. Amphibians and reptiles of the Pacific Northwest. University Press of Idaho, Moscow, Idaho. In *Amphibian Declines: the conservation status of United States species*. University of California Press pp. 695.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest Version 2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Osete, M. L., V. C. Ruiz-Martínez, C. Caballero, C. Galindo, J. Urrutia-Fucugauchi and D. H. Tarling. 2000. Southward migration of continental volcanic activity in the Sierra de las Cruces, Mexico: paleomagnetic and radiometric evidence. *Tectonophysics* 318: 201-215.
- Panchal, M and M. A. Beaumont. 2007. The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. *Evolution* 61:1466–1480.
- Papenfuss, T. J., D. B. Wake and K. Adler. 1983. Salamanders of the genus *Bolitoglossa* from the Sierra Madre del Sur of southern Mexico. *Journal of Herpetology* 17:295-307.
- Parra-Olea, G. 2002. Molecular phylogenetic relationships of neotropical salamanders of the genus *Pseudoeurycea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22(2):234-246.
- Parra-Olea, G., E. Martínez-Meyer and G. Pérez-Ponce de León. 2005a. Forecasting climate change effects on salamander distribution in the highlands of central Mexico. *Biotropica* 37(2):202-208.
- Parra-Olea, G., M. García-París, James Hanken and D. B. Wake. 2005b. Two new species of *Pseudoeurycea* (Caudata: Plethodontidae) from the mountains of northern Oaxaca Mexico. *Copeia* 2005:461-469.
- Parra-Olea, G., M. García-París and D. B. Wake. 1999. Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Revista de Biología Tropical* 47(1-2): 217-223.
- Parra-Olea, G., M. García-París, J. Hanken and D. B. Wake. 2004. A new species of arboreal salamander (Caudata: Plethodontidae: *Pseudoeurycea*) from the mountains of Oaxaca, Mexico. *Journal of Natural History* 38:2119-2131.
- Parra-Olea, G., T. J. Papenfuss and D. B. Wake. 2001. New species of lungless salamanders of the genus *Pseudoeurycea* (Amphibia: Caudata: Plethodontidae) from Veracruz, Mexico. *Scientific Papers of the Natural History Museum, The University of Kansas* 20: 1-9.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology. Notes* 6: 288-295.
- Peralta-García, A. 2006. Relaciones filogenéticas del género *Batrachoseps* (Amphibia: Plethodontidae) en la Península de Baja California. Tesis Profesional para obtener el título de biólogo. Baja California, México.
- Pertoldi, C., R. Bijlsma and V. Loeschcke. 2007. Conservation genetics in globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. *Biodiversity and Conservation* 16:4147-4163.
- Petit, R. 2008. On the falsifiability of the nested clade phylogeographic analysis method. *Molecular Ecology* 17(6):1404-1404.
- Petit, R, J. 2007. The coup de grâce for the nested clade phylogeographic analysis? *Molecular Ecology*. 0: doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03589.x

- Pfenniger, M. and D. Posada 2002. Phylogeography history of the land snail *Calindula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56(9):1776-1788.
- Posada, D. and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Version 3.6. *Bioinformatics* 14(9):817-818.
- Posada, D., K. A. Crandall, A. R. Templeton. 2000. Geodis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9:487-488.
- Rambaut, A. and A. J. Drummond. 2007. Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Regal, P. J. 1966. Feeding specializations and the classifications of terrestrial salamanders. *Evolution* 20:92-407.
- Reusch, B. H. T. and T. E. Wood. 2007. Molecular ecology of global change. *Molecular Ecology* 16:3973-3992.
- Rissler, L. J., R. J. Hijmans, C. H. Graham, C. Moritz and D. B. Wake. 2006. Phylogeographic lineages and species comparisons in conservation analysis: a case study of California Herpetofauna. *American Naturalist* 167:655-666.
- Roderic, D. M. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12(4):357-358.
- Rogers, A. R., and H. C. Harpending. 1992. Population growth make waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3):552-569.
- Rojas-Soto, O. R., A. E. De Los Monteros and R. M. Zink. 2007. Phylogeography and patterns of differentiation in the curve-billed thrasher. *The Condor* 109(2):456-463.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES Version 3.1: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* 1:9-10.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Ed. Cold Spring Harbor Lab Press, New York.
- Sanderson, M. J. 2002. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* 19:101-109.
- Saunders, D. A., R. J. Hobbs and C. R. Margules. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5:18-32.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin Version 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shaffer, M. L. 1981. Minimum population sizes for species conservation. *BioScience* 31:131-134.
- Simberloff, D. and J. Cox. 1987. Consequences and costs of conservation corridors. *Conservation Biology* 1:63-71.
- Simonsen K. L., G. A. Churchill and C. F. Aquadro. 1995. Properties of statistical test of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics Society of America* 141:413-429.
- Slatkin, M. and R. R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations *Genetics* 129:555-562.
- Slowinski, J. B. 2001. Molecular polytomies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19(1):114-120.

- Spellman, G. M. and J. Klicka. 2007. Phylogeography of the white-breasted nuthatch (*Sitta carolinensis*): diversification in North American pine and oak woodlands. *Molecular Ecology* 16:1729-1740.
- Spielman, D., B. W. Brook, D. A. Briscoe and R. Frankham. 2004. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease genetic resistance? *Conservation Genetics* 5:439-448.
- Staub, N. L., C. W. Brown, and D. B. Wake. 1995. Patterns of growth and movements in a population of *Ensatina eschscholtzii platensis* (Caudata: Plethodontidae) in the Sierra Nevada, California. *J. Herpetol* 29:593-599.
- Sugiura, Y. 2000. Cultura Lacustre y sociedad del Valle de Toluca. *Arqueología Mexicana*. 8: 32-37.
- Swofford, D. 2002. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4.0d81. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F., 1989 Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis *Genetics* 123:585-595.
- Takahata, N. and S. R. Palumbi. 1985. Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics* 109:441-57.
- Takahata, N. and M. Slatkin. 1984. Mitochondrial gene flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:1764-67
- Tan, M. A., and D. B. Wake. 1994. MtDNA Phylogeography of the California Newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4(4): 383-394.
- Templeton, A. R. 2004. Statistical phylogeography: evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13:789-809.
- Templeton, A. R. 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology* 17(8):1877-1880.
- Templeton, A. R., E. Boerwinkle and C. F. Sing. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations inferred from restriction endonuclease mapping. *Genetics*. 117: 343-351.
- Tricart, J. 1985. Pro-lagos del Eje Neovolcánico de México. Instituto de Geografía. UNAM. México pp 66.
- Uribe, P. Z., A. Ramírez y G. Casas. 1999. Anfibios y reptiles de las serranías del Distrito Federal, México. Cuadernos 32, Inst. de Biol. UNAM, México.
- Vázquez-Selem, L., K. Heine, K., 2004. Late Quaternary glaciation in Mexico. En; Ehlers, J., P. L. Gibbans (eds.), *Quaternary glaciations-extend and chronology*. Part III. South America: Elsevier, Amsterdam.
- Velasco de León, M. P., J. A. Gil, A. Silva-Pineda y S. Yussim Guarneros. 2007. Aspectos geológicos y paleontológicos. pp. 25-38. En: Luna I., J. J. Morrone y D. Espinosa (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*. UNAM. México, D. F.
- Wake, D. B. 1967. Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae. *Copeia* 2:494-496.
- Wake, D. B. 1997. Incipient species formation in salamanders of the *Ensatina* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:7761-7767.
- Wake, D. B. 2006. Problems with species: Patterns and processes of species formation in salamanders. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93:8-23
- Wake, D. B. and A. Larson. 1987. Multidimensional analysis of an evolving lineage. *Science* 238 (4823):42-48.

- Wake, D. B. and J. F. Lynch. 1976. The distribution, ecology, and evolutionary history of plethodontid salamanders in tropical America. *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin* 25:1-65.
- Wake, D. B., and K. P. Yanev. 1986. Geographic variation in a "ring species," the plethodontid salamander *Ensatina eschscholtzii* of North America. *Evolution* 40:702-715.
- Wake, D. B., T. J. Papenfuss and J. F. Lynch. 1992. Distribution of salamanders along elevational transects in Mexico and Guatemala. *Tulane Studies in Zoology and Botany*. (1):303-319.
- Waples, R. S. 1991. Pacific salmon *Oncorhynchus* spp., and the definition of "species" under the endangered species act. *Mar. Fish Rev.* 53:11-22
- Weisrock, D. W., L. J. Harmon and A. Larson. 2005. Resolving deep phylogenetic relationships in salamanders: analyses of mitochondrial and nuclear genomic data. *Systematic Biology* 54(5):758-777.
- Wiens, J. J. 2008. Systematics and Herpetology in the age of genomics. *BioScience*. 58(4):297-307.
- Wiens, J. J., G. Parra-Olea, M. García-París and D. B. Wake. 2007. Phylogenetic history underlies elevational biodiversity patterns in tropical salamanders. *Proceedings of the Royal Society* 274: 919-928.
- Yanev, K. P. 1980. Biogeography and distribution of three parapatric salamander species in coastal and borderland California. In: Power D. M., ed. *The California Islands: Proceedings of a Multidisciplinary Symposium*. Santa Barbara: Santa Barbara Museum of Natural History 531-550.
- Yanev, K. P. 1978. *Evolutionary Studies of the Plethodontid Salamander Genus Batrachoseps*. Ph. D. Thesis in Zoology. University of California, Berkeley.
- Zwickl, D. and J. Balhoff. 2006. Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference. Garli Versión 0.951. SM2D GraphView by Snowmint Creative Solutions.