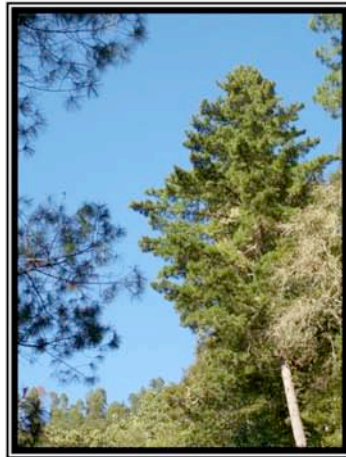


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA



**Estructura filogeográfica de *Pinus strobiformis* y su
relación con los cambios climáticos durante el
Pleistoceno**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA

Alejandra Citlalli Moreno Letelier

Director de tesis: Dr. Daniel Piñero Dalmau



México D.F., febrero de 2009



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.

A

Verónica

Camilo

Vero

Jimena

Resumen

La alta diversidad del género *Pinus* en México se considera relativamente reciente, como sugiere la baja resolución en las filogenias de algunos grupos de especies. Las glaciaciones del Pleistoceno han sido un factor importante en el moldeado de la distribución de la variación genética en las especies de pinos. La filogeografía es una herramienta que puede arrojar evidencia de los efectos de las glaciaciones sobre poblaciones de especies cercanamente emparentadas.

Se utilizaron microsatélites de cloroplasto para reconstruir el flujo génico del polen entre poblaciones de *Pinus strobiformis* y las poblaciones adyacentes de *Pinus ayacahuite*. La diversidad genética de *P. strobiformis* ($H_{eIAM} = 0.856$) fue alta, pero no se distribuyó homogéneamente a lo largo de su rango. La Sierra Madre Occidental tuvo los valores más altos de diversidad, mientras que la Sierra Madre Oriental presentó menos variación y fue genéticamente similar a *P. ayacahuite* del Centro de México. La diferenciación genética fue alta, pero el Análisis de Varianza Molecular mostró que la diferenciación es más pronunciada entre regiones geográficas que entre especies. La red de haplotipos no presentó discontinuidades grandes y varios haplotipos son compartidos entre especies, lo que sugiere que la divergencia de las poblaciones es reciente. Se encontró evidencia de expansiones poblacionales durante el Pleistoceno en la Sierra Madre Occidental, Sky Islands y Faja Volcánica Trans-Mexicana, así como evidencia de flujo génico a larga distancia, lo que concuerda con la evidencia palinológica de mayor extensión de los bosques de coníferas durante los periodos glaciales.

Las relaciones genealógicas entre *Pinus strobiformis* y sus parientes más cercanos *Pinus flexilis* y *Pinus ayacahuite* siguen sin resolverse. Sin embargo, los resultados filogeográficos sugieren que los cambios climáticos y que las preferencias ecológicas están detrás de la diferenciación de estos taxa.

Abstract

The large diversity of genus *Pinus* in Mexico is deemed to be fairly recent, as suggested by the poor resolution of some species complexes in phylogenies. The Pleistocene glaciations are considered to be a main factor affecting the distribution and genetic composition of pine species. Phylogeography is a tool that can shed some light on the effects of glaciations over populations of closely related species.

Chloroplast microsatellites were used to reconstruct pollen gene flow among populations of *Pinus strobiformis* and neighboring populations of *Pinus ayacahuite*. The gene diversity of *P.*

strobiformis ($H_{eIAM} = 0.856$) was high, although is not evenly distributed across the range. The highest diversity was found in Sierra Madre Occidental, while populations from Sierra Madre Oriental are less variable and more genetically similar to *P. ayacahuite* of Central Mexico. Overall genetic differentiation was high, but the Analysis of Molecular Variance showed that it was more pronounced between geographical regions than between species. The haplotype network did not show large genetic discontinuities, and several haplotypes were shared between species, suggesting that despite the phylogeographic structure found, the divergence of the populations has been recent. Evidence of a Pleistocenic population expansion was found in the populations of the Sierra Madre Occidental, Sky Islands and the Trans-Mexican Volcanic Belt as well as possible long distance gene flow in some populations, concordant with palinological evidence of a wider extension of conifer forests during glacial times.

The genealogical relationships among *Pinus strobiformis* and its closest relatives *Pinus flexilis* and *Pinus ayacahuite* remain poorly solved. However, the phylogeographical results suggest that climate changes together with different ecological preferences are behind the differentiation of these taxa.

Agradecimientos

Esta tesis fue posible gracias a la beca CONACYT no. 173276 y fue parte del proyecto CONACYT “Estrategia regional de conservación de los bosques de coníferas en México: enfoque florístico geográfico, filogeográfico y paleobotánico” con el no. 0201/A1. Se realizó en el laboratorio de Genética y Evolución del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México. La tesis fue dirigida por el Dr. Daniel Piñero Dalmau como tutor principal, y por el Dr. Luis Eguiarte Fruns y la Dra. Socorro Lozano García.

Gracias también a los revisores de esta tesis por sus valiosos comentarios y aportaciones: Dr. Ken Oyama, Dr. David S. Gernandt, Dra. Susana Magallón, Dr. Diego González Halphen y Dr. Luis Eguiarte Fruns.

El agradecimiento principal es para Daniel Piñero, por abrir el taller de Pinos mexicanos que fue la causa de que cayera en el laboratorio y de que no me fuera de ahí durante muchos años. De los pinos luego derivaron muchas cosas, pero fue gracias a él y a su método montessori que ahora soy un poquito mejor bióloga que antes.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Luis Eguiarte por sus enseñanzas desde el primer semestre y por obligarme a salir de la neutralidad de vez en cuando; y la Dra. Socorro Lozano, responsable de mi pasión por los paleoclimas y de lo larga que es esa parte en la tesis. Esperemos que el conocimiento siga aumentando.

Gracias en especial a mis compañeros de camada, Lev y Ana, por su compañía, amistad y por todo lo que hemos compartido y aprendido juntos desde que iniciamos el taller.

Otra mención especial merecen Paty Delgado, Ale “La Loba” Vázquez-Lobo y Rodolfo Salas por ser mis gurus en el laboratorio y en el campo. De ellos aprendí todo lo que se de los pinos y compartimos muchas aventuras en las interminables colectas alrededor del país.

Gracias también a Lev por la amistad y el apoyo, por las discusiones mengambréicas, los comentarios de las noticias de la prensa y todas las pláticas de temas académicos y no tanto que hemos tenido y espero que sigamos teniendo por muchos años.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio. Muchos han pasado y otros llegado durante la eternidad de mi estancia aquí, pero todos han sido esenciales en el proceso de *adoctoramiento* y para darle sabor al lab: Miros, Ana, Valentina, Ale V., Rodo, Paty, Lev, Alexandre, Karen, Argelia, Oscar, Ale O, Nadia, Bianca, Mónica, Mariana, Alicia, Adán, Diego, Joost, Brian, Paty Landa-verde, Gaby, Gretel, Marlyn, Valeria, Migue, y un largo etcétera, porque en el lab hemos estado muchos. En especial, gracias a Paty y Miros, porque con ellas compartimos los primeros sufrimientos de los micros y al mismo tiempo surgió una gran amistad. Gracias por su apoyo en todo momento. Gracias también a Ale Ortíz por interesarse en este proyecto maratónico y continuarlo.

Gracias también a otra gran cantidad de gente que me ayudó con las colectas: Phil Evans, Judith

Becerra, Chris Wanner, Rodolfo Salas-Lizana, David Gernandt, Ana Wegier, Alejandra Vázquez-Lobo, Dieter Wimberger, Lev Jardón, Miroslava Rentería, Patricia Delgado, Erika Mendoza, Marco Gámez, Victor Manuel Castillo, Armando Barbosa, Julian Barbosa (Ejido El Oso) y Jose Villanueva.

Gracias:

Al laboratorio hermano de Evolución Molecular y Experimental, a sus jefes Valeria y Luis y a todos sus miembros.

A Gretel por su amistad y su guía a prueba de fallos en el laboratorio. También a David Gernandt por compartir la pasión por los pinos. A Dieter por el aprendizaje. A Alexandre por su ayuda en el lab y por las conversaciones tan interesantes que tuvimos. A Pablo, porque aunque sólo le tocó la recta final, su motivación fue esencial para llegar a la meta.

A los Moreno-Letelier: mamá, papá, Vero y Jimena, por su cariño constante y gran apoyo.

Gracias también a mis amigos que han estado, ahora sí que en las buenas y en las malas: Gaby, Erika "Güillis", Niza, Enrique, Natalia, Lev, Xitlali, Mónica, Ramadán, Alicia, Alf, Paty Landaverde, Gretel, Diana, Pablo, Robert, Alejandro "Troll", y La Banda ampliada.

A Maus y Misha por bajar mis niveles de cortisol.

A la Selección Natural y las Kynkys por ser grandes compañeras en el fut y todas unas damas. A los DTs René Cerritos, Sergio y Agus por enseñarme a jugar fútbol.

A mis estudiantes de Evolucion I, a todos ellos, a los que siguieron por los caminos evolutivos y los que no. Lo que es cierto es que ellos me enseñaron más a mí que yo a ellos.

A mis maestros (oficiales y no oficiales), en particular los del doctorado: Daniel, Luis, Valeria, León, Rodo, Ale V., Socorro, Margarita, David, Susana, el grupo de discusión sobre coníferas, al Dr. Krogmann, Ella, Niza, Enrique, Ale O., al grupo de la clase experimental de coalescencia y otros que se me escapen por ahora. Gracias también a Antonio González por revisar mi artículo y que le gustara.

A todas las personas con las que me he topado durante esta travesía y me han ayudado a superar la novatada.

Nomenclatura

A.P. Antes del presente

cpSSRs chloroplast simple sequence repeats; repeticiones de secuencia simple de cloroplasto

d.a.p. diámetro a la altura del pecho

EA Este de Asia

ENA Este de Norteamérica

FVTM Faja Volcánica Transmexicana

m.a. millones de años

MRCA Most Recen Common Ancestor

msnm metros sobre el nivel del mar

ONA Oeste de Norteamérica

pb pares de bases

UMG Ultimo Máximo Glacial, 23 000-18 000 años A.P.

Índice general

1. Introducción	10
1.1. Historia de la flora templada en México	10
1.2. Patrones biogeográficos y evidencia fósil	11
1.3. Los pinos en México	13
1.4. Historia natural de <i>Pinus strobiformis</i>	17
1.4.1. Taxonomía	17
1.4.2. Descripción	19
1.4.3. Distribución	19
1.4.4. Hábitat	21
1.4.5. Antecedentes de estudios genéticos en <i>Pinus strobiformis</i>	21
1.5. Paleoclima y la biota durante el Pleistoceno	22
1.5.1. Los ciclos glaciales	22
1.5.2. Paleoclima en México	25
1.6. Filogeografía	32
1.7. Hipótesis	35
1.8. Objetivos	35
2. Phylogeographic structure of <i>Pinus strobiformis</i> Engelm. across the Chihuahuan Desert filter barrier	37
3. Demografía histórica de <i>Pinus strobiformis</i>: procesos poblacionales y cambio climático durante los periodos glaciales	38
3.1. Conceptos generales	38
3.2. Material y métodos	40
3.2.1. Análisis de mismatch y prueba de neutralidad	40
3.2.2. Análisis filogeográfico de clados anidados	43
3.3. Resultados	45
3.3.1. Análisis de <i>mismatch</i> y prueba de neutralidad	45

3.3.2.	Análisis Filogeográfico de Clados Anidados	46
3.4.	Discusión	48
3.4.1.	Análisis de <i>mismatch</i> y prueba de neutralidad	48
3.4.2.	Análisis Filogeográfico de Clados Anidados	52
4.	Relaciones filogenéticas entre <i>Pinus strobiformis</i>, <i>Pinus ayacahuite</i> y <i>Pinus flexilis</i>	55
4.1.	Introducción	55
4.2.	Material y métodos	56
4.2.1.	Amplificación de regiones no codificantes de cloroplasto de <i>Pinus</i>	56
4.2.2.	Análisis filogenético	58
4.3.	Resultados	59
4.4.	Discusión	62
5.	Conclusiones generales	65
5.1.	Perspectivas	66
	Bibliografía	68
A.	Apéndice	79
A.1.	Haplotipos para los loci de cloroplasto Pt36718, Pt71936 y Pt30204	79
A.2.	Codificación binaria de los haplotipos de microsatélites de cloroplasto	80
A.3.	Información sobre secuencias utilizadas en análisis filogenéticos	81
A.4.	Resultados del análisis de máxima verosimilitud para la región trnL-trnF del cloroplasto de pinos blancos	83

1. Introducción

1.1. Historia de la flora templada en México

México es considerado como un país megadiverso, ya que concentra entre el 10 y 15 % de las especies terrestres con sólo el 1.3 % de la superficie de tierra emergida en el mundo (Rzedowski, 2005). Esta alta diversidad está dada por la ubicación del territorio que incluye una porción tropical y otra templada y que junto con su compleja topografía, genera una gran diversidad de climas y microhábitats. Además del factor físico, también existe el factor histórico. A fines del Cretácico principios del Terciario (65 m.a.) se retiró el mar epicontinental que cubría gran parte del Norte de México (Ferrusquía-Villafranca, 1993) permitiendo la migración hacia el sur de especies de Norteamérica, que a su vez tenían afinidad con el Este de Asia y con Europa (Qian, 2002). Posteriormente, el cierre del Istmo de Panamá en el Plioceno (3.5-2.5 m.a.; Fig. 1.1) permitió la migración hacia el norte de taxa tropicales desde Sudamérica (Marshall and Liebherr, 2000). Esta conjugación de taxa con distintas afinidades ecológicas y con distinta historia evolutiva generó lo que se conoce como Zona de Transición Mexicana. En la zona de transición no sólo se encuentra una gran diversidad en el ensamblaje de especies en comunidades, sino que también en formas biológicas y un gran número de endemismos (Rzedowski, 1991). Las zonas que concentran el mayor número de endemismos en México son las zonas áridas y las zonas montañosas que incluyen bosques mesófilos de montaña y bosques de pino-encino. Juntos, estos ecosistemas incluyen más del 25 % de las especies de plantas que se encuentran en México (Rzedowski, 1991). El estrato arbóreo de los bosques templados está compuesto en su mayoría de especies de origen Neártico y presenta un gran número de endemismos (Rzedowski, 1991; Alcántara et al., 2002; Rzedowski, 2005). La predominancia del elemento Neártico en los bosques templados de México puede deberse a las migraciones hacia el sur a raíz del enfriamiento global del Oligoceno (Donoghue, 2008).

Entender el origen de esta gran diversidad de especies templadas en una región subtropical de transición como es México requiere conocer la historia de estos grupos, su origen y los eventos que determinaron la composición actual de las comunidades de montaña. Entre los factores que hay que tomar en cuenta están los eventos geológicos, climáticos y ecológicos, que facilitaron migraciones y expansiones de rango o provocaron extinciones y vicarianza de la flora templada.

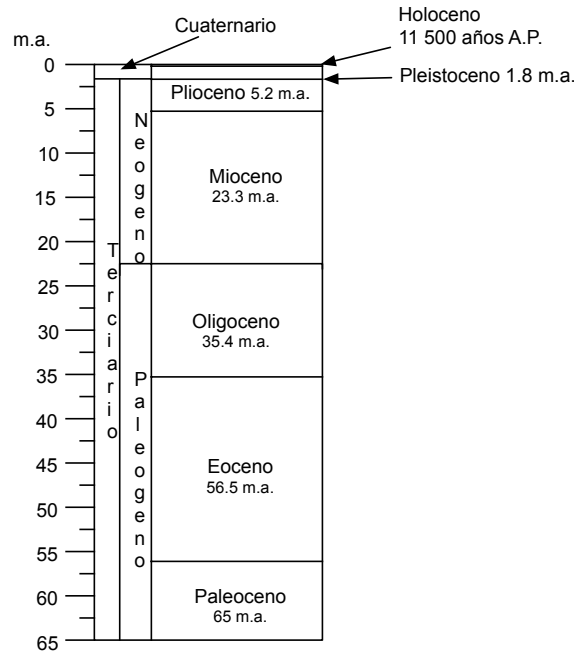


Figura 1.1: Escala geológica del Cenozoico*.

*Tomado de Gibbard and van Kolfschoten (2004).

1.2. Patrones biogeográficos y evidencia fósil

La afinidad entre la flora templada de Norteamérica y el Este de Asia ha llamado la atención de los naturalistas desde el siglo XIX, lo que ha generado una multitud de hipótesis para explicar el origen de estos patrones biogeográficos (Donoghue and Smith, 2004; Qian, 2002). Originalmente se planteó una similitud florística mayor entre el Este de Asia (EA) y el Este de Norteamérica (ENA) que con el Oeste de Norteamérica (ONA), también conocida como la hipótesis de Gray (Qian, 2002), sin embargo, la historia de la flora templada en Norteamérica es más compleja. Una vez separada Laurasia, Norteamérica estuvo conectada con Europa por el puente del Atlántico Norte durante el Terciario temprano y con el Este de Asia por el puente de Beringia durante la mayor parte de Terciario y de manera intermitente en el Cuaternario (Qian, 2002). El clima en el Terciario era más cálido que el actual y la mayor parte de Norteamérica estaba cubierta de vegetación tropical y subtropical, conectada con el EA y Europa (Donoghue and Smith, 2004). Posteriormente, en el Oligoceno descendió la temperatura global y junto con la formación de las Montañas Rocallosas en el Mioceno-Plioceno (10-5 m.a.; Fig. 1.1), el clima cambió drásticamente en ONA. Esto provocó extinción de muchos taxa asiáticos y su reemplazamiento por taxa de afinidad mexicana y por nuevos taxa procedentes de EA via Beringia. Estas extinciones y recolonizaciones generaron un patrón de mayor afinidad entre ENA y EA para taxa tempranamente divergentes, y entre EA y

ONA para taxa derivados (Qian, 2002; Donoghue and Smith, 2004). El descenso paulatino de la temperatura durante el Oligoceno y Mioceno, culminó en los ciclos glaciales del Pleistoceno. Estos cambios climáticos produjeron no sólo la extinción de taxa termofílicos en ONA, sino que promovieron la migración al sur de muchos grupos tolerantes al frío como las coníferas y su subsiguiente diversificación (Qian, 2002). La fecha de la aparición de flora templada en México, representada por fósiles de pollen de pino en Chiapas, es posiblemente del Oligoceno al Mioceno temprano (23 m.a.) (Graham, 1999), aunque los restos fósiles son muy escasos y mal preservados. A partir del Plioceno se encuentran restos de *Quercus* y *Picea* en Veracruz, lo que coincide con la elevación de las sierras del sur de México, generando más hábitat disponible para flora templada (Graham, 1999). Sin embargo, es a partir del Pleistoceno que los restos fósiles de especies templadas son realmente abundantes (Graham, 1999), lo que indica que las bajas temperaturas fueron determinantes para el establecimiento de la vegetación de afinidad neártica en las regiones montañosas de México.

El patrón de migración de la flora neártica es de Norte a Sur, donde los elementos dominantes en los ecosistemas tienen afinidad con EA y ENA, como por ejemplo, los componentes del dosel del bosque mesófilo de montaña del oriente de México (Luna Vega et al., 1999). En el occidente de México, la flora templada tiene una clara afinidad con ONA, e incluso se considera a la Sierra Madre Occidental como parte de la provincia biótica de las Montañas Rocallosas, debido al gran número de taxa compartidos (Peet, 2000). Como se mencionó anteriormente, hubo una segunda colonización de ONA desde EA después del levantamiento de las montañas y promovido por el enfriamiento del planeta. Por esta razón, se considera que gran parte de la flora de las montañas Rocallosas es de origen reciente (<20 m.a.) y que los ciclos glaciales del Pleistoceno promovieron una rápida diversificación de varios grupos, como los pinos (Velázquez et al., 2000), que no comparten especies con EA pero cuyos parientes cercanos sí se encuentran en esa región (Qian, 2002; Syring et al., 2007b). En resumen, la colonización de México por flora neártica se vió favorecida por dos factores que afectaron radicalmente el clima. El primer factor fue el enfriamiento global iniciado en el Oligoceno y que concluyó con los ciclos glaciales del Pleistoceno (Millar, 1998). El enfriamiento causó la extinción de la flora tropical y subtropical de ONA y la migración hacia el sur de la flora templada desde los refugios boreales (Millar, 1998; Graham, 1999). El otro factor que alteró el clima fue la elevación de la Sierra Madre Occidental (Oligoceno-Mioceno), Faja Volcánica Transmexicana (Mioceno-Plioceno) y Sierra Madre del Sur (Mioceno-Plioceno), que sirvieron como corredores para las especies templadas que migraban desde el norte (Graham, 1999; Ferrari et al., 2002; Corona et al., 2007; Donoghue, 2008). Posteriormente, al cerrarse el Istmo de Panamá en el Plioceno (3.5-2.5 m.a.) elementos Neotropicales de origen sudamericano, migraron al norte creando la Zona de Transición Mexicana. Esta zona de transición entre flora neártica y neotropical y la compleja orografía han hecho de México un centro de gran diversidad. Dentro del componente

neártico, varios géneros son particularmente diversos como *Quercus* con 140 especies y *Pinus* con cerca de 50 (30 y 50 % del total de especies de cada género respectivamente), por lo que México se considera como centro secundario de diversificación de estos grupos (Rzedowski, 1991, 2005). La flora de afinidad templada (neártico) ocupa cerca del 22 % del territorio mexicano, generalmente en zonas montañosas donde los bosques de pino-encino son dominantes (Rzedowski, 1991; Velázquez et al., 2000). Estas zonas montañosas concentran un alto número de endemismos dentro de los linajes neárticos, y algunos de ellos posiblemente son producto de una diversificación durante los cambios de distribución de la biota durante el Pleistoceno (Marshall and Liebherr, 2000).

1.3. Los pinos en México

El origen del género *Pinus* ocurrió posiblemente en el Cretácico temprano en Laurasia, principalmente en latitudes medias (30-50°N) (Millar, 1998). La diferenciación de los subgéneros *Pinus* y *Strobos* posiblemente ocurrió entre el Cretácico tardío y el Eoceno medio (Miller, 1973; Millar, 1998; Willyard et al., 2007). La transición Mesozóico-Cenozoico estuvo marcada por un aumento de las ya cálidas temperaturas y de la precipitación, lo que causó un cambio muy drástico en la distribución y composición de la flora boreal (Millar, 1998). El Paleoceno y sobre todo el Eoceno (Fig. 1.1) se caracterizaron por condiciones tropicales en altas latitudes y la ausencia de casquetes polares (Millar, 1998; Donoghue and Smith, 2004). Durante este periodo los pinos fueron desplazados de latitudes medias por un bosque boreotropical de angiospermas y se refugiaron en zonas de entre 70-80°N y cerca de los 2°N (Millar, 1998; Qian, 2002). La excepción a las condiciones tropicales generalizadas fue el ONA, que por su mayor altitud tenía un clima más templado y fue refugio gran número de coníferas (Millar, 1998). La paleoflora del ONA incluye varios fósiles del Eoceno (48 m.a.), uno que presenta características similares al subgénero *Pinus* (*Pinus arnoldii*) y otro fósil con características parecidas al subgénero *Strobos* (*Pinus milkameensis*; Miller, 1973). Otros fósiles de pinos blandos (subgénero *Strobos*) del Eoceno (46-45 m.a.) provienen de Idaho, y son *Pinus sanjuanensis* (posiblemente relacionado con la subsección *Cembroides*) y *Pinus crossii* (subsección *Balfouriana*; Erwin and Schorn, 2005).

Durante este mismo periodo (el Terciario temprano), el mar epicontinental que cubría la mayor parte de México durante el Cretácico se retiró, posibilitando la subsiguiente migración hacia el sur de los pinos, durante el Oligoceno (Terciario medio; Graham, 1999). Esta migración fue provocada por un enfriamiento global al inicio del Oligoceno que causó la extinción de la flora boreotropical y la expansión los bosques de pinos a latitudes medias (Millar, 1998). En particular, la diversidad de especies de pinos aumentó en el ONA, generando un centro secundario de diversidad en esta zona durante el Oligoceno y Mioceno (Millar, 1998).

La migración al sur de los pinos siguió dos rutas: 1) ruta Este a lo largo de la planicie costera del

Golfo de México y Sierra Madre Oriental y, 2) ruta Oeste a lo largo de las recientemente formadas montañas Rocallosas, Sierra Madre Occidental y Sierra Madre del Sur (Oligoceno-Mioceno; Fig. 1.1) (Perry, 1991; Graham, 1999; Ferrari et al., 2002). Los primeros fósiles de *Pinus* en México son del Oligoceno tardío (polen encontrado en Simojovel, Chiapas), pero son muy escasos, lo que hace pensar que inicialmente la migración del elemento Neártico a México fue en pequeña escala (Graham, 1999). Fue hasta la consolidación de las principales cadenas montañosas (Mioceno) y al enfriamiento global del Plioceno-Pleistoceno que se establecieron los bosques templados en México (Rzedowski, 1991; Graham, 1999).

Los pinos en Norteamérica han diversificado varias veces: primero durante el Mesozoico, seguido de una extinción a principios del Cenozoico y otra durante el Oligoceno en el ONA (Millar, 1998). Las secciones de ambos subgéneros surgieron aproximadamente al mismo tiempo durante el Paleogeno (Millar, 1998), dando origen a dos secciones exclusivamente norteamericanas: la sección *Trifoliae* del subgénero *Pinus* y la sección *Parrya* del subgénero *Strobos*, ambas con especies que se distribuyen en México (Fig. 1.2; Willyard et al., 2007). Dentro de estas secciones se encuentran varios grupos de posible origen reciente: la subsecciones *Cembroides*, *Ponderosae* y *Australes* (Gernandt et al., 2005). Algunas de estas subsecciones son muy jóvenes (< 12 m.a.) pero particularmente diversas, como *Ponderosae* y *Australes* que tienen edades estimadas con base en métodos de reloj molecular de 2 y 5 m.a. respectivamente, mientras que *Cembroides* es más antigua, con 8-11 m.a. (Fig. 1.2; Gernandt et al., 2008). La subsección *Strobos* también es muy diversa y se ha estimado un tiempo mínimo de divergencia de 12 m.a. (Gernandt et al., 2008). Las especies de esta subsección se encuentran principalmente en EA y ONA, lo que refleja el vínculo biogeográfico entre estas regiones. Dentro de este grupo pueden observarse tres clados bien diferenciados con base en marcadores moleculares de cloroplasto y de núcleo (Fig. 1.3): *Pinus peuce* del este de Europa que es el grupo hermano del resto, otro que comprende especies estrictamente norteamericanas y otro clado muy diverso con especies asiáticas y norteamericanas (Gernandt et al., 2005; Liston et al., 2007; Syring et al., 2007b). La posición de *Pinus lambertiana* y *Pinus monticola* no resulta muy clara, ya que dependiendo de los marcadores que se usen para la reconstrucción filogenética, se agrupan con el clado norteamericano o con el clado asiático (Liston et al., 2007; Syring et al., 2007b). En el caso particular de *P. lambertiana*, se ha detectado introgresión en las poblaciones del la parte norte de la distribución, que resulta en una especie con dos linajes de cloroplast distintos: uno relacionado con las especies norteamericanas de la subsección *Strobos* en el sur, y otro relacionado con *P. albicaulis* y el grupo asiático-norteamericano en el norte (Liston et al., 2007).

A pesar de que el origen de la subsección *Strobos* es más antiguo que el de otros grupos de pinos, el largo de las ramas entre las especies de los dos clados principales son muy cortas y hay muchos polimorfismos compartido, lo que sugiere una diversificación reciente en EA y ONA (Ger-

nandt et al., 2005; Liston et al., 2007; Syring et al., 2007b). La formación de las montañas Rocallosas, la elevación de las principales cordilleras mexicanas y las posteriores glaciaciones produjeron un cambio drástico en la composición florística de ONA y México al alterar el hábitat y favoreciendo aquellas especies resistentes al frío. Tres especies del clado norteamericano, *Pinus flexilis*, *Pinus strobiformis* y *Pinus ayacahuite* son de afinidad montana y se distribuyen desde Canadá hasta Honduras (Steinhoff and Andersen, 1971; Perry, 1991; Farjon and Styles, 1997), por lo que se espera que los ciclos glaciares hayan jugado un papel importante en su evolución. En particular, *P. strobiformis* se distribuye desde el sur de las montañas Rocallosas en Arizona y Nuevo México, hasta el límite occidental de la Faja Volcánica Transmexicana en el estado de Michoacán, atravesando el trópico de Cáncer. Esta zona es orográfica y climáticamente muy compleja (Ferrusquía-Villafranca, 1993), por lo que es importante conocer la forma en que el entorno ha afectado la distribución de *P. strobiformis* y su relación con otros dos miembros de este complejo de especies.

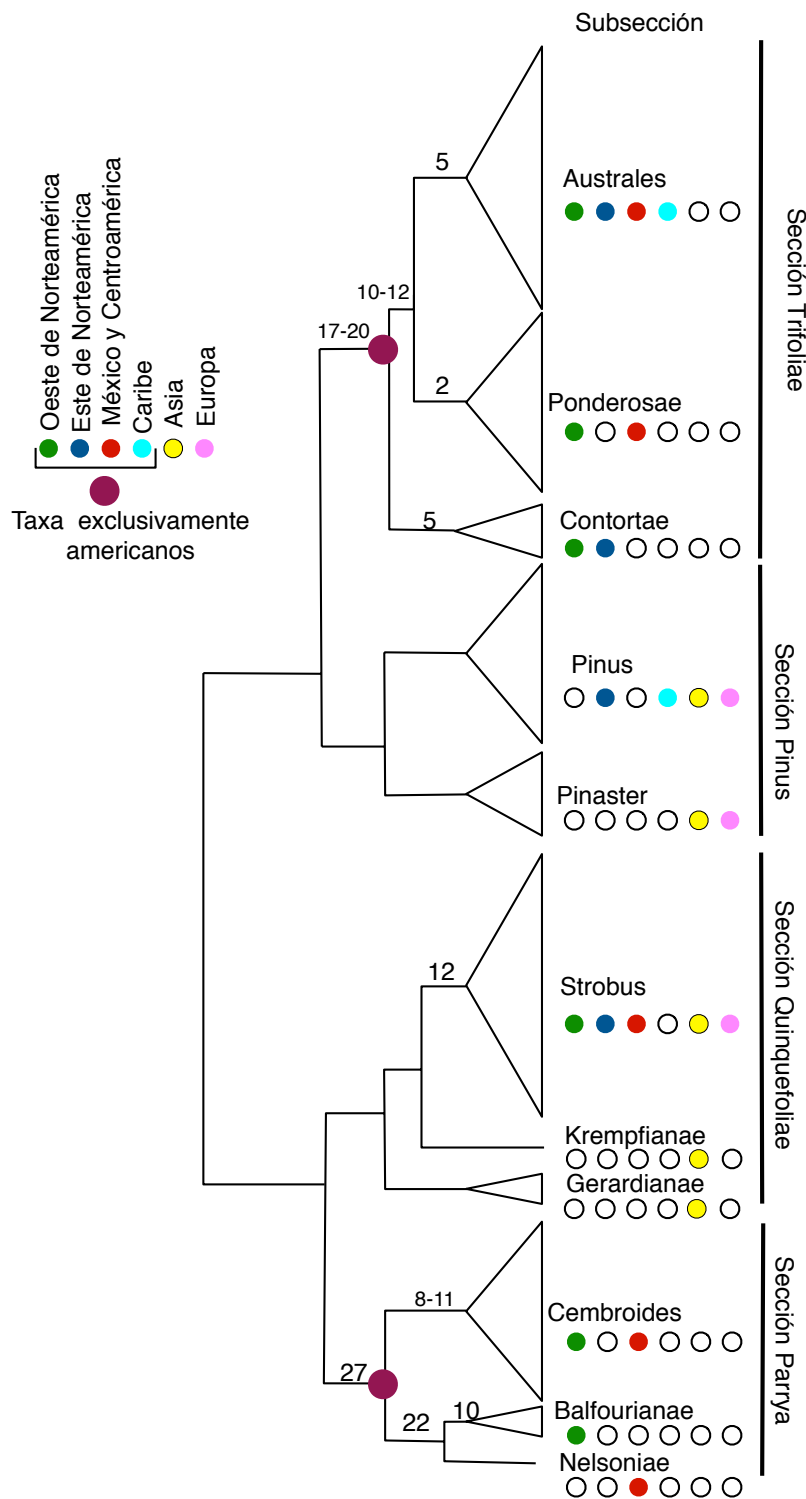


Figura 1.2: Filogenia del género *Pinus* y la distribución de las especies de cada subsección*. El tamaño de los triángulos es proporcional al número de especies en los clados. Los números sobre las ramas indican los tiempos de divergencia mínimos en millones de años de los grupos de interés**. * Gernandt et al. (2005); ** Gernandt et al. (2008).

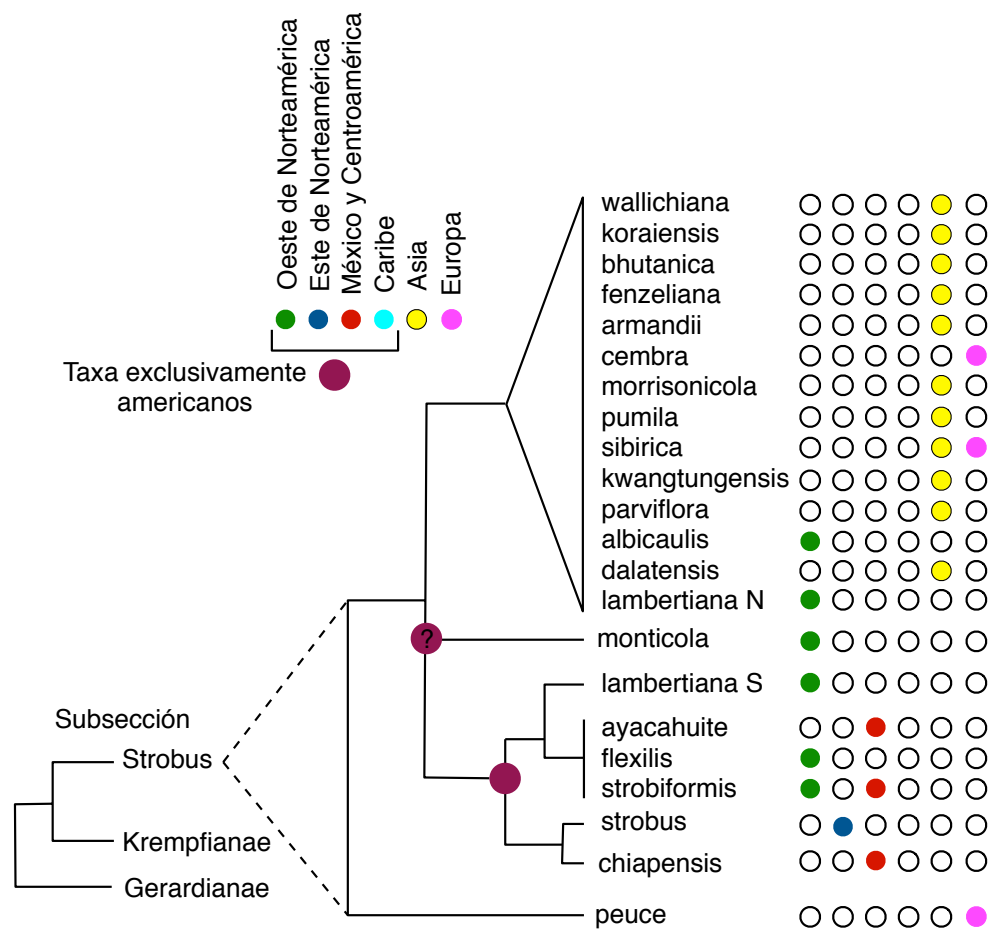


Figura 1.3: Representación gráfica de las relaciones filogenéticas* y distribución geográfica de las especies de la subsección *Strobos*.

* (Gernandt et al., 2005; Liston et al., 2007)

1.4. Historia natural de *Pinus strobiformis*

1.4.1. Taxonomía

Pinus strobiformis pertenece a un complejo de especies que poseen muchas características semejantes: *Pinus flexilis*, *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis* (Steinhoff and Andersen, 1971; Pérez de la Rosa, 1993). *P. flexilis* y *P. ayacahuite* tradicionalmente han presentado pocos problemas para su identificación y clasificación. Por el contrario, *P. strobiformis*, al tener una distribución y morfología intermedia entre las otras dos especies, ha sido objeto de controversia.

La primera colecta de *P. strobiformis* data de 1846 y fue realizada por Adolphus Wislizenus durante una expedición al norte de México cerca de Casiguirachi, Chihuahua. Originalmente Wislizenus consideró a *P. strobiformis* como un intermedio entre *P. flexilis* y *P. ayacahuite*, aunque

posteriormente Engelmann en 1848 lo describió como una especie nueva: *Pinus strobiformis* (Farjon and Styles, 1997). Posteriormente, Engelmann (1880) consideró a *P. strobiformis* como una subespecie de *P. flexilis*, y en el mismo año, Gordon lo consideró como subespecie de *P. ayacahuite*. Shaw en 1909 separa a *P. strobiformis* en dos taxones, *P. ayacahuite* var. *brachyptera* y *Pinus reflexa*. Martínez (1948) identificó la sección Ayacahuites, donde incluye a *Pinus flexilis*, *Pinus reflexa* (Shaw) y *Pinus ayacahuite* con tres variedades: var. *brachyptera*, var. *veitchii* y var. *ayacahuite* (Pérez de la Rosa, 1993). Little y Critchfield (1969) reconocen a *Pinus strobiformis*, aunque lo consideran un eslabón entre *P. ayacahuite* del sur y *P. flexilis* del norte (Pérez de la Rosa, 1993; Farjon and Styles, 1997). En 1991, Perry divide una vez más a *P. strobiformis* en dos taxones, *P. ayacahuite* var. *brachyptera* y *P. strobiformis*, aunque reconoce que son simpátricas en la mayoría de su distribución y que se presentan individuos intermedios (Perry, 1991). Farjon y Styles (1997) no reconocen a *P. ayacahuite* var. *brachyptera*, pero sí a *P. strobiformis*, además de incluir a *P. reflexa* de tres localidades en la Sierra Madre Oriental (Farjon and Styles, 1997). Posteriormente, Price y colaboradores (1998) identifican un sólo taxón, *Pinus ayacahuite* var. *strobiformis*, descartando *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* y *Pinus reflexa*. La mayoría de los trabajos anteriores se basaron en la revisión de ejemplares de herbario, sin embargo, Pérez de la Rosa en 1993 realizó un estudio morfológico extenso de *P. strobiformis* y *P. ayacahuite* basándose en ejemplares obtenidos de varios individuos por localidad a lo largo de toda la distribución de las especies. En dicho estudio, un análisis de componentes principales distingue dos grupos, norte y sur, con las cuencas del Lerma-Santiago y del Pánuco actuando como barreras. Estos grupos corresponden con las poblaciones de *P. strobiformis* (Norte) y *P. ayacahuite* (Sur) y la longitud del ala es la principal variable que los distingue (Pérez de la Rosa, 1993). En resumen, las diferencias entre las tres especies son sutiles y en algunos casos sobrelapan (Cuadro 1.1), sin embargo en conjunto resultan útiles para identificar a las especies en el campo.

Cuadro 1.1: Características diagnósticas de *P. strobiformis*, *P. flexilis* y *P. ayacahuite*

Especie	Longitud				Margen de hojas	Canales resiníferos
	Semilla	Ala	Hojas	Cono		
<i>P. ayacahuite</i>	7-8 mm	30-35 mm	7-20 cm	15-40 cm	aserrado	2-4
<i>P. strobiformis</i>	12-15 mm	<6 mm	7-15 cm	10-50 cm	aserrado	3-5
<i>P. flexilis</i>	10-15 mm	nula	<5.5 cm	< 10 cm	liso	1-3

Basado en: Steinhoff and Andersen (1971); Farjon and Styles (1997); Musálem and Ramírez (2003)

1.4.2. Descripción

Los árboles adultos de *Pinus strobiformis* son moderadamente altos, llegando a alcanzar hasta 30 m y un d.a.p. de 1 m (Perry, 1991; Farjon and Styles, 1997). La copa es generalmente cónica, aunque esto es más evidente en los árboles jóvenes. La corteza es delgada y lisa en individuos jóvenes, con un color gris plateado característico, mientras que en árboles adultos adquiere un tono pardo con placas pequeñas e irregulares (Musálem and Ramírez, 2003). Las ascúculas se encuentran en fascículos de 5, tienen un color verde-azulado y son glaucas en sus caras internas; miden de 7 a 15 cm de longitud y tienen los bordes aserrados (Musálem and Ramírez, 2003). Los estomas se encuentran sólo en las superficies ventrales y las hojas poseen de 3 a 5 canales resiníferos. La morfología de los conos es muy variable, pero generalmente exceden los 10 cm de longitud, llegando a medir hasta 50 cm en algunos casos (Steinhoff and Andersen, 1971). Los conos son colgantes de color amarillo ocre brillante, de cilíndricos a cónicos, muy resinosos y con escamas elongadas y gruesas, generalmente recurvadas, especialmente en la base del cono (Steinhoff and Andersen, 1971; Perry, 1991). En algunos ejemplares la apófisis presenta una prolongación ancha y enroscada (Musálem and Ramírez, 2003). El pedúnculo es variable, ya que va desde prácticamente inexistente hasta unos 2 cm de longitud. Las semillas son grandes, de 10 a 15 mm de longitud y usualmente pesan más de 140 mg, no tienen ala o poseen un ala vestigial que no excede los 6 mm (Steinhoff and Andersen, 1971). Es común que sólo se desarrolle una semilla por escama, en lugar de dos, como en otros pinos, dejando además una cavidad claramente distinguible, al contrario de lo que sucede en *Pinus ayacahuite*, donde las escamas no tienen cavidades de semilla marcadas (Farjon and Styles, 1997; Musálem and Ramírez, 2003).

1.4.3. Distribución

Pinus strobiformis está ampliamente distribuido, aunque no suele ser muy abundante localmente. Se encuentra principalmente en las cordilleras del norte de México, la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental. Las fronteras sur de su distribución se consideran las cuencas del río Lerma-Santiago y del río Pánuco. Sin embargo, existen algunas poblaciones aisladas al sur de dichas cuencas: El Cuale, Jalisco, La Palma, Michoacán y El Zamorano, Querétaro (Pérez de la Rosa, 1993). El rango de *P. strobiformis* se extiende hasta Estados Unidos, en las Sky Islands de Arizona, Nuevo México y Chihuahua, así como algunas poblaciones aisladas en Sierra de la Madera y Maderas del Carmen, Coahuila, y en el parque nacional del Big Bend en Texas que se localizan en el Desierto de Chihuahua (Perry, 1991; Pérez de la Rosa, 1993; Farjon and Styles, 1997). Las regiones biogeográficas en las que se distribuye *P. strobiformis* se muestran en la Fig. 1.4. También se han reportado poblaciones en el extremo sur de las Montañas Rocallosas, como la cordillera de Mogollon, Colorado y Utah, sin embargo dichas poblaciones presentan características interme-

dias con *P. flexilis* (Steinhoff and Andersen, 1971). Asimismo, en el extremo sur de la distribución se encuentran poblaciones en la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM), que colindan con *Pinus ayacahuite*, donde también podría existir introgresión.

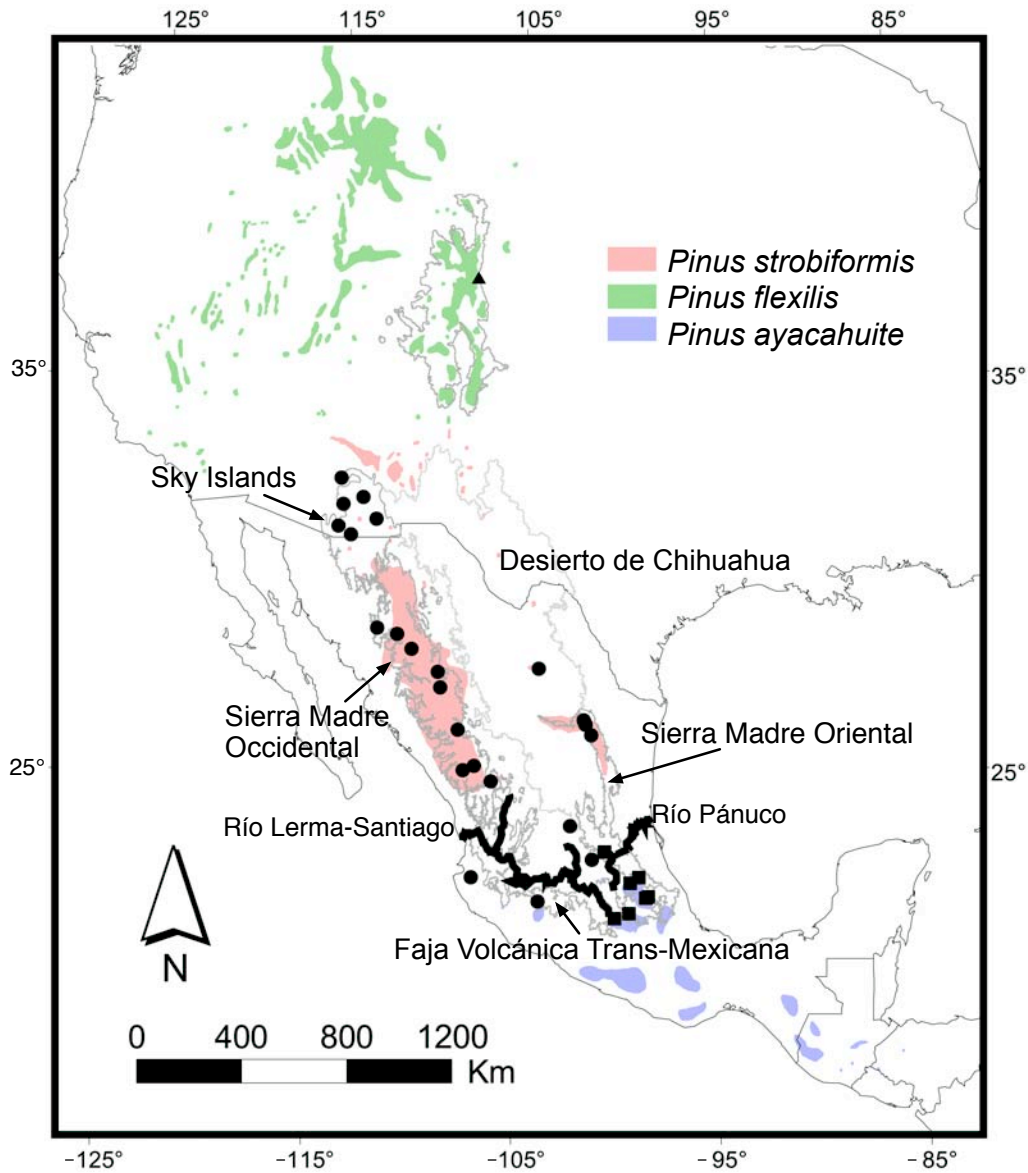


Figura 1.4: Regiones biogeográficas en donde se encuentra *P. strobiformis* y sus especies hermanas *Pinus flexilis* y *Pinus ayacahuite*. Las poblaciones incluidas en este estudio están representadas por círculos (*P. strobiformis*), triángulo (*P. flexilis*) y cuadros (*P. ayacahuite*).

1.4.4. Hábitat

Pinus strobiformis prefiere sitios sombríos y húmedos, con suelos fértiles, bien drenados y cerca de cuerpos de agua. Típicamente se encuentra en laderas con exposición Norte y su rango altitudinal es de 2000 a 3200 msnm. Rara vez forma masas puras y más frecuentemente está asociado con *P. teocote*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. hartwegii*, *P. arizonica*, *P. engelmanni*, *P. leiophylla*, *Pseudotsuga* sp., y *Abies* sp. (Perry, 1991; Farjon and Styles, 1997; Musálem and Ramírez, 2003).

Una diferencia importante entre *Pinus ayacahuite* y *P. strobiformis* son sus requerimientos climáticos. *P. strobiformis* se desarrolla principalmente en climas templados-fríos (temperatura media 13°C), mientras que *P. ayacahuite* lo hace en templados-cálidos (temperatura media 15°C). Las temperaturas máximas extremas para ambas especies son similares, de 30 a 40°C, sin embargo, la temperatura mínima extrema que puede soportar *P. strobiformis* es de -23°C, mientras que *P. ayacahuite* es poco tolerante a las heladas, con temperaturas mínimas extremas de -5°C (Musálem and Ramírez, 2003). En las zonas donde crece *P. strobiformis* la precipitación se distribuye de manera bimodal, la principal época de lluvias de finales de primavera y todo el verano, pero son frecuentes las nevadas en invierno. En promedio, la precipitación en la Sierra Madre Oriental y Occidental es de 1000 y 1500 mm respectivamente. La diferencia en hábitat también puede observarse con *P. flexilis*, ya que esta especie crece en sitios más secos y fríos que *P. strobiformis*, con una precipitación anual menor a 1000 mm y con una contribución mayor de las nevadas, además de temperaturas medias en el mes más frío menores a 0°C (<http://esp.cr.usgs.gov/data/atlas/little/>).

1.4.5. Antecedentes de estudios genéticos en *Pinus strobiformis*

Por ser una especie poco abundante localmente, *P. strobiformis* ha sido poco estudiado. Un trabajo con 14 loci de isoenzimas para 12 poblaciones de *P. ayacahuite* y 2 de *P. strobiformis* encontró que el último posee niveles de variación genética mayor que las poblaciones de *P. ayacahuite* var. *ayacahuite*, pero menor a *P. ayacahuite* var. *veitchii* y una clara diferenciación genética con las poblaciones de ambas variedades de *P. ayacahuite* (Musálem and Ramírez, 2003). Un estudio filogenético con un gen nuclear encontró que *P. strobiformis* posee la mayor diversidad nucleotídica de 34 especies de pinos blandos (subgénero *Strobus*), sin embargo también comparte alelos con *P. ayacahuite* y *P. flexilis* (Syring et al., 2007b).

La especie del grupo de los ayacahuites (*sensu* Martínez) que más ha sido estudiada es *P. flexilis*. En un análisis de las poblaciones de Colorado se encontró escasa diferenciación genética entre las localidades usando un espaciador intergénico de cloroplasto, lo cual contrasta con la elevada diferenciación genética encontrada para marcadores mitocondriales (Latta and Mitton, 1997). Esta alta diferenciación genética para loci mitocondriales también se observó en un estudio filogeográfico de la misma especie, en donde se identificaron 6 posibles refugios pleistocénicos, dos de los

cuales (Arizona y Nuevo México) pudieron estar en contacto con el límite norte de la distribución de *P. strobiformis* (Mitton et al., 2000).

1.5. Paleoclima y la biota durante el Pleistoceno

1.5.1. Los ciclos glaciales

La Tierra ha pasado por varias oscilaciones climáticas a lo largo de su historia. Durante el Mesozoico, el clima fue mucho más cálido que en la actualidad, condiciones que persistieron durante el Terciario temprano. A partir del Mioceno (23 m.a.) los niveles de CO₂ en la atmósfera disminuyeron y la temperatura empezó a descender, culminando en los ciclos glaciales del Plioceno tardío y Pleistoceno (Graham, 1999; Gibbard and van Kolfshoten, 2004). Estos cambios climáticos cíclicos o ciclos de Milankovitch están dados por cambios en los parámetros orbitales de la Tierra que cambia la insolación que recibe. Hay ciclos de 41 000 años (ciclo de Matuyama) dado por el cambio en el eje de inclinación de la Tierra; otro de 100 000 años (ciclo de Bruhnes) producido por el cambio en la excentricidad de la órbita; y otro más corto de 19 a 23 000 años causado por la precesión del eje de la Tierra (Rogers and Wang, 2002).

Los ciclos glaciares empezaron hace aproximadamente 2.4 m.a. (Plioceno) siguiendo el ciclo corto de Matuyama y posteriormente hace 0.9 m.a. hubo una transición al ciclo de Bruhnes, estableciéndose completamente hace 0.7 m.a. (Rogers and Wang, 2002; Rutherford and D'Hont, 2000). El cambio entre ambos ciclos está marcado por una intensificación de las condiciones glaciares en el hemisferio Norte por las oscilaciones producidas por la precesión, que han continuado desde entonces hasta el Último Máximo Glacial (UMG) que duró de 23 000 a 18 000 años A.P. (Clemens and Tiedmann, 1997; Stauffer, 1999; Rogers and Wang, 2002).

La cronología de los ciclos glaciales se ha realizado principalmente con base a los niveles de ¹⁸O en sedimentos marinos (Stauffer, 1999). El oxígeno tiene dos isótopos estables, ¹⁶O y ¹⁸O, siendo ¹⁶O hasta 500 veces más abundante que el isótopo pesado. La molécula de H₂¹⁶O es más ligera que H₂¹⁸O, por lo que se evapora con más facilidad, dejando el agua de mar parcialmente enriquecida con ¹⁸O. Este proceso es dependiente de la temperatura. Durante los periodos glaciales se encuentra un exceso de ¹⁸O en el agua de mar, mientras que el hielo de los casquetes polares alimentados por el agua evaporada es isotópicamente más ligero (Lowe and Walker, 1997). La razón entre la cantidad de cada isótopo ($\delta^{18}\text{O}$) encontrado en el hielo o en las conchas de foraminíferos o moluscos marinos y un estándar, permite calcular de manera indirecta la paleotemperatura y determinar si se trataba de un periodo glacial o interglacial. En los sedimentos marinos se esperan valores de $\delta^{18}\text{O}$ positivos durante los periodos glaciales y valores de 0 ó negativos durante los interglaciares. De esta manera se pudo determinar la amplitud de los ciclos y comprobar las hipótesis

de Milankovitch que explicaban los ciclos glaciales por cambios en los parámetros orbitales de la Tierra (Lowe and Walker, 1997). Hasta el momento, se han identificado más de 20 ciclos llamados también Estadíos Isotópicos Marinos (MIS en inglés). Aquellos estadíos que corresponden a un periodo glacial (isotópicamente pesados) se les denomina estadiales y se les otorga un número par, mientras que los periodos interglaciares se llaman interestadiales y les corresponde un número impar (Fig. 1.5). El interestadial 1 corresponde al Holoceno, los estadiales 2 y 4 y el interestadial 3 corresponden al Wisconsin o último periodo glacial y el interestadial 5 corresponde al Sangamoniano, o penúltimo interglacial (Fig. 1.5; Gibbard and van Kolfschoten, 2004). Estos estadiales e interestadiales han sido identificados en Norteamérica, sin embargo los registros continentales no son concordantes entre los sitios y en la mayoría de los casos, la última glaciación alteró la evidencia de glaciaciones previas, por lo que la mayoría de los registros terrestres sólo abarcan los últimos 120 000 años (Pleistoceno tardío).

Los ciclos glaciales alteraron los patrones de circulación atmosférica y oceánica, la disponibilidad de humedad y la estacionalidad de las lluvias, además de la temperatura global (Metcalf et al., 2000; Peterson et al., 2000; Herbert et al., 2001). Los cambios más drásticos ocurrieron en las latitudes mayores, con casquetes polares cubriendo gran parte de Norteamérica y Europa. En bajas latitudes también ocurrió un decremento de temperatura de hasta 6°C y crecimiento de glaciares de montaña (Porter, 2001; Lachniet and Vazquez-Selem, 2005; Metcalfe, 2006). El patrón general fue de compresión de las zonas de vegetación hacia el Ecuador, al avanzar el casquete del hemisferio Norte (Hewitt, 2000). En las zonas no glaciadas de bajas latitudes, también hubo cambios considerables. En general el clima se hizo más seco y hubo un descenso de la línea de las nieves y vegetación de las montañas, mientras que las selvas tropicales se fragmentaron (Peterson et al., 2000; Lozano-García and Vázquez-Selem, 2005; Piperno et al., 2007). Por ejemplo, en el Amazonas se registró un descenso de 4 a 9°C, indicado por la presencia de coníferas en zonas bajas durante el UMG (Colinvaux, 1996).

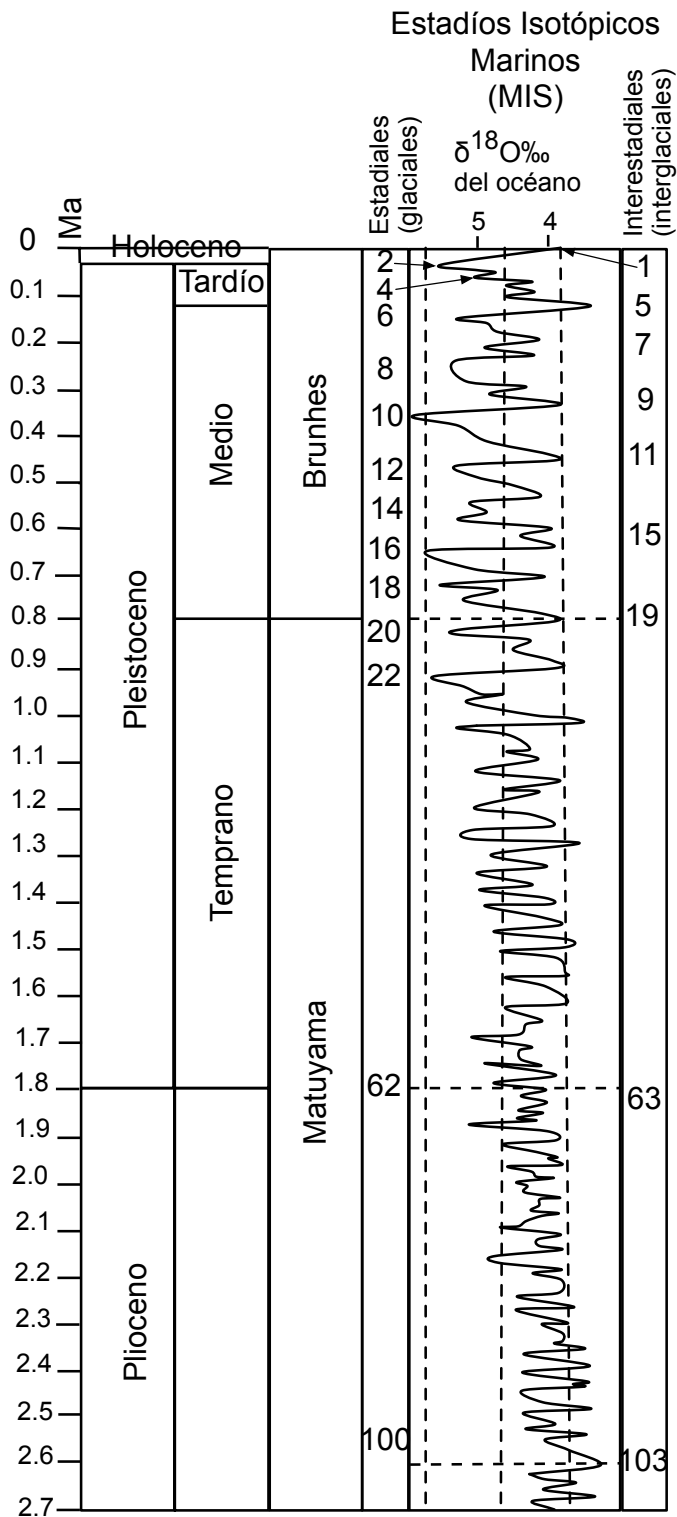


Figura 1.5: Escala geológica del Plioceno, Pleistoceno y Holoceno. Valores mayores de $\delta^{18}O$ en el océano indican condiciones glaciales.

Basado en Gibbard and van Kolschoten (2004).

1.5.2. Paleoclima en México

Faja Volcánica Transmexicana (FVTM)

La historia climática de México es muy compleja, ya que los efectos de las glaciaciones fueron muy distintos en lugares que actualmente reciben humedad del Atlántico o del Pacífico (Metcalf et al., 2000). La zona mejor estudiada corresponde a la Faja Volcánica Transmexicana, sobre todo por la abundancia de sitios con las características adecuadas para preservar los registros. El registro más largo es el del Lago de Chalco que abarca desde el Wisconsin medio (40 000 años A.P.) hasta el Holoceno tardío (3000 años A.P.). Desde los 40 000 a 22 500 años el lago era alcalino, abierto y profundo, luego el nivel del lago aumentó ligeramente en el UMG, pero esto se debió a la erupción del Popocatepetl que alteró el drenaje de la cuenca (Caballero and Ortega-Guerrero, 1998). Salvo ese caso particular, todos los registros muestran un máximo glacial seco y frío, aunque los lagos no llegaron a secarse del todo, por lo que las bajas temperaturas también contribuyeron a disminuir la evaporación (Metcalf et al., 2000). A finales del Pleistoceno hay variación en los registros pero en general indican condiciones secas que continuaron hasta el Holoceno temprano (Metcalf et al., 2000). Esto último se contradice con la evidencia de otros lagos en zonas tropicales, donde el Holoceno temprano se caracteriza por ser más húmedo que el periodo glacial (Caballero and Ortega-Guerrero, 1998). Esto no ocurre en el centro de México, ya que en numerosos registros se observa una disminución en los niveles lacustres que se recupera para el Holoceno medio y tardío en algunos sitios (Metcalf et al., 2000; Caballero and Ortega-Guerrero, 1998). Los datos de esta zona indican que el clima durante el periodo del máximo glacial no estaba netamente influenciado por los vientos alisios del Atlántico (que originaron condiciones secas) o los vientos del Oeste del Pacífico (que traían condiciones húmedas), sino que fue un mosaico de ambos e influenciados por la altitud, ya que cuencas más occidentales como Pátzcuaro, Zacapu y Cuitzeo presentaron niveles lacustres más altos durante el máximo glacial por el aumento de precipitación (Bradbury, 1997; Caballero and Ortega-Guerrero, 1998; Metcalf, 2006). En la cuenca de México, las condiciones fueron más secas por la pérdida de intensidad de los alisios y disminución de la precipitación en el verano, aunque no tan secas como otras zonas donde estos vientos son la única fuente de humedad (Caballero and Ortega-Guerrero, 1998).

Existe consenso respecto al marcado descenso en la temperatura en toda la zona, no sólo por los registros lacustres sino por evidencia de avances glaciales y modificación de las líneas de las nieves. Los volcanes Ajusco e Iztaccíhuatl presentaron una depresión en la línea de las nieves entre 600 y 900 m respectivamente (Porter, 2001), aunque ninguno de estos registros corresponde estrictamente al UMG. La mayor extensión de los glaciares del volcán Iztaccíhuatl fue hace 150 000 a 126 000 años AP (MIS 6; Fig. 1.5), lo que sugiere una fuente de humedad, ya que el descenso en la temperatura únicamente sin aumento en la precipitación, no explica el avance glacial (Metcalf,

2006).

Noroeste de México, Desierto Sonorense y Sierra Madre Occidental

Esta zona constituye actualmente un mosaico orográfico y climático que la hace muy difícil de describir. Está caracterizada por gradientes muy marcados de temperatura y de elevación, así como por dos patrones de lluvias distintos: la costa del Pacífico que incluye California y Baja California tiene un régimen de lluvias de invierno cuya fuente es el Pacífico; el desierto Sonorense y la Sierra Madre Occidental con un régimen de lluvias de verano o monsoon, cuya fuente de humedad es el Golfo de México (Metcalfé et al., 2000; Thompson and Anderson, 2000). También contrastan las planicies costeras del Golfo de California con las elevaciones de la Sierra Madre Occidental y las montañas de Arizona, con una altitud mayor a 2000 msnm. Además, gradientes de temperatura muy marcados tanto diurnos como por temporada, permiten la existencia de tipos de vegetación tan distintos como el desierto y el bosque mixto de coníferas en áreas relativamente reducidas (Thompson and Anderson, 2000).

La información paleoclimática de esta zona es muy diversa y posee algunos registros muy largos y de bastante resolución, sobre todo los núcleos marinos y registros lacustres de California. La serie de tiempo más larga fue obtenida de núcleos marinos en la costa de California y Baja California y abarca 550 000 años y 5 estadales (Herbert et al., 2001). En estos núcleos se registra los cambios en la temperatura superficial del mar, que son indicadores indirectos de la intensidad de la Corriente de California que determina el clima actual de la costa del Pacífico (Herbert et al., 2001). En general, se registra una disminución de 10-4°C en la temperatura superficial, que sin embargo no coincide con el los máximos glaciales, ya que se registran temperaturas más altas en estos puntos (Herbert et al., 2001). La presencia del casquete polar en su volumen máximo, cambió la posición de los vientos del oeste que limitaron la propagación de la Corriente de California y se favoreció la entrada de aguas cálidas del Sur, provocando temperaturas más altas (Herbert et al., 2001; Lea, 2001). Este fenómeno pudo haber generado condiciones similares a las de El Niño, que ocasionan un aumento considerable en la precipitación, que sin embargo fueron de efectos muy localizados y casi idénticos en máximos glaciales previos, por lo que se podría suponer que la perturbación de los vientos del oeste por los casquetes polares es bastante predecible (Herbert et al., 2001).

El descenso en la temperatura y aumento de la precipitación durante periodos glaciales también influenciaron la vegetación del desierto de Sonora y zonas aledañas. Los registros de esta zona son básicamente de dos tipos: polen y madrigueras de ratón . El estudio más extenso ha sido llevado a cabo con madrigueras de ratón y abarca edades del Wisconsin medio hasta el presente (McAuliffe and Van Devender, 1998). En todos los casos es evidente una depresión en la línea de vegetación, ya que en zonas actualmente ocupadas por desierto se encontraron evidencias de bosques abier-

tos de *Juniperus* y pinos piñoneros durante el Wisconsin (McAuliffe and Van Devender, 1998). Sin embargo existen evidencias de que el Wisconsin medio (interestadial 3) fué más seco que el Wisconsin tardío (UMG), pero mucho más húmedo que el Holoceno, y que predominaron asociaciones vegetales que no tienen análogos modernos (Van Devender, 1990b; Lozano-García et al., 2002; Metcalfe, 2006). La composición de las comunidades glaciales muestra la total ausencia de especies sensibles a heladas y aquellas que requieren precipitación de verano (McAuliffe and Van Devender, 1998; Thompson-Arundel, 2002). Esto es una indicación de que la precipitación se presentaba principalmente en el invierno, como en la costa de California actualmente y que el monzón proveniente del Golfo de México se debilitó sustancialmente (Thompson and Anderson, 2000; Thompson-Arundel, 2002). En general se considera que la precipitación aumentó de un 30 a 70 %, pero la disminución de la temperatura fue de 3 a 8°C, dependiendo de la latitud (Van Devender, 1990b).

Entre los pocos registros de polen están los de la Laguna Seca en la cuenca de San Felipe Baja California, que abarca de 40 000 a 13 000 años AP y muestra una dominancia de polen de *Juniperus* y *Pinus*, pero con porcentajes variables a lo largo de la secuencia. Actualmente este tipo de vegetación crece por encima de los 1000 msnm y es de esperarse que durante el Wisconsin se desarrolló un bosque abierto a 500 msnm, donde está la Laguna Seca (Lozano-García et al., 2002). Esto está en concordancia con lo reportado para otros sitios en Baja California (Cataviñá), donde hay evidencia de bosques de pinos piñonero en regiones actualmente desérticas (Lanner and Van Devender, 1998; Lozano-García et al., 2002; Metcalfe, 2006). En general, se considera que el clima del desierto de Sonora durante el UMG era de tipo mediterráneo, con lluvias en invierno del doble de lo que actualmente recibe (Metcalfe, 2006).

Otro registro de polen se encuentra en la Ciénega de Camilo (1600 msnm), municipio de Yécora, en la Sierra Madre Occidental y abarca la transición Pleistoceno-Holoceno (Ortega-Rosas et al., 2008). En esta secuencia de polen se registra también un descenso en la línea de vegetación de al menos 400 m y de 2°C en la temperatura. Esto se infiere por la presencia de polen de *Abies* y la dominancia de *Pinus* (posiblemente *Pinus strobiformis*) en un lugar donde actualmente domina *Quercus* (Ortega-Rosas et al., 2008). Este tipo de vegetación corresponde a un bosque mixto de coníferas tolerante al frío y fue sustituido después de los 8 000 años AP por un bosque de pino-encino, lo que indica un calentamiento progresivo y disminución de la precipitación (Thompson and Anderson, 2000; Ortega-Rosas et al., 2008).

Desierto Chihuahuense y Sierra Madre Oriental

La zona más estudiada del Desierto Chihuahuense es la que corresponde a Estados Unidos, aunque recientemente se han hecho estudios en México (Metcalfe et al., 2002). La mayor parte de los datos paleoclimáticos para las zonas áridas han sido obtenidos en madrigueras de ratón, aunque

también se han realizado estudios con isótopos, sedimentos lacustres y geomorfología (Van Devender, 1990a; Pendall et al., 1999; Betancourt et al., 2001; Musgrove et al., 2001; Metcalfe et al., 2002).

En el límite norte del desierto de Chihuahua existen evidencias de que el desierto actual fue colonizado en el Holoceno y que durante el Wisconsin estaba dominado por bosques abiertos de pinos piñoneros y *Juniperus* en las zonas más bajas (Van Devender, 1990a). Estos bosques colindaban directamente con bosques mixtos de coníferas, como lo muestran fósiles de hojas de *Pseudotsuga menziesii* encontrados en las madrigueras de ratón (Betancourt et al., 2001). Todos estos taxa han sido identificados en madrigueras de ratón a 1500-1600 msnm, cuando la mayoría se distribuye a altitudes superiores a 2000 msnm (Betancourt et al., 2001; Thompson and Anderson, 2000). En la parte mexicana del desierto de Chihuahua se han encontrado restos de *Pinus remota* y *Juniperus* en el Bolsón de Mapimí con una antigüedad de 13 000 años ^{14}C (Pleistoceno tardío), que luego fue sustituido por matorral y suculentas entre 12 000 y 9000 años ^{14}C (Holoceno temprano; Metcalfe, 2006). Esta evidencia, junto con la presencia de lagos permanentes y formaciones de calcita, sugieren condiciones más frías y húmedas (Betancourt et al., 2001; Musgrove et al., 2001). Sin embargo, aún existe un debate en cuanto a la estacionalidad de las lluvias. El consenso está en el debilitamiento de las lluvias de monsoon, pero no hay evidencias claras de que las lluvias fueran totalmente de invierno, o si también hubo un aumento en precipitación al final de la primavera (Betancourt et al., 2001; Pendall et al., 1999; Thompson-Arundel, 2002). Sin embargo, valores de isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ en el esmalte de la dentadura de *Thomomys* y *Geomys* indican la predominancia de pastos C4 (condiciones húmedas en verano) durante los interglaciales 27, 29 y 31, pero hay pocas evidencias de que los periodos glaciales fueran húmedos (Rogers and Wang, 2002). Las condiciones húmedas en los periodos glaciares empiezan a partir del glacial 22 (hace 860 000 años A.P. aprox.), determinadas tanto por isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ y fósiles (Rogers and Wang, 2002). En general, los resultados obtenidos muestran que el Pleistoceno medio fue más seco que el Pleistoceno tardío, con veranos frescos e inviernos benignos y húmedos, pero con cierta contribución de lluvias en verano (Metcalfe, 2006). En el Pleistoceno tardío, los periodos glaciares húmedos y fríos e interglaciares cálidos y secos son la norma (Polyak and Asmerom, 2005; Jiménez-Moreno et al., 2007). Incluso se ha encontrado evidencia de polen fósil que indica que los interglaciales MIS 7 y MIS 5e (Fig. 1.5) fueron mucho más cálidos que el actual Holoceno (Jiménez-Moreno et al., 2007).

El régimen de lluvias de verano se estableció hasta 9000 A.P., lo que tuvo como consecuencia la desaparición del bosque abierto de coníferas en zonas bajas (Metcalfe, 2006). Esto último concuerda con datos de polen y diatomeas en la laguna Babícora en Chihuahua, que abarca los últimos 65 000 años A.P. En el Wisconsin temprano las condiciones fueron húmedas, dada la presencia de diatomeas de aguas dulces y profundas y a una vegetación de *Quercus*, *Pinus* y *Picea* (Metcalfe

et al., 2002). Durante el Wisconsin medio el lago se volvió más somero, lo que concuerda con el patrón de condiciones más secas en este tiempo. A partir de los 29 000 años A.P. y hasta el fin del Pleistoceno, las condiciones se tornaron más frías y húmedas, lo que coincide con el aumento de polen de *Pinus* y *Picea* (Metcalfé et al., 2002). Posteriormente, la transición al Holoceno estuvo marcada por fluctuaciones en las condiciones climáticas. Cabe hacer notar que este registro es notable por varias cosas, es el más largo obtenido hasta ahora para esta zona de México y además por su altitud (2138 msnm), comprende una zona que no entra dentro de los estudios con madrigueras de ratón, y por lo tanto nos muestra lo sucedido con la vegetación de zonas templadas. La presencia de *Picea* es muy llamativa porque actualmente sólo se encuentra en las zonas más altas y frías del estado de Chihuahua, por lo que su distribución es muy restringida (Ledig et al., 2002). Estos resultados indican que esta especie aumentó su distribución, quizá junto con otras coníferas con las que se asocia (*Pseudotsuga menziesii* y *Pinus strobiformis*), al igual que los bosques abiertos de pinos piñoneros de zonas más bajas.

La Sierra Madre Oriental ha resultado más difícil de estudiar dada su complejidad geológica y la escasez de sitios aptos. Sin embargo, hay evidencias de depósitos lacustres y fluviales de origen Cuaternario que muestran patrones de sedimentación como los observados en lugares cercanos a glaciares del Pleistoceno (Ruíz-Martínez and Werner, 1997). Sin embargo no existen fechas que permitan hacer una correlación más fina entre estos sedimentos y los periodos glaciales e interglaciales.

Efectos de los cambios climáticos sobre la biota

La mayor parte de los estudios sobre el efecto de las glaciaciones sobre la distribución de los organismos se han realizado en altas latitudes, ya que los cambios fueron más drásticos y la evidencia es más abundante. Los casquetes polares cubrieron la mayor parte del norte de Europa y aún más en Norteamérica llegando al sur de los 40°N en el UMG (Hewitt, 2000). Las primeras reconstrucciones se basaron en registros fósiles, principalmente de polen, que permitieron reconstruir las paleo-comunidades y patrones de dispersión de distintas especies de plantas (Cruzan and Templeton, 2000). Posteriormente, se analizó el impacto de estos cambios sobre la variación genética de las poblaciones, correlacionando la estructura genética con la información fósil, lo que permitió describir patrones generales usando la nueva disciplina de la filogeografía. El avance de los casquetes polares generó una aridificación general, favoreciendo la expansión de tipos de vegetación como la tundra o estepa en latitudes templadas y desiertos y savanas en los trópicos (Hewitt, 2000; Emerson and Hewitt, 2005).

En Europa, el aumento en la extensión de la tundra fragmentó los bosques templados, causando extinciones en el borde del glaciar y el aislamiento de las poblaciones en refugios en el Sur (Hewitt, 2000; Liepelt et al., 2002). Con base en información de registro fósil y datos genéticos se han

identificado tres refugios principales compartidos por taxa animales y vegetales: Iberia, Italia y los Balcanes (Emerson and Hewitt, 2005). Cada refugio mantuvo cierta variación genética, pero el patrón general es de aislamiento entre refugios, ocasionalmente roto por flujo génico a larga distancia, como el observado entre Italia y los Balcanes para *Abies alba* (Liepelt et al., 2002). Posteriormente, con el retiro de los glaciares, se produjo una rápida colonización hacia el norte, seguida de cuellos de botella conforme el frente de colonización avanzaba, dejando un patrón decreciente de diversidad genética de sur a norte. Sin embargo, las zonas de mayor diversidad genética son aquellas donde se encontraron los frentes de colonización de poblaciones provenientes de distintos refugios (Petit et al., 2003). Estas zonas de gran diversidad se consideran zonas de contacto o de sutura y coinciden para varias especies de plantas y animales en el centro de Europa.

Los cuellos de botella, la subsiguiente pérdida de diversidad y alta estructura genética son un patrón general en las especies europeas de árboles de bosques templados, sobre todo para marcadores mitocondriales (Petit et al., 2005). Sin embargo, estudios en pinos de afinidad montana en los refugios (*Pinus sylvestris* y *Pinus nigra*) muestran que estas especies tolerantes al frío no sufrieron pérdidas de hábitat y de diversidad genética (Robledo Arnuncio et al., 2005). Estas especies de pino se distribuyen actualmente en las zonas montañosas de la Península Ibérica y se consideran relictuales, sin embargo, restos de polen fósil y datos genéticos sugieren un aumento en los rangos poblacionales durante los periodos glaciales, en detrimento de poblaciones de pinos termofílicos como *Pinus pinea* o *Pinus halepensis* (Robledo Arnuncio et al., 2005). Esta evidencia sugiere que la respuesta de los organismos a los cambios climáticos depende de su afinidad ecológica y su distribución, por lo que el clima glacial pudo favorecer especies tolerantes al frío en bajas latitudes.

Los cambios de distribución de la biota en Norteamérica durante los periodos glaciales han sido menos estudiados, ya que la orografía hace que la interpretación sea más compleja (Hewitt, 2000). Existen numerosos estudios sobre filogeografía de peces de agua dulce y otros vertebrados pequeños, sin embargo esto no permite generalizar sobre patrones generales de cambio a nivel de comunidad o bioma, como sí lo permiten los estudios de flora dominante en un ecosistema. En general, Norteamérica también experimentó una aridificación durante los periodos glaciales, que propició el desplazamiento al sur de la tundra y la estepa, y la fragmentación de los bosques templados (Ray and Adams, 2001). En el oeste de Norteamérica hubo un aumento en la distribución de taxa adaptados al frío, como *Picea*, *Pinus monticola* o *Tsuga mertensiana*, que actualmente sólo se encuentran cerca de la línea de las nieves en las Montañas Rocallosas (Whitlock and Grigg, 1999). El caso opuesto es *Pinus resinosa*, cuyo rango actual se encuentra en una zona que estuvo cubierta por el casquete polar en el UMG, por lo que las poblaciones sufrieron extinción a gran escala, cuellos de botella, y pérdida de variación genética, aún en los refugios de los Apalaches o Nueva Escocia (Walter and Epperson, 2001). Para los pinos que se distribuyen en las monta-

ñas Rocallosas, hay evidencia de extinción de las poblaciones del norte por el avance glaciar y de refugios en el sur de las Rocallosas o incluso en México, con alta diferenciación genética para poblaciones provenientes de distintos refugios (Latta and Mitton, 1999; Mitton et al., 2000). Una vez retirados los glaciares al inicio del Holoceno (10 000 años A.P.), se ha visto el mismo patrón que en Europa: rápida migración hacia el norte y expansiones poblacionales (Mitton et al., 2000; Marshall et al., 2002) y zonas de contacto con alta variación genética (Latta and Mitton, 1999; Walter and Epperson, 2001). En la Fig. 1.6 se resumen los principales cambios ambientales y de vegetación en Norteamérica durante el UMG.

En latitudes más cercanas a los trópicos, los cambios son más difíciles de seguir, ya sea por la complejidad orográfica, la falta de evidencia fósil o de estudios filogeográficos. La opinión prevalente es de una mayor aridificación, expansión de las savanas y fragmentación de las selvas, sin embargo hay evidencia de que en la cuenca del Amazonas la línea de vegetación bajó y bosques de coníferas ocuparon tierras bajas durante el UMG (Colinvaux, 1996). En México y el suroeste de Estados Unidos se observa un patrón distinto, ya que en esta región la precipitación aumentó, por lo que las condiciones pasaron de ser cálidas y secas con lluvias en verano como en la actualidad, a frescas y húmedas con precipitación variable, mayormente en invierno durante el último periodo glacial (Wisconsin, 75 000-10 000 años A.P.) (Bradbury, 1997; Metcalfe, 2006). Estas condiciones propiciaron el reemplazamiento del matorral desértico del norte de México por bosques abiertos de piñón-junípero, y los bosques de piñón-junípero fueron sustituidos por bosques mixtos de coníferas (Holmgren et al., 2007). Las especies mexicanas de *Picea* son un buen ejemplo del aumento en la distribución de taxa de montaña, ya que para *Picea mexicana* se ha detectado una diferenciación genética de solo el 6.9% usando isoenzimas, incluso en poblaciones separadas por el desierto de Chihuahua (Ledig et al., 2002). En *Picea martinezii* y *Picea chihuahuana* no se encuentra estructura filogeográfica ni aislamiento por distancia, pero sí evidencias de un colapso poblacional en el Pleistoceno, por lo que se concluye que las poblaciones actuales son relictuales (Ledig et al., 2000; Jaramillo-Correa et al., 2006). Para varias especies del género *Abies* del Centro y Sur de México, se encontró polimorfismo compartido entre especies (cpSSRs y DNA mitocondrial; Jaramillo-Correa et al., 2008). En particular, para cpSSRs se observó estructura filogeográfica significativa, marcada por eventos de introgresión que se atribuyen a periodos glaciales.

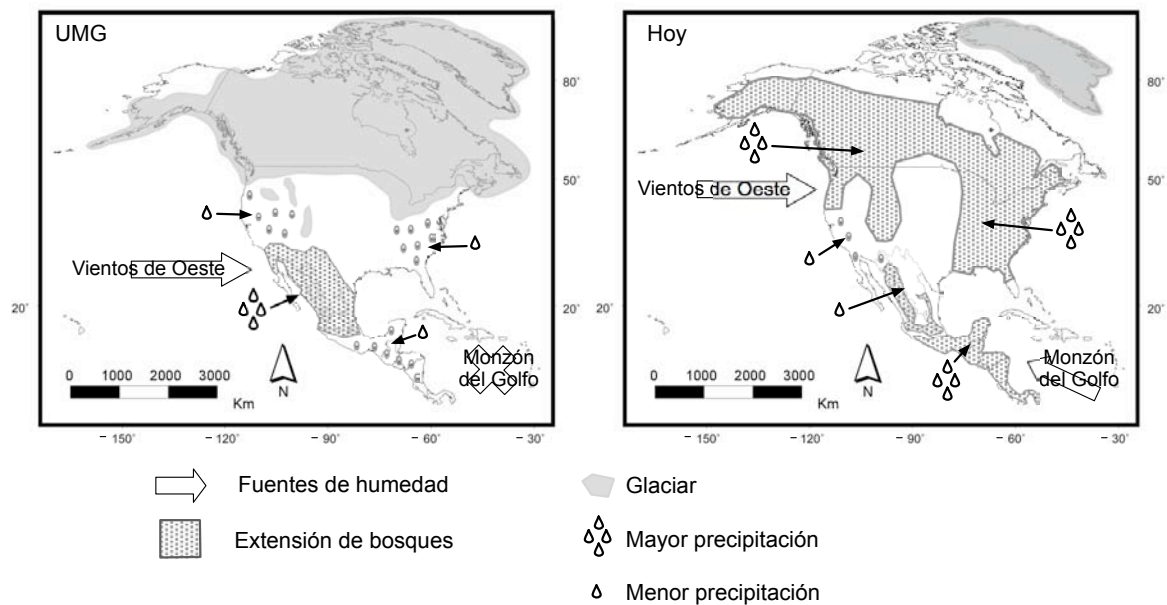


Figura 1.6: Condiciones ambientales y de distribución de los bosques durante el UMG y en la actualidad.

1.6. Filogeografía

El estudio de las poblaciones naturales ha estado limitado por las herramientas existentes y durante mucho tiempo, sólo pudieron monitorearse procesos contemporáneos (Cruzan and Templeton, 2000). Disciplinas como la ecología, demografía y genética de poblaciones han dominado el estudio de los individuos por debajo del nivel de especies, mientras que la sistemática se ocupaba de las especies mismas. Esto generó una barrera artificial entre macro y microevolución, ya que procesos como la hibridación, introgresión y especiación eran difíciles de abordar al no poder analizar directamente los genes (Avise et al., 1987). El desarrollo de las técnicas de DNA ha posibilitado el estudio de las poblaciones en un contexto histórico (Emerson and Hewitt, 2005). Es entonces que surge la filogeografía como la disciplina que estudia la distribución de los linajes de genes en el espacio (Avise, 2000). Esta aproximación permite probar hipótesis que se refieren a procesos históricos como la vicarianza, las expansiones demográficas o cuellos de botella, la introgresión, el aislamiento por distancia o la expansión del rango, que rara vez dejan huella morfológica pero sí genética. Estos procesos ocurren a nivel intraespecífico, pero pueden ocurrir en la frontera al formar parte de procesos de especiación (Schaal and Olsen, 2000; Hewitt, 2001).

Los marcadores moleculares de DNA permiten el estudio de los patrones de flujo génico entre poblaciones de la misma especie, a partir de lo cual se puede entender el origen de nuevos linajes y eventualmente de nuevas especies (Schaal et al., 1998; Schaal and Olsen, 2000). Las propiedades

más importantes que debe poseer un marcador molecular para estudios filogeográficos son (Avice et al., 1987; Schaal et al., 1998; Posada and Crandall, 2001):

- Neutralidad
- Variables a nivel intraespecífico
- Estados de carácter que pueden ser ordenados, es decir, sus relaciones de ancestría-descendencia pueden ser inferidas.

Con base al tipo de marcador molecular se puede construir una genealogía de genes, que no necesariamente es la genealogía de la especie (Posada and Crandall, 2001), u obtener diversos estadísticos de resumen que describan la variación genética, su distribución e historia demográfica (θ , N_e , D de Tajima, etc.; Hey and Machado, 2003).

Los análisis filogeográficos iniciales se hacían sobreponiendo genealogías de genes sobre mapas geográficos (aproximación genealógica), y a partir de los primeros resultados se pudieron identificar los siguientes patrones (Avice et al., 1987; Avice, 2000; Nordborg and Innan, 2002):

1. Vicarianza o extinción de poblaciones intermedias con flujo génico. Patrón: los alelos coalescen en la misma región geográfica y poseen distancias genéticas mayores que con alelos de otras regiones.
2. Contacto secundario o especiación simpátrica. Patrón: alelos genéticamente divergentes se encuentran en una misma zona geográfica.
3. Flujo génico limitado y fragmentación reciente. Patrón: los alelos coalescen en la misma región geográfica pero las distancias genéticas entre alelos de distintas regiones no son muy pronunciadas.
4. Flujo génico intenso. Patrón: ausencia de estructura, distribución aleatoria de la variación genética y distancias genéticas pequeñas entre alelos.
5. Flujo génico intermedio y barreras efímeras. Patrón: distribución aleatoria de la variación genética pero con algunas regiones con alelos privados.

La aproximación genealógica tiene sus limitantes, ya que no toma en cuenta la estocasticidad del proceso genealógico. Es decir, en una población en que todos los individuos tienen la misma probabilidad de dejar descendencia, los alelos que pasan a la siguiente generación son una muestra aleatoria de la generación anterior. En este tipo de población se conoce como Wright-Fisher y las únicas fuerzas evolutivas que actúan son la deriva génica y la mutación (Hudson, 1991; Nordborg,

2001). Este proceso aleatorio genera que existan un muchas genealogías posibles que no son tomadas en cuenta en las aproximaciones genealógicas a la filogeografía (Hey and Machado, 2003; Carstens et al., 2005). La aproximación filogenética no toma en cuenta otros procesos que pueden generar incongruencias entre distintos loci como la selección natural o la recombinación (Nordborg and Innan, 2002), ni las características de historia de vida del organismo, como el tamaño efectivo poblacional o el tiempo generacional, por lo que no permiten estimar el tiempo de divergencia entre poblaciones o hacer comparaciones entre especies filogenéticamente lejanas (Carstens et al., 2005).

La presencia de polimorfismo ancestral compartido obscurece las genealogías, sobre todo porque puede confundirse con flujo génico (Bulgin et al., 2003; Maddison and Knowles, 2006). Por esta razón, las aproximaciones filogenéticas resultan más eficaces cuando los taxa estudiados presentan divergencias antiguas y poco flujo génico, como la vicarianza (patron 1). Sin embargo, las genealogías de genes pueden tener distintas formas dependiendo del tiempo que ha transcurrido desde la interrupción del flujo génico (Fig. 1.7; Avise, 2000; Rosenberg, 2003):

1. Monofilia recíproca: todos los alelos de una especie o poblaciones de una zona geográfica coalescen entre ellos antes que con los alelos de otra especie y/o zona geográfica. Esto ocurre cuando el tiempo de divergencia ha sido lo suficientemente largo y las barreras al flujo génico no se han cruzado, permitiendo que el reparto de linajes sea completo.
2. Parafilia: sólo un grupo de alelos encuentra su ancestro común más reciente en su zona geográfica (B en la Fig. 1.7), pero otros alelos tienen su ancestro común más reciente anterior a la divergencia (A en la Fig. 1.7).
3. Polifilia: la coalescencia de los alelos ocurre antes de la divergencia.

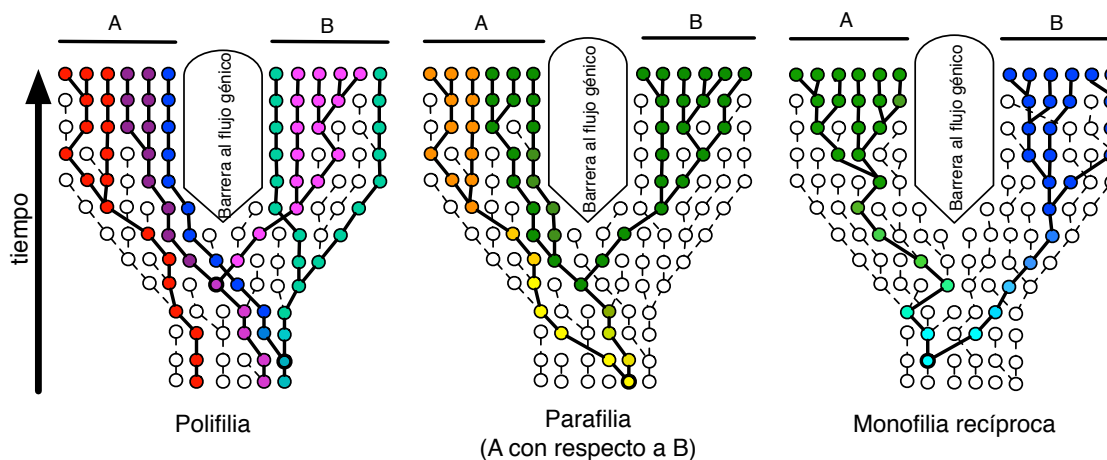


Figura 1.7: Distintos tipos de genealogías de genes

En los dos últimos casos, los alelos que comparten un ancestro pero se encuentran en zonas geográficas distintas o pertenecen a especies diferentes. La parafilia y la polifilia pueden ser producto de una divergencia muy reciente o de flujo génico. Sin embargo, es posible estimar índices de diferenciación genética, tasas de flujo génico y parámetros poblacionales que pueden identificar patrones filogeográficos y reconstruir la demografía histórica aunque la genealogía de los genes no resulte clara (Hey and Machado, 2003). En particular, en presencia de procesos cíclicos que han alterado la distribución de las especies (como las glaciaciones), el rol del flujo génico recurrente y/o el aislamiento reciente de poblaciones es mucho más probable, por lo que las genealogías de genes deben ser apoyadas por otro tipo de evidencia (registro fósil, información ecológica) para reconstruir la historia de los linajes (Carstens and Knowles, 2007).

1.7. Hipótesis

1. Sobre la estructura genética de *P. strobiformis* y el posible impacto de los cambios climáticos sobre la misma:

Pinus strobiformis es una especie de afinidad montana, con un rango ecológico limitado a condiciones frías y húmedas como las que prevalecieron durante los periodos glaciales en el norte de México. Por lo tanto se espera que durante los periodos fríos las poblaciones de esta especie aumentaron su rango de distribución, permitiendo el contacto entre poblaciones actualmente aisladas. Se esperan escasa diferenciación entre poblaciones, ausencia de aislamiento por distancia y alta variación genética.

2. Sobre las relaciones dentro del complejo *Pinus flexilis-strobiformis-ayacahuite*:

Como otros linajes de pinos de origen reciente, el complejo de especies donde se encuentra *Pinus strobiformis* mostrará poca divergencia a nivel de haplotipos, polimorfismo ancestral compartido y posible evidencia de introgresión en los límites de la distribución de estas especies.

1.8. Objetivos

1. Estimar los niveles de variación genética y estructura filogeográfica de *Pinus strobiformis* y compararla con lo esperado bajo un escenario de expansión poblacional durante el Pleistoceno.
2. Identificar distintos patrones de flujo génico como aislamiento por distancia, dispersión a larga distancia, vicarianza e introgresión.

3. Hacer inferencias sobre la demografía histórica a partir de las relaciones genealógicas entre haplotipos, su distribución en el espacio y grado de similitud.
4. Establecer la relación entre *Pinus strobiformis* y las poblaciones cercanas de *Pinus ayacahuite*, e identificar posible reparto incompleto de linajes y/o introgresión.

**2. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis*
Engelm. across the Chihuahuan Desert filter barrier**



ORIGINAL
ARTICLE

Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier

Alejandra Moreno-Letelier* and Daniel Piñero

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico D.F., Mexico

ABSTRACT

Aim To explore the genetic and phylogeographic structure of a temperate forest species, *Pinus strobiformis* Engelm., in a subtropical region in the context of climate change during the Pleistocene. It is expected that the colder conditions during glacial stages favoured range expansions of *P. strobiformis*, thus promoting gene flow.

Location Mexico and the United States.

Methods Estimates of genetic diversity and structure were obtained using chloroplast microsatellite loci of 23 populations of *P. strobiformis* across its entire range, seven neighbouring populations of *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex. Schtdl, and one population of *Pinus flexilis* James.

Results The genetic diversity of *P. strobiformis* ($H_e = 0.856$) was found to be high, especially in western populations, whereas eastern populations were less variable and more genetically similar to *P. ayacahuite* of central Mexico. We found evidence of significant phylogeographic structure ($N_{ST} = 0.444$; $P = 0.026$), high genetic structure ($R_{ST} = 0.270$), and isolation by distance. Pairwise R_{ST} and SAMOVA (spatial analysis of molecular variance) results indicated an east–west partition of genetic variation, with populations within each group showing little differentiation and no isolation by distance.

Main conclusions The phylogeographic structure of *P. strobiformis* across the entire range was pronounced, with two main genetic and geographic groups separated by the Chihuahuan Desert. However, within each of the two groups there was little population differentiation and no isolation by distance, suggesting genetic connectivity as a result of population expansions within these areas during glacial stages.

Keywords

Genetic structure, isolation by distance, Mexico, microsatellites, phylogeography, *Pinus*, *Pinus strobiformis*, Pleistocene, USA.

*Correspondence: Alejandra Moreno-Letelier, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-275, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico D.F., Mexico. E-mail: amoreno@miranda.ecologia.unam.mx

INTRODUCTION

The impact of the Pleistocene glaciations on the genetic diversity and distribution of species in temperate zones has been the main focus of phylogeography, but comparatively little is known about the impact of glaciations in tropical and subtropical regions (Cruzan & Templeton, 2000; Hewitt, 2000; Emerson & Hewitt, 2005). In general, the patterns observed in animals and plants in higher latitudes include bottlenecks, loss

of variation, and isolation into lower-latitude refugia during glacial periods, followed by population expansions, rapid colonization and gene flow during interglacials (Hewitt, 2000, 2001; Petit *et al.*, 2003; Emerson & Hewitt, 2005). The effects of glaciations in the tropics were less drastic and more heterogeneous, because climate is affected not only by latitude but also by altitude and exposure, and tropical and subtropical regions with a varied topography can harbour temperate climates with temperate biota that would have responded

rather differently to glacial period climates than the tropical species in the same region (Metcalfe *et al.*, 2000; Velázquez *et al.*, 2000). In Mexico, an average decrease in temperature of 6°C has been reported for the Last Glacial Maximum (LGM), together with increased precipitation in some areas (Bradbury, 1997; Metcalfe, 2006) and a snowline depression of 1300 m (Lachniet & Vázquez-Selem, 2005; Lozano-García & Vázquez-Selem, 2005; Mark *et al.*, 2005). These changes produced a downward altitudinal migration and broader distributions of montane plant communities that have been documented in palaeobotanic records (Van Devender, 1990a,b; Lozano-García *et al.*, 2002; Metcalfe *et al.*, 2002; Piperno *et al.*, 2007). In particular, northern Mexico and the south-western United States were colder and moister during the Wisconsin glacial period, which allowed many conifer species to have broader distributions than they do today (Van Devender, 1990a,b; Bradbury, 1997; Metcalfe *et al.*, 2002; Lozano-García *et al.*, 2005). For example, fossil pollen records from the LGM suggest a much wider distribution of montane *Picea chihuahuana* throughout northern and central Mexico (Metcalfe *et al.*, 2002; Lozano-García *et al.*, 2005), and genetic data indicate a lack of phylogeographic structure and high pollen-mediated gene flow (Jaramillo-Correa *et al.*, 2006). This suggests that the expected pattern for temperate species in the tropics may have been the opposite from that observed in higher latitudes: population and range expansions with gene flow during glacial periods, and bottlenecks and isolation in high-elevation refugia during interglacials.

Pinus strobiformis Engelm. (southwestern white pine, Chihuahuan white pine, cahuite), subgenus *Strobus*, section *Quinquefoliae* (Gernandt *et al.*, 2005) has a wide but scattered distribution restricted to very specific environmental conditions: high-elevation (2000–3200 m) mixed conifer forests in temperate and humid areas of northern Mexico and the south-western United States (Perry, 1991; Farjon & Styles, 1997). It forms a species complex with two geographically adjacent, but non-sympatric, species, namely *Pinus flexilis* James and *Pinus ayacahuite* Ehrenb. (Perry, 1991; Farjon & Styles, 1997; Price *et al.*, 1998; Syring *et al.*, 2007). Its temperate affinity, tolerance to frost (USDA hardiness zone 6) and discontinuous but wide distribution (Perry, 1991; Musálem & Ramírez Luis, 2003) make *P. strobiformis* a good model with which to study the effect of climate changes on the genetic composition of temperate flora in the subtropics.

We used chloroplast microsatellites and phylogeographic methods to test our main hypothesis: *P. strobiformis* was favoured by the colder climate during the Pleistocene glacial stages. Thus, *P. strobiformis* is expected to have had larger population sizes and a wider distribution range, which could have permitted contact between currently isolated populations, allowing gene flow and the maintenance of high levels of genetic diversity. In the absence of geographic barriers, these differences in distribution would be reflected in low levels of population differentiation and genetic structure and in the absence of isolation by distance.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and DNA extraction

Needles from a total of 431 trees were collected. The individuals came from 23 populations of *P. strobiformis* distributed across its entire native range (Fig. 1 and Table 1). As *P. strobiformis* is very closely related to *P. ayacahuite* and *P. flexilis* (Perry, 1991; Farjon & Styles, 1997; Musálem & Ramírez Luis, 2003), 75 individuals from seven populations of *P. ayacahuite* and six from one population of *P. flexilis* were included to take into account the possibility of shared ancestral polymorphisms or introgression, by measuring the degree of genetic differentiation among taxa and the number of shared haplotypes. DNA extraction was performed using a modified miniprep cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) protocol (Doyle & Doyle, 1987), and 12 microsatellite loci (cpSSRs) described for *Pinus thunbergii* were amplified (Vendramin *et al.*, 1996), of which three were polymorphic: Pt71936, Pt63718, and Pt30204. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed in 25 µL of total volume with 0.2 mM of each dNTP, 2.5 mM of MgCl₂, 0.2 µM of each primer, 20 mM of Tris-HCl 10× buffer, 25 ng of sample DNA, and 1 U of *Taq* polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplification was carried out on a MJ Research thermocycler with a hot-start of 5 min at 95°C, and 25 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 55°C, and 1 min extension at 72°C. The final extension was for 8 min at 72°C. The PCR products were visualized in 6% polyacrylamide gels dyed with silver nitrate (Elsik *et al.*, 2000). Band sizes were scored using a 10-bp molecular size ladder (Invitrogen). Three individuals for each of the different alleles from each locus were sequenced to assess the exact size and repeat number. To increase the possibility of detecting molecularly accessible size homoplasy (MASH; Culver *et al.*, 2001; Estoup *et al.*, 2002) in the compound microsatellite locus Pt30204, additional copies from each of the size alleles were sequenced for a total of 86 sequences. The sequencing scheme was as follows. Ten per cent to 30% of individuals were chosen at random for each of the most common alleles and sequenced. When additional haplotypes were found, all individuals with the same haplotype in that population were also sequenced. PCRs for subsequent sequencing were performed as described above but using *Pfu* polymerase (Biotools, Madrid, Spain) to avoid strand-slippage. The PCR products were purified from agarose gels using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sequencing reactions were performed using BigDye 3.1 (Applied Biosystems, Warrington, WA, USA) and were run in an Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer sequencer (Foster City, CA, USA). Sequences for each locus were aligned manually using SeAl ver. 2.011 (Rambaut, 1996).

Gene diversity and homoplasy

The allele combinations of the three loci produced the haplotypes that were used in further tests. Haplotypes were

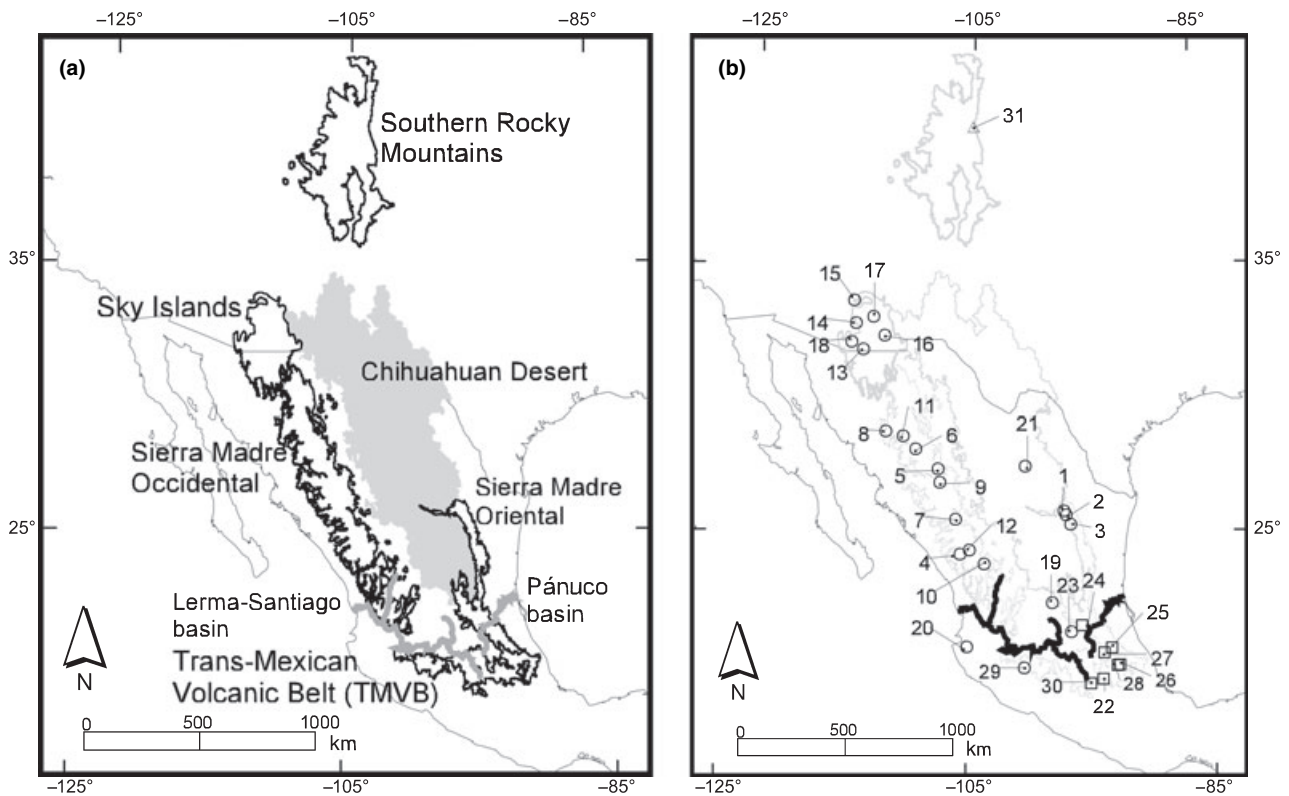


Figure 1 Geographical areas included in the range of *Pinus strobiformis* and sampled populations (Mollweide projection): (a) major regions and potential geographical barriers; (b) sampled populations, where circles represent *P. strobiformis* (Engelm.), squares represent *Pinus ayacahuite* (Ehrens.) and the triangle represents *Pinus flexilis* (James). The numbers correspond to populations in Table 1 and in the text.

inferred using the size alleles or electromorphs and the alleles from sequencing the three loci. We assumed that, despite sequencing, some homoplasy still existed in different haplotype sequences of the same fragment length. If not corrected, this would affect the estimates of diversity and genetic structure (Provan, 2001). The index of homoplasy is the probability that two gene copies of the same state haplotypes observed as identical are not identical by descent; thus, this index can be estimated as the ratio between the infinite allele mutation model (IAM) homozygosity with no homoplasy and the stepwise mutation model (SMM) homozygosity, which includes size homoplasy (Estoup *et al.*, 2002). Based on this definition, Navascués & Emerson (2005) used a homoplasy index based on heterozygosity:

$$H = 1 - \left(\frac{1 - H_{eSEQ}}{1 - H_{eSIZE}} \right),$$

where H_{eSEQ} can be considered as the genetic variation of the haplotypes corrected for MASH, and H_{eSIZE} , the genetic variation based on size electromorphs. Two measures of genetic diversity were estimated using ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005): Nei's genetic variation (H_e) for both data sets and the parameter θ under two models of mutation, IAM and SMM only for the data corrected for MASH. As $\theta = 2N_e\mu$ for haploid genomes, where N_e is the effective population size and μ the mutation rate, it can also shed light

on population history (Excoffier *et al.*, 2005). A haplotype network was constructed using the absolute distance among sequence-based haplotypes using rcs ver. 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Loops in the network were resolved according to the guidelines in Pfenniger & Posada (2002).

Phylogeographic and genetic structure

Phylogeographic structure was measured with N_{ST} , a parameter that estimates genetic structure taking into account the phylogenetic distance among haplotypes (Hardy & Vekemans, 2002). A significant N_{ST} value compared with a simulated N_{ST} obtained via permutations would mean that closely related haplotypes are located in nearby populations (Heuertz *et al.*, 2006). The distance matrix among haplotypes was calculated with

$$D_{SH}^2(ij) = \frac{1}{k} \left[\sum_{k=1}^K |a_{ik} - a_{jk}| \right]^2,$$

where a_{ik} and a_{jk} are the microsatellite lengths in base pairs of alleles i and j of the k locus (Goldstein & Pollock, 1997; Heuertz *et al.*, 2006), and the permutation test of N_{ST} was performed with SPAGeDi ver. 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002). Overall genetic structure (R_{ST}) was estimated for all the populations and for each species for both data sets. The rest of the analyses were performed with the haplotypes corrected

Table 1 List of populations and genetic diversity values obtained from chloroplast microsatellites (cpSSRs).

Label	<i>n</i>	Population	W longitude, N latitude	Species	SAMOVA group	H_{eSEQ} (SD)	θ_{SMM}	θ_{IAM}
1	20	Los Lirios	-100.537, 25.376	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Oriental	0.563 (0.063)	2.120	0.966
2	20	Monterreal	-100.442, 25.231	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Oriental	0.521 (0.042)	1.680	0.813
3	20	Cerro del Potosí	-100.222, 24.888	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Oriental	0.647 (0.057)	3.521	1.389
4	20	El Salto	-105.378, 23.776	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.853 (0.061)	22.523	4.742
5	20	Guachochi-Balleza	-106.501, 26.942	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.442 (0.133)	1.106	0.591
6	20	Laguna Arareko	-107.584, 27.689	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.895 (0.043)	44.625	7.239
7	17	Santiago Papasquiaro	-105.620, 25.075	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.728 (0.114)	6.255	2.062
8	20	Yécora	-109.027, 28.360	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.842 (0.039)	19.556	4.338
9	20	El Vergel	-106.388, 26.439	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.805 (0.070)	12.685	3.287
10	20	La Michilía	-104.246, 23.416	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.921 (0.033)	79.722	10.246
11	20	Basaseachic	-108.202, 28.166	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.700 (0.109)	5.056	1.784
12	19	Mimbres	-104.949, 23.922	<i>Pinus strobiformis</i>	SM Occidental	0.813 (0.043)	13.778	3.467
13	19	Huachuca	-110.299, 31.420	<i>Pinus strobiformis</i>	Sky Islands	0.737 (0.083)	6.720	2.163
14	20	Santa Catalina	-110.709, 32.410	<i>Pinus strobiformis</i>	Sky Islands	0.742 (0.058)	7.018	2.227
15	20	Pinal	-110.851, 33.289	<i>Pinus strobiformis</i>	Sky Islands	0.484 (0.113)	1.379	0.700
16	20	Chiricahua	-109.275, 31.935	<i>Pinus strobiformis</i>	Sky Islands	0.847 (0.051)	20.963	4.532
17	20	Graham	-109.866, 32.653	<i>Pinus strobiformis</i>	Sky Islands	0.616 (0.067)	2.887	1.208
18	20	Santa Rita	-110.866, 31.699	<i>Pinus strobiformis</i>	Sky Islands	0.726 (0.062)	6.175	2.044
19	20	San Luis Potosí	-101.073, 21.994	<i>Pinus strobiformis</i>	Isolated	0.711 (0.085)	5.467	1.882
20	20	El Cuale	-104.992, 20.371	<i>Pinus strobiformis</i>	Isolated	0.842 (0.059)	19.556	4.337
21	7	Sierra de la Madera	-102.381, 27.035	<i>Pinus strobiformis</i>	Isolated	0.762 (0.115)	8.320	2.494
22	17	San Rafael	-98.736, 19.210	<i>Pinus ayacahuite</i>	TMVB	0.485 (0.079)	1.387	0.703
23	9	Zamorano	-100.185, 20.929	<i>Pinus strobiformis</i>	TMVB	0.0	0.0	0.0
24	10	Pingiica	-99.701, 21.169	<i>Pinus ayacahuite</i>	TMVB	0.356 (0.159)	0.704	0.411
25	11	Agua Blanca	-98.352, 20.353	<i>Pinus ayacahuite</i>	TMVB	0.764 (0.107)	8.450	2.520
26	10	Chichicaxtla	-97.982, 19.738	<i>Pinus ayacahuite</i>	TMVB	0.867 (0.085)	27.625	5.389
27	10	Pueblo Nuevo	-98.694, 20.179	<i>Pinus ayacahuite</i>	TMVB	0.0	0.0	0.0
28	10	Ciénega Larga	-98.084, 19.714	<i>Pinus ayacahuite</i>	TMVB	0.533 (0.180)	1.796	0.855
29	20	La Palma	-102.339, 19.608	<i>Pinus strobiformis</i>	TMVB	0.195 (0.115)	0.271	0.180
30	7	Zempoala	-99.315, 19.048	<i>Pinus ayacahuite</i>	TMVB	0.571 (0.119)	2.222	1.000
31	6	Boulder	-105.303, 39.986	<i>Pinus flexilis</i>	Rocky Mountains	0.600 (0.215)	2.625	1.128

SAMOVA (spatial analysis of molecular variance) groups are shown in Fig. 2; H_{eSEQ} is the genetic diversity of data corrected for molecularly accessible size homoplasy (standard deviation in parentheses); SMM and IAM correspond to the mutation models under which θ was estimated (see text).

for MASH. Two hypotheses of genetic differentiation were tested using an analysis of molecular variance (AMOVA): grouping populations according to their taxonomic classification (*P. strobiformis*, *P. ayacahuite* and *P. flexilis*) and grouping populations in a way that maximizes the genetic differentiation between groups of populations. The latter groups were defined using spatial analysis of molecular variance (SAMOVA) ver. 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002), which simulates different partitions of *n* populations into *K* groups and retains the partition with the highest F_{CT} value (i.e. the proportion of genetic variation among groups). This software also identifies zones of high genetic discontinuity that may correspond to geographic barriers. Values of *K* from 2 to 10 were tested, and the number of groups with the highest F_{CT} value was used in the AMOVA. Pairwise R_{ST} values were estimated for the geographical areas defined by geologic and floristic criteria, plus for the isolated populations of El Cuale (20), Sierra de la Madera (21) and San Luis Potosí (19) (regions and locality numbers after Fig. 1 and Table 1). Furthermore, the effective number of migrants (*Nm*) was obtained indirectly from R_{ST} for each pair of geographical areas. The AMOVA and population differenti-

ation analyses were conducted using ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). As the previously mentioned populations do not belong to the main geographical areas, genetic assignment was performed on the individuals using GENECLASS 2.0, to place them in either of the groups obtained by SAMOVA and thus test for secondary contact (Piry *et al.*, 2004).

To detect geographical association of genetic variation we used a Mantel test between a genetic distance matrix and a geographical distance matrix. The genetic distance matrix was based on Goldstein's $\delta\mu^2$, which takes into account the repeat size of microsatellites (Goldstein & Pollock, 1997). Both the genetic and geographical distance matrices were calculated with SPAGED1 ver. 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002). The Mantel test was performed in ARLEQUIN ver. 3.1 with 10,000 permutations.

RESULTS

Genetic diversity and homoplasy

A total of 29 haplotypes were found from electromorphs, and 34 after sequencing. Loci Pt63718 and Pt71936 were simple

microsatellites with structure A(11) and A(14), respectively, for the most common allele. The locus Pt30204 was a compound microsatellite with the following structure: A(14) GGTTTGG A(10) G(10) for the most common allele. The sequences for the three loci of each haplotype were submitted to GenBank (accessions EU165603–EU165704). All mononucleotide repeats of locus Pt30204 were variable and therefore each repeat was considered as an independent locus. The frequencies and locations of the sequence-based haplotypes, together with the haplotype network, are shown in Fig. 2 (and see Table S1 in the Supporting Information). The genetic variation of the entire sample was $H_{eSEQ} = 0.858$ and $H_{eSIZE} = 0.852$, and the homoplasy index was $H = 0.038$,

equivalent to 3.8% of molecularly accessible homoplasy in the entire sample. The genetic diversity for *P. strobiformis* was $H_{eSEQ} = 0.856$ ($\theta_{SMM} = 23.622$; $\theta_{IAM} = 4.88$) and for the sample of *P. ayacahuite* was $H_{eSEQ} = 0.557$ ($\theta_{SMM} = 2.05$; $\theta_{IAM} = 0.944$). Haplotypes were closely related to each other, with only one mutational step separating them in the network (Fig. 2b), and seven haplotypes were shared between both species. Samples of *P. strobiformis* included 29 haplotypes, 22 (75.9%) of which were species-specific, compared with three (30%) out of 10 for *P. ayacahuite* (Fig. 2a). The genetic variation of each population and the θ values are shown in Table 1. Most of the variation was found in populations of the Sierra Madre Occidental, with a few exceptions such as El

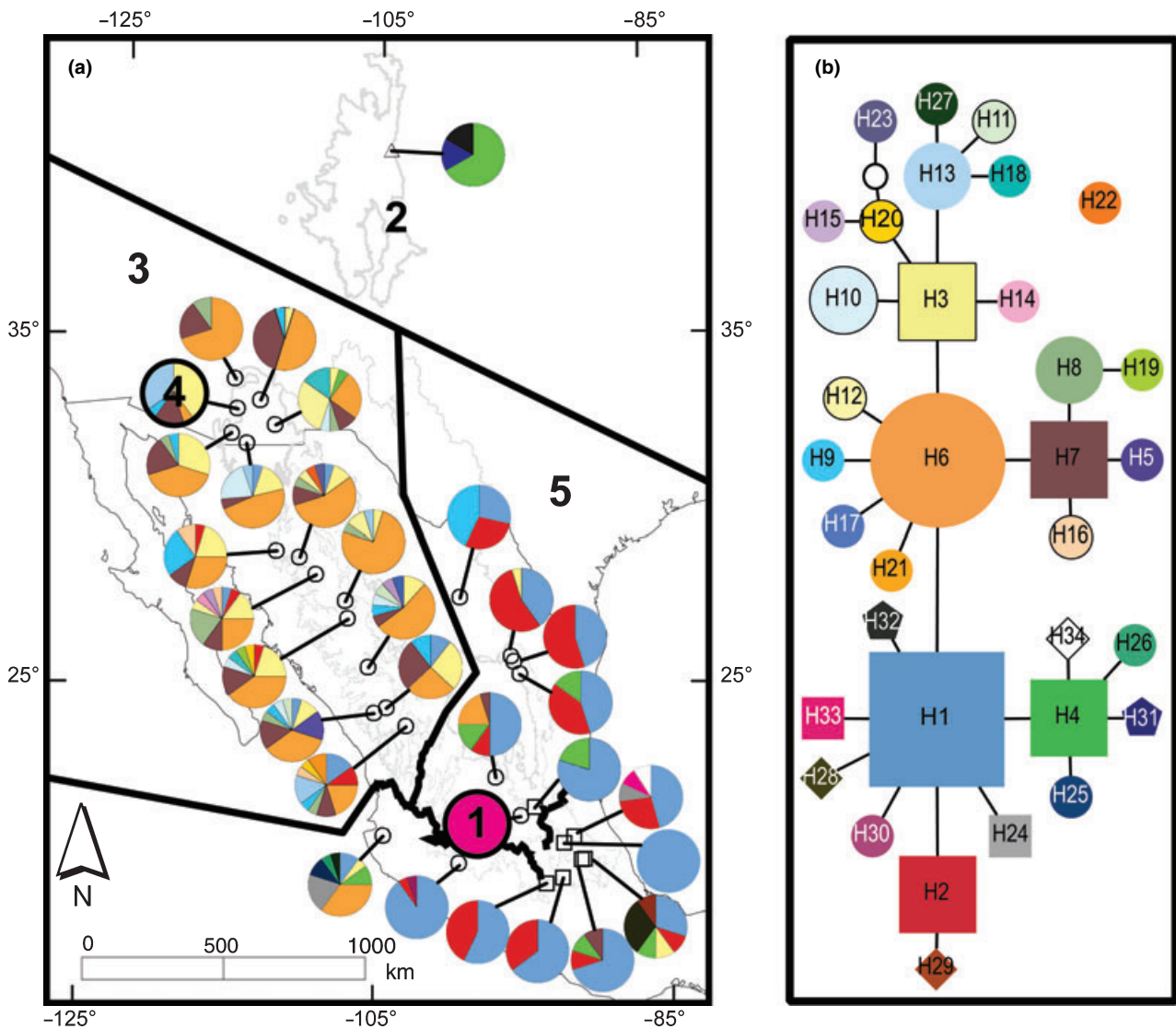


Figure 2 (a) Distribution of haplotypes in *Pinus strobiformis* and selected populations of *Pinus flexilis* and *Pinus ayacahuite* (Mollweide projection), indicating the frequency distribution of haplotypes in each population and SAMOVA (spatial analysis of molecular variance) groups delimited by black lines: 1, Zamorano; 2, Boulder (*P. flexilis*); 3, West (*P. strobiformis*); 4, Santa Rita; and 5, East. (b) Haplotype network indicating hypothesized relationships among haplotypes. Circles correspond to haplotypes exclusive to *P. strobiformis*, diamonds to *P. ayacahuite*, and pentagons to *P. flexilis*; shared haplotypes are shown in squares. The size of each symbol indicates the relative frequency of each haplotype. Colour-coding of the haplotypes in the network is the same as in (a).

Cuale (20) and Chichicaxtla (26). Low variation was found in populations of *P. strobiformis* at the edge of its distribution range: for example, Pinal (15) and Graham (17) at the northern limit, and Zamorano (23) and La Palma (29) at the southern limit.

Phylogeographic and genetic structure

The permutation test of phylogeographic structure was statistically significant ($P = 0.026$), with $N_{ST} = 0.444 > N_{ST(Permutated)} = 0.268$, indicating that closely related haplotypes were found in nearby populations (Fig. 2). The overall genetic structure was significantly different from zero ($P < 0.05$), with $R_{ST(SEQ)} = 0.316$ and $R_{ST(SIZE)} = 0.324$. For *P. strobiformis* alone $R_{ST(SEQ)} = 0.270$ and for *P. ayacahuite*, $R_{ST(SEQ)} = 0.096$. The SAMOVA results yielded an optimum of five groups: **Group 1:** Zamorano (23); **Group 2:** Boulder (31; the outgroup, *P. flexilis*); **Group 3:** El Salto (4), Guachochi-Balleza (5), Laguna Arareko (6), Santiago Papasquiario (7), Yécora (8), El Vergel (9), La Michilía (10), Basaseachic (11), Mimbres (12), Huachuca (13), Santa Catalina (14), Pinal (15), Chiricahua (16) and Graham (17); **Group 4:** Santa Rita (18); and **Group 5:** Los Lirios (1), Monterreal (2), Cerro Potosí (3), San Luis Potosí (19), El Cuale (20), Sierra de la Madera (21), San Rafael (22), Pingüica (24), Agua Blanca (25), Chichicaxtla (26), Pueblo Nuevo (27), Ciénega Larga (28), La Palma (29) and Zempoala (30). Group 3 contains most of the western populations (Sierra Madre Occidental and isolated mountains of the south-western United States, collectively called Sky Islands in Fig. 1a), and Group 5 contains the eastern populations (Sierra Madre Oriental) and most populations from the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB). Several zones of high genetic discontinuity were identified: the main one separates *P. flexilis* from the rest of the populations, and a second divides the populations in an east–west manner along the natural barrier of the Chihuahuan Desert and the Lerma-Santiago basin (Figs 1a & 2a). Remaining zones of high genetic discontinuity separate the population of Santa Rita (18) in the Sky Islands and Zamorano (23) in the TMVB.

The F_{CT} value obtained from the SAMOVA was $F_{CT(SAMOVA)} = 0.385$, and it was $F_{CT(taxonomy)} = 0.223$ based on species grouping, indicating that populations within the same

geographic area have a greater affinity to each other than populations of the same species, and suggesting a stronger geographic than taxonomic structure. This taxonomic inconsistency is mainly because some populations of *P. strobiformis* group with *P. ayacahuite* (Sierra Madre Oriental [1, 2, 3], El Cuale [20], Sierra de la Madera [21], San Luis Potosí [19] and La Palma [29]). Pairwise R_{ST} and N_m values show significant genetic structure among the main areas, except for the Sky Islands and the Sierra Madre Occidental, between El Cuale (20) and San Luis Potosí (19), and between Sierra de la Madera (21) and the Sky Islands (Table 2). The geographically intermediate populations of El Cuale (20), Sierra de la Madera (21) and San Luis Potosí (19) show lower but still significant differentiation from neighbouring regions and N_m -values > 2 (Table 2). The results of the genetic assignment test show that several individuals of the isolated populations belong with high probability to either of the main groups defined by the SAMOVA (West and East), but some individual haplotypes have higher probabilities to have arisen *in situ* (Fig. 3). Those individuals have haplotypes that are private; that is, they are found only in one population (e.g. haplotypes H25, H26 and H27 from El Cuale [20]; Fig. 2).

Pinus strobiformis and *P. ayacahuite* were significantly different from each other, with $R_{ST} = 0.221$ ($P < 0.05$) between the species. However, the estimated N_m between *P. strobiformis* and *P. ayacahuite* was 1.76, which could indicate either incomplete lineage sorting of ancestral polymorphisms or historical gene flow.

East–west structure is also suggested by the Mantel test, with a significant correlation between genetic and geographic distance (Fig. 4). The same test performed using just the West or East populations showed no correlation (East: $r = -0.001$, $P = 0.407$; West: $r = -0.0005$, $P = 0.514$).

DISCUSSION

Genetic diversity and homoplasy

The genetic diversity of *P. strobiformis* is comparable to that of other pines with large but scattered distributions, such as *Pinus pinaster* Ait. ($H_e = 0.812$) and *Pinus albicaulis* Engelm. ($H_e = 0.907$; Vendramin *et al.*, 1998; Richardson *et al.*,

Table 2 Pairwise R_{ST} (and N_m) values between geographical regions.

	a	b	c	d	e	f	g
a. Sky Islands							
b. SM Occidental	0.001 (355.5)						
c. SM Oriental	0.410 (0.717)	0.395 (0.766)					
d. TMVB	0.432 (0.658)	0.392 (0.775)	0.149 (2.857)				
e. El Cuale	0.206 (1.929)	0.172 (2.404)	0.319 (1.069)	0.221 (1.763)			
f. Sierra de la Madera	0.145 (2.956)	0.151 (2.819)	0.280 (1.285)	0.314 (1.091)	0.183 (2.228)		
g. San Luis Potosí	0.242 (1.567)	0.203 (1.959)	0.302 (1.157)	0.112 (3.944)	0.019 (25.24)	0.180 (2.276)	
h. Boulder	0.514 (0.472)	0.469 (0.567)	0.737 (0.183)	0.603 (0.328)	0.321 (1.058)	0.547 (0.414)	0.433 (0.654)

Significant R_{ST} ($P < 0.05$) values are shown in bold. $R_{ST(P. strobiformis)} = 0.270$ ($P < 0.05$); $R_{ST(P. ayacahuite)} = 0.096$ ($P < 0.05$).

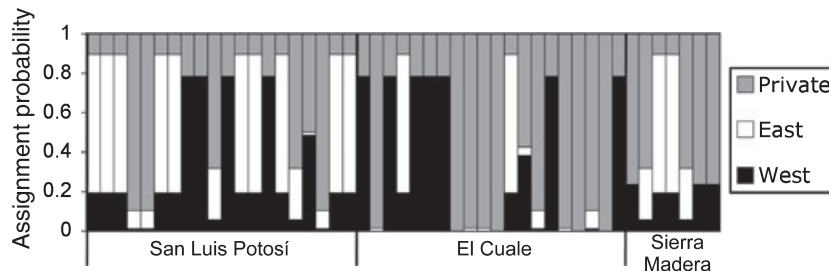


Figure 3 Assignment probabilities for each individual (haplotype) to the major genetic groups obtained by SAMOVA (spatial analysis of molecular variance) (West or East) and private haplotypes (restricted to single populations). Fine lines separate individuals and bold lines separate populations. Computations were carried out considering haplotypes as one locus and with a Bayesian criterion and 100,000 simulations.

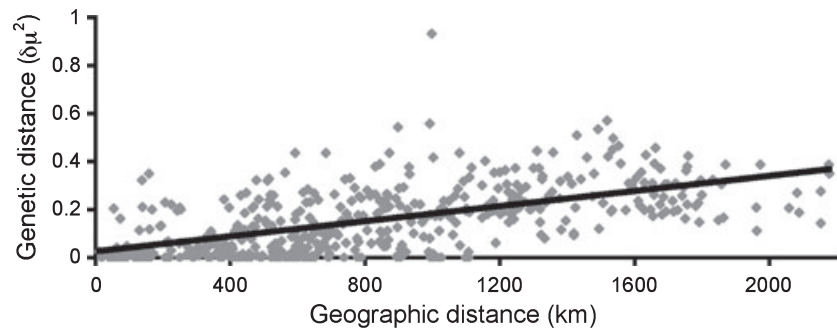


Figure 4 Relationship between geographical and genetic distance (Mantel test results, $r = 0.593$, $P < 0.05$ with 10,000 permutations). The notable outlier is a comparison between Boulder (31; *Pinus flexilis*) and Santa Rita (18; an isolated population); see text.

2002), but higher than the values reported for more thermophilic Mexican pines, such as *Pinus montezumae* Lamb. ($H_e = 0.409$), *Pinus pseudostrobus* Lindl. ($H_e = 0.419$) and *Pinus nelsonii* Shaw ($H_e = 0.64$; Cuenca *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2007). Both H_e and θ are very high in populations from the Sierra Madre Occidental and some of the Sky Islands (Table 1), although local abundance at each location is low. As θ incorporates N_e (Excoffier *et al.*, 2005), a high value in some localities might further indicate high historical population sizes, and that populations of the Sierra Madre Occidental have served as a reservoir of genetic diversity throughout climate oscillations. A similar pattern was observed in cold-tolerant *Pinus sylvestris* L. from the Iberian Peninsula, which formed vast woodlands during the glacial stages and maintained high levels of genetic diversity, in contrast to more thermophilic pine species that were severely restricted (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2005). The haplotype network showed that most haplotypes were one mutational step away from each other with no large genetic discontinuities (Fig. 2b). The exception was haplotype H22 found in Basaseachic (11), which lacked an entire repeat in locus Pt30204 and could not be connected to any other haplotype in the network. The rest of the haplotypes were closely related, indicating that *P. ayacahuite* and *P. strobiformis* have diverged recently. The observation of both ancestral and derived shared haplotypes suggests incomplete lineage sorting and introgression (Matos & Schaal, 2000; Gutiérrez-Larena *et al.*, 2002; Syring *et al.*, 2007).

Size homoplasy across the entire sample is low, which agrees with simulation studies (Navascués & Emerson, 2005;

Navascués *et al.*, 2006). The main effects of homoplasy are the underestimation of genetic variation and genetic structure and an overestimation of gene flow (Provan, 2001). It is unlikely that this was the case because both $R_{ST(SEQ)}$ and $R_{ST(SIZE)}$ estimates were similar and significantly different from zero, suggesting a genetic structure sufficiently strong to be recovered using electromorph data.

Phylogeographic and genetic structure

Our analyses support the existence of two major phylogeographic groups: one that includes haplotypes found mostly in *P. ayacahuite* and a few nearby populations of *P. strobiformis* (East), and another comprising almost exclusively haplotypes from *P. strobiformis* (West). Unlike what was expected under a scenario of glacial population admixture between populations from the Sierra Madre Occidental and the Sierra Madre Oriental, phylogeographic and genetic structure between populations of *P. strobiformis* was high and significant. The high R_{ST} resulted from the difference in haplotype frequencies, with H3 and H6 more abundant in *P. strobiformis* from western populations and H1 and H2 more abundant in eastern populations and shared with *P. ayacahuite*. AMOVA results show a higher percentage of diversity between geographic groups than between species, with populations within a given group (3-West and 5-East, Fig. 2a) being more similar to each other than populations from the same species. This east–west structure is also evident in the pairwise R_{ST} values among geographical regions. The western part of the range that

includes the Sky Islands and the Sierra Madre Occidental is not differentiated and shows evidence of gene flow, whereas the populations of the Sierra Madre Oriental are practically isolated. These latter populations have higher N_m values with the TMVB than with any other region, and thus are assigned to group 5 in the SAMOVA.

Genetic continuity of the populations of the Sky Islands with those of the Sierra Madre Occidental (3-West) is concordant with floristic analyses that show a higher affinity between the floras of these two regions than between the Sky Islands and the Southern Rocky Mountains (Peet, 2000). In fact, members of the current Sky Islands flora such as *P. strobiformis* are believed to have originated from a northward migration of madrean elements following glacial retreat (Peet, 2000), replacing conifer species from the Rocky Mountains that had their glacial refugia in the south-western United States, such as *Pinus ponderosa* Dougl. Ex. Laws., *Pinus flexilis* and *Pinus contorta* Dougl. Ex. Loud. (Latta & Mitton, 1999; Mitton *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2002). The population of Santa Rita (18) seems an exception to the pattern of genetic continuity, as it was assigned to a different group by the SAMOVA (Fig. 2a), mainly as a result of the high frequency of haplotype H13. This could be a product of a founder effect followed by genetic drift during a recolonization of the Sky Islands by *P. strobiformis* replacing *P. flexilis*.

The north-south migrations together with the altitudinal shifts and population expansions would have resulted in a lack of genetic differentiation in *P. strobiformis* from the Sierra Madre Occidental and the Sky Islands, as shown in our study. A similar pattern of low genetic differentiation and no isolation by distance was found in *Picea chihuahuana* in the Sierra Madre Occidental (for cpSSRs; Jaramillo-Correa *et al.*, 2006) and in a galling insect, *Daktulosphaira vitifoliae*, from the Sky Islands (Downie, 2004); in each case it was attributed to population expansions during glacial periods. The observed decrease of genetic diversity from south to north could indicate the recent colonization of the populations at the northern distributional limit (Petit *et al.*, 2003).

The other group (5-East) includes populations of *P. strobiformis* and *P. ayacahuite* from two geographical regions (Sierra Madre Oriental and TMVB), indicating the lack of genetic barriers even across such a wide geographical range (Fig. 2a). Moreover, the distribution of genetic diversity does not follow taxonomic divisions. A similar pattern was found in the *Quercus affinis*-*Quercus laurina* complex from the TMVB and Sierra Madre Oriental, with two genetically distant but widespread haplotypes and no taxonomic association, suggesting frequent intermixing of populations during glacial periods (González-Rodríguez *et al.*, 2004). The lack of taxonomic structure within group 5-East could be the result of introgression, of shared ancestral polymorphisms between *P. strobiformis* and *P. ayacahuite*, or of a combination of both (Bulgin *et al.*, 2003). Theoretically, it is expected that ancestral polymorphism is represented by frequent and internal haplotypes that have more connections to other haplotypes and are geographically widespread, whereas the presence of shared-

derived haplotypes is more likely to be the result of gene flow (Matos & Schaal, 2000; Gutiérrez-Larena *et al.*, 2002). Haplotypes H1, H2, H3 and H4 could be shared ancestral alleles because they are found in different populations of all geographical regions (Fig. 2), and also in the closely related *P. flexilis*. There is also evidence of interspecific gene flow: El Cuale (20) and Agua Blanca (25) share H24, whereas Zamorano (23) and Agua Blanca (25) share H33, which are both derived haplotypes (Fig. 2b). Thus, both introgression and shared ancestral polymorphism can explain why $F_{CT(SAMOVA)}$ is higher than $F_{CT(taxonomy)}$. The population of Zamorano was placed in a group of its own (Fig. 2a) because it is monomorphic for the rare haplotype H33. The extreme isolation of this population could be the result of environmental factors, as Zamorano is found on an isolated mountain with a climate that is drier and colder than those of the other populations of the TMVB (Pérez de la Rosa, 1993). The harsher climatic conditions would allow *P. strobiformis* to survive, but would limit introgression with *P. ayacahuite*, which prefers a milder climate (Musálem & Ramírez Luis, 2003).

Considering the scattered distribution of *P. strobiformis* and the fact that many populations are geographically isolated (i.e. Sky Islands, Sierra Madre Oriental, El Cuale [20], San Luis Potosí [19], Sierra de la Madera [21]), we attribute the evidence of gene flow among geographical areas to historical rather than to recent events. Most of the gene flow is observed among the isolated populations of El Cuale (20), Sierra de la Madera (21) and San Luis Potosí (19; Table 2); these populations can be seen as stepping stones between the main geographical and genetic groups, as was evident by the genetic assignment test (Fig. 3). The genetic composition of these populations may be regarded as resulting from secondary contact owing to its high diversity and the presence of haplotypes from both groups (Figs 2 & 3; Latta & Mitton, 1999; Walter & Epperson, 2001; Gutiérrez-Larena *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2003). Furthermore, in the population of San Luis Potosí (19), there is morphological evidence that suggests introgression with *P. ayacahuite* (Pérez de la Rosa, 1993). The inferred long-distance gene flow between Sierra de la Madera (21) and the Sky Islands ($N_m = 2.96$; Table 2) can be explained by palynological evidence of mixed conifer forests at lower elevations in the mountains, as well as by a juniper-pine woodland in the Chihuahuan Desert during the last glacial stage, which could have served as stepping stones for pollen dispersal of *P. strobiformis* (Metcalfé *et al.*, 2000, 2002; Peet, 2000). Despite the strong east-west structure arising from the filter-barrier of the Chihuahuan Desert, populations appear to have maintained limited genetic connectivity through island-like populations across the desert.

The geographical structure indicated by pairwise R_{ST} and SAMOVA results is also evident in the significant results of the Mantel test that suggest isolation by distance of the whole sample and across the different regions (Fig. 4). However, within the West group, it seems that gene flow has been frequent and widespread, with no isolation by distance in the Sierra Madre Occidental and the Sky Islands, even across the

1200 km separating some pairs of populations. The same pattern is observed in the East group, with no clear association between distance and genetic differentiation. This result reinforces the notion of past genetic connectivity among populations within the main geographic groups, owing to past distributional changes and range expansions of temperate flora (Metcalf *et al.*, 2000; Jaramillo-Correa *et al.*, 2006; Metcalfe, 2006).

CONCLUSIONS

The phylogeographic pattern observed in *P. strobiformis* is complex. The overall phylogeographic structure of *P. strobiformis* is pronounced, with two clearly differentiated geographic groups and isolation by distance, unlike what was expected under the scenario of extensive gene flow during the Pleistocene. However, each of the two main groups are characterized by low genetic differentiation among populations and no isolation by distance, consistent with our hypothesis of glacial conditions favouring range expansion and past contact between populations of *P. strobiformis*. The Sierra Madre Occidental (West group) harbours most of the genetic diversity and could have sustained larger populations in its high, north–south-distributed plateaus. *Pinus strobiformis* prefers a cool and moist climate and can withstand harsh winters, and the temperature decrease and precipitation increase during glacial stages would have increased habitat availability. In contrast, the abrupt topography of the Sierra Madre Oriental may have resulted in a patchier distribution of suitable microhabitat for *P. strobiformis* during glacial stages, and may account for current differences in genetic variation among populations from the mountain ranges. Moreover, there is no evidence that the more moist LGM conditions inferred for the Sierra Madre Occidental and Chihuahuan Desert extended east into the Sierra Madre Oriental.

In summary, climate changes may be expected to affect the genetic composition of species, depending on their ecological affinities and the characteristics of their distribution ranges, with some species being favoured during glacial periods and others during interglacials. *Pinus strobiformis* was mainly favoured by the colder climate during the LGM, with the Chihuahuan Desert being the main barrier to genetic communication. This barrier has been crossed only occasionally, possibly during especially cold glaciations, but has separated the two main genetic groups, which have similar but independent histories.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was funded by CONACYT, grant number 0201/A1 to D.P. and 173276 to A.M.L. We thank Phil Evans, Judith Becerra, Chris Wanner, Rodolfo Salas-Lizana, David Gernandt, Ana Wegier, Alejandra Vázquez-Lobo, Dieter Wimberger, Lev Jardón, Miroslava Rentería, Patricia Delgado, Erika Mendoza, Marco Gámez, Victor Manuel Castillo, Armando Barbosa, Julian Barbosa (Ejido El Oso) and Jose Villanueva for their

help during sample collection. Thanks to Alejandra Vázquez-Lobo, Miroslava Rentería and Gretel Geada-López for their assistance in laboratory work and to Enrique Scheinvar and Niza Gámez for their help with the maps. We also thank Luis Eguiarte, Socorro Lozano-García, David Gernandt, Lev Jardón, Nadia Santini and Alejandra Ortíz for their comments. Thanks to David Hafner and two anonymous referees for their suggestions for improving this manuscript. This work is part of the PhD in Biomedical Sciences of A.M.L.

REFERENCES

- Bradbury, J.P. (1997) Sources of glacial moisture in Mesoamerica. *Quaternary International*, **43–44**, 97–110.
- Bulgin, N.L., Gibbs, H.L., Vickery, P. & Baker, A.J. (2003) Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). *Molecular Ecology*, **12**, 831–844.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657–1660.
- Cruzan, M.B. & Templeton, A.R. (2000) Paleoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 491–496.
- Cuenca, A., Escalante, A. & Piñero, D. (2003) Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology*, **12**, 2087–2097.
- Culver, M., Menotti-Raymond, M. & O'Brien, S.J. (2001) Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite loci in pumas (*Puma concolor*). *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 1151–1156.
- Delgado, P., Salas-Lizana, R., Vázquez-Lobo, A., Wegier, A., Anzidei, M., Alvarez-Buylla, E.R., Vendramin, G.G. & Piñero, D. (2007) Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb. and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae): morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences*, **168**, 861–875.
- Downie, D.A. (2004) Phylogeography in a galling insect, grape phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae* (Phylloxeridae) in the fragmented habitat of Southwest USA. *Journal of Biogeography*, **31**, 1759–1768.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11–15.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–2581.
- Elsik, C.G., Minihan, V.T., Hall, S.E., Scarpa, A.M. & Williams, C.G. (2000) Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*, **43**, 550–555.
- Emerson, B.C. & Hewitt, G.M. (2005) Phylogeography. *Current Biology*, **15**, 368–371.

- Estoup, A., Jarne, P. & Cornuet, J.M. (2002) Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 1591–1604.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–80.
- Farjon, A. & Styles, B.T. (1997) *Flora Neotropica: Pinus (Pinaceae)*. New York Botanical Garden, New York.
- Gernandt, D.S., Geada-López, G., Ortiz-García, S. & Liston, A. (2005) Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, **54**, 29–42.
- Goldstein, D.B. & Pollock, D.D. (1997) Launching microsatellites: a review of mutation processes and method for phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, **88**, 335–342.
- González-Rodríguez, A., Bain, J.F., Golden, J.L. & Oyama, K. (2004) Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis*–*Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology*, **13**, 3467–3476.
- Gutiérrez-Larena, B., Fuertes Aguilar, J. & Nieto Feliner, G. (2002) Glacial-induced altitudinal migrations in *Armeria* (Plumbaginaceae) inferred from patterns of chloroplast DNA haplotype sharing. *Molecular Ecology*, **11**, 1965–1974.
- Hardy, O.J. & Vekemans, X. (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 618–620.
- Heuertz, M., Carnevale, S., Fineschi, S., Sebastiani, F., Hausman, J.F., Paule, L. & Vendramin, G.G. (2006) Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology*, **15**, 2131–2140.
- Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 909–913.
- Hewitt, G.M. (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, **10**, 537–549.
- Jaramillo-Correa, J.P., Beaulieu, J., Ledig, F.T. & Bousquet, J. (2006) Decoupled mitochondrial and chloroplast DNA population structure reveals Holocene collapse and population isolation in a threatened Mexican-endemic conifer. *Molecular Ecology*, **15**, 2787–2800.
- Lachniet, M.S. & Vázquez-Selem, L. (2005) Last Glacial Maximum equilibrium line altitudes in the circum-Caribbean (Mexico, Guatemala, Costa Rica, Colombia, and Venezuela). *Quaternary International*, **138–139**, 129–144.
- Latta, R. & Mitton, J. (1999) Historical separation and present gene flow through a zone of secondary contact in ponderosa pine. *Evolution*, **53**, 769–776.
- Lozano-García, S. & Vázquez-Selem, L. (2005) A high-elevation Holocene pollen record from Iztaccíhuatl volcano, central Mexico. *The Holocene*, **15**, 329–338.
- Lozano-García, S., Ortega-Guerrero, B. & Sosa-Nájera, S. (2002) Mid- to late-Wisconsin pollen record of San Felipe basin, Baja California. *Quaternary Research*, **58**, 84–92.
- Lozano-García, S., Sosa-Nájera, S., Sugiura, Y. & Caballero, M. (2005) 23,000 yr of vegetation history of the Upper Lerma, a tropical high-altitude basin in Central Mexico. *Quaternary Research*, **64**, 70–82.
- Mark, B.G., Harrison, S.P., Spessa, A., New, M., Evans, D.J.A. & Helmens, K.F. (2005) Tropical snowline changes at the last glacial maximum: a global assessment. *Quaternary International*, **138–139**, 168–201.
- Marshall, H.D., Newton, C. & Ritland, K. (2002) Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 367–378.
- Matos, J.A. & Schaal, B.A. (2000) Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: a coalescent approach to hybridization. *Evolution*, **54**, 1218–1233.
- Metcalf, S.E. (2006) Late Quaternary environments of the northern deserts and central transvolcanic belt of Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **93**, 258–273.
- Metcalf, S.E., O'Hara, S.L., Caballero, M. & Davies, S.J. (2000) Records of the late Pleistocene–Holocene climatic change in Mexico – a review. *Quaternary Science Reviews*, **19**, 699–721.
- Metcalf, S., Say, A., Black, S., McCulloch, R. & O'Hara, S. (2002) Wet conditions during the last glaciation in the Chihuahuan Desert, Alta Babicora Basin, Mexico. *Quaternary Research*, **57**, 91–101.
- Mitton, J.B., Kreiser, B.R. & Latta, R.G. (2000) Glacial refugia of limber pine (*Pinus flexilis* James) inferred from the population structure of mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, **9**, 91–97.
- Musálem, M.A. & Ramírez Luis, A. (2003) *Monografía de Pinus ayacahuite*. INIFAP, México D.F.
- Navascués, M. & Emerson, B.C. (2005) Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasmy. *Molecular Ecology*, **14**, 1333–1341.
- Navascués, M., Vaxenvanidou, Z., González Martínez, S.C., Climent, J., Gil, L. & Emerson, B.C. (2006) Chloroplast microsatellites reveal colonization and metapopulation dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology*, **15**, 2691–2698.
- Peet, R.K. (2000) Forests and meadows of the Rocky Mountains. *North American terrestrial vegetation* (ed. by M.G. Barbour and W.D. Billings), pp. 75–121. Cambridge University Press, Cambridge, MA.
- Pérez de la Rosa, J.A. (1993) *Taxonomía de Pinus strobiformis y Pinus ayacahuite*. MSc Thesis, Colegio de Posgraduados, Montecillo, México.
- Perry, J.P. (1991) *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, OR.
- Petit, R.J., Aguinalde, I., De Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J.P., Rendell, S. & Vendramin, G.G. (2003) Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**, 1563–1565.
- Pfenniger, M. & Posada, D. (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae,

- Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution*, **56**, 1776–1788.
- Piperno, D.R., Moreno, J.E., Iriarte, J., Holst, I., Lachniet, M., Jones, J.G., Ranere, A.J. & Castanzo, R. (2007) Late Pleistocene and Holocene environmental history of the Iguala Valley, Central Balsas Watershed of Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **104**, 11874–11881.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.M., Paetkau, D., Baudouin, L. & Estoup, A. (2004) GeneClass2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, **95**, 536–539.
- Price, R.A., Liston, A. & Strauss, S.H. (1998) Phylogeny and systematics of *Pinus*. *Ecology and biogeography of Pinus* (ed. by D.M. Richardson), pp. 49–87. Cambridge University Press, Cambridge.
- Provan, J. (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 142–147.
- Rambaut, A. (1996) *Se-Al: sequence alignment editor*. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/> (last accessed on 19 June 2008).
- Richardson, B.A., Brunfeld, S.J. & Klopfenstein, N.B. (2002) DNA from bird-dispersed seed and wind-disseminated pollen provides insights into postglacial colonization and population genetic structure of whitebark pine (*Pinus alba-aulis*). *Molecular Ecology*, **11**, 215–227.
- Robledo-Arnuncio, J.J., Collada, C., Alía, R. & Gil, L. (2005) Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *Journal of Biogeography*, **32**, 595–605.
- Syring, J., Farrell, K., Businsky, R., Cronn, R. & Liston, A. (2007) Widespread genealogical nonmonophyly in species of *Pinus* subgenus *Strobos*. *Systematic Biology*, **56**, 163–181.
- Van Devender, T.R. (1990a) Late Quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan Desert, United States and Mexico. *Packrat middens: the last 40,000 years of biotic change* (ed. by J.L. Betancourt, T.R. Van Devender and P.S. Martin), pp. 104–133. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Van Devender, T.R. (1990b) Late Quaternary vegetation and climate of the Sonoran Desert, United States and Mexico. *Packrat middens: the last 40,000 years of biotic change* (ed. by J.L. Betancourt, T.R. Van Devender and P.S. Martin), pp. 134–165. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Velázquez, A., Toledo, V.M. & Luna, I. (2000) Mexican temperate vegetation. *North American terrestrial vegetation* (ed. by M.G. Barbour and W.D. Billings), pp. 573–592. Cambridge University Press, Cambridge, MA.
- Vendramin, G.G., Lelli, L., Rossi, P. & Morgante, M. (1996) A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, **5**, 595–598.
- Vendramin, G.G., Anzidei, M., Madaghiele, A. & Bucci, G. (1998) Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**, 456–463.
- Walter, R. & Epperson, B.K. (2001) Geographic pattern of genetic variation in *Pinus resinosa*: area of greatest diversity is not the origin of postglacial populations. *Molecular Ecology*, **10**, 103–111.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1 Haplotype frequencies by population.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

BIOSKETCHES

Alejandra Moreno-Letelier is interested in population genetics, molecular evolution and phylogeography with a particular focus on historical demography and speciation.

Daniel Piñero is interested in the fields of population genetics and phylogeography. He is currently involved in the study of Mexican pines.

Editor: David Hafner

3. Demografía histórica de *Pinus strobiformis*: procesos poblacionales y cambio climático durante los periodos glaciales

3.1. Conceptos generales

Los fundamentos de la teoría neutral y los modelos de coalescencia permiten predecir los niveles de variación genética en las poblaciones a partir del tamaño efectivo poblacional y la tasa de mutación (Avise et al., 1987; Avise, 2000). Los modelos matemáticos más simples están basados en los supuestos de una población ideal, conocida como población Wright-Fisher (Hey and Machado, 2003), donde:

1. El tamaño poblacional (N) es constante
2. Los individuos son diploides y se reproducen al azar
3. El número de progenie por individuos tiene una distribución Poisson
4. Las generaciones son discretas

A partir de estos modelos tiene que la heterocigosis en equilibrio mutación-deriva, está dada por, $\hat{H} = \frac{4N_e\mu}{1+4N_e\mu}$ y el número efectivo de alelos es $4N_e\mu + 1$, donde N_e es el tamaño efectivo poblacional y μ es la tasa de mutación por generación (Avise et al., 1988; Gillespie, 2004). A partir de estas expresiones, puede predecirse el número de diferencias entre pares de genes en una población de tamaño constante: $Q(i) = \frac{1}{1+\Theta} \left(\frac{\Theta}{1+\Theta}\right)^i$, donde $\Theta = 4N_e\mu$ e i es el número de sitios segregantes entre pares de secuencias (Watterson, 1975; Slatkin and Hudson, 1991). Bajo el modelo de población Wright-Fisher, se espera que la distribución de diferencias pareadas (distribución mismatch) sea multimodal, sin embargo, varios procesos demográficos pueden apartar a una población del equilibrio mutación deriva (Slatkin and Hudson, 1991). Las expansiones demográficas afectan N_e y por lo tanto se altera la heterocigosis y el número efectivo de alelos en las poblaciones (Slatkin and Hudson, 1991; Harpending, 1994; Harpending and Rogers, 2000). Las expansiones demográficas generan un patrones de variación fácilmente identificables y modelables. Bajo crecimiento poblacional, la distribución de diferencias pareadas es unimodal, debido a que los alelos están

cercanamente relacionados y los eventos de coalescencia ocurren en un corto periodo de tiempo. Conforme aumenta el tamaño de la población, los eventos de coalescencia son más raros y se acumulan mutaciones, generando un exceso de alelos de copia única (*singletons*) con respecto a lo esperado en el equilibrio y las genealogías de genes tienen forma de estrella (Fig. 3.1; Fu, 1997; Harpending and Rogers, 2000; Nordborg and Innan, 2002).

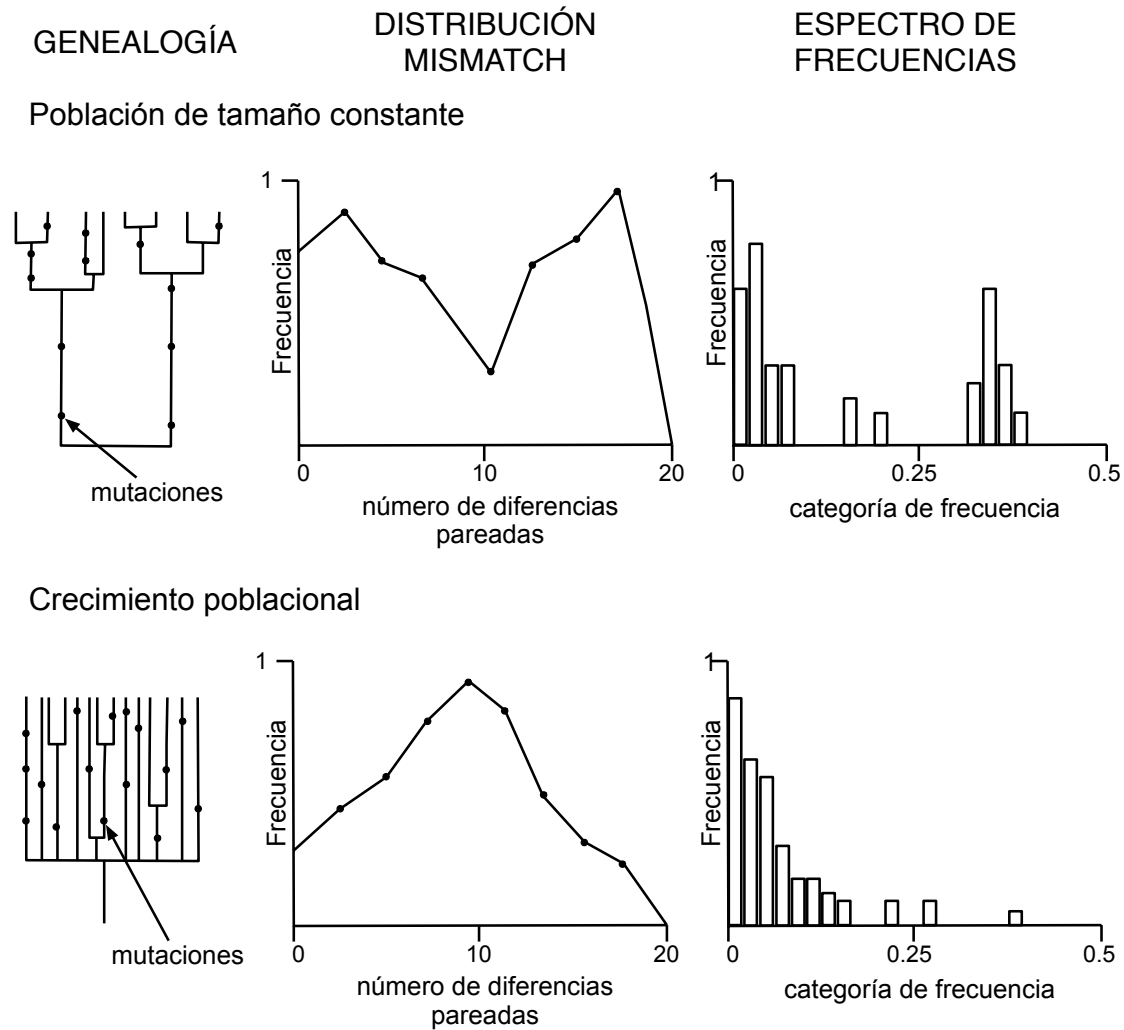


Figura 3.1: Comparación entre las genealogías, distribución mismatch y espectro de frecuencias (no. de singletons) bajo un tamaño de población constante y crecimiento poblacional*.

* (Harpending and Rogers, 2000; Navascués et al., 2006)

A partir de este marco conceptual, se desarrollaron una serie de herramientas matemáticas y estadísticas que permiten identificar eventos de expansión demográfica del pasado (Emerson et al., 2001). A la disciplina que incorpora estas metodologías basadas en la distribución de la variación genética, se le conoce como demografía histórica (Hey and Machado, 2003). Entre los métodos

estadísticos que se utilizan para detectar expansiones poblacionales están: análisis de distribución mismatch (diferencias pareadas), estadísticos de resumen que evalúan la distribución de las frecuencias de los alelos (F_s de Fu, D de Tajima, etc.), y análisis basados en genealogías de genes (Avice et al., 1988; Fu, 1997; Harpending and Rogers, 2000; Emerson et al., 2001; Templeton, 2001; Hey and Machado, 2003).

Para explorar el impacto de los ciclos glaciales del Pleistoceno sobre las poblaciones de *Pinus strobiformis* se utilizaron dos tipos de herramientas de demografía histórica. Una basada en estadísticos de resumen y en la distribución de diferencias pareadas (distribución mismatch) y otra que se basa en una genealogía de genes y su distribución geográfica (Análisis Filogeográfico de Clados Anidados, NCPA). Se utilizaron microsatélites de cloroplasto, que son altamente variables, haploides y están ligados, por lo que la recombinación puede descartarse (Vendramin et al., 1996). A pesar de que las altas tasas de mutación de los microsatélites resultan en niveles variables de homoplasia (Estoup et al., 2002), han resultado útiles para la reconstrucción de la demografía histórica y la estructura filogeográfica de especies de diversificación reciente (Richard and Thorpe, 2001; Heuertz et al., 2006; Navascués et al., 2006; Delgado et al., 2007), cuando otro tipo de marcadores no contienen suficiente variación.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Análisis de mismatch y prueba de neutralidad

Los episodios demográficos de crecimiento y decremento poblacional dejan huella en la cantidad de diversidad genética de las poblaciones. El decremento poblacional provoca una pérdida de diversidad y el crecimiento retiene diversidad que de otra manera se perdería por deriva génica (Harpending, 1994). La diversidad genética como indicador de la demografía histórica puede medirse por medio de la distribución de las diferencias pareadas entre secuencias (mismatch) y con la distribución de frecuencias de los alelos (Fig. 3.1; Harpending and Rogers, 2000). Bajo un modelo neutral de sitios infinitos y tamaño poblacional constante se espera una distribución multimodal de diferencias pareadas entre secuencias, lo cual quiere decir que algunos haplotipos están cercanamente relacionados y otros haplotipos son más divergentes (Slatkin and Hudson, 1991; Excoffier et al., 2005). En una población en equilibrio, la probabilidad de que un par de linajes coalesca en la generación anterior está dado por $\frac{1}{2N}$, donde N es el tamaño poblacional, y dicha probabilidad está distribuída de manera uniforme a lo largo del tiempo (Slatkin and Hudson, 1991; Navascués et al., 2006). En una población en crecimiento exponencial $N_t \gg N_0$, la probabilidad de que dos linajes coalescan es mayor con tamaños menores de N (cerca de N_0) y ocurren en un corto periodo de tiempo (Fig. 3.2; Slatkin and Hudson, 1991; Nordborg, 2001). Las expansiones poblacionales

pueden detectarse en una población ya que generan (Harpending and Rogers, 2000):

1. Una distribución unimodal de diferencias pareadas (*mismatch*)
2. Exceso de alelos raros o de una copia (*singletons*)
3. Eventos de coalescencia cercanos a la raíz, lo que produce genealogías en forma de estrella

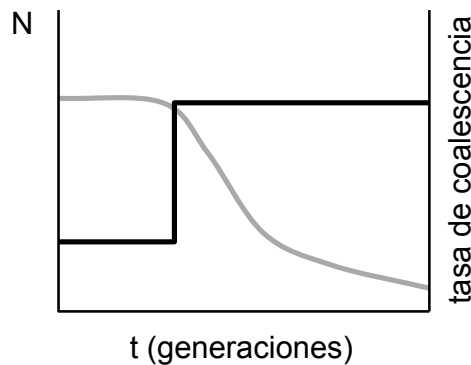


Figura 3.2: Relación entre el tamaño poblacional (negro) y la tasa de coalescencia entre linajes (gris) durante una expansión demográfica.

Distribución de diferencias pareadas (*mismatch*)

La distribución de diferencias pareadas se aborda con el análisis de *mismatch*, en el que se compara la distribución de diferencias entre haplotipos de microsatélites de cloroplasto con la distribución esperada bajo el modelo de expansión súbita de la población (H_0 = expansión súbita). En este análisis se estima el tiempo transcurrido desde la expansión (τ), ponderado por el número de loci $\tau = l\mu t$ donde l es el número de loci (5), μ la tasa de mutación para microsatélites de cloroplasto de pinos (5.5×10^{-5} sustituciones/generación; Provan et al. 1999; Navascués et al. 2006) y t el número de generaciones (Navascués et al., 2006). Para *P. strobiformis* y *P. ayacahuite* se utilizaron dos tiempos generacionales para estimar t en años: la edad a la primera reproducción, 15 años (Pavek, 1993; Musálem and Ramírez, 2003) y el promedio del intervalo reproductivo para *P. strobus* y *P. strobiformis*: 100 años (Jones et al., 2006). Ninguna de estas dos medidas del tiempo generacional corresponden al tiempo generacional en términos estrictamente demográficos, ya que para estimarlo se necesitan datos de tabla de vida que no están disponibles para estos pinos. El tiempo generacional puede medirse como la edad media en que los miembros de una cohorte producen descendencia, o como la edad media de los adultos reproductivos en una estructura estable de edades (Franco and Silvertown, 2004). La primera definición corresponde al tiempo a la primera reproducción, pero no es muy adecuada ya que generalmente los individuos jóvenes

producen pocas semillas lo cual afecta la probabilidad de establecimiento de su progenie. La segunda definición es la más apegada a la realidad, pero se requiere información precisa sobre la demografía de la especie para tener un estimado adecuado. Los estudios demográficos para *Pinus strobiformis* y *P. ayacahuite* son muy incompletos. Existe mayor información para *P. strobus*, una especie cercanamente relacionada del Este de Estados Unidos. La edad a la primera reproducción de *P. strobus* es 15 años, pero la producción de semillas aumenta gradualmente hasta estabilizarse en los 90 años y no presenta senescencia (Wendel and Clay Smith, 1990). La longevidad media de *P. strobus* y *P. strobiformis* es 200 años (Wendel and Clay Smith, 1990; Pavek, 1993), por lo que se promedió la edad a la primera reproducción y la longevidad media para obtener un aproximado del tiempo generacional: 107.5 años y se redondeó a 100 años.

La prueba de ajuste con un modelo de expansión súbita se hace con un algoritmo que minimiza la suma de diferencias al cuadrado (SSD) entre el modelo y los datos, y la significancia se evalúa con 10000 réplicas de bootstrap (Navascués et al., 2006). La significancia de SSD es $p(SSD)$, y se calcula como la proporción de bootstraps (simulados) mayores a lo observado, por lo que un valor significativo ($p < 0.05$) implica el rechazo del modelo de expansión súbita (H_0 ; Excoffier et al., 2005).

Prueba de neutralidad y el espectro de frecuencias

Para detectar un posible crecimiento poblacional basado en el espectro de frecuencias, se realizó la prueba de neutralidad de Fu (F_s), que compara las frecuencias haplotípicas de la muestra con lo esperado bajo un modelo de neutro de evolución (Fu, 1997). El estimado F_s adquiere un valor negativo significativo ($p < 0.02$) si existe un exceso de singletons, lo que sugiere expansión demográfica (Excoffier et al., 2005). Un exceso de singletons, igual que una genealogía en forma de estrella también pueden ser ocasionados por selección direccional a favor de un alelo, lo cual causa un cambio en las frecuencias similar a un cuello de botella seguido de una expansión (barrido selectivo o *selective sweep*; Fu, 1997; Nordborg and Innan, 2002). La selección purificadora también provoca un un exceso de singletons en la muestra, pero esto se debe a la reducción de los alelos o haplotipos de frecuencias intermedias, no por el aumento en sí de los singletons (Fu, 1997).

La forma de distinguir entre un proceso demográfico y selección natural, se basa en que la selección natural sólo actúa en el locus bajo selección y la zona circundante, mientras que los procesos demográficos tienen efectos sobre todo el genoma (Nordborg and Innan, 2002). Por lo tanto, la única forma de determinar si cierto patrón de variación se debe a un cuello de botella es corroborarlo con varios loci no ligados.

Esto último representa una gran limitante al uso del cloroplasto para inferir la demografía histórica de una especie. Sin embargo, estudios realizados en *Pinus ponderosa* y *P. flexilis* con varios

marcadores no ligados de cloroplasto, mitocondria y núcleo, han encontrado cierta concordancia entre los patrones de distribución de la variación genética de los distintos genomas (Latta and Mitton, 1997; Latta et al., 2001). Esta concordancia nunca es completa, ya que los genes del núcleo, mitocondria y cloroplasto tienen distintos tamaños efectivos, tiempos de coalescencia y modos de herencia, lo que altera ligeramente la señal demográfica (Latta et al., 2001). Por lo tanto, en ausencia de evidencia que sugiera que el cloroplasto en pinos está sujeto a selección a nivel intra-específico, la hipótesis nula será que se comporta como un locus neutral.

Los análisis de distribución de diferencias pareadas y la prueba de neutralidad de Fu fueron diseñados originalmente para secuencias de nucleótidos. Sin embargo, estudios con simulaciones han mostrado que es posible detectar eventos de expansión poblacional usando microsatélites, si se codifica el alelo más grande para cada locus con 1s para cada unidad de repetición (mononucleótido) y las deleciones con 0s (ver Apéndice A.2; Navascués et al., 2006). Los análisis se realizaron por zona geográfica y usando los grupos de SAMOVA utilizando Arlequin ver. 3.11 (Excoffier et al., 2005). La lógica detrás de utilizar los grupos de SAMOVA y de zonas geográficas fue minimizar los efectos de la estructura genética sobre la capacidad de detección de expansiones poblacionales (Wakeley, 2001; Excoffier, 2004). La estructura genética diluye la señal demográfica al incluir en una sola muestra frecuencias haplotípicas de regiones que posiblemente han tenido historias distintas, por lo que en el presente análisis se procuró tener grupos genéticamente homogéneos (Excoffier, 2004). Por lo anterior, no se realizaron análisis a nivel de especie.

3.2.2. Análisis filogeográfico de clados anidados

La distribución de la variación genética en el espacio es producto de procesos históricos y contemporáneos (Cruzan and Templeton, 2000). Tradicionalmente los métodos para estimar el grado de estructuración genética, como F_{ST} , no distinguen entre este tipo de eventos, ni pueden incluir dos o más modelos de migración (Templeton et al., 1995). El Análisis Filogeográfico de Clados Anidados (NCPA, Nested Clade Phylogeographic Analysis; Templeton, 2004) integra información genealógica en forma de una red de haplotipos, las frecuencias haplotípicas y la localización geográfica para identificar las causas de la asociación geográfica de la variación genética (Templeton et al., 1995; Templeton, 2001).

La red de haplotipos se construye usando un método de parsimonia estadística, utilizando el programa TCS ver 2.1 (Clement et al., 2000). Los haplotipos se codificaron a partir de las secuencias de los repeats para cada locus (ver Apéndice A.1) y seleccionando la opción de gap como 5to estado. Cada gap de una base se consideró un evento independiente, ya que la evolución de los microsatélites sigue un modelo de mutación paso a paso (Navascués et al., 2006). Los haplotipos exclusivos a *P. flexilis* se eliminaron de la red para no generar señales engañosas, ya que esta po-

blación está muy alejada del resto y el tamaño de muestra es muy pequeño. El alineamiento usado en la reconstrucción de la red se encuentra en el Apéndice A.1.

Este tipo de redes puede presentar ambigüedades que resultan en conexiones alternativas entre haplotipos. Dichas ambigüedades dificultan la aplicación del NCPA por lo que deben ser resueltas. Los siguientes lineamientos basados en la teoría de coalescencia son útiles para resolver ambigüedades en la red (Crandall and Templeton, 1993; Pfenninger and Posada, 2002):

1. Criterio de frecuencia: es más probable que un haplotipo esté conectado a un haplotipo frecuente que a un singleton (copia única).
2. Criterio de topología: los haplotipos tienen mayor probabilidad de originarse a partir de un nodo que de un haplotipo en la punta de la red.
3. Criterio geográfico: un haplotipo tiene mayor probabilidad de estar conectado a otro de la misma zona geográfica. Sin embargo, esta suposición sólo se mantiene si el flujo génico es muy bajo. De no haber estimados independientes de flujo génico, este último criterio no debe ser tomado en cuenta para resolver ambigüedades.

El anidamiento se realiza desde las puntas, agrupando los haplotipos que estén a un paso mutacional de otros, generando el primer nivel de anidamiento (Templeton et al., 1987). Estos clados anidados de primer nivel se consideran puntas en el segundo nivel de anidamiento, y así sucesivamente hasta incluir todo el cladograma.

Una vez obtenido el anidamiento, se realizan pruebas de asociación geográfica utilizando el programa GeoDis 2.5 (Posada et al., 2000). Para realizar estas pruebas, primero se determina el centro geográfico de los individuos del clado X o $D_c(X)$, es decir, se estima la dispersión de todos los haplotipos del clado X (Templeton et al., 1995). La distancia al clado X , $D_n(X)$ es la distancia del clado X al centro geográfico del clado anidado inmediatamente superior, y esto mide el nivel de desplazamiento del clado X con respecto al clado que lo contiene (Cruzan and Templeton, 2000). El NCPA parte de la hipótesis nula de ausencia de asociación geográfica, para lo cual calcula D_c y D_n permutando clados contra localidades geográficas. A partir de ahí se realizan pruebas de significancia de dos colas para detectar valores de D_c y D_n significativamente altos o bajos, es decir, detecta si un clado está excesivamente extendido o restringido en el espacio. Una vez obtenidas las pruebas de significancia se sigue la clave una clave de inferencia (Templeton, 2004) para identificar los patrones siguientes:

- Flujo génico restringido
- Expansión contigua del rango
- Fragmentación alopátrica

- Dispersión a larga distancia
- Aislamiento por distancia

La clave de inferencia se sigue a partir de los clados de primer nivel (haplotipos a un paso mutacional de distancia), que representan los eventos más recientes. Los clados de niveles superiores, que incluyen a los nodos de la red, guardan información sobre eventos más antiguos. Esto se basa en predicciones a partir de modelos de coalescencia, en que los haplotipos interiores tienen mayor probabilidad de ser más antiguos, mientras que los haplotipos de las puntas suelen ser más recientes (Templeton et al., 1987; Crandall and Templeton, 1993).

3.3. Resultados

3.3.1. Análisis de *mismatch* y prueba de neutralidad

El análisis de *mismatch* para regiones geográficas y grupos de SAMOVA no fue significativamente distinto al modelo de expansión súbita en la mayoría de los casos, es decir, hay señal molecular de una expansión demográfica (Cuadro 3.1). Las excepciones son la Sierra Madre Oriental y el Grupo Este (Sierra Madre Oriental y FVTM, sin Zamorano). Sin embargo, ambas pruebas no son independientes, ya que la Sierra Madre Oriental está incluida dentro del Grupo Este, y pudo sesgar la distribución de diferencias pareadas. Los tiempos a la expansión son todos relativamente recientes y todos corresponden al Pleistoceno (entre 1.6 m.a. y 10 000 años A.P.). La distribución de las diferencias fue en todos los casos unimodal (Fig. 3.3), lo que concuerda con una expansión reciente.

La prueba de neutralidad de F_u (F_s) no concordó en todos los casos con los resultados del análisis de *mismatch*, ya que no se desvía significativamente de 0 (neutralidad o estasis poblacional), pero resultó negativa y altamente significativa en la Sierra Madre Occidental, Faja Volcánica Transmexicana debido a un exceso de singletons que sugieren una expansión poblacional (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1: Parámetros poblacionales obtenidos de la prueba de *mismatch* y resultados de la prueba de neutralidad (F_s). El tiempo a la expansión fue calculado con base en 15 y 100 años de tiempo generacional. Valores que no difieren de manera significativa del modelo de expansión poblacional ($p > 0.05$) y que difieren significativamente de la neutralidad ($p(F_s) < 0.02$) se presentan en negritas.

Población	N	SSD	p(SSD)	τ	$t(\text{años}^{15})$	$t(\text{años}^{100})$	F_s	$p(F_s)$
Sky Islands	119	0.0032	0.2160	1.242	33 877	225 852	-4.092	0.0412
El Cuale	20	0.0078	0.3941	1.937	52 840	352 272	-2.483	0.052
Sierra Madre Occidental	175	0.0031	0.0834	1.505	41 068	273 792	-13.163	0.0003
Sierra Madre Oriental	60	0.028	0.0225	0.8	21 839	145 596	-0.132	0.445
FVTM	104	0.0058	0.1418	0.824	22 478	149 858	-7.155	0.0015
Santa Rita	20	0.002	0.7563	1.412	38 512	256 747	-0.562	0.336
Grupo Oeste	275	0.0029	0.0597	1.416	38 618	257 458	-13.664	0.0003
Grupo Este	202	0.0078	0.0271	1.019	27 805	185 369	-10.664	0.001

N: tamaño de muestra; SSD: suma del cuadrado de las diferencias entre el modelo y la muestra; τ : tiempo a la expansión en unidades mutacionales ($\tau = 2\mu t$); t : tiempo a la expansión en años (superíndice indica tiempo generacional); F_s : prueba de neutralidad de Fu.

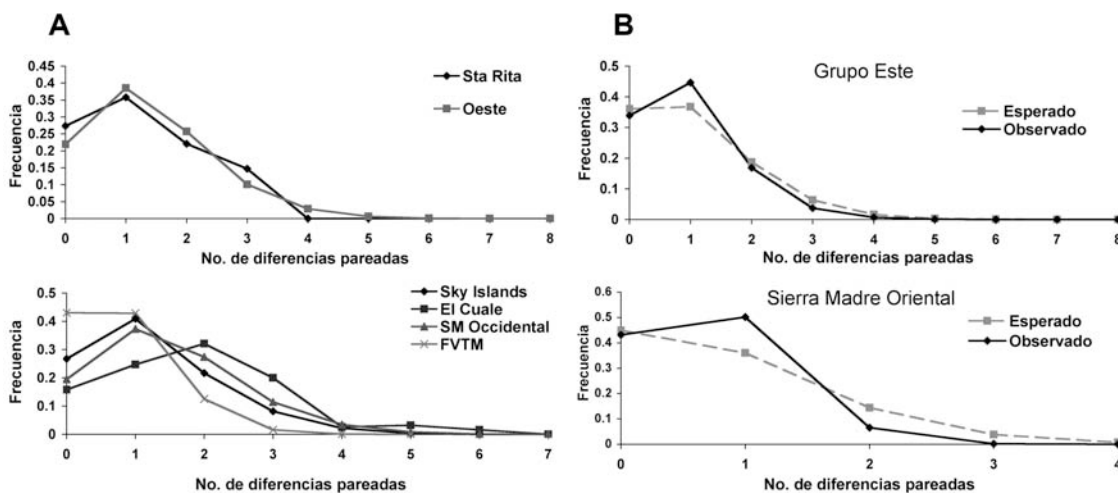


Figura 3.3: Distribución del número de diferencias pareadas. **A** Distribuciones no significativamente distintas al modelo de expansión súbita ($p > 0.05$) para grupos SAMOVA (superior) y grupos geográficos (inferior). **B** Distribuciones significativamente distintas al modelo de expansión súbita ($p < 0.05$), grupos SAMOVA (superior) y grupos geográficos (inferior).

3.3.2. Análisis Filogeográfico de Clados Anidados

La red de haplotipos presentó numerosas ambigüedades en forma de conexiones múltiples entre haplotipos. Estas conexiones múltiples o *loops* son producto de la naturaleza de los marcadores, sin embargo todas ellas fueron resueltas siguiendo los lineamientos antes mencionados. La red y los clados anidados se muestran en la Fig. 3.4. En el NCPA se utilizaron todos los clados con

excepción de 1-2, ya que se encuentra en una sola localidad. De los clados de primer orden, 6 de ellos no presentaron asociación geográfica significativa (1-3, 1-4, 1-5, 1-7, 1-9, 1-11) y la clave de inferencia no fue aplicada. La ausencia de asociación geográfica significativa puede indicar flujo génico intenso. En el siguiente nivel de anidamiento, el clado 2-1 no presentó asociación geográfica significativa. La cadena de inferencia para los clados con resultados significativos se presenta en el Cuadro 3.2. En los primeros niveles de anidamiento (clados 1-X), se infirieron tres eventos de flujo génico restringido con aislamiento por distancia y un evento de expansión contigua del rango y en los otros 7 clados no hubo asociación geográfica significativa. En el segundo nivel de anidamiento, el clado 2-2 que se localiza mayormente en el este de México (Fig. 3.4) presentó expansión contigua del rango, mientras que el 2-3 localizado principalmente en el oeste de México, tiene un patrón de flujo génico restringido y aislamiento por distancia. En todo el cladograma, se encontró una patrón de fragmentación alopátrica. Este nivel de anidamiento representa los eventos más antiguos de la red y es consistente con la estructura Este-Oeste obtenida por otros métodos (Capítulo 2).

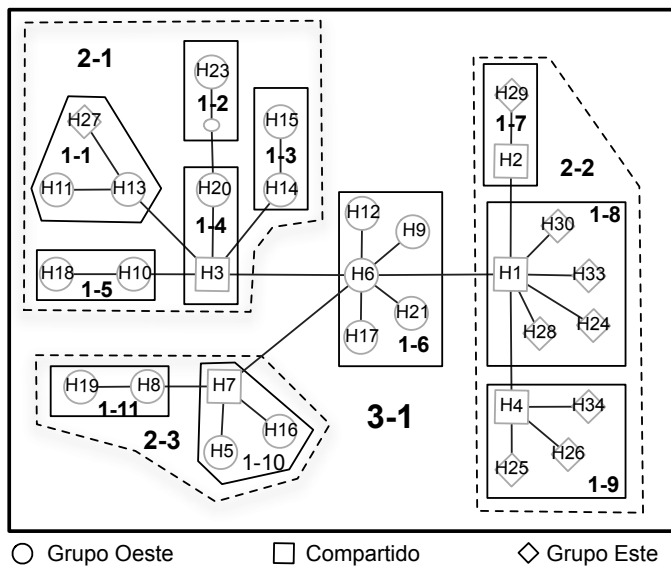


Figura 3.4: Diagrama de clados anidados a partir de la red de haplotipos obtenidos a partir de microsatélites de cloroplasto. Los círculos representan haplotipos encontrados en el grupo Oeste (Sierra Madre Occidental y Sky Islands; ver capítulo 2), los rombos son los haplotipos exclusivos del grupo Este (capítulo 2) y los cuadros representan haplotipos compartidos entre zonas geográficas.

Cuadro 3.2: Resultados de la prueba de contingencia de asociación geográfica y cadena de inferencia para los clados con resultados significativos para D_c , D_n .

Clado	$X^2(P)$	Cadena de inferencia	Evento inferido*
1-1	30 (0.02)	1-19-20-2-11-12- NO	ECR
1-6	166.41 (0.0)	1-2-3-4- NO	FGR/ APD
1-8	267.83 (0.0)	1-2-3-4-NO	FGR/ APD
1-10	39.36 (0.175)	1-2-3-4-NO	FGR/ APD
2-2	95.34 (0.0)	1-2-11-12-NO	ECR
2-3	18.34 (0.30)	1-2-3-4-NO	FGR/ APD
3-1	515.63 (0.0)	1-2-3-4-9-10-SI	FA

* NOTACION: **ECR** expansión contigua del rango; **FGR** flujo génico restringido; **APD** aislamiento por distancia; **FA** fragmentación alopátrica

3.4. Discusión

3.4.1. Análisis de *mismatch* y prueba de neutralidad

Los resultados del análisis de *mismatch* indican expansión súbita en casi todos los casos analizados, con excepción de la Sierra Madre Oriental y el grupo Este (Sierra Madre Oriental y FVTM sin Zamorano). Como se mencionó anteriormente, el análisis de *mismatch* y la prueba de neutralidad de Fu se realizaron en grupos que fueran genéticamente homogéneos (obtenidos a partir de SAMOVA) para evitar que la estructura genética borrara la señal de una expansión. En presencia de estructura poblacional, las señales demográficas se distorsionan ya que cada región puede tener una historia distinta, sobre todo si la tasa de migración es baja (Ray et al., 2003). Tal es el caso del grupo Este, que es significativamente distinto al modelo de expansión súbita, sin embargo, dentro de la muestra del grupo Este están incluidos El Cuale y la Faja Volcánica Trans-Mexicana (Cuadro 3.1) que sí presentan señal de expansión súbita. La dilución de la señal demográfica se debe a la diferenciación genética entre las regiones de la Sierra Madre Oriental y la Faja Volcánica Trans-Mexicana, que puede observarse en los valores significativos de R_{ST} entre regiones (Capítulo 2). En la Sierra Madre Oriental hay muy poca variación genética (sólo 4 haplotipos en 60 individuos) y no tiene señal de expansión poblacional, mientras que la Faja Volcánica Trans-Mexicana y El Cuale tiene mayor variación genética (15 haplotipos en 124 individuos) y presentan señal de expansión. Sin embargo, a pesar de que la contribución en tamaño muestral de la Sierra Madre Oriental borra la señal demográfica en el grupo Este, el número de haplotipos únicos no se ve afectado, por lo que F_s conserva un valor significativamente negativo como lo indicaría una expansión demográfica (Ray et al., 2003; Navascués et al., 2006).

La señal de expansión demográfica en el grupo Oeste es consistente con los resultados por grupo geográfico, ya que tanto las Sky Islands, Sierra Madre Occidental y Santa Rita presentan

señal de expansión demográfica, aunque únicamente la Sierra Madre Occidental tiene un valor de F_s negativo y significativo. Los valores de F_s negativos indican un exceso de singletons producto de una expansión demográfica, lo cual a su vez depende de la tasa de mutación y de τ (Ray et al., 2003; Excoffier et al., 2005). Esto último explica por qué la prueba de neutralidad de Fu no es tan eficiente para detectar expansiones recientes y/o expansiones en un número de demes limitados (Ray et al., 2003; Navascués et al., 2006), como es el caso en Santa Rita y las Sky Islands, que no poseen singletons. La Sierra Madre Occidental presenta la mayor variación de la muestra y gran cantidad de singletons. Por lo anterior, su valor de F_s es significativamente negativo, que se traduce en un valor significativamente negativo en el grupo Oeste del cual forma parte.

Otro aspecto a considerar es la edad de la expansión, sobre todo en el contexto de las glaciaciones del Pleistoceno que pudieron causar las expansiones demográficas de una especie de clima templado. Las Sky Islands, Santa Rita y Sierra Madre Occidental presentan valores de τ similares y distribuciones *mismatch* con la misma moda en una diferencia (Cuadro 3.1, Fig.- 3.3). Las distribuciones *mismatch* similares nos sugieren que se trató de una sola expansión en los miembros del grupo Oeste (Sky Islands y Sierra Madre Occidental) y Santa Rita (Ray et al., 2003; Excoffier, 2004). La diferenciación genética tan marcada de Santa Rita, a pesar de haberse originado en la misma expansión que el resto de las Sky Islands, puede deberse a deriva génica posterior a la colonización y a que en un modelo de islas, H_e suele disminuir cuando el número de demes (islas) es pequeño (Wakeley, 2001; Excoffier, 2004). Hay otras dos expansiones que ocurrieron independientemente de las del grupo Oeste y Santa Rita: una más joven en la Faja Volcánica Trans-Mexicana, y otra más antigua en El Cuale (Fig. 3.3 y Cuadro 3.1). Todas las expansiones estimadas con un tiempo generacional de 15 ó 100 años coinciden con algún periodo glacial (Fig. 3.5).

Para 100 años como tiempo generacional, que es el estimado más preciso considerando las fuentes de error, la expansión más antigua (El Cuale) se da en uno de los periodos glaciales más fríos, ocurrido hace 350 000 años (MIS 10). La más reciente cae en el penúltimo glacial (MIS6) que forma parte del estadio glacial Illinois (de 300 000 a 132 000 años A.P.). Las otras expansiones ocurrieron más o menos al mismo tiempo en el MIS 8, un periodo glacial comparable al UMG (Fig. 3.5A). Como se mencionó en la sección 1.5 de la Introducción, el clima glacial en el noroeste de México era más húmedo y frío que en la actualidad (Metcalf et al., 2007), esto pudo propiciar un aumento de nicho para *Pinus strobiformis*, que prefiere condiciones frescas y húmedas, actualmente restringidas a las partes más altas de las montañas (Musálem and Ramírez, 2003). Las condiciones favorables en un periodo glacial especialmente frío y la cercanía geográfica pueden ser las responsables de la señal demográfica concordante entre las Sky Islands (incluida Santa Rita) y la Sierra Madre Occidental, además de la ausencia de aislamiento por distancia y altos niveles de flujo génico detectados en esta área tan extensa (Capítulo 2). El Cuale y la Faja Volcánica Trans-Mexicana presentan historias distintas. El Cuale es producto de una expansión

antigua, lo cual explica la gran cantidad de haplotipos únicos en esa zona, y sin embargo el valor de F_s no se desvía de la neutralidad (Cuadro 3.1). Esto puede deberse a que el tamaño de muestra es pequeño (20) y a que, al ser una población aislada, el tamaño de deme es pequeño lo cual limita la diversidad genética (Ray et al., 2003).

El tiempo a la expansión estimado a partir de un tiempo generacional de 15 años, concentra todas las expansiones en el periodo glacial del Wisconsin (hace 110 000 años A.P.; Fig. 3.5B). Sin embargo, 15 años es la edad a la primera reproducción (Pavek, 1993), lo cual no corresponde directamente al tiempo generacional de una especie longeva y con generaciones sobrelapadas (Franco and Silvertown, 2004), por lo que considero que los estimados de tiempo a la expansión con 15 años son poco realistas.

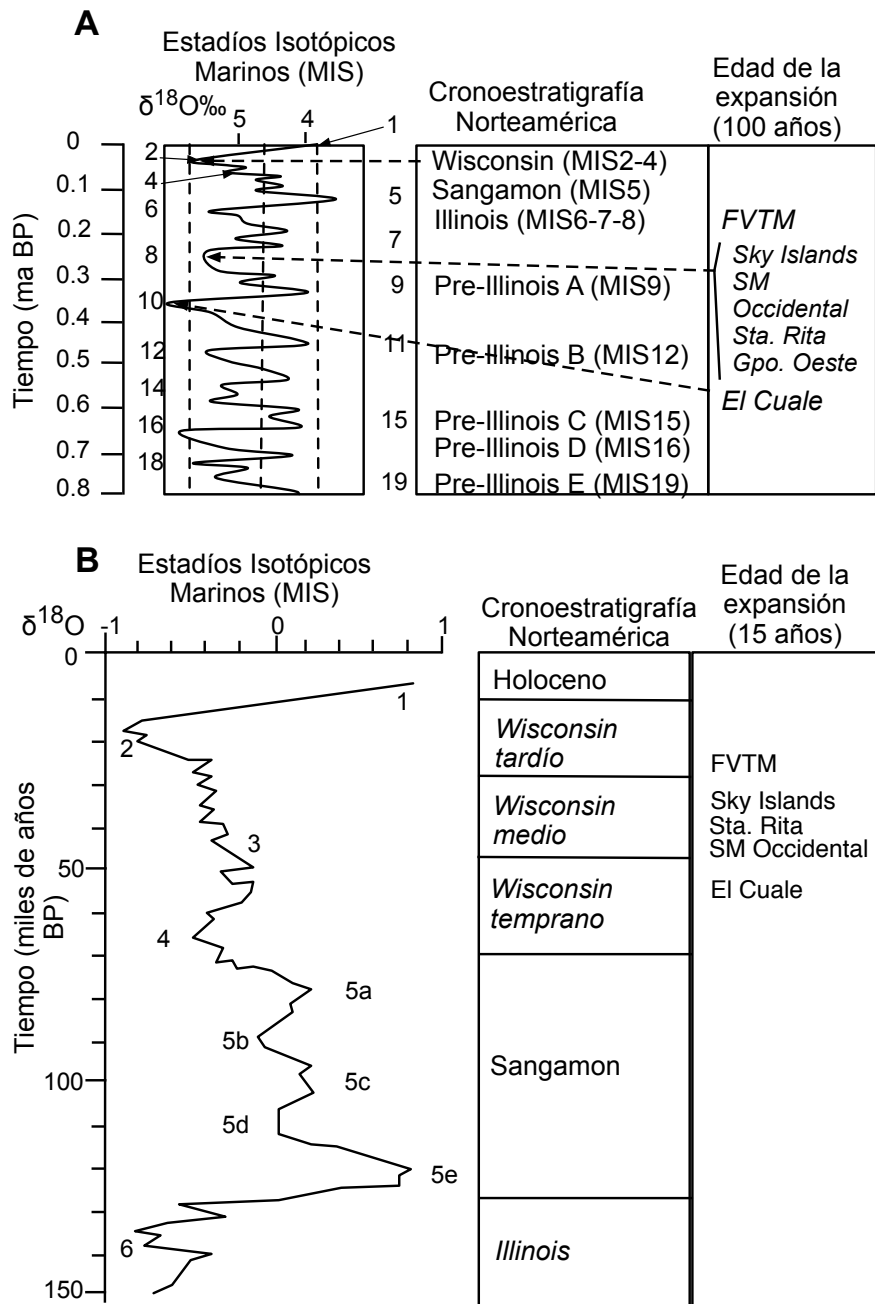


Figura 3.5: Cronosecuencia del Pleistoceno tardío con los eventos de expansión demográfica estimados para tiempos generacionales de 100 años (A) y 15 años (B). Basado en Gibbard and van Kolfschoten (2004).

Otras interpretaciones

Un valor de F_s negativo puede ser producto de varios procesos evolutivos diferentes: expansión demográfica, selección purificadora y selección direccional. En este trabajo la interpretación está

basada en el supuesto de que el cloroplasto se comporta como un locus neutral, sin embargo, en animales se ha encontrado que la mitocondria está sujeta a selección direccional y que ha estado sujeta a barridos selectivos en varias especies (Wright et al., 2008). También se ha detectado selección balanceadora en genes de autoincompatibilidad que se localizan en el cloroplasto de algunas plantas (Wright et al., 2008), sin embargo existen pocos estudios que realicen pruebas de neutralidad en genomas citoplásmicos de plantas con diversos sistemas de apareamiento.

En el caso del cloroplasto, se puede descartar a la selección purificadora como causante de los valores de F_s negativos, ya que la tasa de sustitución en este genoma es muy baja y gran parte de la variación es neutral, por lo que no se ha observado acarreo (*hitchhiking*) extensivo, como se ha visto en la mitocondria de animales (Wright et al., 2008). Además, como se mencionó anteriormente, la selección purificadora elimina los haplotipos de frecuencias intermedias, dejando un haplotipo muy frecuente cercano a la fijación y un exceso de haplotipos raros (Fu, 1997). En nuestra muestra tenemos varios haplotipos muy frecuentes (Fig) en todas las regiones geográficas en que se obtuvo una F_s significativamente negativa, por tanto, la selección purificadora es menos probable.

El efecto del barrido selectivo es muy similar al de un cuello de botella ya que también elimina variación, genera un exceso de haplotipos raros, y el haplotipo favorecido se encuentra en una alta frecuencia (Fu, 1997; Hahn et al., 2002; Arunyawat et al., 2007; Wright et al., 2008). Sin embargo, el patrón observado en nuestros datos indica un exceso de haplotipos raros pero también varios haplotipos de frecuencia intermedia en todas las regiones, por lo que la reducción en los niveles de variación no resulta evidente. Este patrón difícilmente podría atribuírsele a la selección balanceadora, porque en el cloroplasto este patrón sólo se ha observado en plantas con sistemas multialélicos de autoincompatibilidad (Wright et al., 2008), mientras que los pinos son autocompatibles (Farjon and Styles, 1997). Las diferencias de frecuencias haplotípicas entre poblaciones de *Pinus strobiformis* no muestran un patrón que pudiera sugerir diferencias adaptativas en el cloroplasto, ya que las condiciones ambientales entre las Sierra Madre Oriental y Occidental son muy similares, sin embargo las frecuencias haplotípicas son distintas y sólo una de estas regiones presenta valores de F_s negativos y significativos. No obstante, la única manera efectiva de determinar la causa de los patrones demográficos observados, sería utilizar otros loci no ligados y pruebas de selección a nivel de codones en genes codificantes.

3.4.2. Análisis Filogeográfico de Clados Anidados

En términos generales, las inferencias del NCPA coinciden con los resultados anteriores (Capítulo 2). Muchos de los clados que se localizan casi exclusivamente en la Sierra Madre Occidental y Sky Islands (Fig. 3.4) no presentaron asociación geográfica, por lo que se refuerza la noción de flujo génico generalizado. Sólo los clados 1-1 y 2-2 presentaron expansión contigua del rango, lo que

concuera con el resultado de la prueba de *mismatch*. En particular, el clado 2-2 incluye todos los haplotipos presentes en la FVTM, que presenta la expansión más reciente según lo estimado con base a las diferencias pareadas. A pesar de que esta expansión se detectó en un clado de segundo orden, lo cual indica eventos más antiguos. La red sólo tiene 3 niveles de anidamiento, por lo que se puede suponer que la divergencia de los haplotipos es muy reciente. Hubo varias inferencias de flujo génico restringido y aislamiento por distancia en clados de primer orden (y uno de segundo orden; Cuadro 3.2). Esto se contradice en parte con la ausencia de aislamiento por distancia dentro de los grupos usando la prueba de Mantel (Capítulo 2). Esta inferencia puede ser producto de: 1) haplotipos compartidos entre regiones distantes (Sierra Madre Occidental y FVTM), que son las que presentan aislamiento por distancia significativo, como es el caso del haplotipo H7 del clado 2-3; 2) la inferencia de flujo génico restringido es producto de la distribución restringida de algunos haplotipos raros (D_c significativamente pequeña). Los haplotipos con distribución restringida, sobre todo en clados de primer orden, pueden haberse originado recientemente por mutación, lo cual concuerda con el exceso de singletons detectado para ambos grupos (Este y Oeste) por la prueba de neutralidad de Fu (Ray et al., 2003). La inferencia más antigua, fragmentación alopátrica, concuerda con lo encontrado con la prueba de SAMOVA, ya que el clado 2-2 corresponde a haplotipos que se localizan en su mayoría en el grupo Este mientras que los otros clados se localizan casi exclusivamente en el grupo Oeste. Ya sea con la prueba de SAMOVA o NCPA, el desierto de Chihuahua sigue siendo la barrera más importante entre estos grupos y la fragmentación debe haber sucedido durante la aridificación de algún periodo interglacial anterior al Holoceno (Polyak and Asmerom, 2005; Jiménez-Moreno et al., 2007).

Nuestros resultados concuerdan con lo obtenido para otras coníferas con distribución similar a *P. strobiformis*. *Picea chihuahuana*, una especie simpátrica a *P. strobiformis*, no presenta un patrón filogeográfico claro con microsátélites de cloroplasto, a pesar de la alta diferenciación de algunas poblaciones (Jaramillo-Correa et al., 2006). Evidencia fósil sugiere que el rango de distribución de *P. chihuahuana* era mucho más amplio en el UMG (Caballero et al., 1999; Metcalfe et al., 2002). Bajo este escenario de expansión del rango, efectos fundadores repetidos y una baja tasa de migración entre demes, producirían alta diferenciación genética entre poblaciones (Excoffier, 2004). Un patrón similar se encontró en poblaciones de varias especies del género *Abies* del centro y sur de México: alta estructura, pero sin un patrón filogeográfico generalizado (Jaramillo-Correa et al., 2008). También para *Abies* existe evidencia fósil de un aumento en el rango de distribución durante periodos glaciales (Lozano-García et al., 2005; Lozano-García and Vázquez-Selem, 2005), que sin embargo no fue detectado genéticamente por los métodos utilizados.

En un trabajo con *Pinus pseudostrobus* y *P. montezumae* usando NCPA se encuentra un patrón mixto de expansión contigua del rango, aislamiento por distancia, colonización a larga distancia y fragmentación (Delgado et al., 2007). Este patrón fue interpretado como producto de las expan-

siones del rango durante periodos glaciales, seguidas por fragmentación y aislamiento durante los interglaciales.

Recientemente han surgido muchas críticas respecto a la eficacia y exactitud del NCPA para inferir procesos históricos (Moya et al., 2007; Panchal and Beaumont, 2007). Sin embargo, nuestros resultados coinciden con lo obtenido por métodos independientes:

1. Fragmentación alopátrica antigua - SAMOVA y N_{ST}
2. Expansión contigua del rango - Prueba de diferencias pareadas (*mismatch*) y prueba de neutralidad de Fu.
3. Aislamiento por distancia - prueba de Mantel

Esto muestra que el NCPA posee la capacidad de detectar procesos históricos, pero como se basa en una genealogía de las muchas posibles (Hey and Machado, 2003), es necesario utilizar todas las herramientas disponibles para hacer inferencias robustas.

4. Relaciones filogenéticas entre *Pinus strobiformis*, *Pinus ayacahuite* y *Pinus flexilis*

4.1. Introducción

Establecer las relaciones filogenéticas entre taxa de reciente divergencia ha resultado problemático debido al polimorfismo compartido (Syring et al., 2007b). Esto es debido a que la monofilia recíproca es el criterio más utilizado para definir especies utilizando información genética (Knowles and Carstens, 2007). Este criterio ha resultado muy útil en el caso de taxa con divergencias antiguas o aislamiento reproductivo claro, pero para otros taxa, el reparto incompleto de linajes lleva a que las genealogías de genes que no reflejen la genealogía de la especie y por lo tanto da lugar a resultados equívocos (Maddison and Knowles, 2006). Bajo un modelo de coalescencia, se espera que el tiempo al ancestro común más reciente (MRCA en inglés) sera largo para tamaños efectivos poblacionales grandes (Nordborg, 2001), en este caso la monofilia recíproca se alcanzaría mucho después de la divergencia de las especies.

Como se mencionó en el Capítulo 1, el complejo de especies *Pinus ayacahuite-strobiformis-flexilis*, es un ejemplo de divergencia reciente, ya que aunque los tres grupos presentan características morfológicas, ecológicas y de nicho que las distinguen (Steinhoff and Andersen, 1971; Pavek, 1993; Pérez de la Rosa, 1993; Musálem and Ramírez, 2003), a nivel genético ha sido difícil establecer sus relaciones debido al polimorfismo compartido y a la incongruencia entre las genealogías de distintos genes no ligados (Syring et al., 2007b,a).

En la mayoría de los trabajos sobre las relaciones filogenéticas dentro del género *Pinus*, los genes tradicionalmente usados para reconstrucción filogenética (*rbcL*, *matK*, *rpl16*, etc.; Geada López et al. (2002); Gernandt et al. (2003, 2005); Willyard et al. (2007)), no presentan suficiente variación informativa para establecer las relaciones dentro de este complejo de especies (Gernandt et al., 2005; Liston et al., 2007; Syring et al., 2007b,a). Entonces, la propuesta en este trabajo es utilizar secuencias no codificantes de cloroplasto, ya que estos marcadores neutrales podrían contener más sitios informativos y ayudar a establecer las relaciones entre especies de reciente divergencia. Aunado a esto, es importante usar varios individuos por especie para evitar sesgos producto de estructura geográfica o por introgresión con otras especies no tan cercanas. Por ejemplo, *Pinus lambertiana* presenta evidencia de captura de cloroplasto de otra especie (posiblemente *Pinus albicaulis*) en la porción norte de su rango de distribución, por lo que las reconstrucciones

filogenéticas usando muestras de distintas zonas producían resultados contrastantes (Liston et al., 2007).

Los objetivos de este capítulo son:

1. Identificar aquellas regiones no codificantes del cloroplasto que presenten suficiente variación para diferenciar a los miembros del complejo de especies: *Pinus strobiformis-flexilis-ayacahuite*.
2. Reconstruir las relaciones filogenéticas de aquellas regiones variables para los miembros del complejo *Pinus strobiformis-flexilis-ayacahuite* y otros pinos de la subsección *Strobus*.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Amplificación de regiones no codificantes de cloroplasto de *Pinus*

Se exploró el genoma del cloroplasto de *Pinus thunbergii* y *Pinus koraiensis* (no. de acceso de GeneBank D17510 y NC_004677), buscando regiones variables. Se eligieron tres: el espaciador intergénico de *atpB-rbcL*, una región no codificante llamada *IRF169* que contiene el microsatélite Pt71936 de *P. thunbergii* (Vendramin et al., 1996) y la región comprendida entre los sitios no codificantes 36207-36781 del cloroplasto de *P. thunbergii*. El espaciador *atpB-rbcL* se amplificó usando la secuencia de primer anclada en *rbcL* reportada en Demesure et al. (1995) y el primer anclado en *atpB* fue diseñado usando MacVector 6.0. Los primers para la amplificación de *IRF169* y la región 36207-36781 fueron diseñados usando MacVector 6.0, tomando como base la alineación de las secuencias de cloroplasto completo de *P. thunbergii* y *P. koraiensis*. Además de los primers diseñados expresamente para este trabajo, se utilizaron los primers universales para amplificar el intrón de *trnL* y el espaciador *trnL-trnF*, reportados por Taberlet et al. (1991), y para amplificar el intrón de *trnG* y el espaciador *trnG-trnS*, reportados por Shaw et al. (2005). En la Cuadro 4.1 se resume la información sobre los primers.

Cuadro 4.1: Descripción de los primers para amplificación de regiones no codificantes de cloroplasto.

Nombre	Secuencia	Tm	Tamaño (pb)
atpB rbcL ¹	5'-GAGACATCCAGTACTGGGCCA-3' 5'-GCTTTAGTCTCTGTTTGTGG-3'	57°C 59°C	820
IRF169-F IRF169-R	5'-GGACAACAAACATCCATCTCG-3' 5'-GGGTTCGGTTCTAATGCTTG-3'	51°C 51°C	650
36207-F 36781-R	5'-GAGCCAATCTATTCTTCCGC-3' 5'-GGGAGGAGAGATGAGGAGAATAAC-3'	51°C 53°C	550
trnL(c) ² trnF(f) ²	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'	51°C 51°C	850
trnG2G ³ trnG ³	5'-GCGGGTATAGTTTGTGGTAAAA-3' 5'-GTAGCGGGAATCGAACCCGCATC-3'	55°C 55°C	800
trnG2S ³ trnS ³	5'-TTTTACCACTAACTATAACCCGC-3' 5'-AGATAGGGATCGAACCCTCG-3'	55°C 55°C	630

¹ Demesure et al. (1995); ² Taberlet et al. (1991); ³ Shaw et al. (2005).

Para cada par de primers, se amplificaron 5 individuos representativos de las 3 especies a analizar, y en el caso de atpB-rbcL y 36207-36781 sólo se secuenciaron individuos de *Pinus strobiformis*. La amplificación de las regiones atpB-rbcL, IRF169 y 36207-36781, se realizó utilizando las condiciones reportadas en Parducci and Szmidt (1999): Tris-HCl 10mM, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 μM de cada primer, 600 μM de dNTPs, 1U Taq polimerasa y de 20-30 ng de DNA. El programa de PCR fue: 4 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C (para atpB-rbcL) ó 1 min a 53°C (para IRF169 y 36207-36781) y 3 min a 72°C, y una extensión final de 10 min a 71°C. El intrón trnG y el espaciador trnG-trnS se amplificaron según lo reportado en Shaw et al. (2005). Las condiciones son: Buffer Tris-HCl 1X, 800 μM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 0.1 μM de cada primer y 1U Taq. El programa es: 5 min a 80°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C y 2 min a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C. El fragmento trnL-trnF fue amplificado usando condiciones modificadas del original (Taberlet et al., 1991): Buffer Tris-HCl 1X, 3 mM de MgCl₂, 800 μM de dNTPs, 0.2 μM de cada primer, 1 U de Taq polimerasa y de 20-30 ng de DNA. La reacción consta de 5 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 5 min a 51°C y 2 min a 72°C, seguidos de una extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron purificados a partir de un gel de agarosa usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). Una parte de las reacciones de secuenciación se realizaron usando Big Dye ver. 3.1 en un secuenciador Applied Biosystems 3100 Genetic Analyser, y otra parte se secuenció usando el servicio de secuenciación del Macrogen (www.macrogen.com, Corea). Las secuencias se alinearon manualmente, usando el programa SeAl ver. 2.011. En caso de encontrar polimorfismo, se secuenciaron 9 individuos representativos de *Pinus flexilis*, 13 de *Pinus ayacahuite* y 58 de *Pinus strobiformis*, abarcando toda el área de distribución de esta última

especie. Los números de acceso a GeneBank de cada uno de los haplotipos distintos encontrados se encuentran en el Cuadro A.1 (Apéndice A.3) .

4.2.2. Análisis filogenético

Máxima Parsimonia

A partir de las regiones polimórficas, se realizó un análisis de máxima parsimonia de todas las variantes haplotípicas encontradas en la muestra de *P. flexilis*, *P. strobiformis* y *P. ayacahuite*, además de varios miembros de la subsección *Strobis* y algunos grupos externos obtenidos de GenBank. La información sobre las secuencias de los otros miembros de la subsección *Strobis* y los grupos externos se presenta en el Cuadro A.2(Apéndice A.3). El análisis de máxima parsimonia se realizó con PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002), codificando los gaps como 5to. estado, tomando las deleciones de más de un par de bases como un solo evento (Simmons and Ochoterena, 2000; Müller, 2006). Se realizó una búsqueda heurística con 100 repeticiones y usando el algoritmo de intercambio TBR (tree-bisection-reconnection). Los valores de bootstrap se estimaron con 1000 replicas.

Máxima verosimilitud

Usando la misma base de datos que el apartado anterior pero considerando los gaps como datos faltantes, se realizó un análisis de máxima verosimilitud utilizando PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). Se determinó el modelo de sustitución más adecuado para la muestra utilizando el criterio de información de Akaike (AIC) implementado por MODELTEST 3.7 (Posada and Crandall, 1998, 2001b). El análisis de máxima verosimilitud se realizó usando una búsqueda heurística con 100 repeticiones y con adición aleatoria de 10 árboles. De obtenerse más de un árbol, se calculó un consenso por regla de mayoría. A partir del árbol consenso, se obtuvieron los valores de bootstrap usando 1000 replicas.

Análisis de parsimonia con restricciones topológicas

Se ha reportado que una buena parte de la variación de secuencias de cloroplasto en coníferas consiste de inserciones y deleciones (Horning and Cronn, 2006; Müller, 2006; Syring et al., 2007b). Por lo tanto, se consideró incluir esta información en el análisis de máxima verosimilitud para obtener un árbol que incorpore la mayor información posible. Esto se hizo utilizando la topología resultante del análisis de máxima verosimilitud como restricción para un análisis de máxima parsimonia. El resto del análisis se realizó como el análisis de máxima parsimonia sin restricciones topológicas.

Parsimonia estadística

Las especies cercanamente relacionadas y de reciente divergencia pueden presentar polimorfismo ancestral compartido (Maddison and Knowles, 2006; Syring et al., 2007b). En estos casos, los haplotipos derivados coexisten con los ancestrales y las relaciones entre los genes no siempre se pueden representar como un patrón bifurcante, por lo que una red resulta más adecuada para representar la genealogía (Posada and Crandall, 2001). Usando la matriz de datos obtenidas de las 80 secuencias del locus trnL-trnF de *P. flexilis*, *P. strobiformis* y *P. ayacahuite* que resultaron polimórficas, se construyó una red usando un criterio de parsimonia estadística que incorpora la información de frecuencia haplotípica para estimar la propabilidad de las conexiones (Clement et al., 2000). La red se construyó usando el programa TCS ver. 1.21 (Clement et al., 2000), utilizando los gaps como 5to. estado, tomando las deleciones de más de 2 bases como un sólo evento, y con un límite de conexión del 90 %. Además de las 80 secuencias antes mencionadas, se incluyeron secuencias de *P. strobis*, *P. lambertiana* y *P. albicaulis* obtenidas de GeneBank.

4.3. Resultados

De las 6 regiones no codificantes de cloroplasto exploradas, sólo una, trnL-trnF, tuvo suficiente polimorfismo informativo para realizar análisis filogenéticos. Otra región, IRF169, no se pudo secuenciar de manera consistente ya que dentro de dicha región existe un microsatélites de más de 14 repeticiones que ocasiona la caída de la lectura del secuenciador. El espaciador atpB-rbcL sólo presentó polimorfismo de longitud y pocas sustituciones, pero no resultaban informativos por ser en su mayoría haplotipos únicos. El resto de las regiones no presentaron polimorfismo. De las 80 secuencias de trnL-trnF, se encontraron 6 haplotipos, 5 sitios variables de 866 y 5 sitios con gaps. Los número de acceso de las secuencias obtenidas para las 6 regiones están en el apéndice A.

De los 80 individuos secuenciados de *P. flexilis*, *P. strobiformis* y *P. ayacahuite*, se identificaron 6 haplotipos. El haplotipo más abundante está compartido por las 3 especies y se encontró en 67 individuos. La mayor variación se encontró en *P. flexilis*, con varios haplotipos restringidos a una región geográfica, menos en algunos individuos de Colorado y California que comparten el haplotipo más abundante con el resto de los individuos de *P. strobiformis* y *P. ayacahuite*. Estas últimas dos especies presentaron en su conjunto 3 haplotipos distintos: el más abundante distribuido ampliamente desde Colorado hasta Guatemala, otro compartido entre un individuo de *P. strobiformis* de Chihuahua y otro de *P. ayacahuite* de Puebla y un tercer haplotipo compartido entre un individuo de *P. flexilis* de Utah y otro individuo de *P. ayacahuite* de Chiapas.

Maxima parsimonia (MP) El alineamiento completo constó de 578 caracteres constantes, 58 caracteres variables no informativos y 25 caracteres informativos para parsimonia. Se obtuvo un

sólo árbol más parsimonioso (Fig. 4.1) con un largo total de 102 pasos (CI 0.892, RI 0.78 y HI 0.108), considerando sólo caracteres informativos para parsimonia.

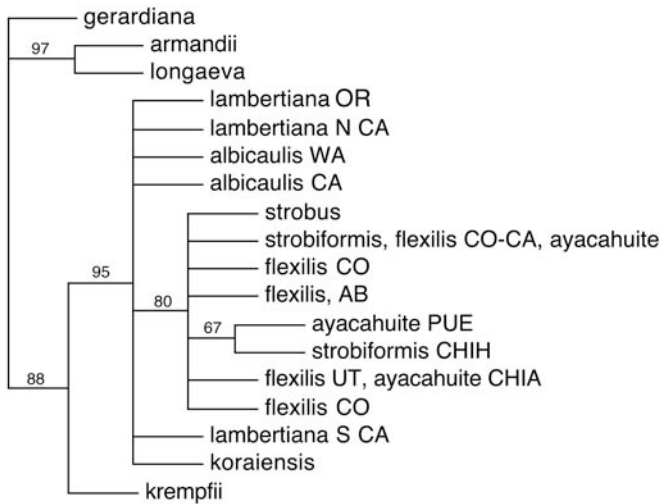


Figura 4.1: Árbol de máxima parsimonia de la región trnL-trnF de cloroplasto para pinos blandos (Subgénero *Strobis*). Para los casos en que más de un individuo por especie fue incluido en la reconstrucción, se especificó la región geográfica de origen del individuo. Nomenclatura: **OR** Oregon; **N CA** norte de California; **WA** Washington; **CA** California; **CO** Colorado; **AB** Alberta Canadá; **PUE** Puebla; **CHIH** Chihuahua; **CHIA** Chiapas; **UT** Utah; **S CA** sur de California. strobiformis y ayacahuite representan varios individuos con el mismo haplotipo tomados de todo el rango de distribución de la especie.

Máxima verosimilitud (MV) Se seleccionó el modelo de sustitución k81uf+I (modelo con dos parámetros de transversión y una frecuencia desigual, más sitios invariables) usando el criterio de información de Akaike implementado por Modeltest 3.7 (Posada and Crandall, 1998). Se obtuvieron 2 árboles (Fig. A.1 en el Apéndice A) y el consenso se calculó usando regla de mayoría (Fig. 4.2).

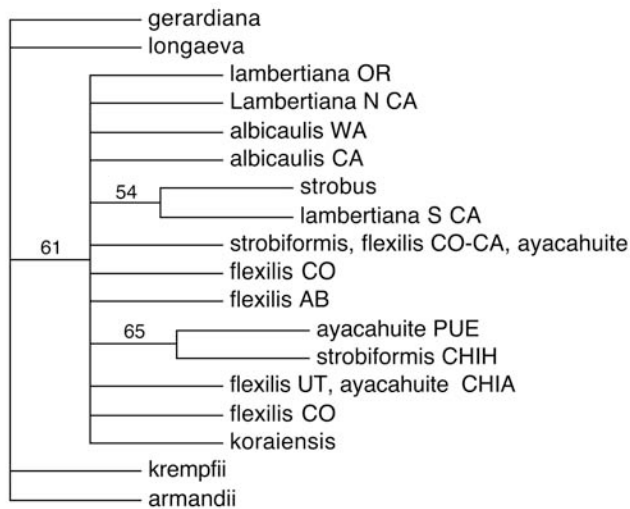


Figura 4.2: Arbol consenso de las relaciones entre trnL-trnF de pinos blancos usando verosimilitud. Los valores de bootstrap basado en 1000 repeticiones están sobre las ramas.

Máxima parsimonia con restricciones topológicas (MPR) Esta última topología del árbol consenso de máxima verosimilitud se cargó como restricción para un análisis de máxima parsimonia y a partir de ahí se obtuvo un único árbol más resuelto, que incorpora la información de los in-dels (Fig. 4.3).

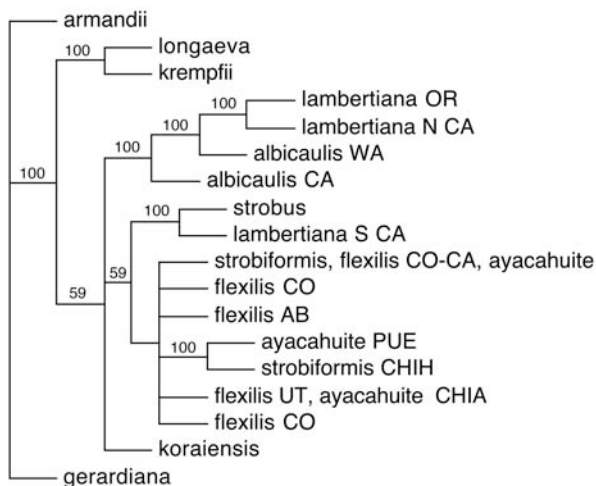


Figura 4.3: Reconstrucción de las relaciones filogenéticas de la región trnL-trnF utilizando máxima parsimonia sobre una topología obtenida por máxima verosimilitud. La nomenclatura de las hojas es igual a la Fig. 4.1. Valores de bootstrap sobre las ramas.

Red de haplotipos con parsimonia estadística La Fig. 4.4 muestra la reconstrucción de la red entre los haplotipos de las especies americanas de la subsección *Strobos*. No se incluyeron los otros miembros del subgénero *Strobos* porque el número de pasos mutacionales entre haplotipos imposibilitaron la conexión.

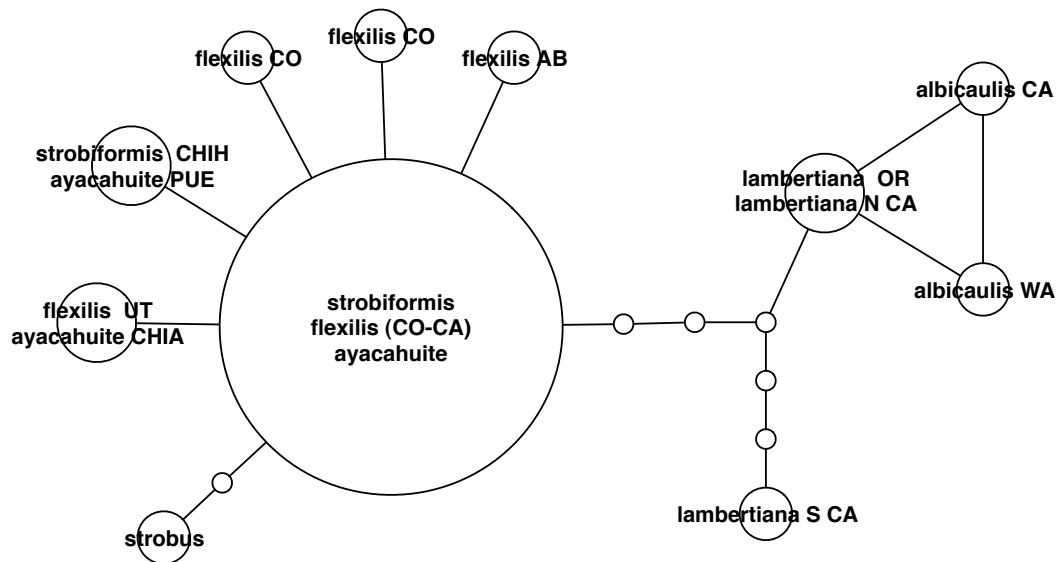


Figura 4.4: Red de haplotipos de trnL-trnF entre las especies norteamericanas de la subsección *Strobos*. La nomenclatura igual a la Fig. 4.1. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos.

4.4. Discusión

Las reconstrucciones filogenéticas y genealógicas arrojaron resultados similares: existe polimorfismo compartido y generalizado entre los miembros del complejo *Pinus flexilis-ayacahuite-strobiformis*. Un haplotipo fue el más abundante y es compartido por las tres especies, otros dos haplotipos son compartidos sólo por un par de especies (*P. ayacahuite* y *P. strobiformis*; *P. flexilis* y *P. ayacahuite*), y tres haplotipos son exclusivos de *P. flexilis* (Figs. 4.1-4.4). Esto último sugiere que la divergencia de *P. flexilis* fue más temprana, porque posee mayor variación exclusiva, sin embargo, el polimorfismo reducido de esta región de DNA impide la estimación confiable de tiempos de divergencia (Arbogast et al., 2002). En general, el bajo polimorfismo encontrado en regiones que abarcan un total de 3300 pb del genoma de cloroplasto, sugiere que ha pasado poco tiempo entre la divergencia de estas tres especies y sus parientes más cercanos *P. strobos* y *P. chiapensis* (Syring et al., 2007b,a), y aun menos tiempo desde la divergencia de estos tres linajes. El número de haplotipos y sitios segregantes está relacionado con el tiempo transcurrido hasta el MRCA (Watterson, 1975; Avise et al., 1987). Cuando las divergencias son recientes, el tiempo transcurrido

es insuficiente para que la mutación genere suficiente polimorfismo en las poblaciones y para que la deriva génica complete el reparto de linajes generando monofilia recíproca (Avice et al., 1987; Avice, 2000; Posada and Crandall, 2001; Rosenberg, 2003).

A pesar de que la resolución de los árboles y la red no es suficiente para establecer las relaciones entre *P. flexilis*, *P. strobiformis* y *P. ayacahuite*, sí obtiene topologías consistentes con análisis previos. Primero, agrupa a las especies antes mencionadas con *P. strobus* en la reconstrucción con MP y MPR, aunque en el árbol de MV ese clado no está resuelto (Figs. 4.1-4.3). Esto es consistente con las filogenias de la Subsección *Strobus* que se han realizado con distintos marcadores (Gernandt et al., 2005; Liston et al., 2007; Syring et al., 2007b,a). Segundo, *P. lambertiana* se separa en dos grupos en los árboles de MP y MPR (Figs. 4.1 y 4.3), uno que se asocia con las especies netamente norteamericanas y otro que se agrupa con *P. albicaulis*, que pertenece a un clado asiático-norteamericano (Fig. 1.3). Esta aparente incongruencia surge porque *P. lambertiana* tiene dos genomas de cloroplasto estructurados geográficamente. Uno de esos genomas localiza en el norte de la distribución de *P. lambertiana* y está cercanamente relacionado con *P. albicaulis*, el otro se distribuye al sur y está cercanamente relacionado con *P. strobus* y las otras especies norteamericanas de la subsección (Liston et al., 2007). Las relaciones de *P. lambertiana* no son tan evidentes en el árbol de MV (Figs. 4.2), por la baja resolución del primero y por el escaso número de especies asiáticas de la Subsección *Strobus* que se incluyeron. *P. koraiensis* y *P. armandii* pertenecen también a la Subsección *Strobus*, pero el grado de divergencia de sus secuencias es tal, que dificultaba la reconstrucción. El caso de *P. armandii* es particularmente notable, porque en todos los análisis se agrupó con alguno de los grupos externos. Esto puede deberse a que la región no codificante utilizada es demasiado variable para reconstruir relaciones entre subsecciones.

En conclusión, se requiere recopilar marcadores con mayor variación molecular para distinguir las relaciones entre especies de divergencia reciente. Los genes nucleares de copia única, y marcadores mitocondriales son buenos candidatos para este tipo de reconstrucciones (Schaal and Olsen, 2000; Caicedo and Schaal, 2004). Sin embargo, es necesario utilizar métodos que tomen en cuenta el polimorfismo compartido, porque la monofilia recíproca es altamente improbable (Maddison and Knowles, 2006).

Considerando lo anterior, queda todavía la pregunta de si estas tres especies son realmente linajes diferentes. Los marcadores moleculares de secuencia no lo establecen con certeza, aunque los haplotipos exclusivos de *P. flexilis* lo sugieren. Los microsatélites de cloroplasto indican que existe estructuración filogeográfica, pero con cierto grado de flujo génico (Cap. 2). Por último, la información ecológica de estas especies indica que ocupan nichos distintos. Las tres especies ocupan zonas templadas y montañosas, sin embargo, sus tolerancias al frío, la sequía, el calor y otras características fisiológicas (p.e. tasa de crecimiento) son claramente distintas (Steinhoff and Andersen, 1971; Farjon and Styles, 1997; Musálem and Ramírez, 2003), por lo que los procesos

ecológicos son los pueden estar detrás de la especiación.

5. Conclusiones generales

La estructura filogeográfica de *Pinus strobiformis* reafirmó la noción del origen reciente de muchas especies de pinos en México, como se planteó en la hipótesis 1 (Capítulo 1). Marcadores moleculares caracterizados por su alto polimorfismo, como los microsátélites de cloroplasto, no fueron suficientes para distinguir de manera clara a las especies del grupo *strobiformis-ayacahuite-flexilis*. Esto indica que en dicho complejo todavía no se ha logrado monofilia recíproca, ya sea porque la divergencia es muy reciente o por introgresión. Los microsátélites de cloroplasto poseen una tasa de mutación mayor a la de regiones no codificantes de cloroplasto, pero menor a la de regiones no codificantes de núcleo (Shaw et al., 2005; Syring et al., 2007b; Willyard et al., 2007). Al mismo tiempo, el tamaño efectivo del cloroplasto es menor al del núcleo, por lo que se esperaba que el tiempo de coalescencia del cloroplasto fuera menor (Wright et al., 2008). Por lo tanto, que las regiones no codificantes de núcleo tampoco posean monofilia recíproca en muchos de los taxa dentro de la subsección *Strobus*, confirma el origen reciente de muchas de estas especies (Syring et al., 2007b).

A pesar de la falta de monofilia recíproca, fue posible recuperar una señal filogeográfica que distingue a *P. strobiformis* de *P. ayacahuite*, al menos en sus principales áreas de distribución. La Sierra Madre Occidental resultó ser la zona con mayor variación genética dentro del rango de *P. strobiformis*, además de poseer numerosos haplotipos únicos. La Sierra Madre Occidental concentra las poblaciones más grandes y la distribución menos fragmentada de la especie, mientras que el resto de las poblaciones consisten de pequeños manchones aislados con unos pocos individuos. Justo en estas poblaciones del límite de la distribución (Sierra Madre Oriental, Faja Volcánica Trans-Mexicana y El Cuale) se encontró evidencia de introgresión con *P. ayacahuite*. Sin embargo, debe considerarse que en el presente trabajo no se incluyeron poblaciones de todo el rango de distribución de *P. ayacahuite*, sino sólo del límite norte. Un trabajo que incluye todo el rango de *P. ayacahuite* muestra que la variación genética está distribuída en dos grupos con el Istmo de Tehuantepec como principal barrera, por lo que existen más haplotipos en *P. ayacahuite* que no fueron muestreados (Ortiz Medrano et al., 2008).

Las relaciones con *P. flexilis* son más difíciles de establecer por lo reducido de la muestra. Se encontró un haplotipo (posiblemente ancestral) compartido con las otras dos especies, además de la evidencia morfológica que sugiere introgresión en algunas poblaciones del norte de Arizona y Nuevo México. Sin embargo, en las Sky Islands no hay evidencia de introgresión con *P. flexilis*, ya

que todos los haplotipos ahí presentes también se encuentran en la Sierra Madre Occidental y no comparten haplotipos con *P. flexilis*. Esto último refuerza la idea de que las poblaciones del límite norte de la distribución se originaron a partir de poblaciones en la Sierra Madre Occidental.

Como se mencionó anteriormente, la estructura filogeográfica no refleja exactamente la taxonomía, pero sí arroja luz sobre varios procesos poblacionales del pasado abordados en las hipótesis. Primero, se identificó al desierto de Chihuahua como la principal barrera al flujo génico. Esta barrera parece ser antigua, sin embargo hay evidencia de que ha sido cruzada ocasionalmente. El flujo génico entre regiones pudo ser producto de expansiones poblacionales durante los periodos glaciales. Estas expansiones dejaron una fuerte señal genética en las dos principales zonas geográficas estudiadas.

El efecto de los ciclos glaciales sobre la flora de los trópicos y subtrópicos ha sido poco estudiado. En México, la flora de ecosistemas de montaña concentra un alto porcentaje de la diversidad total de plantas vasculares, por lo que es de esperarse que las alteraciones ambientales producto de las glaciaciones hayan contribuido en mayor medida a la diversificación de numerosos grupos de afinidad templada como las coníferas. La depresión de la línea de las nieves seguido por el movimiento altitudinal de la vegetación permitió la expansión de bosques de coníferas a tierras bajas durante los máximos glaciares, produciendo ciclos de flujo génico y expansiones poblacionales seguidas de aislamiento y fragmentación. En el caso particular de especies con preferencias por condiciones frías y húmedas como *Pinus strobiformis*, pudieron prosperar durante los periodos glaciales y mantener altos niveles de variación genética. Sin embargo, la falta de registros fósiles con la resolución adecuada impide establecer con precisión la magnitud de los cambios en las poblaciones de esta especie, por lo que serían necesarias otro tipo de aproximaciones como los análisis basados en coalescencia, para reconstruir su rango de distribución durante el Pleistoceno.

5.1. Perspectivas

En este trabajo quedaron varias preguntas sin responder, en particular, sobre las relaciones entre *P. strobiformis*, *P. flexilis* y *P. ayacahuite*. Por lo observado con microsatélites de cloroplasto, la presencia de polimorfismo ancestral compartido no permite distinguir claramente a las especies ni estimar tiempos de divergencia, al no existir un modelo de mutación confiable. Aunado a esto, el cloroplasto sólo nos cuenta una parte de la historia: la del flujo génico a través de polen. Por esto, sería necesario usar más loci independientes para construir una historia integral y distinguir procesos como expansiones poblacionales de selección natural. Sin embargo, un mejor muestreo de *P. flexilis* aunado al uso combinado de marcadores moleculares como secuencias de DNA de organelos y genes nucleares de copia única permitirían la aplicación de métodos estadísticos basados en coalescencia que pueden lidiar con el polimorfismo ancestral, delimitar especies y estimar

los tiempos de divergencia (Nielsen and Wakeley, 2001; Hey and Nielsen, 2007; Knowles and Carstens, 2007).

La distribución de *P. flexilis*, *P. strobiformis* y *P. ayacahuite* es contigua y presentan compatibilidad reproductiva, lo cual dificulta la identificación clara de los taxa en los límites de su distribución, como lo demuestran los numerosos reportes de individuos intermedios entre *P. flexilis*-*P. strobiformis* y *P. strobiformis*-*P. ayacahuite* (Steinhoff and Andersen, 1971; Perry, 1991; Pérez de la Rosa, 1993; Farjon and Styles, 1997; Musálem and Ramírez, 2003). Los efectos de las glaciaciones sobre *P. flexilis* han sido bastante estudiados y existe un registro fósil bastante completo. Sin embargo, poco se conoce sobre su posible contacto con *P. strobiformis* en los refugios pleistocénicos. La ausencia de fósiles de *P. strobiformis* no permite delimitar la distribución norte de esta especie, por lo que no es posible establecer si las poblaciones norteñas de *P. strobiformis* fueron desplazadas hacia el sur durante el UMG o se mezclaron con las poblaciones de *P. flexilis*. Para responder esta pregunta sería necesario contar con un muestreo más completo del rango sur de *P. flexilis* y del rango norte de *P. strobiformis*, sobre todo de las poblaciones del Desierto de Chihuahua, y utilizar marcadores adicionales que permitieran evaluar la posible introgresión entre estos taxa, por ejemplo los microsatélites nucleares. Un mejor muestreo de las poblaciones del Desierto de Chihuahua y el uso de marcadores con más resolución, permitirían también reconstruir la posible ruta de migración de *P. strobiformis* a través del desierto y explicar la distribución disjunta de esta especie.

La introgresión con *P. ayacahuite* quedó manifiesta en este trabajo, sin embargo, menores niveles de variación genética y alta diferenciación poblacional en *P. ayacahuite* (Ortiz Medrano, 2007), sugieren que la historia de esta especie ha sido distinta a la de *P. strobiformis*. Las condiciones ambientales en las regiones montañosas del Sur de México son poco conocidas y la poca evidencia paleoclimática existente sugiere que las condiciones fueron más frías y secas que el presente, condiciones poco propicias para *P. ayacahuite*. La modelación del nicho ecológico tomando en cuenta las posibles condiciones climáticas durante el Pleistoceno, podría ser una alternativa para explorar el efecto de las glaciaciones en la distribución de las especies. Así mismo, permitiría reconocer las variables climáticas que limitan la distribución de las tres especies, ya que sus nichos ecológicos son similares pero no iguales. Este tipo de aproximación se ha empezado a utilizar para delimitar especies de reciente divergencia y con distribuciones alopátricas (Raxworthy et al., 2007), y podría ser muy útil en nuestro caso.

Bibliografía

- Alcántara, O., Luna, I., Velazquez, A., 2002. Altitudinal distribution patterns of a Mexican cloud forests based upon preferential characteristic genera. *Plant Ecology* 161, 167–174.
- Arbogast, B., Edwards, S., Wakeley, J., Beerli, P., Slowinski, J., 2002. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33, 707–740.
- Arunyawat, U., Stephan, W., Städler, T., 2007. Using multilocus sequence data to assess population structure, natural selection and linkage disequilibrium in wild tomatoes. *Molecular Biology and Evolution* 24, 2310–2322.
- Avise, J., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge MA.
- Avise, J., Arnold, J., Martin Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J., Reeb, C., Saunders, N., 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489–522.
- Avise, J., Ball, R., Arnold, J., 1988. Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and ingreeding theory for neutral mutations. *Molecular Biology and Evolution* 5, 331–344.
- Betancourt, J., Aasen Rylander, K., Peñalba, C., McVikar, J., 2001. Late quaternary vegetation history of Rough Canyon, south-central New Mexico, USA. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 165, 71–95.
- Bradbury, J., 1997. Sources of glacial moisture in Mesoamerica. *Quaternary International* 43-44, 97–110.
- Bulgin, N., Gibbs, H., Vickery, P., Baker, A., 2003. Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). *Molecular Ecology* 12, 831–844.
- Caballero, M., Lozano-García, S., Ortega, B., Urrutia, J., Macías, J., 1999. Environmental characteristics of Lake Tecocomulco, Northern basin of Mexico, for the last 50,000 years. *Journal of Paleolimnology* 22, 399–411.
- Caballero, M., Ortega-Guerrero, B., 1998. Lake levels since about 40000 years ago at lake Chalco, near Mexico City. *Quaternary Research* 50, 69–79.

- Caicedo, A., Schaal, B., 2004. Population structure and phylogeography of *Solanum pimpenellifolium* inferred from nuclear gene. *Molecular Ecology* 13, 1871–1882.
- Carstens, B., Brunsfeld, S., Demboski, J., Good, J., Sullivan, J., 2005. Investigating the evolutionary history of the Pacific northwest mesic forest ecosystem: hypothesis testing within a comparative phylogeographic framework. *Evolution* 59, 1639–1652.
- Carstens, B., Knowles, L., 2007. Shifting distributions and speciation: species divergence during rapid climate change. *Molecular Ecology* 17, 619–627.
- Clemens, S., Tiedmann, R., 1997. Eccentricity forcing of Pliocene-early Pleistocene climate revealed in a marine oxygen-isotope record. *Nature* 385, 804–806.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657–1660.
- Colinvaux, P., 1996. Quaternary environmental history and forest diversity in the neotropics. In: Jackson, J., Budd, A., Coates, A. (Eds.), *Evolution and environment in tropical America*. University of Chicago Press, Chicago, IL, pp. 359–405.
- Corona, A., Toledo, V., Morrone, J., 2007. Does the Trans-Mexican Volcanic Belt represent a natural biogeographical unit? An analysis of the distributional patterns of Coleoptera. *Journal of Biogeography* 34, 1008–1015.
- Crandall, K., Templeton, A., 1993. Empirical tests of some predictions from coalescence theory with applications of intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134, 959–969.
- Cruzan, M., Templeton, A., 2000. Paleoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution* 15, 491–496.
- Delgado, P., Salas-Lizana, R., Vázquez-Lobo, A., Wegier, A., Anzidei, M., Alvarez-Buylla, E., Vendramin, G., Piñero, D., 2007. Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae): Morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences* 186, 861–875.
- Demesure, B., Sodzi, N., Petit, R., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4, 129–131.
- Donoghue, M., 2008. A phylogenetic perspective on the distribution of plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11549–11555.
- Donoghue, M., Smith, S., 2004. Patterns in the assembly of temperate forests around the Northern Hemisphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 359, 1633–1644.
- Emerson, B., Hewitt, G., 2005. Phylogeography. *Current Biology* 15, 367–371.
- Emerson, B., Paradis, E., Thèbaud, C., 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 707–716.

- Erwin, D., Schorn, H., 2005. Revision of the conifers from the Eocene Thunder Mountain flora, Idaho, U.S.A. *Review of Palaeobotany and Palynology* 137, 125–145.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J., 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591–1604.
- Excoffier, L., 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: Lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13, 853–864.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47–80.
- Farjon, A., Styles, B., 1997. *Flora Neotropica: Pinus* (Pinaceae). New York Botanical Garden, New York.
- Ferrari, L., López-Martínez, M., Rosas-Elguera, J., 2002. Ignimbrite flare-up and deformation in the southern Sierra Madre Occidental, western Mexico: Implications for the late subduction history of the Farallon plate. *Tectonics* 21, 1–24.
- Ferrusquía-Villafranca, I., 1993. Biological diversity of Mexico: Origins and distribution. Oxford University Press, New York, Ch. Geology of Mexico: a synopsis, pp. 3–108.
- Franco, M., Silvertown, J., 2004. A comparative demography of plants based upon elasticities of vital rates. *Ecology* 85, 531–538.
- Fu, Y., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- Geadá López, G., Kamiya, K., Harada, K., 2002. Phylogenetic relationships of *Diploxylon* pines (subgenus *Pinus*) based on plastid sequence data. *International Journal of Plant Sciences* 163, 737.
- Gernandt, D., Geadá López, G., Ortiz García, S., Liston, A., 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54, 29–42.
- Gernandt, D., Liston, A., Piñero, D., 2003. Phylogenetics of *Pinus* Subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* inferred from cpDNA sequences. *Systematic Botany* 28, 657–673.
- Gernandt, D., Magallon, S., Geadá López, G., Zeron Flores, O., Willyard, A., Liston, A., 2008. Use of simultaneous analyses to guide fossil-based calibrations of Pinaceae phylogeny. *International Journal of Plant Sciences* 169, 1086–1099.
- Gibbard, P., van Kolfschoten, T., 2004. The pleistocene and holocene epochs. In: Gradstein, F., Ogg, J., Smith, A. (Eds.), *A geologic time scale 2004*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 441–452.
- Gillespie, J., 2004. *Population genetics. A concise guide*. Johns Hopkins University Press.
- Graham, A., 1999. The tertiary history of the northern temperate element in the Northern Latin American biota. *American Journal of Botany* 86, 32–38.

- Hahn, M., Rausher, M., Clifford, W., 2002. Distinguishing between selection and population expansion in an experimental lineage of bacteriophage T7. *Genetics* 161, 11–20.
- Harpending, H., 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human biology* 66, 591.
- Harpending, H., Rogers, A., 2000. Genetic perspectives on human origins and differentiation. *Annual Review Genomics Human Genetics* 1, 361–385.
- Herbert, T., Schuffert, J., Andreasen, D., Heusser, L., Lyle, M., Mix, A., Ravelo, A., Stott, L., Herguera, J., 2001. Collapse of the California current during glacial maxima linked to climate change on land. *Science* 293, 71–76.
- Heuertz, M., Carnevale, S., Fineschi, S., Sebastian, F., Hausman, J., Paule, L., Vendramin, G., 2006. Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus sp.* (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology* 15, 2131–2140.
- Hewitt, G., June 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 909–913.
- Hewitt, G., 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10, 537–549.
- Hey, J., Machado, C., July 2003. The study of structured populations- new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4, 535–543.
- Hey, J., Nielsen, R., February 20 2007. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov Chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2785–2790.
- Holmgren, C., Norris, J., Betancourt, J., 2007. Inferences about winter temperatures and summer rains from the late Quaternary record of C4 perennial grasses and C3 desert shrubs in the northern Chihuahuan Desert. *Journal of Quaternary Science* 22, 141–161.
- Horning, M., Cronn, R., 2006. Length polymorphism scanning is an efficient approach for revealing chloroplast DNA variation. *Genome* 49, 134–142.
- Hudson, R., 1991. Gene genealogies and the coalescent process. Vol. 7 of *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Oxford, pp. 1–44.
- Jaramillo-Correa, J., Aguirre-Planter, E., Khasa, D., Eguiarte, L., Piñero, D., Furnier, G., Bousquet, J., 2008. Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern México and Guatemala. *Molecular Ecology* 17, 2476–2490.
- Jaramillo-Correa, J., Beaulieu, J., Ledig, F., Bousquet, J., 2006. Decoupled mitochondrial and chloroplast DNA population structure reveals Holocene collapse and population isolation in a threatened Mexican-endemic conifer. *Molecular Ecology* 15, 2787–2800.

- Jiménez-Moreno, G., Anderson, R., Fawcett, P., 2007. Orbital- and millennial-scale vegetation and climate changes of the past 225ka from Bear Lake, Utah-Idaho (USA). *Quaternary Science Reviews* 26, 1713–1724.
- Jones, F., Hamrick, J., Peterson, C., Squiers, E., 2006. Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. *Molecular Ecology* 15, 851–861.
- Knowles, L., Carstens, B., 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology* 56, 887–895.
- Lachniet, M., Vazquez-Selem, L., 2005. Last Glacial Maximum equilibrium line altitudes in the circum-Caribbean (Mexico, Guatemala, Costa Rica, Colombia, and Venezuela). *Quaternary International* 138-139, 129–144.
- Lanner, R., Van Devender, T., 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, Ch. The recent history of pinyon pines in the American Southwest, pp. 171–182.
- Latta, R., Linhart, Y., Mitton, J., 2001. Cytonuclear disequilibrium and genetic drift in a natural population of Ponderosa pine. *Genetics* 158, 843–850.
- Latta, R., Mitton, J., 1997. A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in Limber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* 146, 1153–1163.
- Latta, R., Mitton, J., 1999. Historical separation and present gene flow through a zone of secondary contact in Ponderosa pine. *Evolution* 53, 769–776.
- Lea, D., 2001. Ice ages, the California current and Devil's Hole- it's a matter of timing. *Science* 293, 59–60.
- Ledig, F., Bermejo-Velázquez, B., Hodgskiss, P., Johnson, D., Flores-López, C., Jacob-Cervantes, V., 2000. The mating system and genetic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of México's Sierra Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia. *Canadian Journal of Forest Research* 30, 1156–1164.
- Ledig, F., Hodgskiss, P., Jacob-Cervantes, V., 2002. Genetic diversity, mating system and conservation of a mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martínez. *Conservation Genetics* 3, 113–122.
- Liepelt, S., Bialozyt, R., Ziegenhagen, B., 2002. Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 14590–14594.
- Liston, A., Parker-Defeniks, M., Syring, J., Willyard, A., Cronn, R., 2007. Interspecific phylogenetic analysis enhances intraspecific phylogeographical inference: a case study in *Pinus lambertiana*. *Molecular Ecology* 16, 3926–3937.
- Lowe, J., Walker, M., 1997. Reconstructing quaternary environments. Longman, Essex, UK.
- Lozano-García, S., Ortega-Guerrero, B., Sosa-Nájera, S., 2002. Mid- to late- Wisconsin pollen record of San Felipe basin, Baja California. *Quaternary Research* 58, 84–92.

- Lozano-García, S., Sosa-Nájera, S., Sugiura, Y., Caballero, M., 2005. 23, 000 yr of vegetation history of the Upper Lerma, a tropical high-altitude basin in Central Mexico. *Quaternary Research* 64, 70–82.
- Lozano-García, S., Vázquez-Selem, L., 2005. A high-elevation Holocene pollen record from Iztaccíhuatl volcano, central Mexico. *The Holocene* 15, 329–338.
- Luna Vega, I., Alcántara Ayala, O., Espinosa Organista, D., Morrone, J., 1999. Historical relationships of the Mexican cloud forests: a preliminary vicariance model applying parsimony analysis of endemism to vascular plant taxa. *Journal of Biogeography* 26, 1299–1305.
- Maddison, W., Knowles, L., 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology* 55, 21–30.
- Marshall, C., Liebherr, J., 2000. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of Biogeography* 27, 203–216.
- Marshall, H., Newton, C., Ritland, K., 2002. Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in Lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 367–378.
- McAuliffe, J., Van Devender, T., 1998. A 22 000 year record of vegetation change in the north-central Sonoran Desert. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 141, 253–275.
- Metcalf, S., August 2006. Late quaternary environments of the northern deserts and Central Transvolcanic Belt of Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93, 258–273.
- Metcalf, S., Davies, S., Braisby, J., Leng, M., Newton, A., Terrett, N., O'Hara, S., 2007. Long and short-term change in the Pátzcuaro Basin, central Mexico. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 247, 272–295.
- Metcalf, S., O'Hara, S., Caballero, M., Davies, S., 2000. Records of the late Pleistocene-Holocene climatic change in Mexico, a review. *Quaternary Science Reviews* 19, 699–721.
- Metcalf, S., Say, A., Black, S., McCulloch, R., O'Hara, S., 2002. Wet conditions during the last glaciation in the Chihuahuan Desert, Alta Babicora Basin, Mexico. *Quaternary Research* 57, 91–101.
- Millar, C., 1998. Early evolution of pines. In: Richardson, D. (Ed.), *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, pp. 69–91.
- Miller, C., 1973. Silicified cones and vegetative remains of *Pinus* from the Eocene of British Columbia. *Museum of Paleontology University of Michigan* 24, 101–118.
- Mitton, J., Kreiser, B., Latta, R., 2000. Glacial refugia of Limber pine (*Pinus flexilis* James) inferred from the population structure of mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 9, 91–97.
- Moya, O., Contreras-Días, H., Oromí, P., Juan, C., 2007. Phylogeography of a ground beetle species in La Gomera (Canary Islands): the effects of landscape topology and population history. *Heredity* 99, 322–330.

- Müller, K., 2006. Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38, 667–676.
- Musálem, M., Ramírez, A., 2003. Monografía de *Pinus ayacahuite*. INIFAP, México D.F.
- Musgrove, M., James, E., Cheng, H., Edwards, R., Banner, J., Mack, L., Combs, D., 2001. Geocronology of late Pleistocene to Holocene speleothems from central Texas: Implications for regional paleoclimate. *Bulletin of the Geological Society of America* 113, 1532–1543.
- Navascués, M., Vaxenavidou, Z., González Martínez, S., Climent, J., Gil, L., Emerson, B., 2006. Chloroplast microsatellites reveal colonization and metapopulation dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology* 15, 2691–2698.
- Nielsen, R., Wakeley, J., 2001. Distinguishing migration from isolation: A Markov Chain Monte-carlo approach. *Genetics* 158, 885–896.
- Nordborg, M., 2001. Coalescent theory. In: Balding, D., Bishop, M., Cannings, C. (Eds.), *Handbook of statistical genetics*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 179–211.
- Nordborg, M., Innan, H., 2002. Molecular population genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 69–73.
- Ortega-Rosas, C., Peñalba, M., Guiot, J., 2008. Holocene altitudinal shifts in vegetation belts and environmental changes in Sierra Madre Occidental, Northwestern Mexico, based on modern and fossil pollen data. *Review of Palaeobotany and Palynology* 15, 1–20.
- Ortiz Medrano, A., 2007. Filogeografía de las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* revelada por microsatélites de cloroplasto. Tesis de licenciatura.
- Ortiz Medrano, A., Moreno-Letelier, A., Piñero, D., 2008. Fragmentación y expansión demográfica en las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* Aceptado.
- Panchal, M., Beaumont, M., 2007. The automation and evaluation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Evolution* 61, 1466–1480.
- Parducci, L., Szmidt, A., 1999. PCR-RFLP analysis of cpDNA in the genus *Abies*. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 802–808.
- Pavek, D., 1993. *Pinus strobiformis*. In: Fire effects information system (Online). USDA Forest Service.
URL <http://www.fs.fed.us/database/feis/>
- Peet, R., 2000. Forests and meadows of the Rocky Mountains. In: Barbour, M., Billings, W. (Eds.), *North American Terrestrial Vegetation*, 2nd Edition. Cambridge University Press, Cambridge MA, Ch. Forests and meadows of the Rocky Mountains, pp. 75–121.
- Pendall, E., Betancourt, J., Leavitt, S., 1999. Paleoclimatic significance of δD and $\delta^{13}C$ values in piñon pine needles from packrat middens spanning the last 40000 years. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 147, 53–72.

- Pérez de la Rosa, J., 1993. Taxonomía de *Pinus strobiformis* y *Pinus ayacahuite*. Tesis de maestría.
- Perry, J., 1991. The pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland.
- Peterson, L., Haug, G., Hughen, K., Röhl, U., 2000. Rapid changes in the hydrologic cycle of the tropical Atlantic during the last glacial. *Science* 290, 1947–1951.
- Petit, R., Aguinagalde, I., De Beaulieu, J., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J., Rendell, S., Vendramin, G., 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300, 1563–1565.
- Petit, R., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., Vendramin, G., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14, 689–701.
- Pfenninger, M., Posada, D., 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): Fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56, 1776–1788.
- Piperno, D., Moreno, J., Iriarte, J., Holst, I., Lachniet, M., Jones, J., Ranere, A., Castanzo, R., 2007. Late Pleistocene and Holocene environmental history of the Iguala Valley, Central Balsas Watershed of Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 11874–11881.
- Polyak, V., Asmerom, Y., 2005. Orbital control of long-term moisture in the southwestern USA. *Geophysical Research Letters* 32, L19709.1–L19709.4.
- Porter, S., 2001. Snowline depression in the tropics during the last glaciation. *Quaternary Science Reviews* 20, 1067–1091.
- Posada, D., Crandall, K., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Posada, D., Crandall, K., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 37–45.
- Posada, D., Crandall, K., 2001b. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50, 580–601.
- Posada, D., Crandall, K., Templeton, A., 2000. GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9, 487–488.
- Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N., Goldstein, D., Powell, W., 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153, 943–947.
- Qian, H., 2002. Floristic relationships between Eastern Asia and North America: test of Gray's hypothesis. *The American Naturalist* 160, 317–332.

- Raxworthy, C., Ingram, C., Rabibisoa, N., Pearson, R., 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology* 56, 907–923.
- Ray, N., Adams, J., 2001. A GIS-based vegetation map of the world at the last glacial maximum (25,000–15,000 BP).
- Ray, N., Currat, M., Excoffier, L., 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20, 76–86.
- Richard, M., Thorpe, R., 2001. Can microsatellites be used to infer phylogenies? evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular phylogenetics and evolution* 20 (3), 351–360.
- Robledo Arnuncio, J., Collada, C., Alía, R., Gil, L., 2005. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *Journal of Biogeography* 32, 595–605.
- Rogers, K., Wang, Y., 2002. Stable isotopes in pocket gopher teeth as evidence of Late Matuyama climate shift in the southern Rocky Mountains. *Quaternary Research* 57, 200–207.
- Rosenberg, N., 2003. The shapes of neutral gene genealogies in two species: probabilities of monophyly, paraphyly, and polyphyly in a coalescent model. *Evolution* 57, 1465–1477.
- Ruíz-Martínez, M., Werner, J., 1997. Research into the Quaternary sediments and climatic variations in NE Mexico. *Quaternary International* 43/44, 145–151.
- Rutherford, S., D'Hont, S., 2000. Early onset and tropical forcing of 100 000-year Pleistocene glacial cycles. *Nature* 408, 72–74.
- Rzedowski, J., 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14, 3–21.
- Rzedowski, J., 2005. México como área de origen y diversificación de linajes vegetales. In: Llorente Bousquets, J., Morrone, J. (Eds.), *Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines*. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., pp. 375–382.
- Schaal, B., Hayworth, D., Olsen, K., Rauscher, J., Smith, W., 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7, 465–474.
- Schaal, B., Olsen, K., 2000. Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7024–7029.
- Shaw, J., Lickey, E., Beck, J., Farmer, S., Liu, W., Miller, J., Siripun, K., Winder, C., Schilling, E., Small, R., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92, 142–166.
- Simmons, M., Ochoterena, H., 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49, 369–381.

- Slatkin, M., Hudson, R., 1991. Pair-wise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555–562.
- Stauffer, B., 1999. Cornucopia of ice core results. *Nature* 399, 412–413.
- Steinhoff, R., Andersen, J., 1971. Geographic variation in *Pinus flexilis* and *Pinus strobiformis* and its bearing on their taxonomic status. *Silvae Genetica* 20, 159–167.
- Swofford, D., 2002. PAUP*, phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Syring, J., Del Castillo, R., Cronn, R., Liston, A., 2007a. Multiple nuclear loci reveal the distinctiveness of the threatened, neotropical *Pinus chiapensis*. *Systematic Botany* 32, 703–717.
- Syring, J., Farrell, K., Businsky, R., Cronn, R., Liston, A., 2007b. Widespread genealogical non-monophyly in species of *Pinus* Subgenus *Strobus*. *Systematic Biology* 56, 163–181.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17, 1105–1109.
- Templeton, A., 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* 10, 779–791.
- Templeton, A., 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluation and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13, 789–809.
- Templeton, A., Boerwinkle, E., Sing, C., 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117, 343–351.
- Templeton, A., Routman, E., Phillips, A., 1995. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140, 767–782.
- Thompson, R., Anderson, K., 2000. Biomes of western North America at 18000, 6000 and 0¹⁴C yr BP reconstructed from pollen and packrat midden data. *Journal of Biogeography* 27, 555–584.
- Thompson-Arundel, S., 2002. Modeling climate limits of plants found in Sonoran desert packrat middens. *Quaternary Research* 58, 112–121.
- Van Devender, T., 1990a. Late quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan desert, United States and Mexico. In: Betancourt, J., Van Devender, T., Martin, P. (Eds.), *Packrat middens: the last 40 000 years of biotic change*. University of Arizona Press, pp. 104–133.
- Van Devender, T., 1990b. Late quaternary vegetation and climate of the Sonoran desert, United States and Mexico. In: Betancourt, J., Van Devender, T., Martin, P. (Eds.), *Packrat middens: the last 40 000 years of biotic change*. University of Arizona Press, pp. 133–165.

- Velázquez, A., Toledo, V., Luna, I., 2000. Mexican temperate vegetation. In: Barbour, M., Billings, W. (Eds.), *North American Terrestrial Vegetation*, 2nd Edition. Cambridge University Press, Cambridge MA, pp. 573–592.
- Vendramin, G., Lelli, L., Rossi, P., Morgante, M., 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5, 595–598.
- Wakeley, J., 2001. The coalescent in an island model of population subdivision with variation among demes. *Theoretical Population Biology* 59, 133–144.
- Walter, R., Epperson, B., 2001. Geographic pattern of genetic variation in *Pinus resinosa*: area of greatest diversity is not the origin of postglacial populations. *Molecular Ecology* 10, 103–111.
- Watterson, G., 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7, 256–276.
- Wendel, G., Clay Smith, H., 1990. Eastern white pine. In: Burns, R., Honkala, B. (Eds.), *Silvics of North America*. Vol. 1: Conifers. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, p. 877.
- Whitlock, C., Grigg, L., 1999. Paleoecological evidence of Milankovitch and Sub-Milankovitch climate variation in Western U.S. during the Late Quaternary. In: Clark, P., Webb, R., Keigwin, L. (Eds.), *Mechanisms of global climate change at millennial time scales*. No. 112 in *Geophysical monograph*. American Geophysical Union, pp. 227–241.
- Willyard, A., Syring, J., Gernandt, D., Liston, A., Cronn, R., 2007. Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Molecular Biology and Evolution* 24, 90–101.
- Wright, S., Nano, N., Foxe, J., Dar, V., 2008. Effective population size and tests of neutrality at cytoplasmic genes in *Arabidopsis*. *Genetical Research* 90, 119–128.

A. Apéndice

A.1. Haplotipos para los loci de cloroplasto Pt36718, Pt71936 y Pt30204

Las unidades de repetición para cada locus se encuentran entre corchetes

H1 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG--]
H2 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG---]
H3 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG---]
H4 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG-]
H5 [TTTTTTTTTTTT---] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG-]
H6 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG-]
H7 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG-]
H8 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGGG]
H9 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTTT] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG--]
H10 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTTT] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG---]
H11 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA--GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGG---]
H12 [TTTTTTTTTTTT---] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG---]
H13 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGG---]
H14 [TTTTTTTTTTTT---] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG---]
H15 [TTTTTTTTTTTT---] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG---]
H16 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTTT] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG-]
H17 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA--GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG--]
H18 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTTT] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGG---]
H19 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTTT] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGGG]
H20 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG---]
H21 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG--]
H22 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTTT] [AAAAAAAAAAAAAAAA-----GGGGGGGGGG-]
H23 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAAAGGGGGGGG---]
H24 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG--]
H25 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG-]
H26 [TTTTTTTTTTTTTT] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG-]
H27 [TTTTTTTTTTTT--] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAAAGGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGG---]
H28 [TTTTTTTTTTTTTT] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG--]
H29 [TTTTTTTTTTTTTT] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGG---]
H30 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAAAGGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG--]
H31 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGGG]
H32 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTTT] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG--]
H33 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG--]
H34 [TTTTTTTTTTTT-] [TTTTTTTTTTTTTT-] [AAAAAAAAAAAAAAAA-GGAAAGGAAAAAAAAA--GGGGGGGGGG-]

A.2. Codificación binaria de los haplotipos de microsatélites de cloroplasto

H1 1111111111101111111111111110111111111111011111111111100111111111100
H2 1111111111101111111111111110111111111111011111111111100111111111000
H3 1111111111100111111111111110111111111111011111111111100111111111000
H4 1111111111101111111111111110111111111111011111111111100111111111110
H5 1111111111100011111111111110111111111111011111111111100111111111110
H6 1111111111100111111111111110111111111111011111111111100111111111100
H7 1111111111100111111111111110111111111111011111111111100111111111110
H8 1111111111100111111111111110111111111111011111111111100111111111111
H9 1111111111100111111111111111111111111111011111111111100111111111100
H10 11111111111001111111111111111111111111111011111111111100111111111000
H11 1111111111100111111111111110111111111111001111111111100111111110000
H12 1111111111100011111111111110111111111111011111111111100111111111100
H13 1111111111100111111111111110111111111111011111111111100111111110000
H14 111111111110001111111111111011111111111101111111111110011111111000
H15 1111111111100011111111111110011111111111101111111111110011111111000
H16 111111111110011111111111111111111111111101111111111110011111111110
H17 1111111111100111111111111110111111111111001111111111110011111111100
H18 111111111110011111111111111111111111111101111111111110011111110000
H19 111111111110011111111111111111111111111101111111111110011111111111
H20 111111111110011111111111100111111111111011111111111100111111111000
H21 111111111110011111111111100111111111111011111111111100111111111100
H23 1111111111100111111111111001111111111110111111111111111111111000
H24 111111111110111111111111001111111111110111111111111001111111111100
H25 111111111110111111111111001111111111110111111111111001111111111110
H26 11111111111111111111111011111111111101111111111110111111111100111111110
H27 11111111111001111111111110111111111111111111111111111100111111110000
H28 111111111111111111111110111111111111011111111111101111111111001111111100
H29 1111111111111111111111101111111111110111111111111011111111110011111111000
H30 1111111111101111111111110111111111111111111111111111110011111111100
H31 1111111111101111111111110111111111111011111111111100111111111111
H32 111111111110111111111111111111111111011111111111100111111111100
H33 1111111111101111111111110111111111111011111111100011111111100
H34 1111111111101111111111110111111111111011111111100011111111110

A.3. Información sobre secuencias utilizadas en análisis filogenéticos

Cuadro A.1: Números de acceso a GeneBank de las secuencias obtenidas para *Pinus strobiformis*, *Pinus flexilis* y *Pinus ayacahuite*.

Región	Individuo	Especie	No. de acceso	Localidad
atpB-rbcL	EV16	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529007	Chihuahua, Mex.
	ES19	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529008	Durango, Mex.
	LM19	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529009	Durango, Mex.
	LM1	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529010	Durango, Mex.
	CHI5	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529011	Arizona, EUA
	LL1	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529012	Coahuila, Mex.
	CUA7	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529013	Jalisco, Mex.
36207-35781	EV13	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529014	Chihuahua, Mex.
	Zam6	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529015	Querétaro, Mex.
	BAL32	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529016	Chihuahua, Mex.
	CUA17	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529017	Jalisco, Mex.
	MCY15	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529018	Sonora, Mex.
trnL-trnF	LM17	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ528997	Durango, Mex.
	FlexB8	<i>Pinus flexilis</i>	FJ528998	Colorado, EUA
	PaaAB11	<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>ayacahuite</i>	FJ528999	Hidalgo, Mex.
	LA6	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ529000	Chihuahua, Mex.
	PaaCL1	<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>ayacahuite</i>	FJ529001	Puebla, Mex.
	FlexAB1	<i>Pinus flexilis</i>	FJ529002	Alberta, Can.
	FlexCO1	<i>Pinus flexilis</i>	FJ529003	Colorado, EUA
	FlexB1	<i>Pinus flexilis</i>	FJ529004	Colorado, EUA
	FlexUT1	<i>Pinus flexilis</i>	FJ529005	Utah, EUA
	RN14	<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>ayacahuite</i>	FJ529006	Chiapas, EUA
trnG	FlexB1	<i>Pinus flexilis</i>	FJ487564	Colorado, EUA
	LA6	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ487565	Chihuahua, Mex.
	LM17	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ487566	Durango, Mex.
	PaaX4	<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>ayacahuite</i>	FJ487567	Puebla, Mex.
	Tex1	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ487568	Texas, EUA
trnG-trnS	FlexB1	<i>Pinus flexilis</i>	FJ487569	Colorado, EUA
	LA6	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ487570	Chihuahua, Mex.
	LM17	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ487571	Durango, Mex.
	PaaX4	<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>ayacahuite</i>	FJ487572	Puebla, Mex.
	Tex1	<i>Pinus strobiformis</i>	FJ487573	Texas, EUA

Cuadro A.2: Números de acceso de las secuencias de trnL-trnF para miembros de la sección *Quinquifoliae* obtenidos de GeneBank

Especie	Localidad	Subsección	No. de acceso
<i>Pinus strobus</i>	EUA	<i>Strobus</i>	DQ010640
<i>Pinus koraiensis</i>	Corea	<i>Strobus</i>	AY228468
<i>Pinus lambertiana</i>	N California, EUA	<i>Strobus</i>	EU998743
<i>Pinus lambertiana</i>	Oregon, EUA	<i>Strobus</i>	EF546755
<i>Pinus lambertiana</i>	S California, EUA	<i>Strobus</i>	EF546756
<i>Pinus albicaulis</i>	California, EUA	<i>Strobus</i>	EF546753
<i>Pinus albicaulis</i>	Washington, EUA	<i>Strobus</i>	EF546754
<i>Pinus armandii</i>	China	<i>Strobus</i>	DQ983639
<i>Pinus longaeva</i> *†	California, EUA	<i>Balfouriana</i>	EU998744
<i>Pinus gerardiana</i> †	Pakistan	<i>Gerardiana</i>	EU998741
<i>Pinus krempfii</i> †	Vietnam	<i>Krempfiana</i>	EU998742

* *Pinus longaeva* pertenece a la sección *Parrya* y es utilizado como grupo externo

† Grupos externos

A.4. Resultados del análisis de máxima verosimilitud para la región trnL-trnF del cloroplasto de pinos blancos

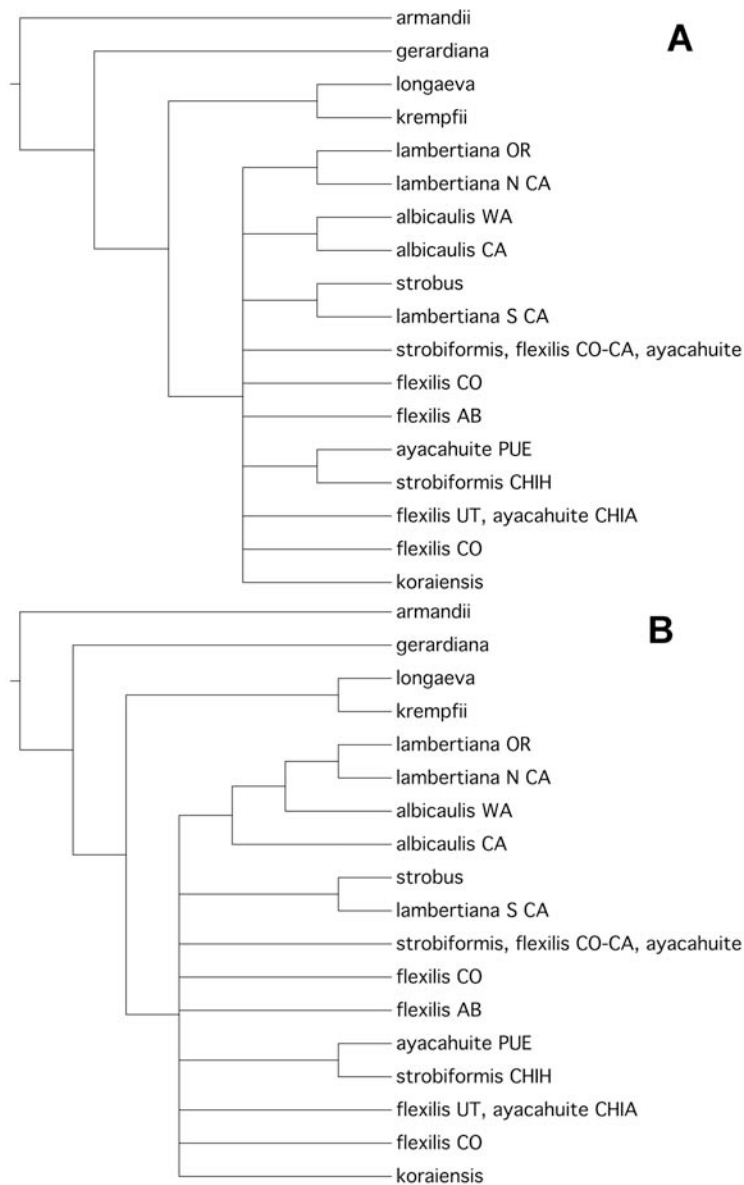


Figura A.1: Árboles resultantes del análisis de máxima verosimilitud para trnL-trnF. A partir de estas topologías se obtuvo un árbol consenso por regla de mayoría.