



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**VARIACIÓN GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DE
HELECHOS ARBORESCENTES (CYATHEACEAE)
DEL BOSQUE MESÓFILO DE MONTAÑA DE LA
SIERRA MADRE ORIENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

**SANTIAGO ALEJANDRO RAMÍREZ
BARAHONA**



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS E. EGUIARTE FRUNS**

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PARA PIA

La presente investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Luis E. Eguiarte Fruns en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo del proyecto *Diversificación de angiospermas en México: relojes moleculares, tasas de especiación, biomecánica y espacios ecológicos* Conacyt SEP-2004-C01-46475-Q

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Dr. Luis E. Eguiarte Fruns

A la Dra. Isolda Luna Vega

Al M. en C. Othón Alcántara Ayala

A mis sinodales, Dra. Erika Aguirre Planter, Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, Biól. Jaime Gasca Pineda, Dra. Mercedes Isolda Luna Vega, Dra. Ella Vázquez Domínguez

A los colectores de muestras en campo, M. en C. Eria Rebollar Caudillo, Biól. Germán Bonilla Rosso, Biól. Rodrigo González Chauvet, M. en C. Enrique Scheinvar Gottdiener, Alicia Barceinas Cruz

Al Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM y en particular a la Dra. Martha Juana Martínez Gordillo por proporcionar muestras de tejido

Al proyecto *Bosque mesófilo de la Sierra Madre Oriental (RTP-102) y patrones de distribución de algunas especies de plantas vasculares con importancia biológica* Conacyt-Semarnat FOSEMARNAT-2004-01-311

A todos los integrantes del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental

A mi familia y amigos por todo

RESUMEN

La familia Cyatheaceae consta de ≈ 600 especies de helechos arborescentes que se distribuyen en respuesta a los patrones de selvas lluviosas y bosques nublados. En México, las especies de esta familia se encuentran principalmente en manchones de bosque mesófilo de montaña con una distribución limitada y fragmentaria. En este trabajo se describe por primera vez la estructura filogeográfica y los patrones de variación genética en poblaciones de *Alsophila firma* y *Cyathea fulva* dentro de la provincia de la Sierra Madre Oriental. Se analizaron secuencias del espaciador intergénico de cpDNA *atpB-rbcL* de 121 plantas provenientes de seis localidades de bosque mesófilo en los estados de Hidalgo y Veracruz, México. Ambas especies mostraron una diversidad genética reducida ($\pi = 0.0009$ y 0.00097 ; $Hd = 0.442$ y 0.442) y una diferenciación genética baja ($G_{ST} = 0.0623$ y 0.0955) con flujo génico elevado ($Nm = 7.53$ y 4.74). Las redes de haplotipos y el análisis filogeográfico de clados anidados mostraron evidencia de expansiones a partir de poblaciones pequeñas. Asimismo, la distribución *mismatch* para ambas especies se ajustó a un modelo de expansión espacial con tamaños poblacionales constantes. Los resultados sugieren una historia demográfica paralela, donde las poblaciones de ambas especies sufrieron una expansión de rango y formaron poblaciones continuas con niveles elevados de flujo génico como consecuencia de la re-expansión del bosque mesófilo hacia tierras bajas.

ABSTRACT

Family Cyatheaceae comprises \approx 600 tree fern species distributed according to cloud and rain forest patterns. In México, tree fern species are found predominantly in cloud forest patches, with a limited and fragmented distribution. In this work, the phylogeographic structure and patterns of genetic variation are described for the first time in populations of *Alsophila firma* and *Cyathea fulva* in the Sierra Madre Oriental province. Data analyses were performed with *atpB-rbcL* chloroplast intergenic spacer sequences obtained for 121 individual plants collected in six cloud forest localities in the states of Hidalgo and Veracruz, México. Both species showed reduced genetic variation ($\pi = 0.0009$ y 0.00097 ; $Hd = 0.442$ y 0.442) and low genetic differentiation ($G_{ST} = 0.0623$ y 0.0955) with high levels of gene flow ($Nm = 7.53$ y 4.74). Haplotype networks and nested clade phylogeographic analyses showed evidence of demographic expansion from small populations. In both species, mismatch distributions followed a pattern expected under a model of spatial expansion with constant population size. These results suggest a common demographic history, where populations of both species suffered range expansions and formed continuous populations with high levels of gene flow in response to cloud forest expansion into lowlands.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Genética de poblaciones y filogeografía	1
Variación genética	1
Filogeografía	4
Marcadores moleculares	6
1.2. Familia Cyatheaceae	8
Especies en México	11
Especies de estudio	12
<i>Alsophila firma</i> (Baker) D. S. Conant	12
<i>Cyathea fulva</i> (M. Martens & Galeotti) Fée	14
1.3. Escenario biogeográfico	16
Bosque mesófilo de montaña	16
Aislamiento y fragmentación	20
1.4. Antecedentes	25
2. OBJETIVOS	27
3. MÉTODOS	28
3.1. Área de estudio	28

3.2. Muestreo	31
3.3. Extracción de DNA	32
3.4. Amplificación y secuenciación	33
Exploración de polimorfismos	33
Espaciadores intergénicos de cpDNA	34
3.5. Análisis de datos	36
Exploración de polimorfismos	36
Análisis de secuencias de cpDNA	36
<i>Variación, diferenciación y estructuración genética</i>	<i>37</i>
<i>Filogenia molecular</i>	<i>39</i>
<i>Asociación entre distancias genéticas y distancias geográficas</i>	<i>39</i>
<i>Distribuciones mismatch</i>	<i>40</i>
<i>Redes haplotípicas y análisis filogeográfico de clados anidados</i>	<i>41</i>
4. RESULTADOS	43
Exploración de polimorfismos	43
Variación, diferenciación y estructuración genética	44
<i>Diversidad nucleotídica</i>	<i>44</i>
<i>Diversidad haplotípica</i>	<i>45</i>
<i>Diferenciación y estructuración genética</i>	<i>47</i>
<i>Filogenia molecular</i>	<i>47</i>
<i>Asociación entre distancias genéticas y distancias geográficas</i>	<i>51</i>
<i>Distribuciones mismatch</i>	<i>54</i>

Filogeografía	57
<i>Redes haplotípicas</i>	57
<i>Análisis filogeográfico de clados anidados</i>	60
5. DISCUSIÓN	62
Exploración de polimorfismos	62
Variación genética y filogeografía	63
<i>Diversidad nucleotídica y haplotípica</i>	63
<i>Diferenciación y estructuración genética</i>	66
<i>Filogenia molecular</i>	69
<i>Asociación entre distancias genéticas y distancias geográficas</i>	69
Filogeografía	70
<i>Redes haplotípicas y análisis filogeográfico de clados anidados</i>	71
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	77
6.1. Conclusiones	77
6.2. Perspectivas	77
REFERENCIAS	79
APÉNDICES	91
Apéndice I	91
Apéndice II	92
Apéndice III	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localidades de sitios de colecta, ejemplares de herbario y secuencias obtenidas de Korall <i>et al.</i> (2007)	30
Tabla 2. Secuencias de primers y temperaturas de alineación utilizadas para la amplificación y secuenciación de espaciadores intergénicos cpDNA	35
Tabla 3. Valores de diversidad y diferenciación genética	44
Tabla 4. Cuadro comparativo de estimados de variación genética para especies de helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución para la familia Cyatheaceae	9
Figura 2. Escamas peciolares presentes en Cyatheaceae	12
Figura 3. Planta adulta y mapa de distribución en México de <i>Alsophila firma</i>	13
Figura 4. Planta adulta y mapa de distribución en México de <i>Cyathea fulva</i>	15
Figura 5. Mapa de distribución de bosque mesófilo de montaña	19
Figura 6. Localidades de colecta en los estados de Hidalgo y Veracruz, México	29
Figura 7. Reconstrucción filogenética de Neighbor-Joining en <i>Alsophila firma</i>	49
Figura 8. Reconstrucción filogenética de Neighbor-Joining en <i>Cyathea fulva</i>	50
Figura 9. Dendogramas de distancia entre poblaciones de <i>Alsophila firma</i> y <i>Cyathea fulva</i>	52
Figura 10. Pruebas de Mantel realizadas en poblaciones de <i>Alsophila firma</i> y <i>Cyathea fulva</i>	53
Figura 11. Distribución de diferencias pareadas en <i>Alsophila firma</i> y <i>Cyathea fulva</i>	55
Figura 12. Frecuencia relativa de haplotipos de <i>atpB-rbcL</i> para <i>Alsophila firma</i>	57
Figura 13. Frecuencia relativa de haplotipos de <i>atpB-rbcL</i> para <i>Cyathea fulva</i>	58
Figura 14. Red de haplotipos de <i>atpB-rbcL</i> para <i>Alsophila firma</i>	59
Figura 15. Redes de haplotipos de <i>atpB-rbcL</i> para <i>Cyathea fulva</i>	60
Figura 16. Distribución geográfica de haplotipos para <i>Alsophila firma</i>	69
Figura 17. Distribución geográfica de haplotipos para <i>Cyathea fulva</i>	70

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Genética de poblaciones y filogeografía

Variación genética

La objetivo principal de la genética de poblaciones, desde hace más de cincuenta años, ha sido la descripción y explicación de la variación genética dentro y entre poblaciones naturales (Lewontin 1991). Además de ser una herramienta para la determinación de los niveles de variación genética en poblaciones naturales, la genética de poblaciones trata con la determinación experimental y teórica de cómo esa variación cambia en tiempo y espacio (Griffiths *et al.* 1996). En este sentido, el objetivo principal de la genética de poblaciones es doble, cuantificar y explicar el por qué de la variación observada en las poblaciones naturales.

Los estudios de genética de poblaciones se centran en la ley de equilibrio Hardy-Wienberg (EHW), la cual se encuentra fundamentada en cinco hipótesis: 1) poblaciones de organismos sexuales que tienen la misma posibilidad de aparearse (apareamiento azaroso), 2) poblaciones con tamaños efectivos muy grandes (tamaño infinito), 3) falta de flujo genético entre poblaciones, 4) tasas de mutación despreciables y 5) ausencia de presiones de selección. Cuando todas estas condiciones se cumplen, las frecuencias genotípicas y fenotípicas deben mantenerse constantes y se dice que las poblaciones se encuentran en equilibrio. No obstante este equilibrio “ideal”, las poblaciones naturales de una especie por lo general muestran

diferencias en la variación genética de una región a otra, debido a la falta de continuidad ambiental y la consecuente estructuración geográfica entre éstas.

La dinámica evolutiva de especies en condiciones naturales está mediada principalmente por la estructura de sus poblaciones, es decir, por la distribución de la variación genética entre éstas (Álvarez-Buylla y Garay 1994). Por lo general las especies de amplia distribución poseen niveles más altos de diversidad genética que las especies endémicas y amenazadas (Frankham *et al.* 2002). La distribución continua es una característica importante que disminuye la diferenciación entre poblaciones debido al frecuente intercambio génico entre éstas (Wright 1951). Por el contrario, la presencia de barreras geográficas puede prevenir el intercambio de genes y provocar una diferenciación inter-poblacional significativa. La fragmentación poblacional por actividades humanas puede incrementar, artificialmente, esta diferenciación (Hao *et al.* 2006).

La cantidad y tipo de variación genética en poblaciones naturales varía entre distintas especies y se encuentra principalmente influenciada por la historia de vida (*e.g.* sistema reproductivo, patrones de dispersión), caracteres ecológicos (*e.g.* densidad poblacional, preferencia de hábitat), procesos demográficos (*e.g.* cuellos de botella, explosiones demográficas) y factores genéticos (Hedrick 2005). Los principales factores que afectan el patrón de variación genética se encuentran ligados fuertemente a la historia demográfica de las poblaciones. Por tanto, identificar situaciones en que diferencias en los patrones de diversidad genética son

reconocibles, puede permitir discernir qué factores que juegan, o han jugado, un papel importante en la determinación de la variabilidad genética (Liu *et al.* 1998).

Cuando las poblaciones de una especie se encuentran diferenciadas geográficamente, la principal fuerza responsable de la estructuración de la variación es el intercambio genético entre éstas. Si el intercambio es elevado, las poblaciones tenderán a ser homogéneas, aún cuando existan otras fuerzas productoras de diferenciación en éstas. Cuando el flujo génico es bajo, las fuerzas evolutivas tenderán a producir una diferenciación genética entre las poblaciones. La diferenciación inter-poblacional significativa resultaría, frecuentemente, del limitado flujo génico en condiciones de presión de selección fuerte o distribución discontinua (Slatkin 1985). En este sentido, la estructuración de una población de organismos, y en última instancia el establecimiento de linajes evolutivamente independientes, está fuertemente influenciado por los patrones de intercambio genético (flujo génico) dentro y entre poblaciones (Schaal *et al.* 1998).

La variación en factores que afectan la ecología reproductiva de plantas, como los niveles de auto-fertilización presentes en distintas poblaciones, pueden tener efectos pronunciados en la naturaleza del intercambio genético entre poblaciones (Schaal *et al.* 1998). La endogamia generalmente resulta en la disminución de la adecuación reproductiva y la depresión de la fecundidad y capacidad vital, y tiende a elevar el riesgo de extinción en poblaciones pequeñas (Frankham *et al.* 2002). La deriva génica, acentuada por la disminución del tamaño poblacional, puede provocar que varios alelos distintos se fijen en las poblaciones y

se observe una variación a nivel poblacional baja y altos niveles de diferenciación entre poblaciones.

La presencia o ausencia de una estructuración geográfica de las poblaciones se vuelve interesante cuando se puede estudiar la distribución de variantes génicas dentro de estas poblaciones. En este caso, los patrones de variación poblacional pueden ser utilizados para probar si cambios climáticos (*e.g.* ciclos de glaciación durante el Pleistoceno) promovieron o inhibieron divergencia, ya que la variación intra-específica refleja tanto eventos recientes como históricos (Templeton *et al.* 1995). Cuando se tienen poblaciones geográfica y genéticamente estructuradas, y se realiza una reconstrucción de la genealogía de una variante génica dentro de estas poblaciones, se denomina ésta como análisis “filogeográfico” (Avice 2006).

Filogeografía

La filogeografía es el estudio de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos, especialmente aquellos dentro o entre especies cercanamente emparentadas (Avice 2000). En otras palabras, la filogeografía trata con los componentes históricos y filogenéticos de la distribución espacial de linajes de genes. Los estudios filogeográficos son útiles para inferir patrones históricos de distribución de especies. En su acepción más simple y general, mediante la identificación de variantes genealógicas, que son superpuestas en un

marco geográfico, se ve reflejada la dinámica espacio-temporal de las especies (Dumolin-Lapegue *et al.* 1997a).

La disciplina filogeográfica se desarrolló por medio de estudios empíricos sobre DNA mitocondrial (mtDNA) en animales. Las propiedades especiales de este material genético permitieron resolver historias genealógicas de organismos coespecíficos. Debido a su herencia uniparental, los árboles de genes mitocondriales, y en su caso de genes dentro del genoma de cloroplasto (cpDNA), constituyen componentes filogenéticos jerárquicos y ramificados (Avice 2000). De esta manera se han podido realizar estudios filogeográficos en distintos grupos de organismos y se ha podido generalizar que la mayoría de las especies consisten de poblaciones geográficamente estructuradas, algunas de las cuales pueden experimentar poco o ningún contacto genético por largos periodos (Avice 2000).

La demografía histórica y contemporánea puede afectar la estructura espacial de poblaciones coespecíficas y por tanto influenciar las genealogías génicas intraespecíficas. De esta manera, el reto empírico principal de la filogeografía intraespecífica es la descripción de eventos demográficos (históricos y actuales) que probablemente hayan producido un patrón espacial observable de grupos de linajes genealógicos. Asimismo, esta disciplina sirve como herramienta conceptual útil que nos permite valorar el papel que han tenido fenómenos biogeográficos distintos (*i.e.* dispersalismo y vicarianza) sobre el arreglo espacial de organismos y sus caracteres (Avice 2000).

Avise (2000) hace énfasis en cuatro aspectos de congruencia genealógica que son relevantes para interpretaciones filogeográficas; éstos involucran un acuerdo en patrones filogenéticos: 1) entre sitios dentro de un mismo gen; 2) entre múltiples árboles génicos en *loci* no ligados; 3) entre dos o más especies co-distribuidas con ecología o historias naturales similares; y 4) entre datos genéticos moleculares y evidencia biogeográfica clásica. El primer aspecto se refiere a la presencia de una división filogenética significativa, es decir, la existencia de una estructuración espacial de las variantes génicas. El segundo sirve de confirmación de los árboles génicos como registro de separaciones filogenéticas a nivel poblacional y de especie. El tercer y cuarto aspecto de congruencia implican la presencia de historias biogeográficas de biotas enteras, es decir, muestran la existencia de patrones biogeográficos.

Los métodos filogeográficos han brindado herramientas para dilucidar los efectos que han tenido eventos históricos de gran escala (*e.g.* oscilaciones climáticas en el Pleistoceno) sobre la distribución y subdivisión de la biota (Trewick *et al.* 2002). Se ha utilizado un amplio espectro de organismos para estudiar patrones filogeográficos, incluyendo animales (*e.g.* osos, Taberlet y Bouvet 1994; aves, Avise y Walker 1998; humanos, Lintz *et al.* 2007) y plantas (*e.g.* encinos, Dumolin-Lapegue *et al.* 1997a; árboles mediterráneos, Petit *et al.* 2003; especies montañas, Schonswetter *et al.* 2006). Sin embargo existen pocos datos publicados referentes a filogeografía de helechos (*e.g.* Trewick *et al.* 2002; Vitalis *et al.* 2002; Janssen *et al.* 2008).

Marcadores moleculares

Para el estudio de la diversidad genética en poblaciones naturales se utilizan, actualmente, una serie de marcadores moleculares específicos o generales de diversas metodologías basadas en la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante el uso de distintos marcadores moleculares se pueden apreciar aspectos particulares en los datos y pueden evaluarse escenarios históricos diferentes.

La amplificación y secuenciación de marcadores representa uno de los mejores métodos para el estudio de la diversidad genética, pues brinda la secuencia exacta de los *loci* analizados. Sin embargo, ésta requiere del diseño de iniciadores específicos y su costo es moderadamente alto. En el presente trabajo se utilizaron espaciadores intergénicos de DNA de cloroplasto (cpDNA) como marcadores moleculares para la reconstrucción filogeográfica.

Estos marcadores de cpDNA han sido frecuentemente utilizados para estudiar la variación genética y los patrones filogeográficos intraespecíficos en poblaciones de plantas (Lu *et al.* 2002). Su herencia uniparental y evolución casi neutral los hacen adecuados para reconstruir los patrones filogeográficos intra-específicos (Ferris *et al.* 1998). Una consecuencia interesante de la herencia uniparental del genoma de cloroplasto es su modo clonal de evolución, que le confiere un alta utilidad en la reconstrucción de filogenias (Dumolin-Lapegue *et al.* 1997b).

Aún cuando el genoma del cloroplasto evoluciona generalmente de manera lenta (Clegg *et al.* 1991), haciendo de éste un sistema ideal para evaluar relaciones filogenéticas (Chiang *et al.* 1998), algunos estudios recientes han revelado variación genética entre poblaciones de la misma especie en secuencias específicas de espaciadores no codificantes entre algunos tRNAs de cpDNA (Demesure *et al.* 1995, 1996). Específicamente, se han utilizado un par de espaciadores intergénicos (*i.e.* *trnL-trnF* y *atpB-rbcL*) para examinar los niveles de variación y la estructura filogeográfica en especies de helechos arborescentes (*e.g.* Wang *et al.* 2003b, 2004, Su *et al.* 2005a, 2005b).

Aún cuando el tipo de herencia de cpDNA se desconoce para la familia Cyatheaceae, los escasos estudios realizados con especies de helechos de otros grupos muestran que la herencia de cpDNA se da exclusivamente por vía materna (Gastony y Yatskievych 1992; Vogel *et al.* 1998; Kuroiwa *et al.* 1998; Xiang *et al.* 1999; Guillón y Raquin 2000). Además, la utilidad de marcadores de este tipo en estudios de genética de poblaciones y filogeografía se ha puesto de manifiesto en especies de dicha familia (Wang *et al.* 2003b, 2004; Su *et al.* 2004, 2005a, 2005b), en las cuales se han encontrado niveles de variación genética significativos y estructuras filogeográficas marcadas.

1. 2. Familia Cyatheaceae

La familia Cyatheaceae consta de 500-600 especies de helechos arborescentes que forman una parte conspicua de los bosques tropicales húmedos de montaña alrededor del mundo (Conant *et al.* 1994; Véliz-Vargas 2006; Ramírez-Barahona *et al.* en preparación). La familia tiene una distribución pantropical, aunque se pueden encontrar miembros en regiones subtropicales y templadas (Korall *et al.* 2007), y se conocen 258 especies para el Neotrópico (Ramírez-Barahona *et al.* en preparación). Casi todos los miembros de esta familia se caracterizan por presentar un tallo aéreo erecto, una base peciolar escamosa y soros dorsales (no marginales) sobre las venas, con un receptáculo usualmente elevado (Kramer y Green 1990). Sin embargo, no existe ningún carácter ubicuo que defina a las especies miembros de la familia.

Es un grupo inusual, ya que es la única familia de helechos con un alta diversidad específica y un número cromosómico aparentemente uniforme; se han establecido los números cromosómicos de aproximadamente 10% de las especies y en todos los casos son diploides con $2n = 138$ (Conant *et al.* 1994). La familia también es inusual entre los helechos por la ocurrencia de híbridos diploides fértiles y de estabilización reproductiva de éstos para formar nuevas especies (Conant y Cooper-Driver 1980).

La familia Cyatheaceae es el grupo de helechos arborescentes más ampliamente distribuido, con límites latitudinales en el hemisferio norte en el archipiélago japonés (Conant *et al.* 1994), y en el hemisferio sur en las islas

subantárticas de Auckland (Large y Braggins 2004). Existen varios centros de diversidad, entre los que se encuentran las Antillas Mayores, América Central, los Andes, Madagascar, Malasia, incluyendo Indonesia, Filipinas y Nueva Guinea (Lellinger 1989). Los helechos arborescentes se distribuyen en respuesta a los patrones de selvas lluviosas cálidas y bosques nublados (Véliz y Vargas 2006).

Desde un punto de vista biogeográfico, las especies de la familia son de gran interés, ya que se ha sugerido que los helechos cyateoides se encontraban distribuidos globalmente durante el Mesozoico medio (200-150 millones de años). Debido a subsecuentes cambios climáticos muchas de sus especies ancestrales se extinguieron y solamente algunas sobrevivieron en zonas montanas tropicales y subtropicales con distribuciones relictuales (Lucansky 1974).

Especies en México

En México se encuentran 16 especies de Cyatheaceae (Apéndice I) y están representados los cuatro géneros (*sensu* Lellinger 1987) de la familia (Mickel y Smith 2004). La familia tiene un límite latitudinal al norte en los manchones de bosque mesófilo de Hidalgo, Querétaro de Arteaga y San Luis Potosí (Figura 1), siendo *Alsophila firma* y *Cyathea fulva* las únicas especies con un intervalo de distribución tan septentrional.

En cuanto a sus límites hacia el sur, todas las especies de la familia presentes en México se extienden hacia América Central y América del Sur (Figura 1), con

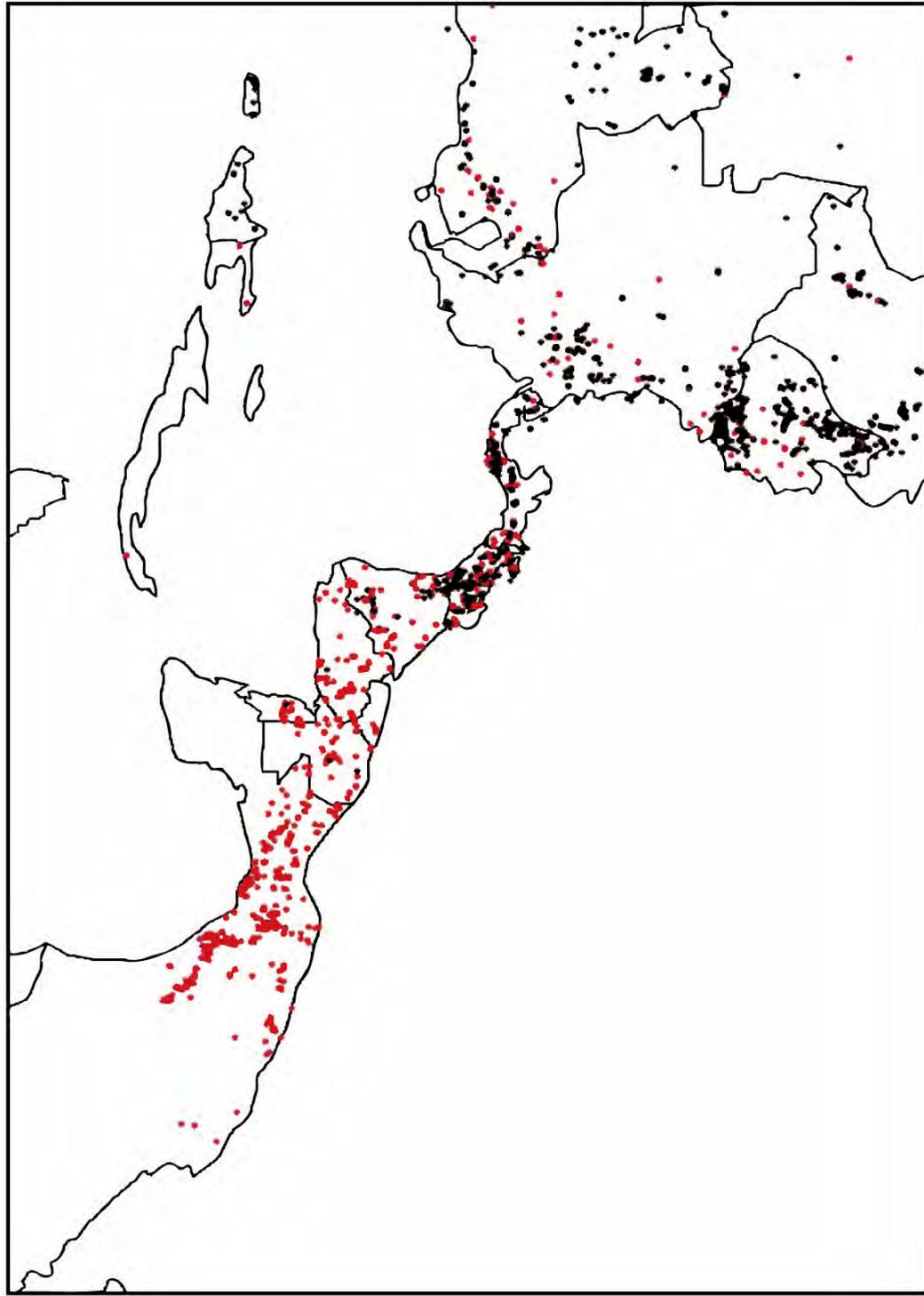


Figura 1. Mapa de distribución para la familia Cyatheaceae en México, Centroamérica, Las Antillas y norte de Suramérica, con énfasis en las 16 especies presentes en México (puntos rojos) (ver Apéndice I), generado con el programa ArcView GIS 3.2 (ESRI 1999). Datos obtenidos a través de las bases de datos del Missouri Botanical Garden (w3Tropicos) y de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) y de consultas de especímenes dentro del Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU).

Los helechos arborescentes en México siguen un patrón de distribución montano, encontrándose distribuidos a lo largo de las principales cadenas montañosas del país (*e.g.* Faja Volcánica Transmexicana, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur). Pueden encontrarse principalmente dentro de manchones de bosque mesófilo de montaña, encinares húmedos y bosques de pino-encino. Generalmente estos helechos crecen en ambientes riparios, especialmente dentro de encinares y bosques de pino-encino, aunque en manchones de bosques mesófilo su distribución es más homogénea, formando parte importante de los estratos arbóreos bajos.

Especies de estudio

Las especies de la familia Cyatheaceae generalmente pueden distinguirse por la presencia de distintas morfologías de las escamas presentes en el ápice del fuste y las bases peciolares (Figura 2).

***Alsophila firma* (Baker) D. S. Conant (*sensu* Lellinger 1987)**

Alsophila es un género de >200 especies alrededor de los trópicos (Mickel y Smith 2004), 35 en el Neotrópico y cuatro en México (Ramírez-Barahona *et al.* en preparación). Las especies de este género son distintas a otras por la presencia de escamas peciolares con setas aciculares negras. *A. firma* es una especie de helechos arborescentes de hasta 10.5 m de altura y 30 cm de diámetro, con frondas

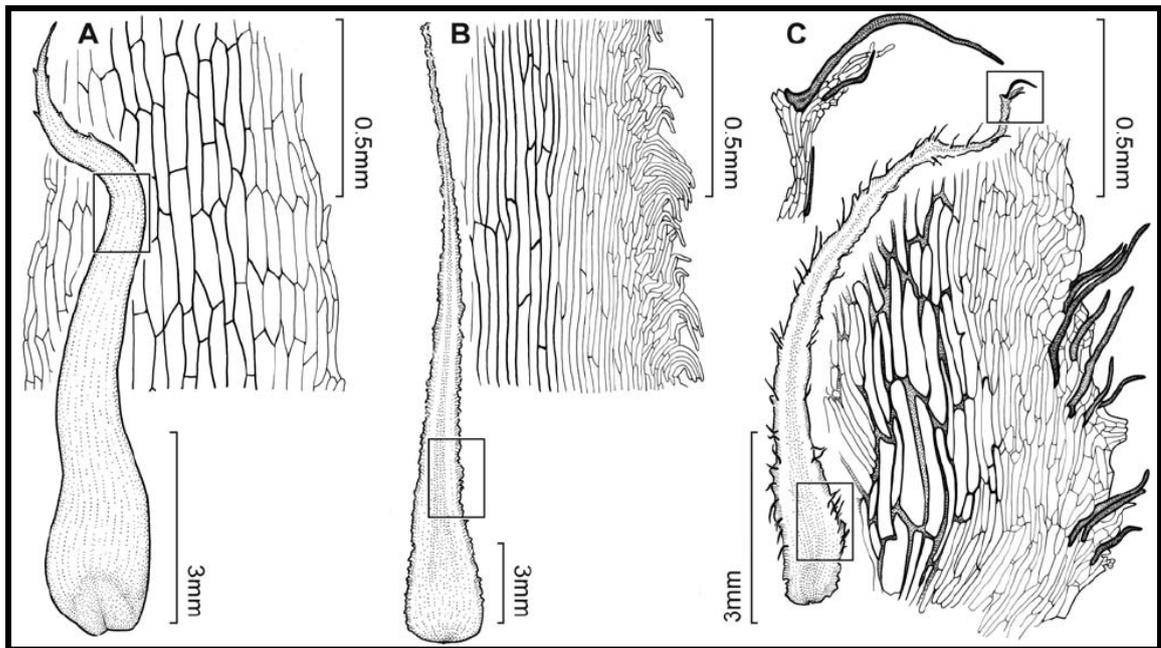


Figura 2. Escamas peciolares presentes en Cyatheaceae. A) Escamas conformes presentes en especies del género *Sphaeropteris*; B) Escamas flabeloides (sin setas aciculares terminales) presentes en especies de los géneros *Cnemidaria* y *Cyathea*; C) Escamas con setas aciculares terminales presentes en el género *Alsophila* (esquema de Korall *et al.* 2006).

bipinnadas-pinnatífidas tan largas como 3 m; la especie se caracteriza por la presencia de indusio globoso, espinas negras alargadas en los estípites, venación simple y pínulas ascendentes con ápices agudos; número cromosómico ($2n$) de 138. *A. firma* se distingue de las demás especies de Cyatheaceae en México por tener una lámina reducida a un ápice parecido a una pinna de hasta 40 cm de largo (Mickel & Smith 2004).

A. firma se distribuye principalmente en bosques húmedos de montaña, en altitudes de 600–2500 msnm. En México se encuentra en manchones de bosque en

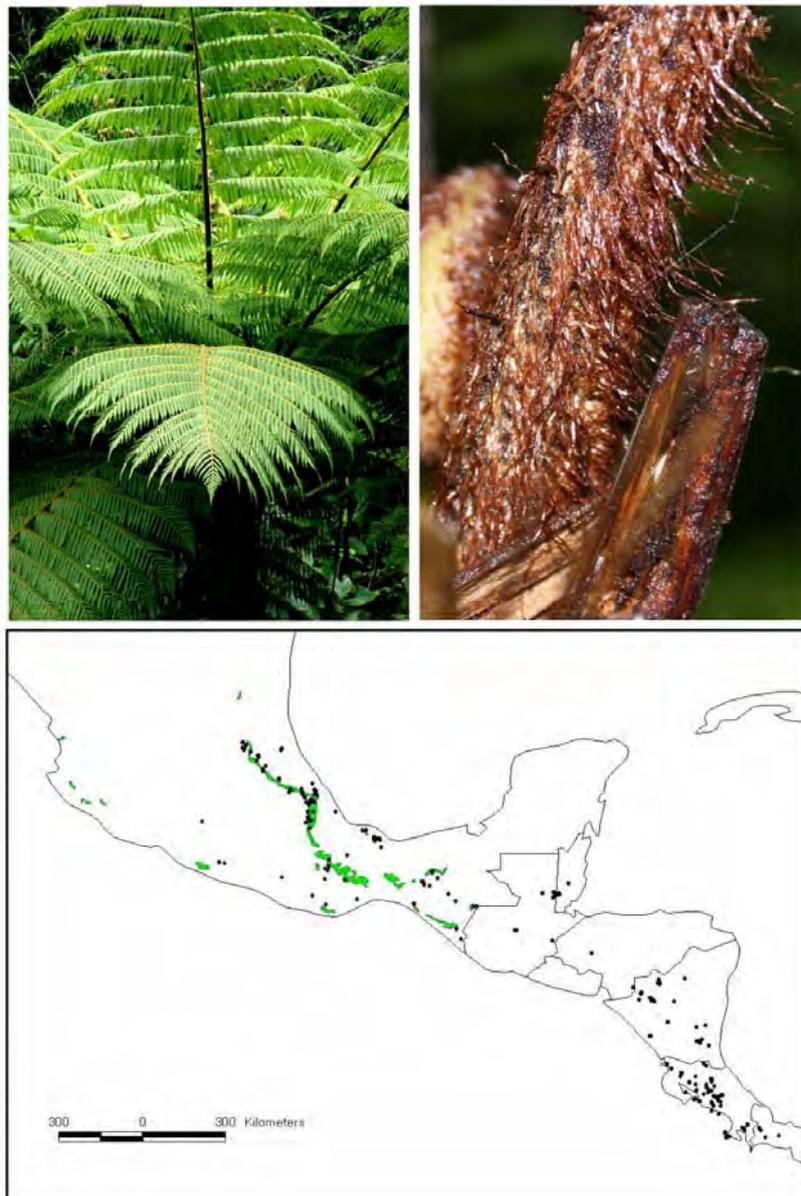


Figura 3. Planta adulta y mapa de distribución en México (abajo) de *Alsophila firma*; lámina (izquierda) y base peciolar con escamas y espinas (derecha); mapa generado con el programa ArcView GIS 3.2 (ESRI 1999) con datos obtenidos a través de las bases de datos del Missouri Botanical Garden (w3Tropicos) y de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) y de consultas del Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU).

los estados de Chiapas, Estado de México, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro de Arteaga, San Luis Potosí y Veracruz; se extiende hacia América Central y América del Sur: Belice, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá y Ecuador (Mickel y Smith 2004) (Figura 3).

***Cyathea fulva* (M. Martens & Galeotti) Fée (*sensu* Lellinger 1987)**

Cyathea es un género de alrededor de 100 especies alrededor del trópico (Mickel y Smith 2004), 11 en México (Ramírez-Barahona *et al.* en preparación). Las especies de este género se distinguen por la presencia de escamas peciolares flabeloides, sin setas aciculares (Mickel y Smith 2004). *C. fulva* es una especie de helechos arborescentes de hasta 12 m de altura y 10 cm de diámetro, con frondas bipinnadas-pinnatífidas tan largas como 5 m; esta especie se caracteriza por la presencia de indusio globoso efímero, espinas robustas en los estípites, venación rara vez simple (1-bifurcada) y pínulas sésiles con segmentos obtusos (Mickel y Smith 2004).

Cyathea fulva se distribuye principalmente en bosques húmedos de montaña en altitudes de 800–2700 m y hasta 3250 m (Mickel y Smith 2004). En México se encuentra en manchones de bosque en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz; en América Central y América de Sur: Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá y Venezuela (Mickel y Smith 2004) (Figura 4).



Figura 4. Planta adulta y mapa de distribución en México (abajo) de *Cyathea fulva*; lámina (izquierda) y base peciolar con escamas y espinas (derecha); mapa generado con el programa ArcView GIS 3.2 (ESRI 1999) con datos obtenidos a través de las bases de datos del Missouri Botanical Garden (w3Tropicos) y de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) y de dentro del Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU).

1.3. Escenario biogeográfico

Bosque mesófilo de montaña

El bosque mesófilo de montaña corresponde en México al clima húmedo de altura, situado entre los 600 y 3000 de altitud. Dentro de las comunidades que viven en zonas montañosas ocupa sitios más húmedos que los bosques de encinos y pinos, generalmente más cálidos que los del bosque de abetos, pero más frescos que los de bosques tropicales (Rzedowski 1978). Las condiciones climáticas que requiere el bosque mesófilo se presentan en zonas restringidas en México y por consiguiente éste tiene una distribución limitada y fragmentaria (Rzedowski 1978) (Figura 5).

El bosque mesófilo de montaña, al igual que otros tipos de vegetación montana, han sufrido grandes fluctuaciones en su distribución durante los ciclos glaciales de cambio climático y por esta razón se considera un tipo de vegetación relictual. De esta manera, el bosque mesófilo de montaña y las especies características que habitan en éste se convierten en modelos interesantes debido a su historia evolutiva compleja.

Además de la historia de contracción debida a factores climáticos, el bosque mesófilo de montaña presenta grandes índices de deterioro y reducción a lo largo de toda su extensión debido a los altos índices de deforestación y explotación agrícola, y por consiguiente el patrón de distribución fragmentario se ha incrementado (Luna *et al.* 1989, 1994). El área ocupada por este tipo de vegetación se ha reducido drásticamente en los últimos cincuenta años y se sigue reduciendo rápidamente

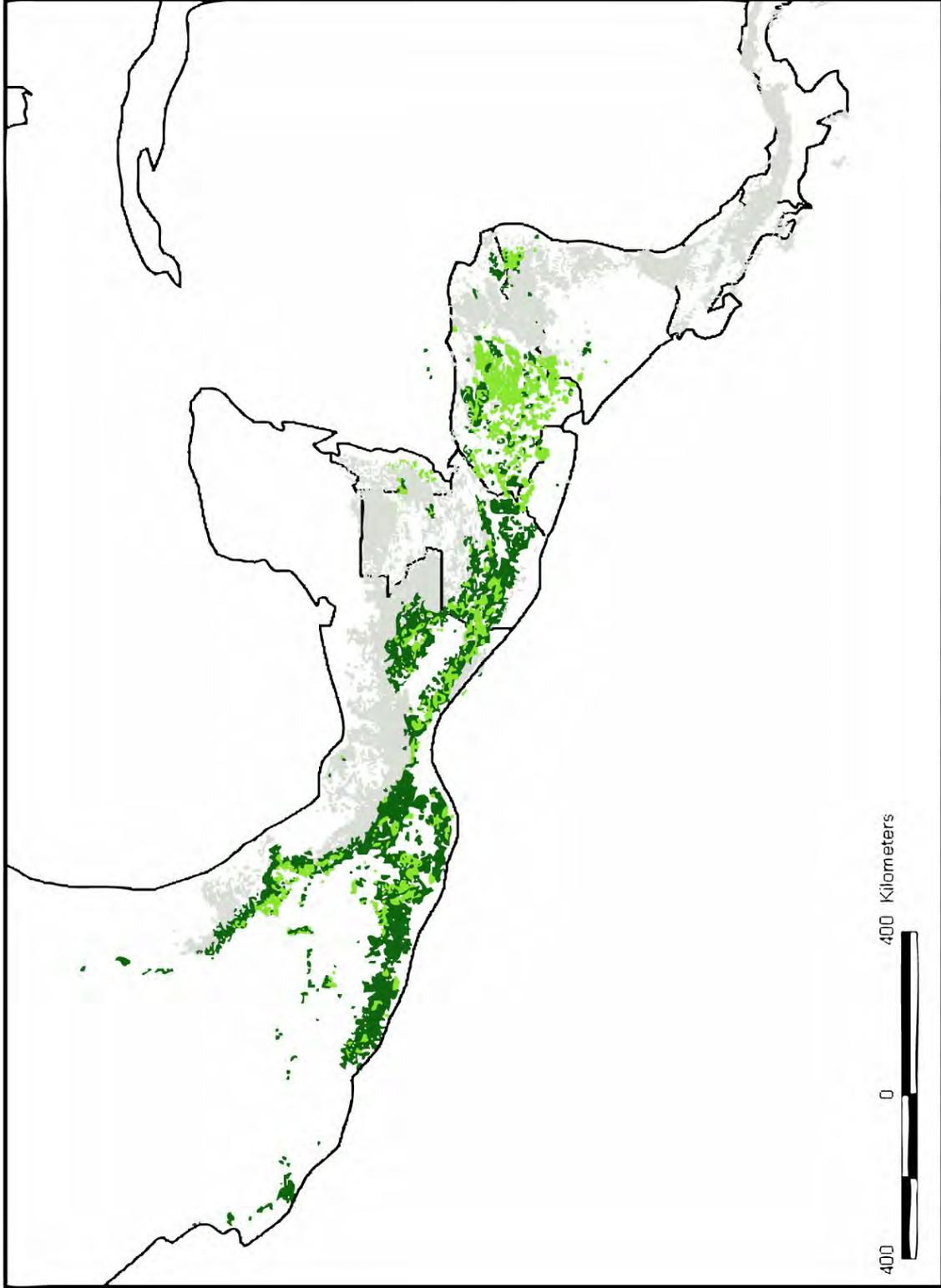


Figura 5. Mapa de distribución de bosque mesófilo de montaña (verde oscuro), bosques de coníferas (verde claro) y selva alta perennifolia (gris) en México y Centroamérica, generado con el programa ArcView GIS 3.2 (ESRI 1999); datos de CONABIO (1999) y CCAD-BM (2004).

como producto principalmente del crecimiento de la población humana y de la expansión de las actividades productivas como la agricultura y la ganadería (Luna *et al.* 1988). Rzedowski (1978) sostiene que este tipo de vegetación cubría menos del 1% del territorio nacional; veinte años más tarde, Challenger (1998) estimó que el bosque mesófilo ocupaba solamente la mitad de su cobertura original. Tomando en cuenta esta tendencia, es altamente probable que el bosque mesófilo tenga una cobertura actual menor al 0.5% del territorio nacional (< 1 millón de hectáreas).

El estudio del patrón fragmentario y la obtención de listas florísticas completas de los distintos manchones con este tipo de vegetación en el país, han permitido proponer hipótesis sobre los procesos que han producido los patrones actuales de distribución de la flora y fauna de México (Alcántara y Luna 2001). El patrón de distribución ha determinado que cada uno de los manchones de bosque tengan una composición florística diferente (Luna *et al.* 1994); este fenómeno debe reflejarse en diferencias entre las poblaciones de especies de plantas características de este tipo de vegetación.

La Sierra Madre Oriental (SMOR), que comprende parte de los estados de Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Puebla, Querétaro de Arteaga, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Figura 6), es una de las regiones del país con mayor cobertura de bosque mesófilo. El estado de Hidalgo es el tercer estado de la República Mexicana con mayor superficie ocupada por bosque mesófilo de montaña, después de Oaxaca y Chiapas (Ortega y Castillo 1996). Los manchones de bosque mesófilo en el estado de Hidalgo, correspondientes a gran parte de los bosques de la

Sierra Madre Oriental, se encuentran en elevaciones de 750-2,400 msnm y son considerados como algunos de los manchones de bosque más extensos y continuos en el país.

La situación para los demás estados es diferente, ya que en éstos, los bosques muestran un índice de deterioro muy elevado. Dentro del estado de Veracruz la Sierra Madre Oriental abarca dos áreas (Sosa y Lorea 2004), la primera es la región de la Huasteca Baja Veracruzana y la segunda es la región Totonaca del estado. La mayor parte del bosque mesófilo de montaña se encuentra dentro de la primer región, en la mitad sur del municipio de Ilamatlán, el centro-sur de Huayacocotla, el sur de Texcatepec y la mayor parte del municipio de Zacualpan (Sosa y Lorea 2004). Estos bosques se encuentran regularmente entre los 1,000 y 1,900 msnm, pero los límites superior e inferior son rebasados en algunos lugares, llegando a los 2,100 y 800 msnm respectivamente (Sosa y Lorea 2004). Los manchones de bosque localizados en la parte central del estado (región Totonaca y región Capital) muestran índices de deterioro de más del 90% de su cobertura original (Williams-Linera *et al.* 2002), dejando estos manchones en lugares poco accesibles para su exploración. En el estado de Puebla los manchones de bosque mesófilo se encuentran en un estado similar de destrucción, aunque realmente no existen estudios acerca de este tipo de vegetación en el estado.

El bosque mesófilo de montaña del estado de Querétaro cubre una superficie aproximada de 54 km², lo que representa menos del 0.5% del territorio total de la entidad (Cartujano *et al.* 2002). Se distribuye parcialmente en los municipios de

Jalpan, Landa de Matamoros, Pinal de Amoles y San Joaquín (Figura 6), en el extremo oriental del estado; los bosques más extensos y continuos están en el extremo oriental del municipio de Landa de Matamoros (Cartujano *et al.* 2002). En el estado de San Luis Potosí los manchones de bosque mesófilo se encuentran en los municipios de Alaquines y Tamasopo en el centro-sureste de la entidad, y en el municipio de Xilitla en el extremo sur del estado (Figura 6); estos últimos bosques representan el límite latitudinal de distribución de la familia.

Aislamiento y fragmentación

Las poblaciones de plantas características del bosque mesófilo en México, entre ellas gran parte de las de especies de Cyatheaceae, han estado sujetas a fuertes presiones demográficas. Esto se debe al bajo porcentaje de cobertura de este tipo de vegetación y a la creciente presión humana sobre los manchones de bosque, que se traduce en una destrucción generalizada de este tipo de vegetación. Reunir información de la variación genética entre y dentro de las poblaciones de especies amenazadas ha sido considerado como esencial en el manejo y conservación, porque las investigaciones de genética de poblaciones proveen de las guías necesarias para interpretar el estado presente y futura prognosis de las especies concernientes (Drummond *et al.* 2000). Las especies de Cyatheaceae, al tener una distribución restringida, tienen poblaciones reducidas que probablemente muestren niveles de variación genética bajos. Por esta razón es de vital importancia la descripción de dicha variación en sus poblaciones.

Los factores climáticos, entre los que destacan los ciclos glaciales ocurridos en el Pleistoceno, parecen ser la principal fuerza generadora de aislamiento y diferenciación poblacional histórica en ecosistemas montanos tropicales y subtropicales (Pennington *et al.* 2004; Jaramillo-Correa *et al.* 2008). Ante estos cambios climáticos, las poblaciones continuas se colapsaron en varios manchones aislados que fueron expuestos a distintas fuerzas generadoras de diferenciación poblacional. Varios autores (*e.g.* Pielou 1991; Roy *et al.* 1996; Knowles 2001; Su *et al.* 2004, 2005a, 2005b; Carstens y Knowles 2007) sostienen que las glaciaciones del Pleistoceno indudablemente han tenido un efecto significativo sobre muchos taxa al generar cambios en las distribuciones de las especies en respuesta a las fluctuaciones climáticas. Las especies montanas tropicales y subtropicales expandieron sus intervalos de distribución hacia altitudes menores durante los periodos más templados (máximos glaciales), generando distribuciones amplias y continuas con altos niveles de flujo génico entre poblaciones (Jaramillo-Correa *et al.* 2008).

Posteriormente, estas especies se retrajeron hacia grandes elevaciones hasta encontrarse confinadas a pequeños manchones insulares de altura durante el último calentamiento ocurrido en el Holoceno (Jackson *et al.* 1996; Jaramillo-Correa *et al.* 2008). Estos pequeños manchones aislados estarían expuestos a fuerzas estocásticas como la endogamia o la deriva génica, que llevarían a la rápida pérdida de variabilidad genética y potencial extinción de las especies (Jaramillo-Correa *et al.* 2006). No obstante, estas poblaciones relictuales pueden ser vistas como refugios

inter-glaciales, a partir de los cuales dichas especies pudieron expandir su intervalo de distribución durante el siguiente ciclo glacial (Ledig *et al.* 2000).

Bajo este escenario de aislamiento y divergencia poblacional, predicho para ambientes montanos tropicales y subtropicales, la selección adaptativa divergente, la falta de flujo génico y la deriva génica se encuentran entre las fuerzas evolutivas más importantes que afectan la estructura poblacional (Knowles 2000, 2001). A su vez, los modelos de colonización pos-glaciales suponen un alta diversidad genética dentro de los refugios glaciales y una pérdida de diversidad durante la re-colonización a partir de estas poblaciones (Hewitt 2000). Sin embargo, el patrón de diversidad genética observado en poblaciones actuales depende, en última instancia, del intervalo de distribución de las poblaciones de refugio y de los niveles de intercambio genético entre éstas (Thiel-Egenter *et al.* 2008).

Los helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae representan un modelo apropiado para la investigación de procesos de diferenciación por dos razones: 1) el linaje es anterior a la última fragmentación del bosque mesófilo de montaña, lo cual permite probar hipótesis de vicarianza bajo el escenario de cambio climático durante el Pleistoceno; 2) los helechos arborescentes en México tienen un alta afinidad a condiciones ecológicas características, sirviendo como una familia modelo para estudiar los patrones de diferenciación del bosque mesófilo de montaña. Las hipótesis de diferenciación y diversificación por oscilaciones climáticas en poblaciones de helechos arborescentes en México, son congruentes con resultados

obtenidos en los pocos estudios que existen para la familia (*i.e.* Wang *et al.* 2003a, 2003b, 2004; Su *et al.* 2004, 2005a, 2005b; Janssen *et al.* 2008).

En este sentido, se puede hablar de la existencia de cuatro factores principales que suponen la existencia de aislamiento entre las distintas poblaciones de helechos arborescentes, que pudieron haber generado un aumento en la diferenciación genética entre dichas poblaciones.

Primero, las capacidades dispersoras de este tipo de helechos están seriamente limitadas, debido principalmente a la fragilidad en la vitalidad (*i.e.*, sobrevivencia) de sus esporas (Cheng *et al.* 1990; Given 1993), a condiciones ambientales limitadas para la germinación y maduración de gametófitos (Bernabe *et al.* 1999; Hiendlmeyer y Randi 2007) y a la dispersión de gran parte de las esporas producidas a distancias cortas (Conant 1976; Peck *et al.* 1990; Wolf *et al.* 2001). Además, los niveles de carga genética disminuyen las probabilidades de establecimiento después de un evento de dispersión de esporas (Singh y Roy 1977), ya que el gametofito establecido en una nueva localidad tendrá altas probabilidades de sufrir una fertilización intra-gametofítica (Klekowski 1973). Este tipo de reproducción lleva a generar esporofitos completamente homocigos en una sola generación, los cuales expresarán todos los alelos deletéreos presentes. Estas limitaciones, junto con la fragmentación y aislamiento, se traducen en un flujo génico reducido en estas poblaciones.

Segundo, Arens (2001) sostiene que las diferencias observadas en el desempeño de *Cyathea caracasana*, cercanamente emparentado con *C. fulva* (*sensu*

Conant *et al.* 1996) se pueden deber a plasticidad fenotípica o a la adaptación intra-poblacional a diferentes ambientes. Si esto último es cierto, podemos decir que la variación inter-poblacional observada puede verse afectada por presiones de selección distintas en cada uno de los manchones de bosque.

Tercero, los tamaños poblacionales de las especies de Cyatheaceae se han ido reduciendo por la fragmentación del bosque mesófilo de montaña en manchones más pequeños y por su alta fidelidad a sitios húmedos y/o riparios. Luna *et al.* (1999) exploraron, por medio del Análisis de Parsimonia de Endemismos, una hipótesis general de las relaciones históricas del bosque mesófilo de México y encontraron evidencia de que cinco grandes manchones de bosque mesófilo divergieron secuencialmente de un bosque anteriormente continuo, donde cambios climáticos mayores proveyeron los eventos de aislamiento que indujeron a su fragmentación. Lo anterior puede sugerir consecuentemente que las poblaciones de Cyatheaceae han ido perdiendo variación genética por la reducción de sus poblaciones y los consecuentes efectos de la deriva génica.

Cuarto, Conant (1990) sostienen que aún cuando el sistema de apareamiento de estos helechos no se conoce a fondo, la condición bisexual y la maduración sincrónica de gametos indican que éstos tienen el potencial de auto-fertilización. Tryon y Tryon (1982) sostienen que en los helechos, la fertilización cruzada requiere que la cercanía de dos gametofitos sea suficiente para que el esperma de uno alcance el huevo del otro, por lo que la densidad poblacional es un factor importante en los niveles de endogamia en las poblaciones. Además, la fertilización depende

enteramente de la presencia de agua en el nicho (Cheng *et al.* 1990) y aún cuando se de una fertilización cruzada entre gametofitos, existe la posibilidad de que éstos provengan de un mismo individuo adulto (auto-fertilización inter-gametofítica) y como consecuencia se esperarían una diferenciación local considerable y baja heterocigosis (Barrington 1993). Estos prerrequisitos aumentan la probabilidad de que se lleve a cabo un proceso de auto-fertilización intra-gametofítica.

1. 4. Antecedentes

Los estudios de variación genética y relaciones filogenéticas de especies de la familia Cyatheaceae son escasos y en México no existen estudios enfocados al análisis de la variación genética en éstas. Conant *et al.* (1994, 1996) analizaron las relaciones filogenéticas de especies de la familia con información de cpDNA; Wang *et al.* (2003a, 2003b, 2004) realizaron estudios de genética de poblaciones y filogeografía en *Alsophila spinulosa* utilizando marcadores RAPD y secuencias de *atpB-rbcL* de cpDNA; Su *et al.* (2004, 2005a, 2005b) estudiaron la estructura filogeográfica de *A. spinulosa* utilizando secuencias de *atpB-rbcL* y *trnL-F*; Korall *et al.* (2007) realizaron análisis filogenéticos utilizando marcadores nucleares y de cpDNA; Zhou *et al.* (2008) aislaron y caracterizaron *loci* de microsatélites en *A. spinulosa*; Janssen *et al.* (2008) analizaron patrones de diversificación en los helechos arborescentes malgaches. Los estudios de variación genética y filogeografía en helechos de otras

familias son más abundantes, pero en relación a otros grupos de plantas, éstos siguen siendo relativamente escasos.

Estudios sobre la biología reproductiva y ecología de la familia Cyatheaceae para el continente son varios, entre los cuales destacan los siguientes: Bittner y Breckle (1995) establecieron tasas de crecimiento y edad de este tipo de helechos; Conant y Cooper-Driver (1980) describieron el establecimiento de híbridos fértiles en especies de *Alsophila* y *Nephelea*; Pérez-García y Riba (1982) determinaron el efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas; Conant (1990) estudió la biología reproductiva de varias especies de *Alsophila*; Arens y Sánchez-Baracaldo (1998) describieron la distribución de plantas en un mosaico sucesional; Bernabé *et al.* (1999) estudiaron la germinación de esporas, supervivencia y establecimiento de esporofitos; Arens (2001) realizó un estudio sobre el crecimiento de *C. caracasana* en diferentes microambientes; Mehlreter y García-Franco (2008) estudiaron la fenología foliar y tasas de crecimiento de *A. firma*.

Los estudios de genética de poblaciones en especies mexicanas son variados, entre los cuales destacan algunos trabajos con especies de helechos (Apéndice II) y especies de distribución restringida; Coello *et al.* (1993) con la planta endémica *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae); Ledig *et al.* (1997) con una especie endémica del género *Picea*; Delgado *et al.* (1999) con el pino mexicano *Pinus rzedowskii* (Pinaceae); Martínez-Palacios *et al.* (1999) con el agave endémico *Agave victoria-reginae*; Aguirre-Planter *et al.* (2000) con especies de *Abies* (Pinaceae); Ledig *et al.* (2000) con la especie endémica *Picea martinezii*; Cuenca *et al.* (2003)

con la especie de pino relictual *Pinus nelsonii*; González-Astorga *et al.* (2003) con la cícada *Dioon edule* (Zamiaceae); Silva-Montellano y Eguiarte (2003) con *Agave lechugilla*; González-Rodríguez *et al.* (2004) con el complejo de encinos *Quercus affinis* – *Q. laurina*; González-Astorga *et al.* (2005) con la especie de cícada *Dioon angustifolium*; Jaramillo-Correa *et al.* (2006) con *Picea chihuahuana*; Ledig *et al.* (2006) con *Abies bracteata*; Jaramillo-Correa *et al.* (2008) con especies del género *Abies*.

2. OBJETIVOS

Objetivos generales

Realizar una primera descripción de la estructura filogeográfica y los patrones de variación genética en poblaciones de dos especies de helechos arborescentes: *Alsophila firma* y *Cyathea fulva* (Cyatheaceae), presentes en manchones de bosque mesófilo de montaña en la Sierra Madre Oriental.

Objetivos particulares

- Establecer la utilidad de distintos espaciadores intergénicos de cpDNA para el estudio de patrones de variación genética y estructuración filogeográfica en las especies de helechos arborescentes mexicanos.
- Calcular los niveles de variación genética y establecer el grado de diferenciación entre las distintas poblaciones de *A. firma* y *C. fulva* en la Sierra Madre Oriental, utilizando información de marcadores de cpDNA.
- Realizar una primera aproximación a la historia y estructura filogeográfica de las poblaciones de las especies analizadas, dentro de la región más septentrional de los intervalos de distribución (*i.e.*, Sierra Madre Oriental) de dichas especies.

- Proponer una hipótesis preliminar sobre la relación que guardan los procesos históricos de cambio climático y fragmentación del hábitat con los patrones de variación genética en las poblaciones de los helechos arborescentes estudiados.

3. MÉTODOS

3. 1. Área de estudio

Bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental (SMOR). El bosque mesófilo (*sensu* Rzedowski 1978) se encuentra en los estados de Hidalgo, Querétaro de Arteaga, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz. Sin embargo, los helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae solamente se presentan en manchones de bosque en la parte más sureña de la provincia, lo que excluye del estudio los bosques del estado de Tamaulipas y la parte central de San Luis Potosí.

Utilizando como referencia datos de registro de herbario existentes en el Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU) y en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME), así como registros de la base de datos del Missouri Botanical Garden (w3 Tropicos), se definieron los sitios de colecta de helechos arborescentes. Se recolectaron muestras de helechos arborescentes en el estado de Hidalgo en los manchones de bosque mesófilo de Tenango de Doria (El Damo), Tlanchinol (Lontla y Tlanchinol) y Zacualtipán de Ángeles (Tlahuelompa); en Veracruz en el bosque del municipio de Huayacocotla (Helechales) y en la región centro (región Capital) del estado, en el municipio de Coatepec (Tecajetes) (Figura 6 y Tabla 1); esta última localidad se encuentra fuera de la provincia Sierra Madre Orientalense. En todas las localidades se colectaron helechos arborescentes de las especies presentes (Tabla 1), que posteriormente fueron identificadas y analizadas.

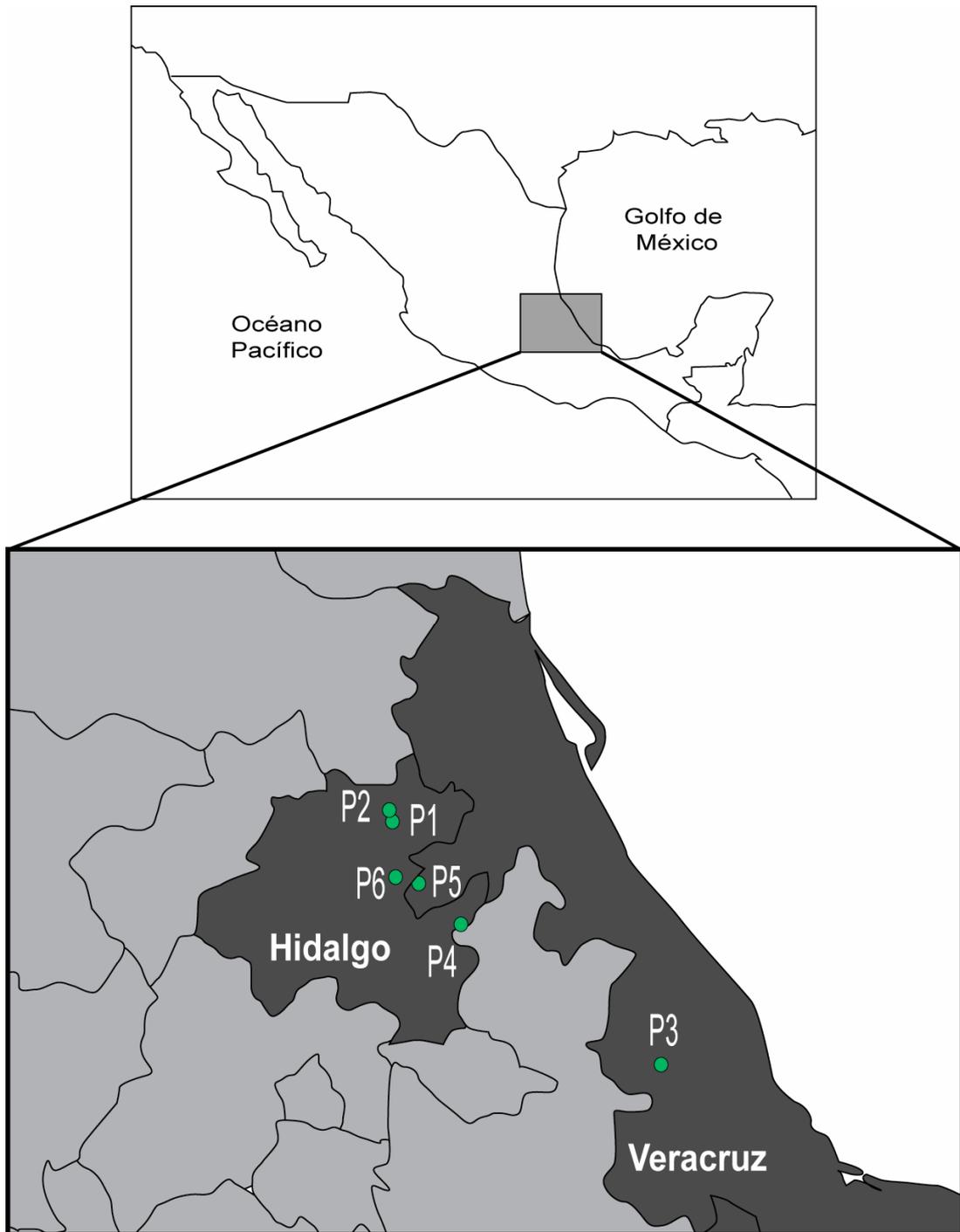


Figura 6. Localidades de colecta en los estados de Hidalgo y Veracruz, México para dos especies de helechos arborecentes *Alsophila firma* y *Cyathea fulva*; P1 = Tlanchinol, P2 = Lontla, P3 = Tecajetes, P4 = El Damo, P5 = Helechales, P6 = Tlahuelompa.

Tabla 1. Localidades de sitios de colecta, ejemplares de herbario (FCME) y secuencias obtenidas de Korall *et al.* (2007) para helechos arborescentes. 1= *Alsophila firma*, 2= *Cyathea fulva*, 3= *Cyathea* sp; *= localidades muestreadas para fines de exploración de polimorfismos; ♦= localidades de colecta fuera de la Sierra Madre Oriental; °= localidades con coordenadas geográficas aproximadas; FCME = Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Localidad	Ubicación			Altitud (msnm)	Especies	
	(municipio, estado)	Longitud	Latitud			
<i>Colecta</i>						
P1	Tlanchinol *	Tlanchinol, Hidalgo	98° 38.052'O	20° 58.957'N	1,374	1, 2
P2	Lontla *	Tlanchinol, Hidalgo	98° 38.566'O	21° 01.668'N	1,535	1, 2
P3	Tecajetes *♦	Coatepec, Veracruz	96° 58.894'O	19° 28.354'N	1,300	1, 3
P4	El Damo	Tenango de Doria, Hidalgo	98° 12.812'O	20° 19.442'N	1,657	1, 2
P5	Helechales	Huayacocotla, Veracruz	98° 28.177'O	20° 35.676'N	2,190	1, 2
P6	Tlahuelompa	Zacualtipán de Ángeles, Hidalgo	98° 36.948'O	20° 37.921'N	1,950	1, 2
<i>Herbario (FCME)</i>						
H1	Villa Juárez °	Xicotepec, Puebla	[97° 57.00'O]	[20° 17.00'N]	-	2
H2	Atoyac °	Atoyac de Álvarez, Guerrero	[100° 22.00'O]	[17° 18.00'N]	-	2
<i>Secuencias obtenidas de Korall et al. (2007)</i>						
G1	Honduras °	Honduras	[86° 50.00'O]	[14° 35.00'N]	-	1
G2	Costa Rica °	Costa Rica	[83° 55.00'O]	[9° 50.00'N]	-	3
G3	Puerto Rico °	Puerto Rico	[66° 30.00'O]	[18° 13.00'N]	-	3

Inicialmente, se muestrearon helechos en tres localidades de bosque mesófilo con el propósito de explorar la presencia de polimorfismos en distintos marcadores y establecer su utilidad en el estudio de los niveles de variación genética y estructura filogeográfica de dichas especies (Tabla 1). De estas tres localidades, dos se localizan en el municipio de Tlanchinol, Hidalgo y una en el municipio de Coatepec, Veracruz. Posteriormente, se colectaron organismos en tres localidades en los estados de Hidalgo y Veracruz (Tabla 1).

3. 2. Muestreo

El muestreo se llevó a cabo de manera aleatoria, técnica similar utilizada por Su *et al.* (2004, 2005a, 2005b) y Wang *et al.* (2003b, 2004), que consiste en la recolección de plantas elegidas arbitrariamente evitando la colecta de clonas. En las dos primeras localidades (Lontla y Tlanchinol) se colectaron organismos de *Alsophila firma* y *Cyathea fulva*, mientras que en la tercera localidad (Tecajetes) se colectaron solamente organismos de *A. firma* y de una tercera especie de *Cyathea* (aff. *bicrenata*) (Tabla 1), debido a la ausencia de organismos de *C. fulva*. En la cuarta localidad (El Damo) se colectaron organismos de ambas especies, aunque se contó con una sola planta de *C. fulva*. En la quinta localidad de colecta (Helechales) se colectaron plantas de *C. fulva* y solamente una para *A. firma*. En la sexta localidad (Tlahuelompa) se colectaron ambas especies, aunque éstas son escasas y solamente se colectó una planta para *A. firma* (Tabla 1).

Para las muestras de cada planta se tomaron preferentemente fragmentos de hojas (pínnulas) jóvenes y saludables de organismos reproductivos; adicionalmente se tomaron muestras de escamas peciolares para cada una de las plantas muestreadas para facilitar su identificación. En el caso de no tener acceso al ápice del fuste, se realizó una identificación visual en campo. Las muestras de tejido foliar se conservaron en bolsas de plástico con silica gel o colocándolas directamente en nitrógeno líquido (-70 °C) para su posterior procesamiento (Chiang *et al.* 1998; Su *et al.* 2004, 2005a 2005b; Wang *et al.* 2003b, 2004). Las muestras de tejido se conservaron a -80 °C hasta ser procesadas.

Adicionalmente, se recolectaron ejemplares de cada especie, que fueron depositados dentro de la colección del Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME) (*S. Ramírez-Barahona 12, 22*) y en el Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU).

3. 3. Extracción de DNA

La extracción de DNA total de tejido foliar se realizó siguiendo el protocolo CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) *mini-prep* de Vázquez-Lobo 1996 (Apéndice III). El protocolo de extracción fue modificado para incorporar múltiples extracciones con CTAB, varios lavados con cloroformo-octanol y digestión con proteinasa K (pasos no reportados). Por otra parte, se varió la cantidad de tejido foliar (lámina) utilizado en las extracciones y se removieron en gran parte cóstulas, soros, esporas y

receptáculos de las muestras. Adicionalmente, se extrajo DNA de ejemplares de herbario depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME). Estos ejemplares en su mayoría corresponden a colectas en los estados de Guerrero, Puebla y Veracruz.

La concentración de DNA se estimó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta, cuantificando mediante la comparación de intensidad de banda con un marcador de peso molecular de 100 pb (Nucleic Acid Markers, 100 bp DNA Ladder, Invitrogen). Inicialmente se extrajo DNA de todos los organismos de cada especie en todas las localidades de colecta. Sin embargo, la calidad de DNA no fue adecuada para amplificar en todas las muestras y algunos ejemplares colectados fueron mal identificados, tratándose de helechos afines a otros grupos (*i.e.* aff. *Diplazium*). En el caso de las extracciones de material de herbario, la concentración de DNA no pudo ser corroborada mediante electroforesis, debido a las bajas concentraciones de material extraído. Para estas muestras de DNA se procedió directamente con la amplificación.

3.4. Amplificación y secuenciación

Exploración de polimorfismos

Para facilitar la exploración y detección de polimorfismos en los marcadores de cpDNA se estableció un panel exploratorio de dos grupos de cinco organismos por

localidad para cada una de las especies; se seleccionaron muestras con concentraciones equivalentes. Para esto se siguió el protocolo reportado por Pelgas *et al.* (2004), donde se mezclaron porciones iguales de DNA de los organismos seleccionados para someterlos a reacciones de amplificación utilizando primers específicos para las tres regiones de cpDNA (Tabla 2). Adicionalmente, cada una de las muestras de DNA de los organismos seleccionados fue sometida a reacciones de amplificación por separado.

Espaciadores intergénicos de cpDNA

Se obtuvieron secuencias para tres regiones del genoma de cloroplasto que incluyen los espaciadores intergénicos *atpB-rbcL*, *trnG-trnR* y *trnL-trnF*; estas tres regiones se encuentran dentro de la región larga LSC (*Large Single Copy*) del genoma de cloroplasto. Los primers para la amplificación de *atpB-rbcL* se obtuvieron de Korall *et al.* (2007), para *trnG-trnR* de Nagalingum *et al.* (2007) y Korall *et al.* (2007), y para *trnL-trnF* de Taberlet *et al.* (1991) (Tabla 2).

Todas las amplificaciones fueron efectuadas en un volumen de reacción de 30 μL , utilizando amortiguador 1 X (500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3), 2.0 mM MgCl_2 , 5% BSA (Albúmina Sérica Bovina), 0.2% triton X-100, 50 μM de cada dNTP, ≈ 10 ng DNA, 1.5U Taq polimerasa y 0.2 μM de cada primer. Para la amplificación del *trnL-trnF* se utilizaron 100 μM de cada dNTP y 0.4 μM de cada primer.

La amplificación de las tres regiones de cpDNA se llevó a cabo siguiendo perfiles de termociclación modificados a partir del protocolo reportado por Su *et al.* (2005b); éstos constaban de 3 minutos iniciales a 94 °C, seguido de 25-30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 60 segundos a temperatura de alineación (Tabla 2) y 90 segundos a 72 °C, con 7 minutos adicionales a 72 °C. Para la amplificación de la región *atpB-rbcL* en ejemplares de herbario se aumento el número de ciclos a 34 debido a la presencia de cantidades mínimas de DNA extraído.

Tabla 2. Secuencias de primers y temperaturas de alineación utilizadas para la amplificación y secuenciación de espaciadores intergénicos cpDNA en dos especies de helechos arborescentes *Alsophila firma* y *Cyathea fulva*.

Región	Primer	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
<i>atpB-rbcL</i>	RBCL26R	GCT TTA GTC TCC GTT TGT GGT GAC AT	54
	ATPB703R	CCA ATG ATC TGA GTA ATS TAT CC	
<i>trnG-trnR</i>	TRNG1F	GCG GGT ATA GTT TAG TGG TAA	55
	TRNG63R	GCG GGA ATC GAA CCC GCA TCA	
	TRNG353F	TTG CTT MTA YGA CTC GGT G	
	TRNR22R	CTA TCC ATT AGA CGA TGG ACG	
<i>trnL-trnF</i>	TRNLC	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	53
	TRNFF	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	

Los productos de PCR fueron examinados mediante una electroforesis en gel de agarosa (1% en TAE) teñido con bromuro de etidio (7.0 µl / 100 ml buffer),

visualizado con luz ultravioleta y fotografiado (Kodak EDAS 240). Aquellos productos de PCR con un solo fragmento de tamaño esperado fueron retenidos para su secuenciación. Estos productos fueron secuenciados en la Universidad de Washington (High-Throughput Genomic Unit). La calidad y presencia de errores en cada una de las secuencias fue verificada manualmente mediante el análisis de los cromatogramas correspondientes.

3.5. Análisis de datos

Exploración de polimorfismos

La presencia de polimorfismos fue verificada al observar “picos” dobles en los cromatogramas de las reacciones de secuenciación [producidos por SNPs (*single nucleotide polymorphism*) o cambios de marco de lectura (causados por *indels*)] (Pelgas *et al.* 2004). Estos polimorfismos fueron confirmados mediante duplicaciones y comparaciones con secuencias por separado de los organismos seleccionados (Jaramillo-Correa *et al.* 2008). En caso de confirmar polimorfismos dentro de la secuencia, se procedió con la secuenciación individual para cada uno de los organismos muestreados.

Análisis de secuencias de cpDNA

Las secuencias del espaciador intergénico *atpB-rbcL* fueron alineadas utilizando el programa BioEdit 5.0.6 (Hall 1999) y la presencia de sitios variables fue corroborada

mediante la inspección manual de los cromatogramas correspondientes. Las secuencias fueron limitadas en los extremos para evitar la presencia de sitios variables debido a artefactos de secuenciación.

Se estimaron los niveles de variación, diferenciación genética y estructura filogeográfica con los datos obtenidos de secuencias de cpDNA. Los presentes análisis se realizaron de manera paralela para cada una de las especies.

Variación genética

Para el análisis de variación se estimaron índices de diversidad nucleotídica y haplotípica con el programa DnaSP v. 4.50.3 (DNA Sequence Polymorphism, Rozas *et al.* 2008). La diversidad nucleotídica π fue calculada con la fórmula (ecuación 10.5, Nei 1987),

$$\frac{n}{n-1} \sum x_i x_j \pi_{ij}$$

donde x_i representa la frecuencia de la secuencia i y π_{ij} la proporción de diferencias nucleotídicas entre la secuencia i y la j .

El estimador de Waterson θ_W , que se utiliza como un estimador de la variación genética global en una población, fue calculado con la fórmula (ecuación 10.3, Nei 1987),

$$\frac{p_n}{A}$$

donde $A = 1 + 1/2 + \dots + (n-1)^{-1}$ y $p_n = s_n / m_T$, donde s_n y m_T son el número de sitios polimórficos por secuencia y el número total de nucleótidos examinados, respectivamente.

La diversidad haplotípica fue calculada con la fórmula (ecuación 8.1, Nei 1987), con corrección para muestras pequeñas,

$$\frac{2n(1 - \sum p_i^2)}{(2n - 1)}$$

donde x_i es la frecuencia del haplotipo i . La varianza de Hd fue calculada como (ecuación 8.12, Nei 1987),

$$\frac{2}{2n(2n-1)} \left\{ 2(2n-2) [\sum x_i^3 - (\sum x_i^2)^2] + \sum x_i^2 - (\sum x_i^2)^2 \right\}$$

Diferenciación y estructuración

El índice G_{ST} (diferenciación) estima la diferenciación genética relativa a la población total y fue calculado utilizando el programa DnaSP v. 4.50.3 (Rozas *et al.* 2008) con la fórmula (ecuación 9, Nei 1973),

$$\frac{D_{ST}}{H_T}$$

donde $D_{ST} = 2\sigma^2_x$ y $H_T = 2x(1-x)$, donde x y σ^2_x son la media y la varianza de la frecuencia de un alelo entre subpoblaciones.

Paralelamente, se realizó otro análisis de variación con el programa DnaSP, pero esta vez tomando en cuenta la presencia de *indels* como estados de carácter informativos. Esto debido a que en este nivel de análisis, el polimorfismo de DNA debido a sustituciones e *indels* puede ser estudiado sin distinción (Nei 1987). En este análisis se calculó la diversidad haplotípica (Hd_i), diversidad nucleotídica (π_i), estimador de Waterson ($\theta-W_i$), índices de diferenciación (G_{STi}) y flujo génico (Nm_i).

Por último, se realizó una prueba de Tajima (D) para comprobar el carácter neutral de este marcador.

Filogenia molecular

Adicionalmente se realizó una reconstrucción filogenética utilizando el algoritmo Neighbour-Joining (NJ) con el programa MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura *et al.* 2007), realizando 1,000 réplicas de bootstrap; para ésta se utilizó el modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura (1980). Se hicieron reconstrucciones individuales para cada especie, utilizando los grupos externos correspondientes y una reconstrucción conjunta para ambas especies. Los grupos externos utilizados en la reconstrucción fueron secuencias de *atpB-rbcL* obtenidas para una tercera especie colectada (*Cyathea* aff. *bicrenata*) en la localidad de Tecajetes (Tabla 1) y secuencias obtenidas por Korall *et al.* (2007) para *Alsophila*

bryophila (Puerto Rico), *A. cuspidata* (Costa Rica), *A. salvinii* (Honduras), *A. tryoniana* (Honduras), *C. caracasana* (Costa Rica), *C. divergens* (Costa Rica), *C. schiedeana* (Honduras) y *Lophosoria quadripinnata* (Ecuador).

Asociación entre distancia genética y distancia geográfica

Asimismo, se elaboraron matrices de distancia (d_n) entre poblaciones a partir del número de sitios nucleotídicos distintos entre secuencias con la fórmula,

$$d_{XY} = \frac{d_X + d_Y}{2}$$

donde d_X y d_Y es la distancia promedio dentro de las poblaciones X y Y , y d_{XY} es la distancia promedio entre poblaciones.

A partir de estas matrices se generaron dendogramas individuales de distancia entre poblaciones con el algoritmo Neighbor-Joining para las poblaciones de cada una de las especies.

La correlación entre distancias genéticas (d_n) y distancias geográficas entre poblaciones fue analizada mediante una prueba estadística de Mantel (1967). Ésta es una prueba estadística de correlación entre dos matrices de datos. La prueba calcula la correlación entre las matrices y después lleva a cabo permutaciones con los datos de dichas matrices. El valor de significancia de la prueba indica la proporción de matrices permutadas que tienen un valor de correlación mayor al valor de la correlación de las matrices originales (estadístico de prueba). Bajo la hipótesis nula

de no correlación entre matrices, se espera que la permutación tenga la misma probabilidad de producir valores que sean menores o mayores al estadístico de prueba.

La prueba de Mantel se llevó a cabo con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2007). Asimismo, se analizó la correlación entre la diferenciación genética (G_{ST}) y las distancias geográficas entre las poblaciones.

Distribuciones mismatch

Una distribución *mismatch* es la distribución del número observado de diferencias entre pares de haplotipos. La distribución de estas diferencias usualmente es multimodal en muestras de poblaciones en equilibrio demográfico, pero generalmente son unimodales en poblaciones que pasaron por una expansión demográfica reciente (Slatkin y Hudson 1991) o por una expansión de rango con altos niveles de migración (Ray *et al.* 2003). De esta manera, es posible obtener información sobre los tamaños poblacionales pasados de una especie (Rogers 1995). Slatkin y Hudson (1991) sostienen que una población estable tiene una distribución estable $Q(i)$, la cual se describe por la fórmula (ecuación 1, Slatkin y Hudson 1991),

$$\frac{1}{1+\theta} (\theta / 1+\theta)^i$$

donde i es el número de sitios polimórficos entre cada par de secuencias y $\theta = 2N\nu$, siendo N el tamaño de la población haploide y ν la tasa de mutación por generación.

Las distribuciones mismatch fueron evaluadas estadísticamente bajo dos modelos: 1) expansión demográfica súbita y 2) expansión de rango. Las pruebas de significancia fueron realizadas con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2007).

Redes haplotípicas y análisis filogeográfico de clados anidados

Las redes de haplotipos para ambas especies se elaboraron con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000) con la opción de *indels* como quinto estado de carácter. Este programa utiliza parsimonia estadística para generar un algoritmo que estima el número máximo de diferencias entre haplotipos justificadas por un límite establecido de probabilidad de parsimonia (0.95). El algoritmo calcula la probabilidad de parsimonia para los haplotipos diferenciados por un paso y si ésta es mayor al límite establecido, conecta y forma redes con estos haplotipos. Posteriormente, el algoritmo calcula la probabilidad para los haplotipos diferenciados por dos pasos y si es mayor al límite conecta las redes de un paso por medio de estos haplotipos. El algoritmo continúa evaluando la probabilidad para haplotipos diferenciados por más pasos hasta que el límite establecido de parsimonia es superado.

Las redes de haplotipos generalmente presentan relaciones ambiguas entre haplotipos que están dadas por la presencia de horquillas entre éstas. La presencia de horquillas dentro de las redes fue corregida manualmente con los criterios siguientes, propuestos por Crandall y Templeton (1993),

1) es más probable que los haplotipos raros se encuentran en nodos terminales y los haplotipos más frecuentes en nodos interiores,

2) es más probable que una variante de copia única (*singleton*) se encuentre conectada con haplotipos de la misma población que con haplotipos de distintas poblaciones.

Una vez corregidas, las redes obtenidas fueron sometidas a un Análisis Filogeográfico de Clados Anidados (NCPA) para evaluar la existencia de grupos de haplotipos y establecer si existe una relación entre la distribución de haplotipos dentro de las poblaciones y la ubicación geográfica de éstas. Asimismo, se llevó a cabo un Análisis de Distancias Geográficas de Árboles de Haplotipos Anidados (NHTAGD) con el programa GeoDis (Posada *et al.* 2000). Paralelamente, se llevo a cabo el mismo análisis de manera manual siguiendo la clave de inferencia para el NHTAGD de Posada *et al.* (2000).

4. RESULTADOS

Exploración de polimorfismos

Por un lado, se obtuvieron secuencias de 1,000 pares de bases (bp) para marcador el *trnG-trnR* en *Alsophila firma*, *Cyathea fulva* y *C. bicrenata*. Para cada una de estas especies no se observaron secuencias con sitios polimórficos ni cambios en el marco de lectura, haciendo de éste un marcador aparentemente monomórfico para cada una de las especies analizadas.

Por otro lado, en el análisis de detección de polimorfismos para el marcador *atpB-rbcL* se observó la presencia de múltiples sitios con polimorfismos y cambios de marco de lectura. Para este marcador se obtuvieron inicialmente 17 secuencias acotadas a 605 bp en *A. firma*, provenientes de seis organismos de Tlanchinol, seis de Lontla y cinco de Tecajetes [además de contar con una secuencia para un organismo de Honduras obtenida por Korall *et al.* (2007)]; para *C. fulva* se obtuvieron, inicialmente, 15 secuencias acotadas a 604 bp, provenientes de siete individuos de Tlanchinol y ocho de Lontla. Las secuencias de este marcador presentaban una región poli-A con una longitud de 14-19 bp para *A. firma* y de 18-19 bp para *C. fulva*; esta región microsatélite fue tomada en cuenta junto con el resto del espaciador para generar estimados de diversidad nucleotídica y construir las redes haplotípicas para ambas especies.

El análisis de detección de polimorfismos no se realizó para el marcador *trnL-trnF* debido a que la secuenciación no fue completa y solamente se obtuvieron secuencias para los extremos del espaciador. Esto se debe a que este espaciador intergénico contiene varias regiones microsatélite que impiden que la reacción de secuenciación continúe más allá de esta región (Korall *et al.* 2007; Janssen *et al.* 2008).

Variación, diferenciación y estructuración genética

Dado que el marcador *atpB-rbcL* fue polimórfico, se procedió con la secuenciación de todos los organismos para todas las localidades de colecta. El número de secuencias obtenidas fue menor al número de organismos colectados debido a amplificaciones y secuenciaciones defectuosas en varios casos. Sin embargo, se obtuvieron tamaños de muestra similares para todos los sitios de colecta en ambas especies; exceptuando algunas localidades con cinco o menos plantas colectadas. En total se obtuvieron 63 secuencias para *Alsophila firma*, 54 para *Cyathea fulva* y 3 para *C. bicrenata* con una longitud final de 615 bp para todas las especies.

Diversidad nucleotídica

Las especies de helechos analizadas (*A. firma* y *C. fulva*) mostraron índices de diversidad nucleotídica (π) a nivel especie de 0.0009 ± 0.00018 y de 0.00097 ± 0.00024 (Tabla 3). Los niveles de diversidad nucleotídica observados en las distintas

poblaciones fue variable en ambas especies, sin que se hayan presentado poblaciones completamente monomórficas. Las poblaciones de *A. firma* tuvieron un mínimo de diversidad de 0.00046 (Lontla) y un máximo de 0.00101 (Tlanchinol); en poblaciones de *C. fulva* se obtuvieron valores mínimos de 0.00017 (Lontla) y máximos de 0.0015 (Helechales). Asimismo, se obtuvieron valores de $\theta-W$ (estimador de Watterson) de 0.00281 ± 0.00121 para *A. firma* y de 0.00328 ± 0.00138 para *C. fulva*. Las pruebas de neutralidad (Tajima) realizadas arrojaron valores de -1.77483 ($0.10 > P > 0.05$) y -1.94647 ($P < 0.05$), respectivamente (Tabla 3).

Diversidad haplotípica

La diversidad haplotípica (Hd) dentro de las poblaciones en ambas especies fue variable (Tabla 3), sin que se hayan encontrado poblaciones monomórficas. Las poblaciones de *A. firma* mostraron un mínimo de diversidad haplotípica de 0.2807 (Lontla) y un máximo de 0.5385 (El Damo), con una diversidad global de 0.442 ± 0.069 . En el caso de *C. fulva* la diversidad mínima fue de 0.10 (Lontla) y la máxima de 0.7091 (Helechales), con una diversidad global de 0.442 ± 0.079 . Estos estimados de diversidad de haplotipos no consideran la variabilidad producto de la presencia de múltiples sitios *indel* debidos a diferencias de longitud en la región homopolímera (poli-A). Tomando en cuenta estas diferencias, la diversidad haplotípica en ambas especies se elevó considerablemente (Tabla 3), teniendo valores globales de 0.7435 y 0.7271 para *A. firma* y *C. fulva*, respectivamente.

Tabla 3. Valores de diversidad y diferenciación genética de poblaciones de dos especies de helechos arborescentes (*Alsophila firma* y *Cyathea fulva*) calculados a partir de datos de secuencias (615 bp) del espaciador intergénicos *atpB-rbcL* de cpDNA. *n*: número de secuencias; *h*: número de haplotipos; *hi*: número de haplotipos considerando *indels*; *Hd*: diversidad haplotípica \pm desviación estándar; *Hdi*: diversidad haplotípica considerando *indels*; π : diversidad nucleotídica \pm desviación estándar; $\theta-W$: estimador de Waterson \pm desviación estándar; *D* = estimado de la prueba de neutralidad de Tajima.

Especie	Localidad	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>hi</i>	<i>Hdi</i>	π	$\theta-W$	<i>D</i>
<i>Alsophila firma</i>									
	Tlanchinol	16	5	0.45	7	0.75	0.00101		
	Lontla	19	2	0.2807	8	0.81287	0.00046		
	Tecajetes	12	3	0.31818	3	0.31818	0.00083		
	El Damo	13	2	0.53846	4	0.80769	0.00089		
	Helechales	1	1	-	1	-	-		
	Tlahuelompa	1	1	-	1	-	-		
	TOTAL	63	8	0.442	16	0.7435	0.0009	0.00281	-1.77483
				± 0.069			± 0.00018	± 0.00121	(0.10>P>0.05)
<i>Cyathea fulva</i>									
	Tlanchinol	15	4	0.37143	5	0.70476	0.0011		
	Lontla	20	2	0.10	3	0.57368	0.00017		
	Tecajetes	-	-	-	-	-	-		
	El Damo	1	1	-	1	-	-		
	Helechales	11	4	0.70909	5	0.76364	0.0015		
	Tlahuelompa	5	2	0.60	3	0.80	0.00099		
	TOTAL	54	8	0.442	13	0.7475	0.00097	0.00328	-1.94647
				± 0.079			± 0.00024	± 0.00138	(P<0.05)

Diferenciación y estructuración genética

Los análisis de diferenciación genética y flujo génico mostraron que las poblaciones de helechos de ambas especies se encuentran poco diferenciadas y tienen flujo génico considerable entre ellas. Los valores de estructuración genética G_{ST} fueron de 0.0623 para *A. firma* y 0.0955 para *C. fulva*, con niveles de flujo génico (Nm) de 7.53 y 4.74, respectivamente. Al tomar en cuenta la presencia de sitios *indel*, los estimados de estructuración genética fueron de 0.0543 para *A. firma* y 0.0748 para *C. fulva*, con índices de flujo génico de 9.26 y 6.18, respectivamente.

Filogenia molecular

La reconstrucción filogenética elaborada con el algoritmo Neighbor-Joining muestra una clara agrupación de haplotipos por especie (Figuras 7 y 8). En el caso de *C. fulva*, se puede observar la presencia de varios grupos conformados por secuencias de distintas localidades. Para esta especie es importante señalar que los grupos externos utilizados (*i.e.* *C. caracasana*, *C. divergens* y *C. schiedeana*) se ubican dentro del grupo principal de secuencias, mientras que las secuencias correspondientes a plantas colectadas de *C. bicrenata* se encuentran claramente separadas de estos últimos (Figura 7).

En el caso de *A. firma*, también puede observarse la presencia de grupos compuestos de secuencias de distintas localidades. En este caso, las secuencias de los grupos externos utilizados (*i.e.* *A. bryophila*, *A. cuspidata* y *A. tryoniana*) quedan

Cyathea fulva

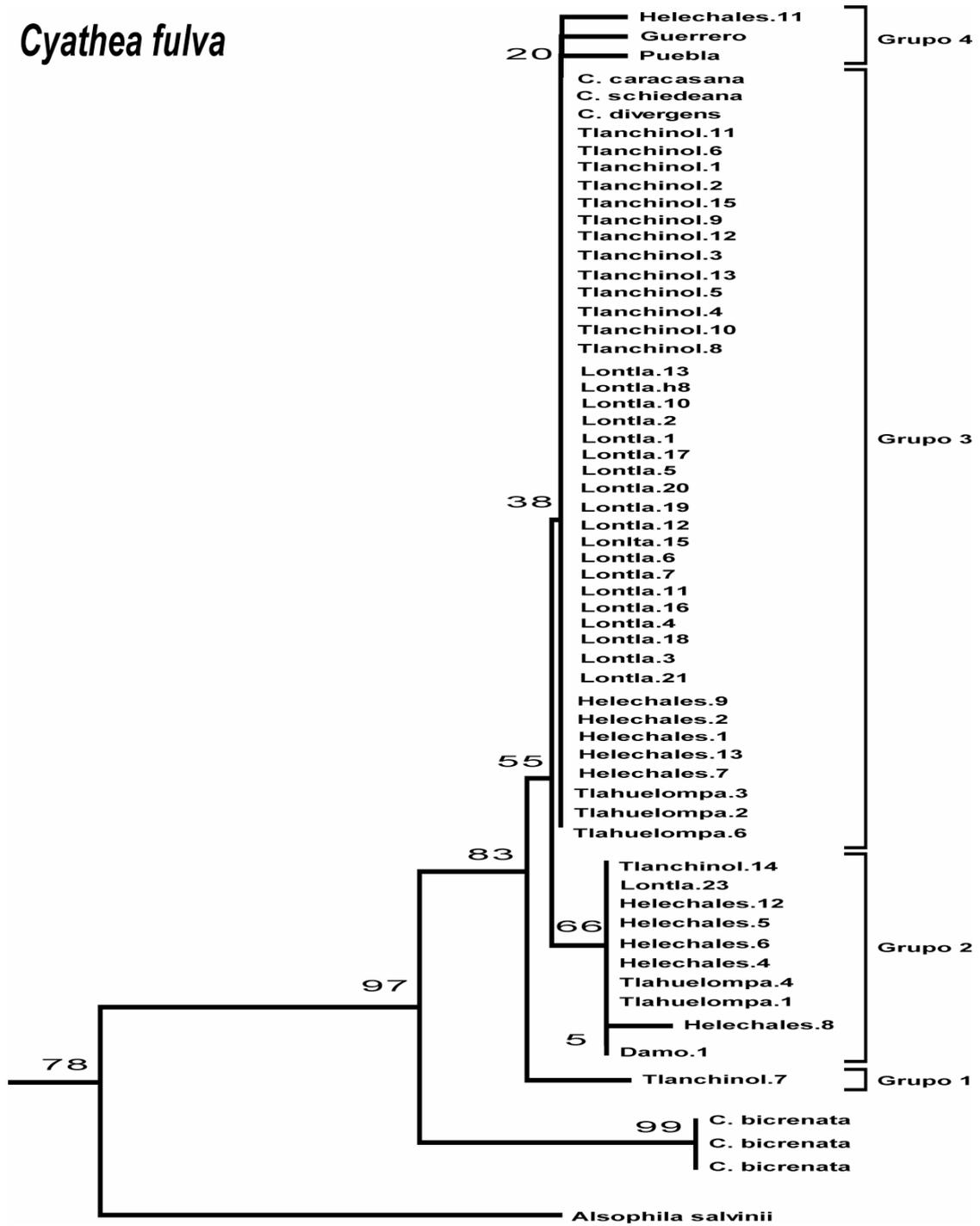


Figura 7. Reconstrucción filogenética de Neighbor-Joining (NJ) para secuencias del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA en *Cyathea fulva* elaborada con el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007); valores de bootstrap obtenidos a partir de 1,000 réplicas.

Alsophila firma

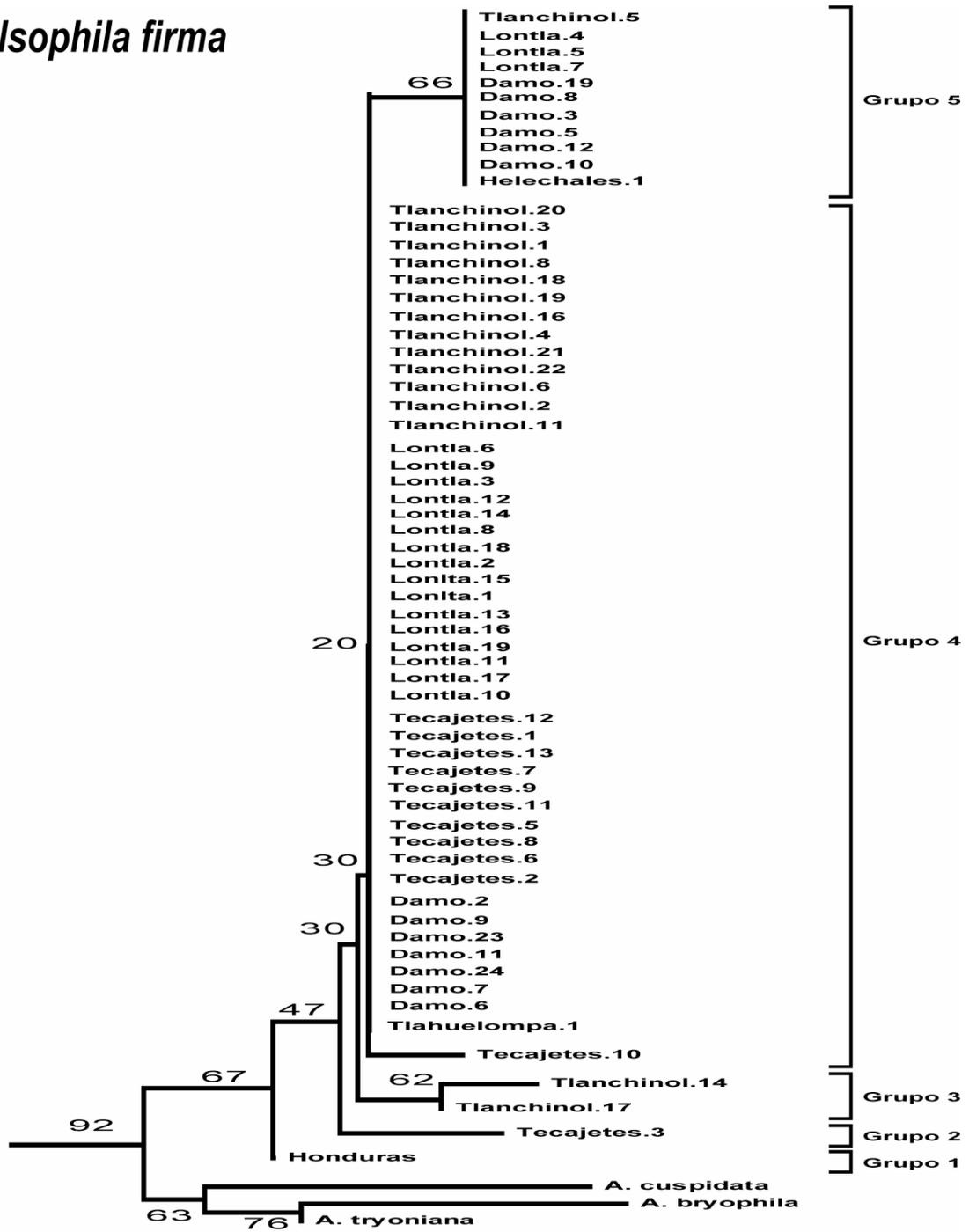


Figura 8. Reconstrucción filogenética de Neighbor-Joining (NJ) para secuencias del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA en *Alsophila firma* elaborada con el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007); valores de bootstrap obtenidos a partir de 1,000 réplicas.

por fuera del grupo principal y la secuencia basal para la especie corresponde al organismo hondureño secuenciado por Korall *et al.* (2007) (Figura 8).

Para *C. fulva* se identificaron cuatro grupos principales de secuencias en la reconstrucción filogenética; una secuencia de Tlanchinol queda en la base del grupo (grupo 1), seguido de un grupo compuesto de tres haplotipos (grupo 2). Se observa un grupo principal de secuencias (grupo 3), dentro del cual se ubican las correspondientes a los grupos externos utilizados (*i.e.* *C. caracasana*, *C. divergens* y *C. shiedeana*). A partir de este grupo se desprende un grupo conformado por una secuencia de Hidalgo y las correspondientes a Guerrero y Puebla (grupo 4).

Para *A. firma* se identificaron cinco grupos principales de secuencias. La secuencia del organismo hondureño se encuentra en la base del árbol (grupo 1), seguido de una secuencia de la localidad de Tecajetes (grupo 2) y un grupo conformado por dos secuencias exclusivas a la localidad de Tlanchinol (grupo 3). A este grupo le sigue una secuencia única de Tecajetes y un grupo principal conformado por secuencias de todas las localidades de colecta (grupo 4). Por último, se observa un grupo terminal compuesto por secuencias exclusivas a las poblaciones hidalguenses (grupo 5).

Asociación entre distancia genética y distancia geográfica

A partir del cálculo de distancias genéticas (número de diferencias nucleotídicas) entre las secuencias se elaboró un dendograma de distancias entre las poblaciones de

helechos analizadas (Figura 9). En el caso de *A. firma*, el dendograma muestra que las localidades genéticamente más cercanas son Tecajetes (Sur) y Tlachinol (SMOR-Norte), quedando Lontla (SMOR-Norte) unida a este grupo y la localidad de El Damo (SMOR-Sur) situándose como la más distante genéticamente. En el caso de *C. fulva*, las poblaciones genéticamente más cercanas son Lontla (SMOR-Norte) y Tlachinol (SMOR-Norte), quedando agrupadas las localidades de Helechales (SMOR-Centro) y Tlahuelompa (SMOR-Centro).

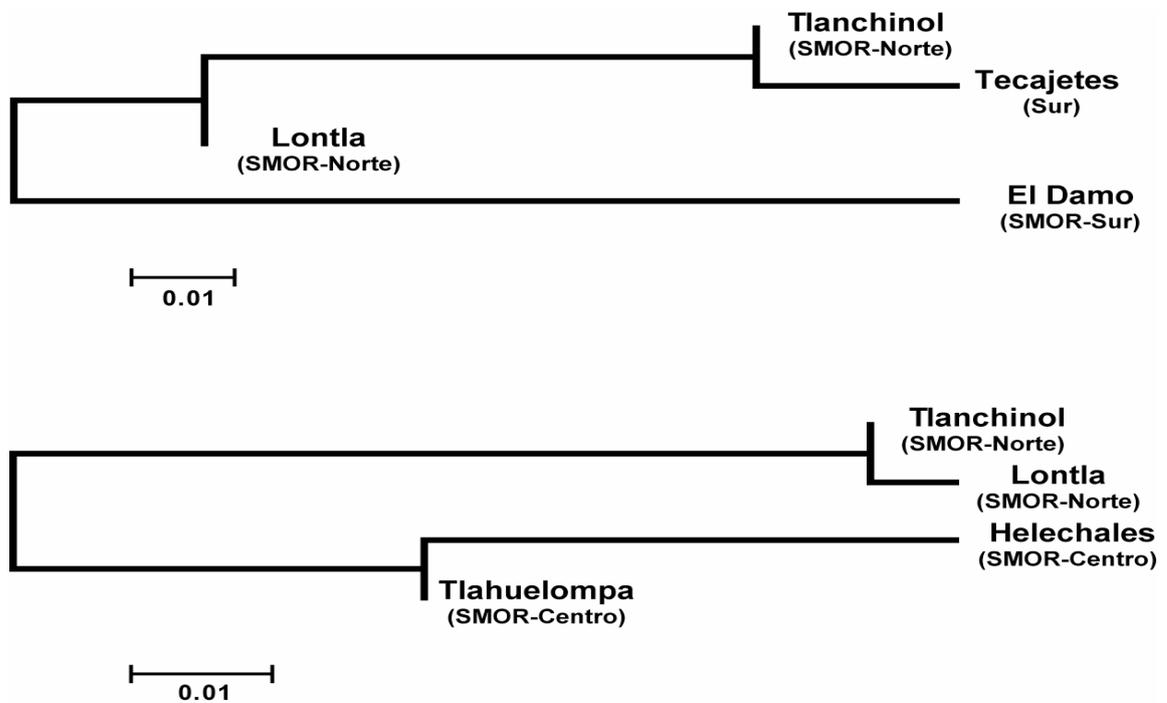


Figura 9. Dendogramas de Neighbor Joining (NJ) de distancias genéticas (promedio de diferencias nucleotídicas) entre secuencias del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA para poblaciones de *Alsophila firma* (arriba) y *Cyathea fulva* (abajo) elaborados con el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007); SMOR = Sierra Madre Oriental.

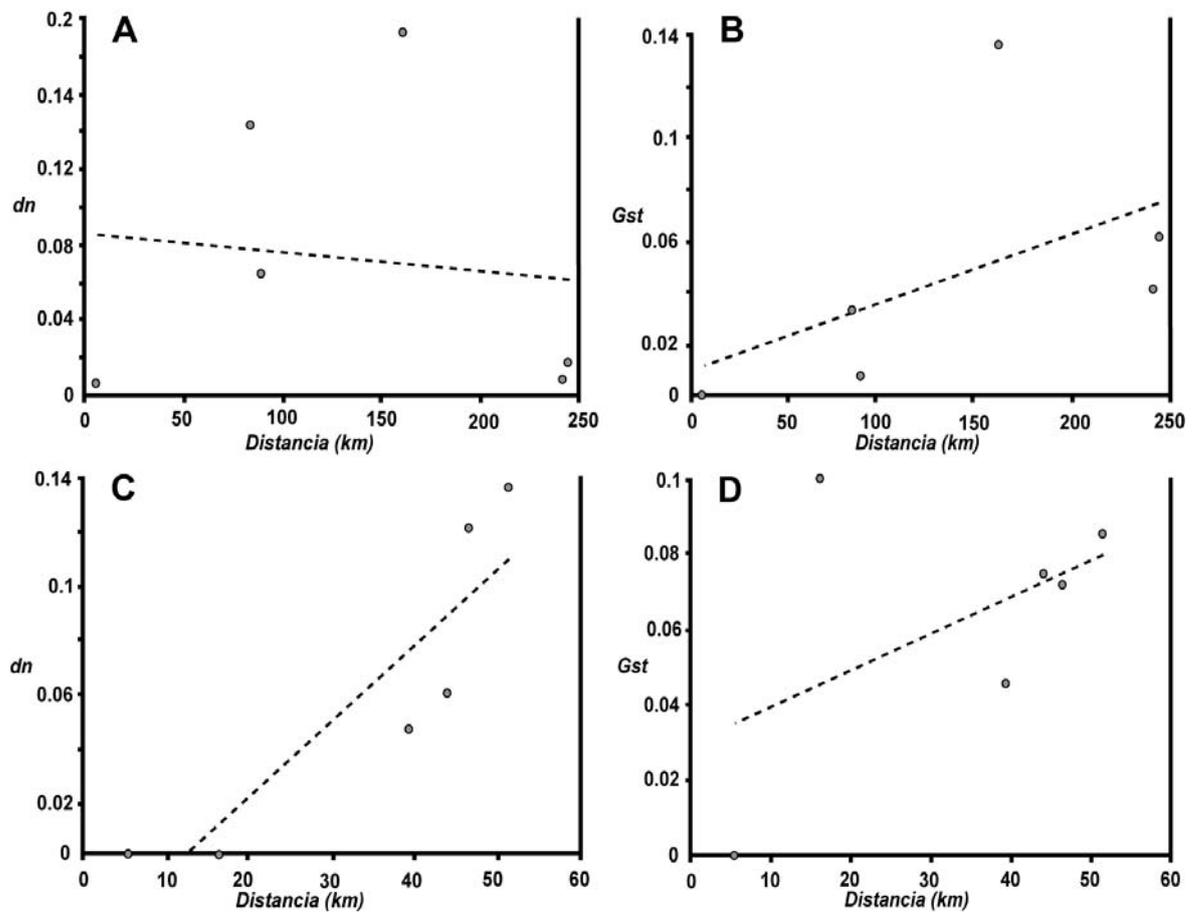


Figura 10. Pruebas de Mantel realizadas en poblaciones de *Alsophila firma* y *Cyathea fulva* elaboradas con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2007); valores de significancia obtenidos a partir de 1,000 permutaciones; A) correlación entre el promedio de diferencias nucleotídicas (dn) entre secuencias de *atpB-rbcL* y distancias geográficas (km) de las poblaciones de *Alsophila firma* ($r = -0.1165$, $p > 0.05$); B) correlación entre los estimados de diferenciación genética (G_{ST}) y distancias geográficas (km) de las poblaciones de *Alsophila firma* ($r = 0.5081$, $p > 0.05$); C) correlación entre el promedio de diferencias nucleotídicas (dn) entre secuencias de *atpB-rbcL* y distancias geográficas (km) de las poblaciones de *Cyathea fulva* ($r = 0.8907$, $p < 0.05$); D) correlación entre los estimados de diferenciación genética (G_{ST}) y distancias geográficas (km) de las poblaciones de *Cyathea fulva* ($r = 0.5078$, $p < 0.05$).

El dendograma de distancia entre poblaciones de *A. firma* (Figura 9) no muestra una relación cercana entre las poblaciones geográficamente más próximas, estando agrupadas las poblaciones de Tlanchinol y Tecajetes, que son las más distantes entre sí (≈ 240 km). En el caso de *C. fulva*, la relación entre distancia genética y proximidad geográfica es mayor, al estar agrupadas por un lado las poblaciones de Tlanchinol y Lontla (separadas por ≈ 5 km) y por otro lado las poblaciones de Helechales y Tlahuelompa (separadas por ≈ 15 km) (Figura 9).

En las poblaciones de *A. firma*, la prueba de Mantel realizada mostró una correlación no significativa ($P > 0.05$) entre las distancias geográficas (*km*) y el número promedio de diferencias entre secuencias (*dn*). La correlación entre distancias geográficas (*km*) y diferenciación genética (G_{ST}) tampoco fue significativa ($P > 0.05$), aún cuando se observa que la diferenciación tiende a aumentar conforme la distancia entre poblaciones es mayor ($r = 0.51$) (Figura 10B).

En las poblaciones de *C. fulva*, la correlación entre las distancias geográficas (*km*) entre poblaciones y el número promedio de diferencias entre secuencias (*dn*) fue significativa ($P < 0.05$), donde se observa una tendencia marcada al aumento del número de diferencias entre secuencias conforme la distancia geográfica entre poblaciones es mayor ($r = 0.89$) (Figura 10C). La correlación entre las distancias geográficas (*km*) y la diferenciación genética (G_{ST}) entre poblaciones también fue significativa ($P < 0.05$), mostrando una tendencia al aumento de la diferenciación conforme aumenta la distancia entre poblaciones ($r = 0.51$) (Figura 10D).

Distribuciones mismatch

La muestra total de secuencias para *A. firma* mostró una distribución mismatch bimodal que corresponden a crestas en cero y dos diferencias pareadas entre secuencias de *atpB-rbcL*; por su parte, se observó un valle marcado en una diferencia pareada (Figura 11A). Para *C. fulva*, se observó una distribución mismatch unimodal que corresponde a una cresta en una diferencia pareada (Figura 11B). La distribución para ambas especies parece ajustarse mejor al modelo de expansión espacial con tamaño poblacional constante que al modelo de expansión demográfica súbita. Sin embargo, las pruebas estadísticas en ambas especies no resultaron significativas para ninguno de los dos modelos simulados ($P > 0.05$).

Filogeografía

Redes haplotípicas

Mediante la elaboración de redes haplotípicas se lograron identificar 16 haplotipos en *Alsophila firma* (Figura 12) y 13 en *Cyathea fulva* (Figura 13); para *C. fulva* se añadieron los haplotipos de *C. divergens* y *C. schiedeana* en el análisis. En las dos especies, se encontraron haplotipos conectados en su mayoría por pasos mutacionales sencillos, aunque existen algunos que se encuentran conectados por tres o cuatro pasos. Las redes haplotípicas obtenidas para ambas especies mostraron topologías similares, donde se presenta una base general de un haplotipo común del cual radia una serie de haplotipos intermedios y únicos (Figuras 14, 15).

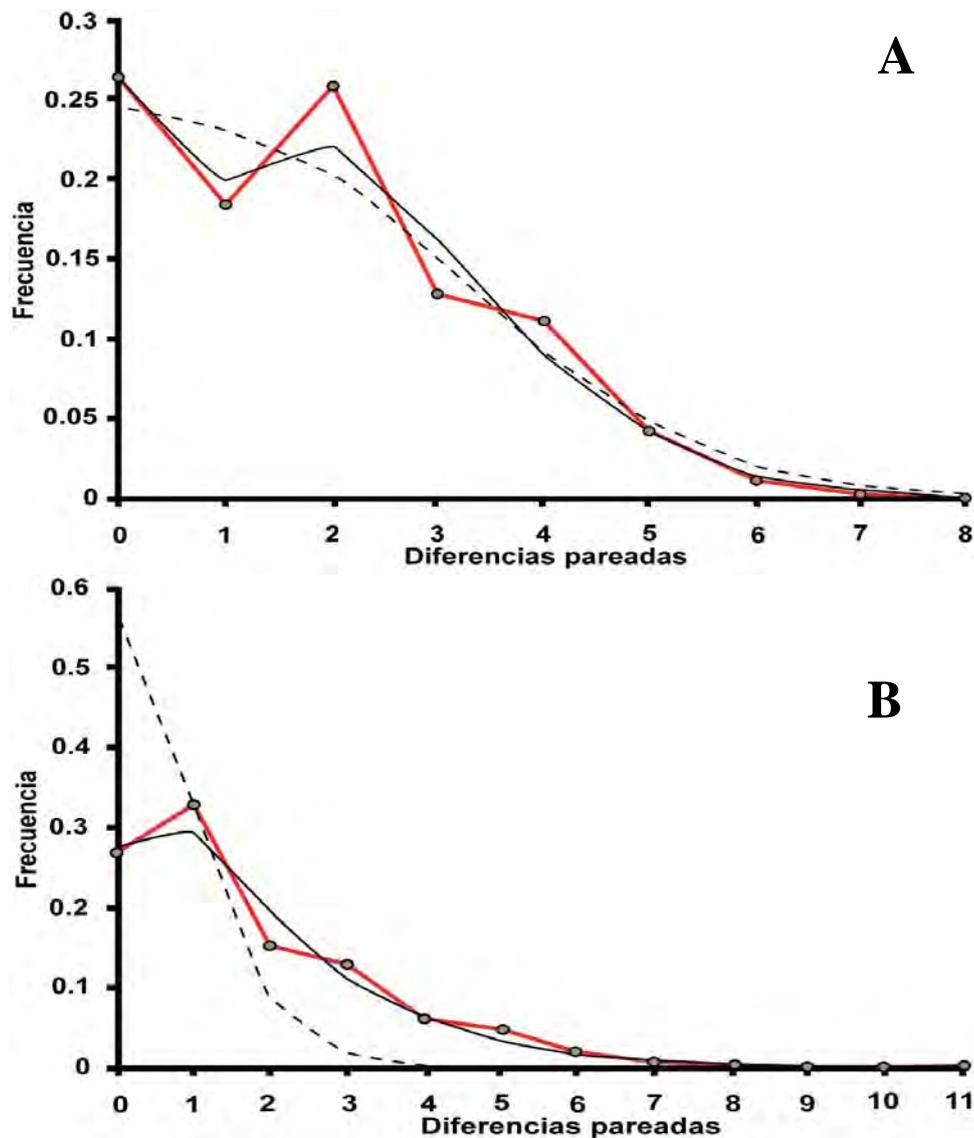


Figura 11. Distribución de diferencias pareadas observadas (línea roja) para la muestra total de secuencias del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA en A) *Alsophila firma* y B) *Cyathea fulvad*. Distribuciones mismatch estimadas bajo el modelo de expansión demográfica súbita (línea punteada) y expansión espacial con tamaño poblacional constante (línea negra), realizadas con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2007); valores de significancia obtenidos a partir de 100 réplicas de bootstrap.

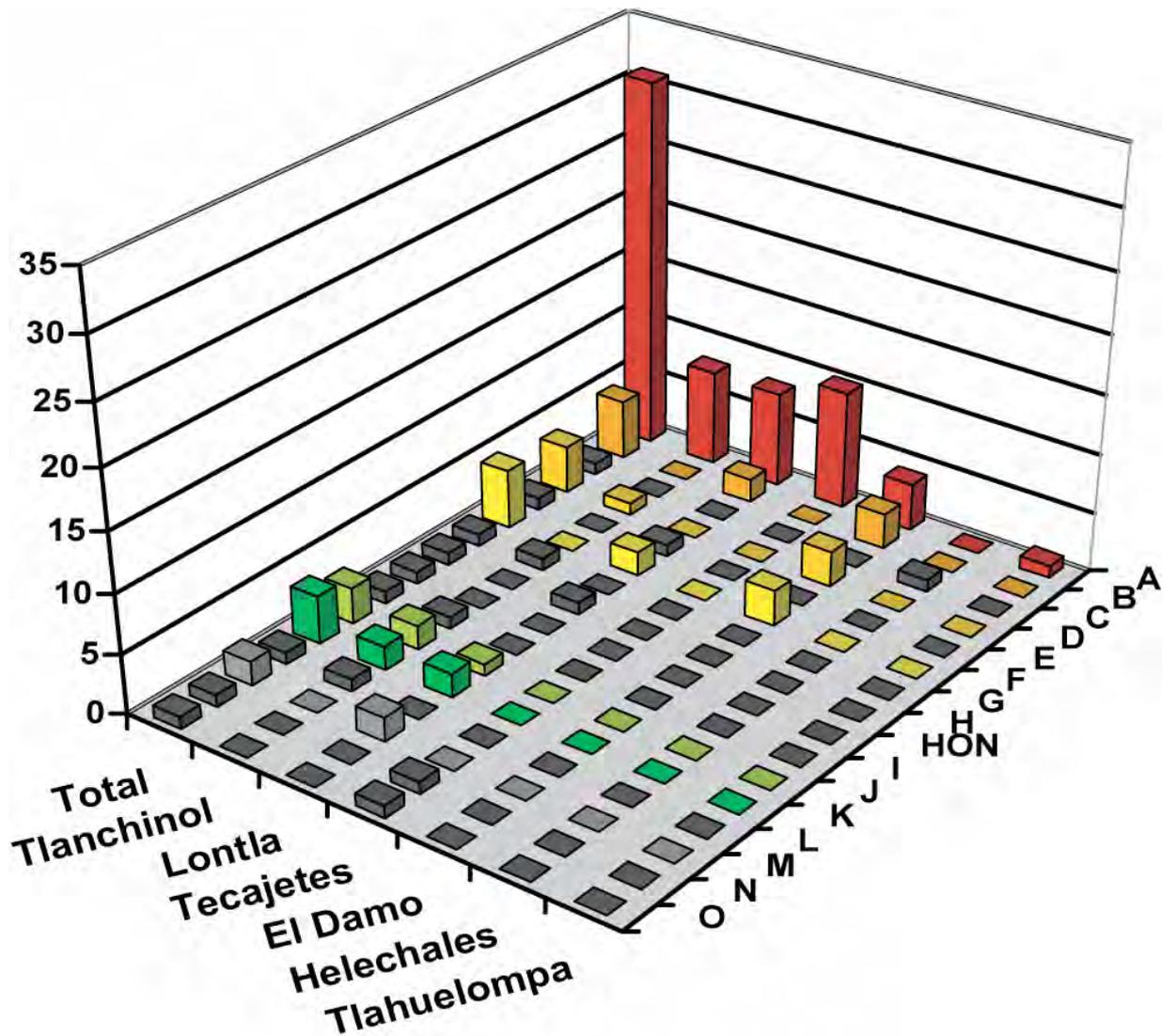


Figura 12. Frecuencia relativa de haplotipos del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA para *Alsophila firma* en distintas localidades de colecta en Hidalgo y Veracruz; HON = haplotipos Honduras obtenido por Korall *et al.* (2007).

A su vez, las poblaciones analizadas no muestran diferencias en cuanto a la presencia y frecuencia de distintos haplotipos (Figuras 12, 13). Considerando la presencia de sitios *indel*, se observó la presencia de haplotipos comunes en dentro de

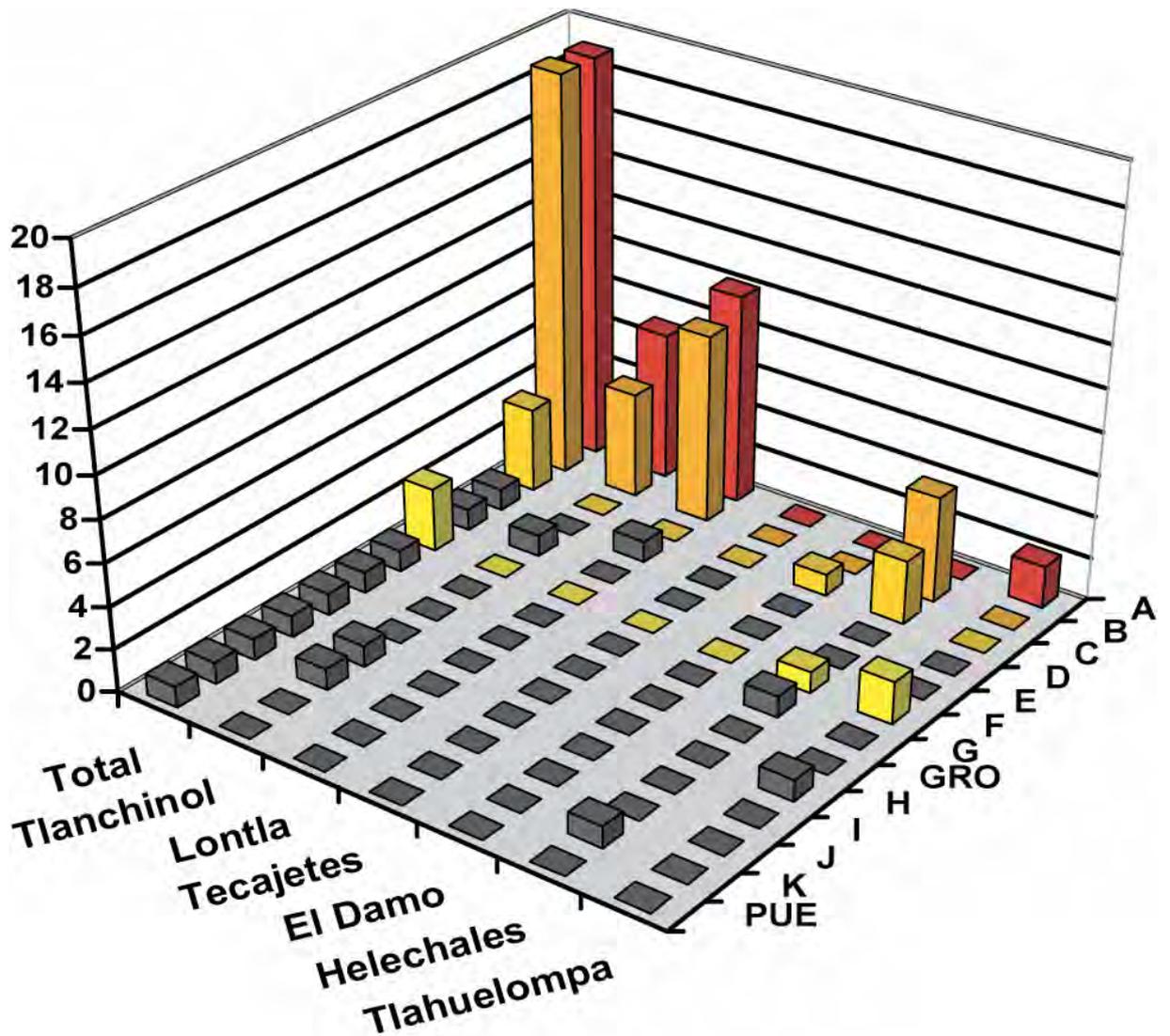


Figura 13. Frecuencia relativa de haplotipos del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA para *Cyathea fulva* en distintas localidades de colecta en Hidalgo y Veracruz; GRO, PUE = haplotipos obtenidos de ejemplares de herbario (FCME) para Atoyac, Guerrero y Villa Juárez, Puebla, respectivamente.

cada una de las dos especies de helechos (uno en *A. firma* y dos en *C. fulva*), distribuidos en todas las poblaciones analizadas, y una serie de haplotipos

intermedios y únicos distribuidos en distintas poblaciones. La diferencia en frecuencia de haplotipos en las distintas poblaciones para cada especie no fue significativamente diferente.

En *A. firma*, el haplotipo común (A) (Figura 14) tiene una frecuencia mayor que la de los demás haplotipos, estando presente en 31 organismos, por tan sólo cinco para el segundo haplotipo más frecuente (D, F) (Figura 12). Este haplotipo es

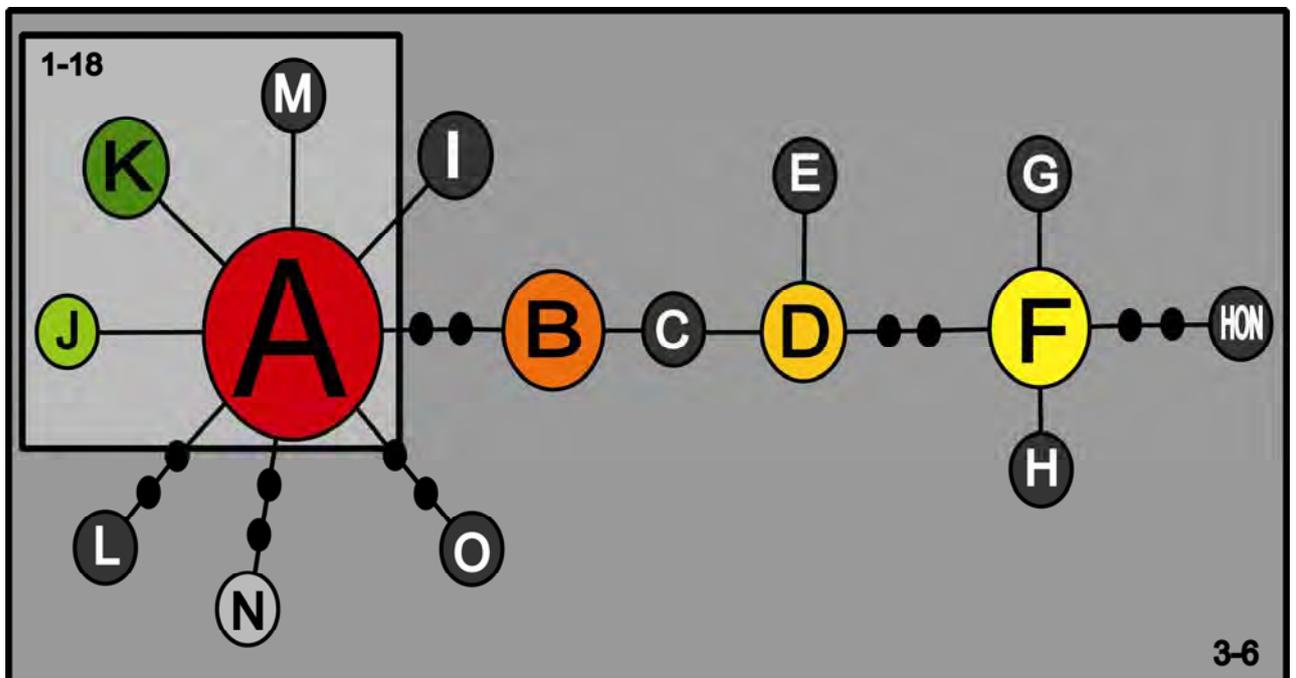


Figura 14. Red de haplotipos del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA para *Alsophila firma*. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia relativa de cada haplotipos (ver figura 12 para distribución de haplotipos en las distintas poblaciones); HON = haplotipos Honduras obtenido por Korall *et al.* (2007). Los cuadros grises indican la presencia de clados con valores significativos para el NCPA.

el centro de la red en forma de estrella y se encuentra en todas las localidades de colecta. En la localidad de Helechales, Veracruz no se pudo recuperar este haplotipo debido a que sólo se contó con un organismo colectado. A partir de éste surgen ocho haplotipos, los cuales se encuentran separados por uno (*I, J, K*) o dos pasos mutacionales (*B, L, M, N, O*).

A partir de uno de estos haplotipos (*B*) surge una rama de haplotipos intermedios (*D, F*) y únicos (*C, E, G, H, HON*), donde el haplotipo hondureño se encuentra como uno de los nodos terminales. El análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA) elaborado para esta especie resultó en tres grandes clados de haplotipos, en los que se observa la presencia de haplotipos comunes (*A, B, F*).

En *C. fulva*, se observan dos haplotipos comunes (*A, B*) (Figura 15) que tienen una frecuencia significativamente mayor que la de los demás haplotipos, estando presente en 19 organismos por tan sólo cuatro para el tercer haplotipo más frecuente (*C*) (Figura 13). El haplotipo A es el centro de la red en forma de estrella, del cual surgen cinco haplotipos que encuentran separados por uno (*I, K, H, PUE*) y cuatro pasos mutacionales (*J*). A partir de uno de estos haplotipos (*H*) se conecta el haplotipo guerrerense (*GRO*) y una rama conformada por los grupos externos *C. schiedeana* (*SCH*) y *C. divergens* (*DIV*).

El otro haplotipo común (*B*) se encuentra unido al haplotipo ancestral (*A*) por un solo paso mutacional y a una rama conformada por haplotipos intermedios (*C, F*) y únicos (*D, E, G*). El NCPA elaborado para esta especie resultó en cinco grandes clados de haplotipos; en dos de estos grupos se observa la presencia de un haplotipo

común (A y B), de los cuales radian otros haplotipos únicos. Los haplotipos de *C. divergens* y *C. schiedeana* quedan agrupados en un solo clado que se encuentra unido al grupo que incluye al haplotipo de Guerrero.

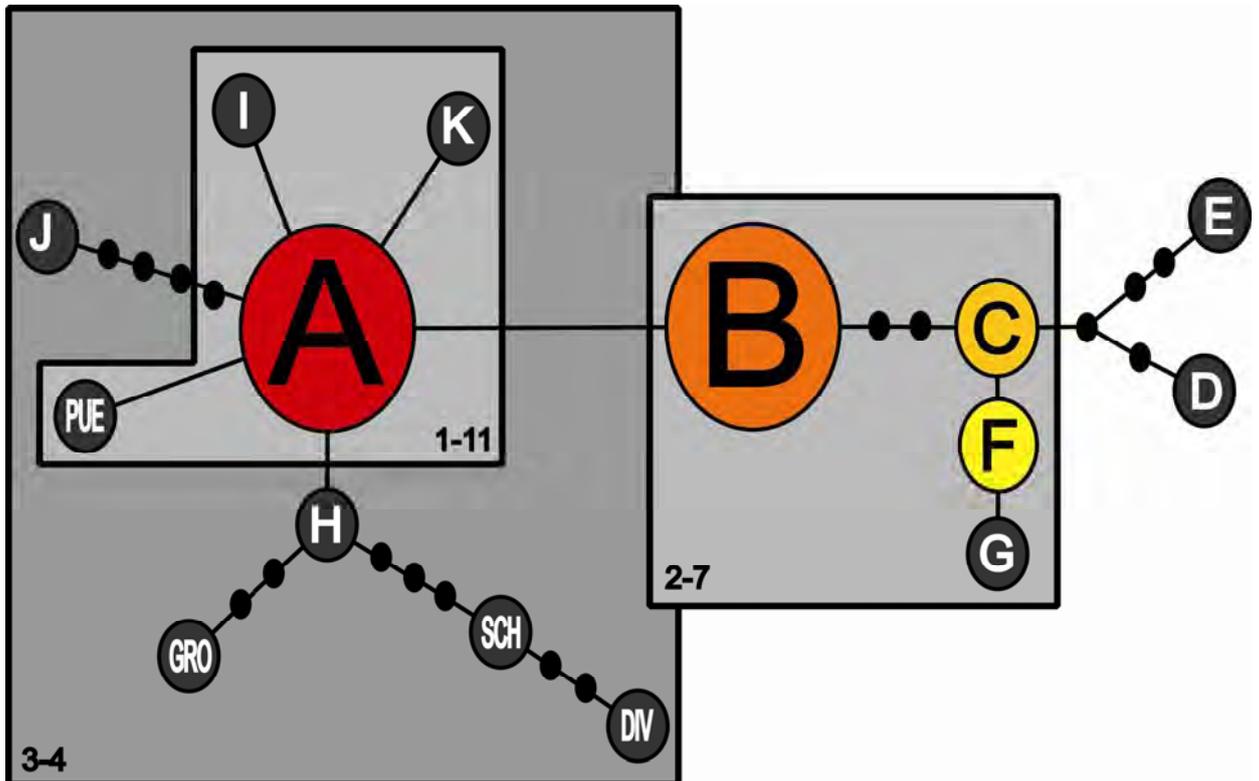


Figura 15. Redes de haplotipos del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA para *Cyathea fulva*. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia relativa de cada haplotipos (ver figura 13 para distribución de haplotipos en las distintas poblaciones); GRO, PUE = haplotipos obtenidos de ejemplares de herbario (FCME) para Atoyac, Guerrero y Villa Juárez, Puebla, respectivamente; DIV, SCH = haplotipos para *Cyathea divergens* y *C. schiedeana* obtenidos por Korall *et al.* (2007). Los cuadros grises indican la presencia de clados con valores significativos para el NCPA.

Análisis filogeográfico de clados anidados

Las inferencias del NCPA realizadas para aquellos clados con valores estadísticamente significativos en *A. firma* mostraron evidencia de flujo génico restringido con aislamiento por distancia en un clado (clado 1-18) y expansión de rango en otro (clado 3-6) (Figura 14). El primero de estos clados está compuesto por el haplotipo común (*A*) y cuatro haplotipos únicos (*I, J, K, M*), mientras que el segundo clado incluye todos los haplotipos para la especie.

Las inferencias realizadas para *C. fulva* mostraron evidencia de colonización a larga distancia y/o fragmentación en un clado (clado 1-11) y flujo génico restringido con aislamiento por distancia en otro (clado 1-18). Asimismo, las inferencias mostraron evidencia de expansión de rango en otro clado (clado 3-4) (Figura 15). El primero de estos clados está compuesto de un haplotipo común (*A*) y tres haplotipos únicos (*I, K, PUE*). El segundo está conformado por un haplotipo común (*B*), un haplotipo intermedio (*C*) y dos haplotipos únicos (*F, G*). Asimismo, el tercero de estos clados está compuesto por un haplotipo común (*A*) y ocho haplotipos únicos (*H, I, J, K, DIV, GRO, PUE, SCH*).

5. DISCUSIÓN

Exploración de polimorfismos

La exploración de polimorfismos resultó en dos marcadores que muestran distintos niveles de polimorfismo. Se obtuvo un marcador aparentemente monomórfico (*trnG-trnR*) y otro con niveles de polimorfismo significativos en ambas especies (*atpB-rbcL*). La presencia de marcadores de cpDNA con distintos niveles de polimorfismo ha sido estudiada en otros grupos de plantas (Shaw *et al.* 2005), con lo cual se establece la resolución de distintos marcadores en el estudio de la variación genética. En el estudio de Shaw *et al.* (2005) se muestra que el marcador *trnL-trnF* forma parte del grupo de marcadores con diversidad baja. No obstante, este marcador ha sido previamente utilizado para analizar los niveles de variación en especies de helechos arborescentes (Su *et al.* 2005b). Aún cuando la secuenciación del marcador *trnL-trnF* no fue completa, los niveles de variación observados en otras especies son equivalentes a los del marcador *atpB-rbcL* (*e.g. Alsophila spinulosa*; Su *et al.* 2004, 2005a; Wang *et al.* 2004).

De esta manera, puede decirse que existen marcadores de cpDNA con distintos niveles de polimorfismo dentro del genoma de cloroplasto. Asimismo, se sugiere la existencia de marcadores con niveles de polimorfismo más elevados a los obtenidos en la presente investigación (*i.e. trnT-trnL, trnD-trnT, trnS-trnG*; Shaw *et*

al. 2005). Estos marcadores pueden aportar una resolución mayor al estudio de variación y estructuración genética en helechos arborescentes.

Variación genética y filogeografía

Diversidad nucleotídica y haplotípica

Los niveles de variación nucleotídica observados en secuencias del espaciador intergénico *atpB-rbcL* de cpDNA en las dos especies de helechos arborescentes analizadas contrastan con los estimados obtenidos para otras especies de la familia. Aún cuando los niveles de variación obtenidos para éstas son bajos, puede decirse que son equivalentes a los obtenidos por Su *et al.* (2004, 2005a) con el mismo marcador para *A. spinulosa* y *A. podophylla* en dos regiones distintas en el sur de China (Tabla 4). Asimismo, se encontraron poblaciones con niveles distintos de variación, pero a diferencia de los estudios realizados para la familia, en la presente investigación no se encontraron poblaciones monomórficas.

Los valores de diversidad haplotípica encontrados a nivel global y poblacional en ambas especies también son equivalentes a lo encontrado en *A. spinulosa* y en *A. podophylla* por Su *et al.* (2004, 2005a) en dos regiones del sur de China (Tabla 4). En el presente estudio se calcularon valores globales similares para ambas especies y se obtuvieron estimados poblacionales parecidos, aunque en las especies mexicanas no se recuperaron poblaciones monomórficas. Al incorporar información de sitios *indel*, la diversidad total calculada aumentó considerablemente

debido a la presencia de diferencias en longitud de la región microsatélite dentro del espaciador.

Tabla 4. Cuadro comparativo de estimados de variación genética para especies de helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae utilizando secuencias de espaciadores intergénicos de cpDNA; *n*: número de secuencias; *h*: número de haplotipos; *hi*: número de haplotipos considerando sitios *indel*; *Hd*: diversidad haplotípica \pm desviación estándar; *Hdi*: diversidad haplotípica considerando sitios *indel*; π : diversidad nucleotídica \pm desviación estándar; SMOR = Sierra Madre Oriental.

Especie	Región	Marcador	Fuente	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>hi</i>	<i>Hd</i>	<i>Hdi</i>	π
<i>Alsophila firma</i>	SMOR,	<i>atpB-rbcL</i>	Presente estudio	63	8	16	0.442	0.7435	0.0009
	México								
<i>Cyathea fulva</i>	SMOR,	<i>atpB-rbcL</i>	Presente estudio	54	8	13	0.442	0.7475	0.00097
	México								
<i>A. spinulosa</i>	Guangdong, China	<i>atpB-rbcL</i>	Su <i>et al.</i> (2004)	61	16	-	0.619	-	0.0012
<i>A. spinulosa</i>	Hainan, China	<i>atpB-rbcL</i>	Su <i>et al.</i> (2004)	14	3	-	0.378	-	0.0013
<i>A. podophylla</i>	Guangdong, China	<i>atpB-rbcL</i>	Su <i>et al.</i> (2005a)	68	8	-	0.742	-	0.0027
<i>A. podophylla</i>	Hainan, China	<i>atpB-rbcL</i>	Su <i>et al.</i> (2005a)	23	6	-	0.00	-	0.00

A nivel interregional, Su *et al.* (2004) reportan valores de diversidad nucleotídica y haplotípica mucho más elevados (0.0113 y 0.744) para *A. spinulosa*.

Sin embargo, estos resultados no son correctos porque aparentemente las poblaciones de ambas regiones analizadas pertenezcan en realidad a distintas especies. La red de haplotipos obtenida para *A. spinulosa* incorpora haplotipos de una segunda especie (*A. podophylla*) como eslabón intermedio entre los haplotipos de una región y otra. En la presente investigación se encontraron haplotipos únicos en muestras de otras regiones (*i.e.* Honduras, Guerrero), sugiriendo la existencia de niveles más elevados de variación a nivel interregional.

Los niveles bajos de variación observados en las especies mexicanas pueden deberse a varios factores demográficos y genéticos. Por un lado, debido a que la estimación se realiza de manera pareada, los valores de diversidad π se ven afectados por la presencia de haplotipos comunes. Muchas de las comparaciones se realizan entre secuencias pertenecientes al mismo haplotipo y por lo tanto el promedio (π) resulta en valores reducidos de diversidad. La presencia de alelos raros provoca que los valores de π sean menores a los del estimador de Watterson (θ_W). La estimación de la variación global (nivel de polimorfismo), dada por el estimador de Watterson (θ_W), equivale a la diversidad nucleotídica sin tomar en cuenta la frecuencia de las secuencias. Esto quiere decir que, en poblaciones compuestas por haplotipos que se comporten de manera neutral y en equilibrio los estimadores θ_W equivalen a la diversidad nucleotídica π (Nei 1987). El hecho de que ambos estimadores sean significativamente diferentes en las especies aquí analizadas es indicativo de procesos poblacionales que han alterado las situaciones de equilibrio.

A este respecto, la prueba de neutralidad de Tajima (D) toma en cuenta la información de secuencias de dos maneras: como la frecuencia de las distintas secuencias y como las diferencias que existen entre éstas (Hedrick 2005). Bajo los supuestos de neutralidad y en situaciones de equilibrio, se espera que los estimados de π y θ_W tengan la misma magnitud. Aún cuando la prueba tiene el potencial de indicar el carácter neutral de un marcador, también puede verse afectada como resultado de eventos demográficos significativos. En este sentido, los valores de Tajima negativos obtenidos indican que las poblaciones analizadas crecieron a partir de una situación de equilibrio (Hedrick 2005) y que existen alelos (haplotipos) menos frecuentes de lo esperado. La presencia de haplotipos comunes y raros puede ser explicada por un proceso de selección direccional-purificadora o por eventos de expansión a partir de poblaciones reducidas.

Aún cuando la prueba de Tajima mostró valores negativos para ambas especies, ésta solamente fue marginalmente significativa para *C. fulva*. El supuesto de que las poblaciones de helechos no se encuentran en equilibrio, derivado de las diferencias entre θ_W y π , no se ve apoyado por las pruebas de Tajima. Sin embargo, esto se debe a que la prueba es poco sensible y necesita números de muestra grandes para arrojar resultados significativos.

Por otro lado, los niveles de variación nucleotídica y haplotípica encontrados pueden estar afectados por el intervalo geográfico de las poblaciones analizadas. El intervalo geográfico de las poblaciones muestreadas es mucho menor que el de las poblaciones analizadas por Su *et al.* (2004, 2005a). La distancia promedio entre

localidades en el presente estudio es de 137.33 km (*A. firma*) y 33.74 km (*C. fulva*), mientras que el promedio de distancia para las localidades en el sur de China es de ≈ 195 km. Como resultado de esto, no fue posible identificar señales concluyentes de estructuración y diferenciación genética. La incorporación de datos para otras regiones (*e.g.* Sierra Madre del Sur, Centroamérica) se vuelve de vital importancia para evaluar patrones de diferenciación marcados en las especies analizadas.

Diferenciación y estructuración genética

Los estimados de estructuración genética (G_{ST}) y flujo génico (Nm) obtenidos para *A. firma* (0.0623 y 7.53) y para *C. fulva* (0.0955 y 4.74) pueden considerarse semejantes a los obtenidos por Su *et al.* (2005a) en *A. podophylla* (0.1054 y 2.12). Aún cuando los resultados de diferenciación para las especies aquí analizadas son menores, el intervalo geográfico de las poblaciones muestreadas es considerablemente menor y por tanto se observan valores menores de diferenciación.

Los estimados de G_{ST} son indicativos del nivel de diferenciación o variación que existe entre poblaciones, un valor cercano a cero indica que no hay diferenciación genética entre poblaciones. Junto con estimados de flujo génico $Nm > 1$, los estimados bajos de diferenciación sugieren que las poblaciones que se encuentran aisladas geográficamente no han sufrido efectos significativos de deriva génica. De esta manera, los estimados de diferenciación genética calculados en ambas especies indican que las poblaciones en los distintos manchones de bosque se

encuentran poco diferenciadas. Esto puede deberse a la existencia de flujo génico actual elevado o que la separación de dichas poblaciones es reciente.

Generalmente, cuando los valores de Nm son más elevados se considera que las poblaciones tienen tanto flujo génico entre ellas que pueden ser consideradas como una sola. Sin embargo, considerando la naturaleza del marcador *atpB-rbcL* (*i.e.*, baja tasa de mutación), puede decirse que el flujo génico estimado no representa flujo génico actual entre poblaciones sino eventos de migración pasados. En este sentido, los altos niveles de flujo génico encontrados son indicativos de la existencia de una población ancestral continua que fue fragmentándose al cambiar las condiciones climáticas. El tiempo desde la fragmentación no ha sido suficiente para acumular y clasificar mutaciones en las distintas poblaciones.

La interpretación de los altos niveles de Nm como indicativos de un alto flujo génico entre las poblaciones analizadas no está de acuerdo con las restricciones biológicas observadas en especies de la familia. La fragilidad de las esporas y las restricciones ambientales a la germinación y maduración de gametofitos son reconocidas como limitantes importantes a la dispersión en estos helechos. Las limitantes biológicas a la capacidad dispersora de estos helechos se ven acentuadas por la fragmentación del bosque mesófilo y la presencia de manchones dentro de una matriz ambiental hostil. Por esta razón, se considera que los estimados de flujo génico obtenidos no representan flujo génico eficiente entre las distintas poblaciones y más bien son indicativos de procesos históricos de migración (Su *et al.* 2005a).

La idea de que la poca diferenciación genética entre poblaciones responde a los altos niveles de flujo génico entre éstas, tampoco está en acuerdo con los patrones de distribución observados en las especies analizadas. El límite de distribución de estas especies aparentemente se encuentra dado por la presencia de uno de los afluentes del Río Panuco, en la parte sur del estado de San Luis Potosí; la existencia de este patrón ha sido previamente reconocida para otros grupos de plantas (Luna *et al.* 1999). La ausencia de helechos arborescentes en manchones de bosque al norte del Río Panuco es indicativa de una limitante a la dispersión importante en especies de la familia.

Asimismo, la falta de flujo génico, aunque no puede ser corroborada del todo, también se ve apoyada por los patrones de distribución de otras especies de la familia, las cuales tienen un límite de distribución aparentemente no asociado a ningún evento topográfico. En cuanto a su distribución, otras especies de la familia (*i.e.* *C. bicrenata*, *C. divergens* var. *tuerckheimii*, *C. schiedeana*) no parecen estar respondiendo de la misma manera que las dos especies aquí analizadas. El intervalo de distribución de éstas se encuentra entre el estado de Puebla y Veracruz, donde no existe una barrera geográfica aparente.

Filogenia molecular

La reconstrucción filogenética realizada mostró una clara separación de las dos especies en grupos de secuencias poco diferenciadas. Dentro de cada especie se

pueden observar grupos de secuencias con un soporte estadístico limitado. En el caso de *A. firma* es interesante que la secuencia de Honduras quede en la base del grupo, ya que puede estar indicando la existencia de patrones de diferenciación regional importantes.

En *C. fulva* se observó que las secuencias de las especies utilizadas como grupos externos (*i.e.* *C. caracasana*, *C. divergens*, *C. schiedeana*) quedan dentro del grupo principal de secuencias de esta especie. Esto parece indicar que las secuencias de estas especies forman parte del mismo linaje que el de las secuencias de *C. fulva*. Aún cuando la información proporcionada por este marcador es insuficiente, el comportamiento de las secuencias parece indicar que los organismos colectados podrían pertenecer en realidad a esta última especie. El comportamiento de estas secuencias llevó a que éstas fueran incluidas en la construcción de la red haplotípica de *C. fulva* y en el subsiguiente análisis filogeográfico de clados anidados.

Asociación entre distancias genéticas y distancias geográficas

Los dendogramas de distancias construidos mostraron resultados contrastantes para ambas especies. En *A. firma* se observa que las poblaciones más parecidas no son aquellas que se encuentran geográficamente más próximas, mientras que en *C. fulva* las poblaciones agrupadas representan aquellas que se encuentran geográficamente más próximas.

Las pruebas de correlación entre las distancias geográficas entre poblaciones, la diferenciación genética y el número promedio de diferencias entre secuencias solamente fueron significativas para las poblaciones de *C. fulva*. No obstante, se observa en ambas especies que la diferenciación genética tiende a aumentar conforme aumenta la distancia geográfica entre las poblaciones. Esta tendencia está más marcada en poblaciones de *C. fulva* y está indicando la existencia de aislamiento por distancia en esta especie. En *C. fulva* se observa que el número promedio de diferencias entre secuencias tiende a aumentar conforme aumenta la distancia geográfica, mientras que en *A. firma* se observa un comportamiento inverso.

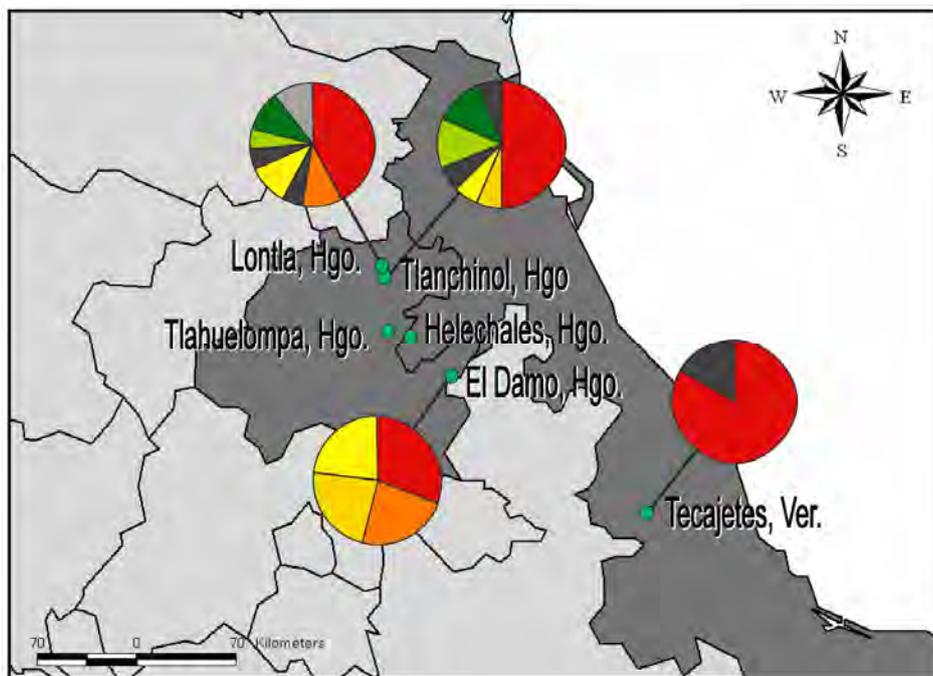


Figura 16. Distribución geográfica de haplotipos del espaciador *atpB-rbcL* de cpDNA en poblaciones de *Alsophila firma* dentro de la Sierra Madre Oriental; haplotipos A =rojo, haplotipos B = naranja, haplotipos D = amarillo oscuro, haplotipo F = amarillo claro, haplotipos J = verde claro, haplotipos K = verde oscuro.

El comportamiento observado en *C. fulva* puede ser explicado por la presencia de haplotipos en las mismas frecuencias en las poblaciones de Lontla y Tlanchinol (Figura 16). En A. firma, la presencia de un haplotipo casi fijado en la población de Tecajetes (Figura 17) explica la agrupación de ésta con las poblaciones del norte de Hidalgo (Lontla y Tlanchinol) y el comportamiento de la correlación entre distancias geográficas y diferencias pareadas. La población veracruzana de Tecajetes tiene un alto índice de perturbación por actividades humanas, con helechos arborescentes limitados a las orillas de un arroyo dentro de una zona agrícola y ganadera.

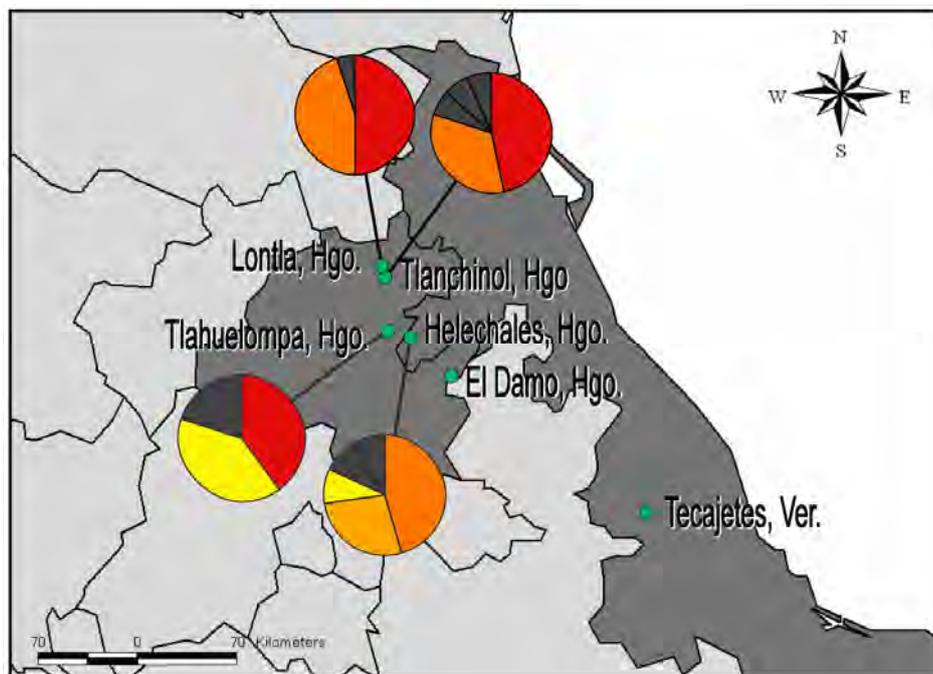


Figura 17. Distribución geográfica de haplotipos del espaciador *atpB-rbcL* de cpDNA en poblaciones de *Cyathea fulva* dentro de la Sierra Madre Oriental; haplotipos A = rojo, haplotipos B = naranja, haplotipos C = amarillo oscuro, haplotipos F = amarillo claro.

Bajo el supuesto de falta de flujo génico actual entre poblaciones, el patrón de aislamiento por distancia sugerido puede explicarse por un proceso de fragmentación secuencial de las poblaciones. Las poblaciones geográficamente más distantes muestran niveles más elevados de diferenciación genética porque éstas se separaron primero y las poblaciones más cercanas muestran menos diferenciación porque tienen una historia más reciente de intercambio genético.

Filogeografía

Los niveles de variación y estructuración observados en helechos arborescentes pueden estar respondiendo al mismo tipo de factores que han moldeado la estructuración y variación en otras especies montañas (Thiel-Egenter *et al.* 2008). Los helechos arborescentes, así como otras especies montañas de altura (*e.g. Abies*), muestran niveles de variación bajos, evidenciados por secuencias de espaciadores intergénicos de cpDNA. Si se comparan los valores obtenidos por Su *et al.* (2004) con los de las especies mexicanas, se observa que los estimados para México son menores.

El hecho de que las dos especies sean iguales en cuanto a su diversidad está indicando que los resultados parecen no ser idiosincrásicos a las especies y que más bien responden a patrones históricos de cambios en su distribución. Si en efecto la historia filogeográfica de estas especies es paralela, la explicación más plausible

sería que se re-expandieron a partir de poblaciones pequeñas y luego se fragmentaron por los subsecuentes cambios en la cobertura vegetal.

Redes haplotípicas y análisis filogeográfico de clados anidados

Más allá de las similitudes entre los resultados del presente trabajo con otros estudios en otras especies de la familia, es importante mencionar que las dos especies analizadas muestran redes con topologías parecidas. Tomando en cuenta estos resultados y la afinidad por localidades de bosque mesófilo que muestran ambas especies, puede proponerse la presencia de una historia evolutiva similar en ambas especies. Los resultados obtenidos apoyan la idea de una historia demográfica común, es decir, los patrones de diversidad encontrados en las dos especies de helechos arborescentes han estado sujetos a procesos demográficos que responden a los mismos factores históricos y ecológicos.

Los resultados de la presente investigación son comparables con aquellos obtenidos en los escasos estudios llevados a cabo en especies de la familia, en los cuales se encontraron haplotipos que se comportan de la misma manera, donde se tienen redes con haplotipos comunes separados por pocos pasos mutacionales de haplotipos únicos. Su *et al.* (2004, 2005a) encontraron redes haplotípicas con topologías en “estrella”, con un haplotipo central separados de otros por pocos pasos mutacionales. Las redes de haplotipos construidas para ambas especies muestran características generales similares, donde se puede observar la presencia de

haplotipos comunes conectados a otros haplotipos únicos poco diferenciados. No obstante, las redes encontradas para las especies mexicanas presentan una complejidad mayor.

La topología observada en ambas redes de haplotipos parece estar indicando que las poblaciones de helechos arborescentes mexicanos estuvieron expuestas a contracciones demográficas y subsecuentes re-expansiones a partir de poblaciones pequeñas. La presencia de un haplotipo común y una serie de haplotipos intermedios y únicos, arreglados en una red en *estrella*, es indicativo de un evento de cuello de botella fuerte seguido de una expansión poblacional (Avice 2000). Esto se ve apoyado por los resultados del análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA), en donde se tiene evidencia de expansiones contiguas de grupos de haplotipos en ambas especies. Los eventos de cuello de botella asociados a estos procesos demográficos tuvieron un fuerte impacto sobre los niveles de variación observados en secuencias de cpDNA, lo cual puede explicar la poca diferenciación observada en las poblaciones analizadas.

Las poblaciones sufrieron una serie de reducciones demográficas que las llevaron a estar compuestas de uno o dos haplotipos, de los cuales fueron surgiendo una serie de haplotipos nuevos por eventos mutacionales sencillos. Los niveles de diversidad nucleotídica y haplotípica apoyan este escenario de cuello de botella y re-expansión poblacional. La presencia de niveles elevados de diversidad haplotípica y niveles bajos de diversidad nucleotídica sugieren una rápida expansión a partir de un tamaño efectivo poblacional pequeño (Avice 2000). Los resultados del NCPA

muestran la presencia de un evento de expansión de intervalo en ambas especies. La propuesta de que los niveles de flujo génico elevados son producto de eventos de migración pasados se ve apoyado por estos resultados y por la topología de las redes.

Asimismo, las distribuciones mismatch para ambas especies, aún cuando no tienen un valor estadístico significativo, parecen ajustarse mejor a un modelo de expansión espacial con tamaños poblacionales constantes. Estos resultados sugieren que las especies de helechos arborescentes sufrieron una expansión de intervalo como consecuencia de la re-expansión del bosque mesófilo de montaña hacia tierras bajas.

El modelo de contracción y re-expansión poblacional inducida por cambios en la cobertura de bosque mesófilo podría explicar en gran parte la presencia de un haplotipo común (dos en *C. fulva*) y la existencia de un solo linaje al cual pertenecen todos los haplotipos. Siguiendo a Janssen *et al.* (2008), puede decirse que la poca variación observada en secuencias de cpDNA en poblaciones mexicanas responde fuertemente a factores demográficos (*i.e.* contracciones). La presencia de haplotipos no diferenciados, que puede decirse pertenecen a un mismo linaje, indica que las poblaciones de helechos arborescentes analizadas provienen todas de un mismo ancestro de cpDNA.

Si la re-expansión se diera a partir de una población polimórfica o de una serie de poblaciones distintas, se esperaría encontrar haplotipos altamente diferenciados, donde las diferencias genotípicas entre poblacionales pos-glaciales se deberían a la clasificación de mutaciones (linajes) que se originaron en un pasado

más remoto (Hewitt 2000). En el caso de un único origen, muchas de las secuencias de cpDNA se diferenciarían poco durante las eras glaciales y pocas mutaciones nuevas distinguirían a los haplotipos pos-glaciales (Hewitt 2000). La diferencia entre las distintas secuencias de cpDNA de las especies analizadas tiene este comportamiento, donde se observa que éstas se diferencian por pasos mutacionales sencillos y en ocasiones solamente por diferencias en longitud.

La presencia de niveles elevados de flujo génico entre estas poblaciones podría estar ocultando la señal de diferenciación. Sin embargo, los resultados del NCPA muestran evidencia de flujo génico restringido con aislamiento por distancia. Si bien la correlación entre diferenciación genética y distancia geográfica no fue significativa, la tendencia observada en las poblaciones parece apoyar la inferencia de aislamiento por distancia en las poblaciones analizadas. Por otro lado, la presencia de haplotipos pertenecientes al mismo linaje también puede obedecer al intervalo geográfico de las poblaciones analizadas. Éstas se encuentran en el límite latitudinal de la distribución de la especie, por lo que la presencia de un solo linaje, y de niveles de variación bajos, puede ser resultado de un proceso de colonización y efecto de fundador. Las inferencias del NCPA resultaron en un clado que muestra evidencia de fragmentación.

El modelo de contracciones y re-expansiones a partir de poblaciones de refugio explica los patrones de variación y estructuración genética en otras especies de helechos arborescentes. Wang *et al.* (2004) y Su *et al.* (2004) encontraron una buena correspondencia entre los patrones de estructuración entre poblaciones de *A.*

spinulosa y los tiempos estimados de separación de estas poblaciones a nivel regional. La separación de estas dos regiones se debe al aumento del nivel del mar ocurrido en el Pleistoceno-Holoceno, el cual responde al calentamiento global ocurrido en este periodo. Sin embargo, la naturaleza de estos datos parece indicar que la separación regional de poblaciones propuesta se trata realmente de un proceso de especiación. No obstante, estos resultados indican que las poblaciones de especies de helechos arborescentes responden significativamente a oscilaciones climáticas.

Los patrones de variación que se observan en las poblaciones de helechos aquí analizadas parecen ser resultado de patrones generales de contracción y re-expansión de poblaciones de especies montanas. La similitud entre los resultados obtenidos para ambas especies sugiere que éstas se vieron afectadas de manera paralela por factores similares. Las poblaciones de ambas especies de helechos han respondido fuertemente a los patrones de expansión y contracción del bosque mesófilo, los cuales en última instancia responden a oscilaciones climáticas (*e.g.* oscilaciones climáticas de Milankovitch, Hewitt 2000).

Los tipos de vegetación montana, especialmente los bosques mesófilos, son particularmente sensibles al cambio climático, ya que la altitud de la base de nubosidad se encuentra determinada por la temperatura y humedad en la atmósfera (Still *et al.* 1999). Aún cuando la magnitud del descenso de temperatura y el balance de humedad en los trópicos durante el último máximo glacial (Pleistoceno Tardío) permanece controversial, los estimados de disminución de temperatura para regiones tropicales durante este periodo varían de -2° a -9°C con respecto a los niveles

actuales (Ballantyne *et al.* 2005). Este incremento de temperatura y la disminución de los niveles de humedad han provocado que la altitud de la base de nubosidad aumente (Urrego *et al.* 2005).

Urrego *et al.* (2005) mostraron que las especies que componen las comunidades de bosque mesófilo han cambiado en respuesta a estos cambios climáticos. Los bosques pleistocénicos de la localidad estudiada por Urrego *et al.* (2005) (*i.e.*, Lago Consuelo, Perú) son muy similares a las comunidades modernas de elevaciones alrededor de los 2,500 metros. Para México, se ha sugerido que el bosque mesófilo de montaña sigue el mismo patrón altitudinal que los bosques andinos. De acuerdo con Lozano-García *et al.* (2005), la línea de vegetación se encontraba ≈ 900 metros por debajo de los niveles actuales. Durante el Pleistoceno tardío los tipos de vegetación asociados a altas elevaciones (*e.g.* bosques de coníferas, bosque mesófilo de montaña) se encontraban por debajo de su rango altitudinal actual.

La geometría simple de las montañas predice que una banda vegetacional de gran altitud en una montaña ocupa menos superficie que su equivalente en altitudes menores (Urrego *et al.* 2005). De esta manera, el área ocupada por especies montanas, especialmente las características de los bosques mesófilos (*e.g.* Cyatheaceae), ha sufrido cambios significativos de acuerdo a los patrones de cambio en la temperatura y humedad. Los helechos arborescentes han estado sujetos a una contracción poblacional significativa producto, principalmente, del aumento de la

temperatura y disminución de la humedad ocurridos en los últimos 40,000 años (Toledo 1982; Metcalfe *et al.* 2000; Jaramillo-Correa *et al.* 2008).

Estos eventos demográficos se encuentran ligados a la fuerte afinidad de estas especies por condiciones ambientales restringidas y a la compleja historia de la distribución de bosque mesófilo de montaña. Los resultados del NCPA sugieren que las poblaciones analizadas estuvieron sujetas a una expansión de rango y que existe un flujo génico limitado y aislamiento por distancia en ambas especies.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6. 1. Conclusiones

La exploración de polimorfismos permitió identificar marcadores que muestran distintos niveles de variación, teniendo marcadores monomórficos como *trnG-trnR* y marcadores que muestran niveles de variación significativos como *atpB-rbcL*.

Los niveles de diversidad nucleotídica fueron bajos y la diversidad haplotípica alta, ya que la mayor parte de los haplotipos encontrados se diferencian por pasos mutacionales sencillos. No obstante, los valores de diversidad encontrados en el presente estudio pueden considerarse normales para especies de la familia.

La topología de las redes obtenidas es similar a las encontradas en otras especies de la familia y sugiere que las poblaciones analizadas se expandieron a partir de una población pequeña aparentemente monomórfica.

Los resultados de la presente investigación revelan que las poblaciones de helechos arborescentes analizadas han tenido una historia de contracción, expansión y fragmentación debida a los cambios de cobertura que ha sufrido el bosque mesófilo de montaña en respuesta a los ciclos de fluctuaciones climáticas.

6. 2. Perspectivas

Los resultados obtenidos en la presente investigación representan una primera aproximación al estudio de la biología evolutiva de especies de helechos arborescentes en México. Si bien los resultados del presente no son concluyentes, su importancia radica en representar uno de los primeros intentos por resolver la historia evolutiva de especies de la familia.

La presente investigación tiene que venir acompañada de análisis más profundos que permitan resolver cuestiones relevantes sobre la historia evolutiva de estas especies. Los siguientes puntos son un intento por ubicar la presente investigación en el marco de un proyecto más extenso sobre la genética de poblaciones y filogeografía de helechos arborescentes en México. Si bien no son los únicos puntos que deben tomarse en cuenta, si representan una guía de los aspectos fundamentales que debe tener un proyecto de tal amplitud.

1. Ampliar de manera significativa el número de localidades de colecta.

Esto permitirá evaluar de manera más precisa cuestiones de aislamiento por distancia, estructuración genética y patrones filogeográficos a una escala mayor (regional).

2. Obtención de información de otros marcadores moleculares.

La búsqueda de marcadores, tanto de cpDNA (*i.e.* microsatélites, espaciadores

intergénicos), y nDNA (*i.e.* microsatélites, ISSR), permitirá tener una mayor resolución sobre cuestiones de variación y estructuración filogeográfica.

- 3. Recolección de muestras para otras especies.** La naturaleza del muestreo de organismos permitirá obtener muestras de diversas especies de la familia, con lo cual se logrará tener una perspectiva más amplia sobre los patrones históricos de estructuración de las poblaciones de helechos de la familia.
- 4. Implementación de estudios ecológicos y de historia natural en especies de la familia.** Ante los escasos estudios llevados a cabo en especies de la familia, los estudios ecológicos básicos se vuelven de vital importancia para el establecimiento y explicación de los patrones observados en la diversidad genética.

REFERENCIAS

- Aguirre-Planter E, Furnier GR, Eguiarte LE (2000)** Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany*, **87**, 362-371.
- Alcántara O, Luna I (2001)** Análisis florístico de dos áreas con bosque mesófilo de montaña en el estado de Hidalgo, México: Eloxochitlán y Tlahuelompa. *Acta botánica Mexicana*, **54**, 51-87.
- Álvarez-Buylla ER, Garay AA (1994)** Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution*, **48(2)**, 437-453.
- Arens NC (2001)** Variation in performance of the tree fern *Cyathea caracasana* (Cyatheaceae) across a successional mosaic in an Andean cloud forest. *American Journal of Botany*, **88(3)**, 545-551.
- Arens NC, Sánchez-Baracaldo P (1998)** Distribution of tree ferns (Cyatheaceae) across the successional mosaic in an Andean cloud forest, Nariño, Colombia. *American Fern Journal*, **88**, 60-71.
- Awise JC (2000)** *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, EUA.
- Awise JC (2006)** *Evolutionary pathways in nature: a phylogenetic approach*. Cambridge University Press, Nueva York.
- Awise JC, Walker D (1998)** Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **265**, 457-463.
- Ballantyne AP, Lavine M, Crowley TJ, Liu J, Baker PB (2005)** Meta-analysis of tropical surface temperatures during the Last Glacial Maximum. *Geophysical Research Letters*, **32**, L05712.
- Barrington DS (1993)** Ecological and historical factors in fern biogeography. *Journal of Biogeography*, **20(3)**, 275-279.

- Bernabé N, Williams-Linera G, Palacios-Ríos M (1999)** Tree ferns in the interior and at the edge of a Mexican cloud forest remnant: Spore germination and sporophyte survival and establishment. *Biotropica*, **31**, 83-88.
- Buckley DM (1990)** Genetic and evolutionary implications of life cycle structure on the colonization ability and biogeography of pteridophytes. *Abstracts, Progress in Pteridology Conference, 3-4*, University of Michigan.
- Bittner J, Breckle SW (1995)** The growth rate and age of tree fern trunks in relation to habitat. *American Fern Journal*, **85**, 37-42.
- Carstens BC, Knowles LL (2007)** Shifting distributions and speciation: species divergence during rapid climate change. *Molecular Ecology*, **16**, 619-627.
- Cartujano S, Zamudio S, Alcántara O, Luna I (2002)** El bosque mesófilo de montaña en el municipio de Landa de Matamoros, Querétro, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **70**, 13-43.
- CCAD-BM (2004)** *Ecosistemas de Mesoamérica 1:250,000*. Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo y Banco Mundial. Santa Elena, El Salvador.
- Challenger A (1998)** *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y Futuro*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Biología, UNAM, y Agrupación Sierra Madre. México, DF.
- Cheng ZY, Tao GD, Xu ZF (1990)** A study on the biological characteristics and the endangering factors of *Alsophila spinulosa*. *Acta Botanica Yunnanica*, **12**, 186-190.
- Chiang TY, Schaal BA, Peng CI (1998)** Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **39**, 245-250.
- Clegg MT, Learn GH, Golenberg EM (1991)** Molecular evolution of chloroplast DNA. *Evolution at the molecular level* (eds. R. K. Selander, A. G. Clark y T. S. Williams), pp. 135-149, Sinauer Publishers, Sunderland, MA, EUA.

- Clement MD, Posada D, Crandall K (2000)** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1660.
- Coello G, Escalante A, Soberon J (1993)** Lack of genetic variation in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) in its only known locality. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80(4)**, 898-901.
- CONABIO (1999)** “*Uso de suelo y vegetación modificado por CONABIO*”. Escala 1:1000000. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México, México.
- Conant DS (1976)** Ecogeographic and systematic studies in American Cyatheaceae. PhD Thesis. Harvard University, Cambridge, EUA.
- Conant DS (1990)** Observations on the reproductive biology of *Alsophila* species and hybrids (Cyatheaceae). *Annals of the Missouri Botanical Gardens*, **77(2)**, 290-296.
- Conant DS, Cooper-Driver G (1980)** Autogamous allohomoploidy in *Alsophila* and *Nephelea* (Cyatheaceae). *American Journal of Botany*, **67**, 1269-1288.
- Conant DS, Stein DB, Valinski AEC, Sundarsanam P, Aheran ME (1994)** Phylogenetic implications of chloroplast DNA variation in the Cyatheaceae I. *Systematic Botany*, **19**, 60-72.
- Conant DS, Raubeson LA, Attwood DK, Perera S, Zimmer EA, Sweere JA, Stein DB (1996)** Phylogenetic and evolutionary implications of combined analysis of DNA and morphology in the Cyatheaceae. *Pteridology in perspective* (ed. J. M. Camus, M. Gibby y R. J. Johns), Royal Botanic Gardens, Kew.
- Crandall KA, Templeton AR (1993)** Empirical test of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, **134(3)**, 959-969.
- Cuenca A, Escalante AE, Piñero D (2003)** Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology*, **12(8)**, 2087-2097.
- Delgado P, Piñero D, Alvaro C, Pérez-Nasser N, Alvarez-Buylla E (1999)** High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii*

- (Pinaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 669-676.
- Demesure B, Comps B, Petit RJ (1996)** Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, **50**, 2515-2520.
- Demesure B, Sodzi N, Petit RJ (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.
- Drummond RSM, Keeling DJ, Richardson T (2000)** Genetic analysis and conservation of 31 surviving individuals of a rare New Zealand tree, *Metrosideros bartlettii* (Myrtaceae). *Molecular Ecology*, **9**, 1149-1157.
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V, Petit RJ (1997a)** Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, **146**, 1475-1487.
- Dumolin-Lapegue S, Pemonge MH, Petit RJ (1997b)** An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, **19**, 393-397.
- ESRI (1999)** *ArcView Gis Ver. 3.2*. Environmental Systems Research Institute Inc., California.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007)** Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Ferris C, King RA, Vainota R, Hewitt GM (1998)** Chloroplast DNA recognizes three refugia sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity*, **80**, 584-593.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002)** *Introduction to conservation genetics*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gastony GJ, Yatskievych G (1992)** Maternal inheritance of the chloroplast and mitochondrial genomes in cheilanthoid ferns. *American Journal of Botany*, **79**, 716-722.
- Given DR (1993)** Changing aspects of endemism and endangerment in pteridophyta. *Journal of Biogeography*, **20(3)**, 293-302.
- González-Astorga J, Vovides AP, Ferrer MM, Iglesias C (2003)** Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. *Biological Journal of the Linnean Society*, **80(3)**, 457-467.

- González-Astorga J, Vovides AP, Cruz-Angon A, Octavio-Aguilar P, Iglesias C (2005)** Allozyme variation in three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from north-eastern México. *Annals of Botany*, **95**, 999-1007.
- González-Rodríguez A, Bain JF, Golden JL, Oyama K (2004)** Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis* - *Q. laurina* complex in México: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology*, **13**, 3467-3476.
- Griffiths AJF, Millar JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1996)** *An introduction to genetic analysis*. W. H. Freeman and Company, Nueva York, EUA, 915 pp.
- Grime JP (1985)** Factors limiting the contribution of pteridophytes to a local flora. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, **86B**, 403-421.
- Guillon JM, Raquin C (2000)** Maternal inheritance of chloroplasts in the horsetail *Equisetum variegatum* (Schleich.). *Current Genetics*, **37(1)**, 53-56.
- Hall TA (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hao B, Li W, Linchun M, Li Y, Rui Z, Mingxia T, Weikai B (2006)** A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana*, an endangered endemic of China, using ISSR markers. *Biochemical Genetics*, **44**, 31-45.
- Hedrick PW (2005)** *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, EUA, 737 pp.
- Hein J, Schierup MH (2004)** *Gene genealogies, variation and evolution: a primer in coalescent theory*. University of Aarhus, Dinamarca.
- Hewitt G (2000)** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907-913.
- Hiendlmeyer R, Randi AM (2007)** Responses of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) and *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae) to different light levels. *Acta Botanica Brasilica*, **21(4)**, 909-915.
- Hooper EA, Haufler CH (1997)** Genetic diversity and breeding system in a group of neotropical epiphytic ferns (*Pleopeltis*; Polypodiaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1664-1674.

- Hudson RR (2000)** A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics*, **155**, 2011-2014.
- Jackson JBC, Budd AF, Coates AG (1996)** *Evolution and environment in Tropical America*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Janssen T, Bystriakova N, Rakotondrainibe F, Coomes D, Labat JN, Schneider H (2008)** Neoendemism in Madagascan scaly tree ferns results from recent, coincident diversification bursts. *Evolution*, **62(8)**, 1876-1889.
- Jaramillo-Correa JP, Beaulieu J, Ledig FT, 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.
- Jaramillo-Correa JP, Aguirre-Planter E, Khasa DP, Eguiarte LE, Piñero D, Furnier GR, 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.
- Kimura M (1980)** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Klekowski EJ (1973)** Sexual and subsexual systems in homosporous pteridophytes: a new hypothesis. *American Journal of Botany*, **60(6)**, 535-544.
- Kramer KU, Green PS (1990)** Pteridophytes and gymnosperms. *The families and genera of vascular plants*. Vol. 1 (ed. K. Kubitzki), Springer-Verlag, Berlin.
- Knowles LL (2000)** Test of Pleistocene speciation in montane grasshoppers (genus *Melanoplus*) from the sky islands of western North America. *Evolution*, **54**, 1337-1348.
- Knowles LL (2001)** Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Test of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology*, **10**, 691-701.
- Korall P, Pryer KM, Metzgar JS, Schneider H, Conant DS (2006)** Tree ferns: monophyletic groups and their relationship as revealed by four protein-coding loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**, 830-845.
- Korall P, Conant DS, Metzgar JS, Schneider H, Pryer KM (2007)** A molecular phylogeny of scaly

- tree ferns (Cyatheaceae). *American Journal of Botany*, **94**(5), 873-886.
- Kuroiwa H, Sugai M, Kuroiwa T (1998)** Behavior of chloroplasts and chloroplast nuclei during spermatogenesis in the fern *Pteris vittata* L. *Protoplasma*, **146**(2-3), 89-100.
- Large MF, Braggins JE (2004)** *Tree ferns*. Timber Press, Portland, EUA, 359 pp.
- Ledig FT, Jacob-Cervantes V, Hodgskiss PD, Eguiluz-Piedra T (1997)** Recent evolution and divergente among populations of rare Mexican endemic, *Chihuahua* spruce, following Holocene climatic warming. *Evolution*, **51**, 1815-1827.
- Ledig FT, Bermejo-Velázquez B, Hodgskiss PD, et al. (2000)** The mating system and genic 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 FT, Hodgskiss PD, Jonson DR (2006)** Genetic diversity and seed production in Santa Lucia fir (*Abies bracteata*) a relict of the Miocene broadleaved evergreen forest. *Conservation Genetics*, **7**, 383-398.
- Lellinger DB (1987)** The disposition of *Trichopteris* (Cyatheaceae). *American Fern Journal*, **77**, 90-94.
- Lellinger DB (1989)** The ferns and fern-allies of Costa Rica, Panama and the Chocó. Part I (Psilotaceae through Dicksoniaceae). *Pteridología*, **2A**, 1-364.
- Lewontin RC (1991)** Twenty-five years ago in GENETICS: electrophoresis in the development of evolutionary genetics: milestone or millstone? *Genetics*, **128**, 657-662.
- Lintz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe S, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M (2007)** An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, **445**, 915-918.
- 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.

- Lui F., L. Zhang y D. Charlesworth (1998)** Genetic diversity in *Leavenworthia* populations with different inbreeding levels. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **265**, 293-301.
- Lu SY, Hong KH, Liu SL, Cheng YP, Wu WL, Chiang TY (2002)** Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization. *Journal of Plant Research*, **115**, 203-216.
- Lucansky W (1974)** Comparative studies of the nodal and vascular anatomy in the Neotropical Cyatheaceae. II. Squamate genera. *American Journal of Botany*, **61**, 472-480.
- Luna I, Almeida L, Villers L, Lorenzo L (1988)** Reconocimiento florístico y consideraciones fitogeográficas del bosque mesófilo de montaña de Teocelo, Veracruz. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **48**, 35-63.
- Luna I, Almeida L, Llorente J (1989)** Florística y aspectos fitogeográficos del bosque mesófilo de montaña de las cañadas de Ocuilan, estados de Morelos y México. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*, **59**, 63-87.
- Luna I, Ocegueda S, Alcántara O (1994)** Florística y aspectos fitogeográficos del bosque mesófilo de montaña del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*, **65(1)**, 31-62.
- Luna I, Alcántara O, Espinosa D, Morrone J (1999)** Historical relationships of the Mexican cloud forest: a preliminary vicariance model applying parsimony analysis of endemism to vascular plant taxa. *Journal of Biogeography*, **26**, 1299-1306.
- Luna I, Morrone J, Alcántara O, Espinosa-Organista D (2001)** Biogeographical affinities among Neotropical cloud forests. *Plant Systematics and Evolution*, **228**, 229-239.
- Martínez-Palacios A, Eguiarte LE, Furnier GR (1999)** Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany*, **86**, 1093-1098.
- Mantel N (1967)** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.

- Mehlreter K, García-Franco J (2008)** Leaf phenology and trunk growth of the deciduous tree fern *Alsophila firma* (Baker) D. S. Conant in a lower montane Mexican forest. *American Fern Journal*, **98(1)**, 1-13.
- Metcalfe SE, O'Hara SL, Caballero M, Davies SJ (2000)** Records of Late Pleistocene-Holocene climatic change in México: a review. *Quaternary Science Reviews*, **19**, 699-721.
- Mickel J, Smith AR (2004)** *The pteridophytes of Mexico*. New York Botanical Garden Press, Nueva York, 1054 pp.
- Nagalingum NS, Shneider H, Pryer KM (2007)** Molecular phylogenetic relationships and morphological evolution in the heterosporous fern genus *Marsilea*. *Systematic Botany*, **32**, 16-25.
- Nei M (1973)** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Science*, **70(12)**, 3321-3323.
- Nei M (1987)** *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, Nueva York.
- Ortega F, Castillo G (1996)** El bosque mesófilo de montaña y su importancia forestal. *Ciencias*, **43**, 32-39.
- Peck JH, Peck CJ, Farrar DR (1990)** Influences of life history attributes on formation of local and distant fern populations. *American Fern Journal*, **80**, 126-142.
- Pelgas B, Isabel N, Bousquet J (2004)** Efficient screening for expressed sequence tag polymorphisms (ESTPs) by DNA pool sequencing and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in spruces. *Molecular Breeding*, **13**, 263-279.
- Pennington TR, Lavin M, Prado DE, et al. (2004)** Historical climate change and speciation: Neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science*, **359**, 515-537.
- Pérez-García B, Riba R (1982)** Germinación de esporas de Cyatheaceae bajo diversas temperaturas. *Biotropica*, **14**, 281-287.

- Petit RJ, Aguinagalde I, De Beaulieu JL, 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 JP, Rendell S, Vendramin GG (2003)** Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic Diversity. *Science*, **300**, 1563-1565.
- Pielou EC (1991)** *Alter the Ice Age: the return of life to glaciated North America*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000)** GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, **9**, 487-488.
- Pryer KM, Schuettpelz E, Wolf PG, Schneider H, Smith AR, Cranfill R (2004)** Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American Journal of Botany*, **91**, 1582-1589.
- Ramírez-Barahona S, Tejero-Diez D, Luna-Vega I.** Neotropical tree ferns (Cyatheales): historical and ecological biogeography. *En preparación*.
- Ranker TA (1992)** Genetic diversity, mating systems, and interpopulation gene flow in Neotropical *Hemionitis palmata* L. (Adiantaceae). *Heredity*, **69**, 175-183.
- Ray N, Currat M, Excoffier L (2003)** Intra-deme molecular diversity in apatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, **20(1)**, 76-86.
- Rogers AR (1995)** Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, **49**, 608-615.
- Roy K, Valentine JW, Jablonski D, Kidwell SM (1996)** Scales of climatic variability and time averaging in Pleistocene biotas; implications for ecology and evolution. *Trend in Ecology and Evolution*, **11**, 458-463.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2008)** *DNA Sequence Polymorphism*, Version 4.50.3. Universidad de Barcelona.
- Rzedowski J (1978)** *Vegetación de México*. Editorial Limusa, México.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA (1998)** Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, **7**, 465-474.

- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005)** The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, **92**(1), 142-166.
- Schönswetter P, Holderegger R, Tribsch A (2006)** Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. *Molecular Ecology*, **14**, 3547-3555.
- Silva-Montellano A, Eguiarte LE (2003)** Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechugilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II. Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. *American Journal of Botany*, **90**, 700-706.
- Singh VP, Roy SK (1977)** Mating systems and distribution in some tropical ferns. *Annals of Botany*, **41**, 1055-1060.
- Slatkin M (1985)** Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 393-430.
- Slatkin M, Hudson RR (1991)** Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, **129**, 555-562.
- Sosa V, Lorea FG (2004)** Florística de Veracruz. *Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental* (eds. I. Luna, J. J. Morrone y D. Espinosa-Organista), Las Prensas de Ciencias, UNAM, México.
- Still CJ, Foster PJ, Schneider SH (1999)** Simulating the effects of climate change on tropical montane cloud forests. *Nature*, **398**, 608-610.
- Su Y, Wang T, Zheng B, Jiang Y, Chen G, Gu H (2004)** Population genetic structure and phylogeographical pattern of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae), inferred from cpDNA *atpB-rbcL* intergenic spacers. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**, 1459-1467.
- Su YJ, Wang T, Zheng B, Jiang Y, Ouyang PY, Chen GP (2005a)** Genetic variation and phylogeographical patterns in *Alsophila podophylla* from southern China based on cpDNA *atpB-rbcB* sequence data. *American Fern Journal*, **95**, 68-79.
- Su YJ, Wang T, Zheng B, Jiang Y, Chen GP, Ouyang PY, Sun YF (2005b)** Genetic differentiation of relictual populations of *Alsophila spinulosa* in southern China inferred from cpDNA *trnL-trnF* noncoding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**, 323-333.

- Taberlet P, Bouvet J (1994)** Mitochondrial DNA polymorphisms, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. *Proceeding of the Royal Society of London Series B*, **255**, 195-200.
- Taberlet P, Gielly L, Patou G, Bouvet J (1991)** Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105-1109.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007)** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (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.
- Thiel-Egenter C, Gugerli F, Alvarez N, Brodbeck S, Cieslak E, Colli L, Englisch T, Gaudeul M, Gielly L, Korbecka G, Negrini R, Paun O, Pellecchia M, Rioux D, Ronikier M, Schönswetter P, Schüpfer F, Taberlet P, Tribsch A, van Loo M, Winkler M, Holderegger R, IntraBioDiv Consortium (2008)** Effects of species traits on the genetic diversity of high-mountain plants: a multi-species study across the Alps and the Carpathians. *Global Ecology and Biogeography*.
- Toledo VM (1982)** Pleistocene changes of vegetation in tropical México. *Biological Diversification in the Tropics* (ed. Prance GT), Columbia University Press, 93-111.
- Trewick SA, Morgan-Richards M, Russell SJ, Henderson S, Rumsey FJ, Pinter I, Barrett JA, Gibby M, Vogel JC (2002)** Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rock fern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. *Molecular Ecology*, **11**, 2003-2012.
- Tryon RM (1972)** Endemic areas and geographic speciation in tropical American ferns. *Biotropica*, **4**, 121-131.
- Tryon RM, Gastony G (1975)** The biogeography of endemism in the Cyatheaceae. *Fern Gazette*, **11**, 73-79.
- Tryon RM, Tryon AF (1982)** *Fern and allies plants*. Berlin: Springer-Verlag.

- Vázquez-Lobo A (1996)** Filogenia de hongos endófitos del género *Pinus* L.: implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, D. F. México.
- Véliz M, Vargas J (2006)** *Helechos arborescentes de Guatemala: distribución, diversidad, uso y manejo*. Unidad de Investigación Herbario BIGU, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos Guatemala.
- Vitalis R, Riba M, Colas B, Grillas P, Olivieri P (2002)** Multilocus genetic structure at contrasted spatial scales of the endangered water fern *Marsilea strigosa* Willd. (Marsileaceae, Pteridophyta). *American Journal of Botany*, **89**(7), 1142-1155.
- Vogel JC, Russell SJ, Rumsey FJ, Barrett JA, Gibby M (1998)** On hybrid formation in the rock fern *Asplenium Xalternifolium* (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Botanica Acta*, **111**, 241-246.
- Wang T, Su YJ, Li X, Zheng B, Chen GP, Wang BS (2003a)** RAPD analysis of the genetic variation within populations of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae). *Acta Ecologica Sinica* **23**(6): 1200-1205.
- Wang T, Su YJ, Zheng B, Chen GP, Zeng QL (2003b)** Phylogenetic analysis of the chloroplast *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer sequences of the Cyatheaceae plants from China. *Journal Tropical and Subtropical Botany* **11**: 137-142.
- Wang T, Su YJ, Li XY, Zheng B, Chen GP, Zeng QL (2004)** Genetic structure and variation in the relict populations of *Alsophila spinulosa* from southern China based on RAPD markers and cpDNA *atpB-rbcL* sequence data. *Hereditas* **140**: 8-17.
- Wiens JJ, Graham CH (2005)** Niche conservatism: integrating evolution, ecology and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **36**: 519-539.
- Williams-Linera G, Manson RH, y Isunza-Vera E (2002)** La fragmentación del bosque mesófilo de montaña y patrones de uso de suelo en la región oeste de Xalapa, Veracruz, México. *Madera y Bosques* **8**(1): 73-89.
- Wolf PG, Schneider H, Ranker TA (2001)** Geographic distributions of homosporous ferns: does dispersal obscure evidence of vicariance? *Journal of Biogeography*, **28**(2), 263-270.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**: 323-354.

Xiang L, Werth CR, Emery SN, McCauley DE (1999) Population-specific gender-biased hybridization between *Dryopteris intermedia* and *D. carthusiana*; evidence from chloroplast DNA. *American Journal of Botany* **87**: 1175-1180.

Zhou Y, Chen GP, Wang T (2008) Isolation and characterization of microsatellite *loci* in the tree fern *Alsophila spinulosa*. *American Fern Journal* **98(1)**: 42-45.

APÉNDICES

Apéndice I. Lista de especies de la familia Cyatheaceae presentes en México (Ramírez-Barahona *et al.* en preparación); géneros *sensu* Lellinger (1987); sinonimias *sensu* Tejero-Diez (comunicación personal).

Género	Especie
<i>Alsophila</i>	<i>erinacea</i> (H. Karst.) D. S. Conant
	<i>firma</i> (Baker) D. S. Conant
	<i>salvinii</i> Hook. <i>in</i> Hooker & Baker
	<i>tryoniana</i> (Gastony) D. S. Conant
<i>Cnemidaria</i>	<i>apiculata</i> (Hook.) Slotze
	(= <i>Cyathea aristata</i> Domin)
	<i>decurrens</i> (Liebm.) R. M. Tryon
	(= <i>Cyathea decurrentiloba</i> Domin)
<i>Cyathea</i>	<i>bicrenata</i> Liebm.
	<i>costaricensis</i> (Mett. ex Kuhn) Domin
	<i>estelae</i> (Riba) Proctor
	<i>divergens</i> var. <i>tuerckheimii</i> Kunze (Maxon) R. M. Tryon
	<i>fulva</i> (M. Martens & Galeotti) Fée
	<i>godmanii</i> (Hook.) Domin
	<i>microdonta</i> (Desv.) Domin
	<i>myosuroides</i> (Liebm.) Domin
	<i>schiedeana</i> (C. Presl) Domin
	<i>Sphaeropteris</i>

Apéndice II. Estimados a nivel especie de variación genética, diferenciación genética y flujo génico en algunas especies de helechos (Monilophyta) utilizando distintos marcadores moleculares. n = tamaño de muestra; Hd = diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; He^* = heterocigosis esperada (H = diversidad génica); PLP = porcentaje de *loci* polimórficos; F_{ST}^* = índice de diferenciación genética (G_{ST}); Nm = flujo génico; SSR = microsátélites; $RAPD$ = random amplified polymorphic DNA; $ISSR$ = inter simple sequence repeat; $AFLP$ = amplified fragment length polymorphism; IGS = espaciador intergénico de cpDNA; MX = especies presentes en México.

Especie	Marcador	Hd	π	He^*	PLP (%)	F_{ST}^*	Nm	Fuente
<i>Adiantum capillus-veneris</i>	SSR	-	-	0.72	-	-	-	Pryor <i>et al.</i> (2001)
<i>Adiantum csikii</i>	RAPD	-	-	0	-	0	-	Vogel <i>et al.</i> (1999)
<i>Adiantum reniforme</i>	RAPD	-	-	0.118	33.7	-	-	Liu <i>et al.</i> (2007)
<i>Alsophila firma</i>	Alozymas	-	-	0.078	20	-	-	Soltis <i>et al.</i> (1991)
<i>Alsophila podophylla</i>	<i>atpB-rbcL</i> ^{IGS}	0.742	0.00273	-	-	-	-	Su <i>et al.</i> (2005a)
<i>Alsophila podophylla</i>	<i>atpB-rbcL</i> ^{IGS}	0	0	-	-	-	-	Su <i>et al.</i> (2005a)
<i>Alsophila spinulosa</i>	Alozymas	-	-	0.141	34.5	0.0568	4.15	Cheng <i>et al.</i> (2008)
<i>Alsophila spinulosa</i>	<i>atpB-rbcL</i> ^{IGS}	0.619	0.00128	-	-	0.042	2.83	Su <i>et al.</i> (2004)
<i>Alsophila spinulosa</i>	<i>atpB-rbcL</i> ^{IGS}	0.378	0.00138	-	-	0	8.75	Su <i>et al.</i> (2004)
<i>Alsophila spinulosa</i>	<i>trnL-trnF</i> ^{IGS}	0.901	0.00677	-	-	0.5353	0.84	Su <i>et al.</i> (2005b)
<i>Alsophila spinulosa</i>	<i>trnL-trnF</i> ^{IGS}	0.9	0.00336	-	-	0.0714	2.17	Su <i>et al.</i> (2005b)
<i>Alsophila spinulosa</i>	RAPD	-	-	0.0144 (H)	48.27	-	-	Wang <i>et al.</i> (2004)

Apéndice II. Continuación

Especie	Marcador	Hd	π	He*	PLP (%)	F _{ST} *	Nm	Fuente
<i>Alsophila spinulosa</i>	RAPD	-	-	0.01445 (H)	55.25	-	-	Wang et al. (2004)
<i>Angiopteris chauliodonta</i>	RAPD	-	-	0.27 (H)	-	0.429 (Gst)	-	Kingston et al. (2004)
<i>Archangiopteris itoi</i>	RAPD	-	-	-	16.67	-	-	Hsu et al. (2000)
<i>Athyrium dissitifolium</i>	SSR	-	-	0.56	100	0.342	-	Woodhead et al. (2005)
<i>Athyrium dissitifolium</i>	SSR	-	-	0.765	100	0.355	-	Woodhead et al. (2005)
<i>Athyrium dissitifolium</i>	AFLP	-	-	0.262 (H)	-	0.496	-	Woodhead et al. (2005)
<i>Botrychium acuminatum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.277	50	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium ascendens</i>	ISOZIMAS	-	-	0.169	33.33	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium Diploids</i>	ISOZIMAS	-	-	0.035	7.33	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium crenulatum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.00	0.00	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium echo</i>	ISOZIMAS	-	-	0.343	66.67	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium heperium</i>	ISOZIMAS	-	-	0.253	50	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium lanceolatum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.086	21.43	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium lunaria</i>	ISOZIMAS	-	-	0.07	11.9	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium matricarifolium</i>	ISOZIMAS	-	-	0.271	50	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium minghamense</i>	ISOZIMAS	-	-	0.233	45.45	-	-	Hauk y Hauffler (1999)
<i>Botrychium pedunculatum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.089	33.33	-	-	Hauk y Hauffler (1999)

Apéndice II. Continuación

Especie	Marcador	Hd	π	He*	PLP (%)	F _{ST} *	Nm	Fuente
<i>Botrychium pinnatum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.218	41.66	-	-	Hauk y Haufler (1999)
<i>Botrychium pseudopinnatum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.286	50	-	-	Hauk y Haufler (1999)
<i>Botrychium punnicola</i>	ISSR	-	-	0.1445 (H)	45	-	-	Camacho y Liston (2001)
<i>Botrychium punnicola</i>	ISSR	-	-	0.1622 (H)	48	-	-	Camacho y Liston (2001)
<i>Botrychium punnicola</i>	ISSR	-	-	0.1027 (H)	34	-	-	Camacho y Liston (2001)
<i>Botrychium punnicola</i>	ISOZIMAS	-	-	0	0	-	-	Hauk y Haufler (1999)
<i>Botrychium simplex</i>	ISOZIMAS	-	-	0.017	3.3	-	-	Hauk y Haufler (1999)
<i>Botrychium spathulatum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.089	16.67	-	-	Hauk y Haufler (1999)
<i>Botrychium tetraploids</i>	ISOZIMAS	-	-	0.215	43.01	-	-	Hauk y Haufler (1999)
<i>Ceratopteris pteridoides</i>	ISSR	-	-	0.14 (H)	44.8	0.297 (Gst)	1.19	Dong et al. (2007)
<i>Cyathea stipularis</i>	ISOZIMAS	-	-	0.037	17.5	-	-	Soltis et al. (1991)
<i>Dryopteris cristata</i>	RAPD	-	-	-	1.9	-	-	Landergott et al. (2008)
<i>Dryopteris remota</i>	RAPD	-	-	-	17.9	-	-	Schneller et al. (1998)
<i>Helechos homosporicos diploides</i>	ISOZIMAS	-	-	0.11	31.5	-	-	Maki y Asada (1998)
<i>Isoetes coreana</i>	RAPD	-	-	0.061	15.5	0.808 (qst)	0.06	Kim et al. (2008)
<i>Isoetes hypsophila</i>	ISSR	-	-	0.2171 (H)	82	-	-	Chen et al. (2005)
<i>Isoetes yunguiensis</i>	RAPD	-	-	-	62.1	-	-	Jinming et al. (2007)

Apéndice II. Continuación

Especie	Marcador	Hd	π	He*	PLP (%)	F _{ST} *	N _m	Fuente
<i>Lophosoria quadripinnata</i> MX	ISOZIMAS	-	-	0.047	19	-	-	Soltis et al. (1991)
<i>Marsilea strigosa</i>	SSR	-	-	0.1262	36.27	-	-	Vitalis et al. (2002)
<i>Pleopeltis astrolepis</i> MX	ISOZIMAS	-	-	0.162	68.2	-	-	Hooper y Haufler (1997)
<i>Pleopeltis complanata</i>	ISOZIMAS	-	-	0.183	58.2	-	-	Hooper y Haufler (1997)
<i>Pleopeltis crassinervata</i>	ISOZIMAS	-	-	0.267	69.1	-	-	Hooper y Haufler (1997)
<i>Pleopeltis polylepis erythrolepis</i>	ISOZIMAS	-	-	0.178	54.5	-	-	Hooper y Haufler (1997)
<i>Pleopeltis polylepis polylepis</i>	ISOZIMAS	-	-	0.203	65.1	-	-	Hooper y Haufler (1997)
<i>Pleopeltis wiesbaurii</i>	ISOZIMAS	-	-	0.142	57.6	-	-	Hooper y Haufler (1997)
<i>Polystichum otomasui</i>	ISOZIMAS	-	-	0.177	61.9	0.108 (Gst)	-	Maki y Asada (1998)
<i>Sceptidrium dissectum dissectum</i>	ISSR	-	-	-	82	-	-	Barker y Hauk (2003)
<i>Sceptidrium dissectum obliquum</i>	ISSR	-	-	-	92	-	-	Barker y Hauk (2003)
<i>Sceptidrium multifidum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.193	55.6	-	-	Watano y Sahashi (1992)
<i>Sceptidrium nipponicum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.116	33.3	-	-	Watano y Sahashi (1992)
<i>Sceptidrium ternatum</i>	ISOZIMAS	-	-	0.216	55.6	-	-	Watano y Sahashi (1992)
<i>Sceptidrium traingularifolium</i>	ISOZIMAS	-	-	0	0	-	-	Watano y Sahashi (1992)
<i>Sphaeropteris lepifera</i>	ISOZIMAS	-	-	0.057	12.5	-	-	Chen (1995)

Apéndice III. Protocolos de laboratorio.

Método miniprep de extracción de DNA (Vazquez-Lobo 1996)

1. En un mortero (previamente limpiado con alcohol) moler alrededor de 1g de tejido y moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, eliminar el máximo de fibras.
2. Moler el equivalente a una punta de espátula de tejido pulverizado (≈ 0.2 g) junto con 1 ml de buffer CTAB 2X (Tris-HCL 100 mM pH 8, NaCL 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% y b-ME 0.3%).
3. Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos a 4° C (en las centrífugas refrigeradas).
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 μ l de CTAB 2X (del volumen tomado inicialmente).
5. Incubar en un baño maría a 60° C durante 10 minutos (agitar los tubos cada 3 minutos).
6. Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar.
7. Centrifugar a 7000 rpm durante 13 minutos a 4° C (centrifuga refrigerada) o más tiempo hasta que el sobrenadante quede transparente.
8. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 μ l). Este paso es fundamental para obtener un DNA limpio, se debe evitar recuperar material de la difase que se forma.
9. Precipitar el DNA con 2/3 del volumen final (500 μ l aprox.) de isopropanol frío.
10. Dejar reposar por lo menos 1 hora y media a -20° C.
11. Centrifugar a 9000 rpm durante cinco minutos a 4° C (centrifuga refrigerada).
12. Eliminar el sobrenadante y agregar al pellet 1ml de etanol al 70% frío.
13. Centrifugar a 7000 rpm durante 5 minutos a 4° C (centrifuga refrigerada).
14. Eliminar el sobrenadante (con pipeta) y resuspender el pellet con 200 μ l de agua.

Buffer de extracción CTAB

- * Tris-HCl 100 mM pH8
- * NaCl 1.5 M
- * EDTA 20 mM pH8

- * CTAB 4 %
- * PVP40 4 %
- * Ácido ascórbico 0.1 %
- * DIECA 0.1 %
- * b-mercaptoetanol 0.3 % (agregar hasta el momento de usar el buffer)

Buffer de extracción CTAB2X

- * Tris-HCl 100 mM pH8
- * NaCl 1.4 M
- * EDTA 20 mM pH8
- * CTAB 2%
- * Opcional: PVP40 4 %
- * Opcional: Ácido ascórbico 0.1 %
- * Opcional: DIECA 0.1 %
- * Opcional: Polietileno Glicol (PEG) 4 % (si se utiliza es necesario un lavado posterior con CTAB2X sin PEG)
- * b-mercaptoetanol 0.3 % (agregar hasta el momento de usar el buffer)

Buffer de extracción STE

- * Tris-HCl 100 mM pH8
 - * EDTA 50 mM pH8
 - * NaCl 100 mM
 - * b-mercaptoetanol 0.3 % (agregar hasta el momento de usar el buffer)
-