



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Las poblaciones solitarias: fragmentación, diferenciación y
rareza de un junípero ribereño y sus implicaciones para la
conservación**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALICIA MASTRETTA YANES



DIRECTOR DE TESIS:

DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

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

Las poblaciones solitarias: fragmentación, diferenciación, y rareza de un junípero ribereño y sus implicaciones para la conservación

realizado por **Mastretta Yanes Alicia** con número de cuenta **3-0252408-0** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. David Sebastián Gernandt

Propietario Dra. Alejandra Vázquez Lobo Yurén

Propietario Tutor Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Suplente Dra. María del Socorro González Elizondo

Suplente Dra. Alejandra Citlalli Moreno Letelier

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 31 de agosto de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*nlm.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Mastretta
Yanes
Alicia
55544987
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302524080

2. Datos del tutor

Dr. Daniel Igancio
Piñero
Dalmau

3. Datos del sinodal 1

Dr. David Sebastián
Gernandt

4. Datos del sinodal 2

Dra. Alejandra
Vázquez Lobo
Yurén

5. Datos del sinodal 3

Dra. María del Socorro
González
Elizondo

6. Datos del sinodal 4

Dra. Alejandra Citlalli
Moreno
Letelier

7. Datos del trabajo escrito

Las poblaciones solitarias: fragmentación, diferenciación y rareza de un junípero ribereño y sus implicaciones para la conservación

87p
2009

A Arturo Maldonado

en memoria

*La biología, antes que sólo pasión por la
naturaleza, es una ciencia*

Resumen

Juniperus blancoi Martínez es una conífera rara, ribereña (a excepción de una de sus variedades) y con una distribución amplia pero fragmentada. En este estudio se utilizó la región *trnC-trnD* de ADNcp para determinar los parámetros de genética de poblaciones y realizar análisis filogeográficos en sus ocho poblaciones conocidas. La diversidad haplotípica fue alta ($h = 0.86266$), se encontró una gran estructuración (5 grupos SAMOVA) y valores altos de diferenciación ($F_{ST}=0.79469$ y $F_{ST}>0.25$ en la mayoría de las comparaciones pareadas). La estructura filogeográfica indica una serie de procesos de expansión, fragmentación y aislamiento, presuntamente debidos a cambios climáticos y a modificaciones en la conformación de las cuencas hidrológicas en los últimos 3.5 Ma, así como a la poca capacidad de dispersión de la especie.

La alta fragmentación, diferenciación y aislamiento en estas poblaciones, sugiere que el entendimiento de las especies raras y su hábitat es complejo. Por ende, su conservación debe atender una serie de consideraciones especiales, algunas de las cuales se sugieren en este trabajo.

Abstract

Juniperus blancoi Martínez is a rare and riparian (with exception of one of its varieties) conifer, with a wide yet restricted distribution. In this study the *trnC-trnD* cpDNA region was used to assess population genetics parameters and to perform phylogeographic analyses using the eight known populations of the species. The haplotipic diversity was high ($h = 0.86266$), we found high geographic structure (5 SAMOVA groups), as well as high differentiation values ($F_{ST}=0.79469$ and $F_{ST}>0.25$ in most of the pairwise comparisons). The phylogeographic structure indicates a series of expansion, fragmentation and isolation processes which were presumably due to climatic changes and modification of the hydrological basin conformation in the last 3.5 Myr, as well as to the small dispersability of the species.

We conclude that high fragmentation, population differentiation and isolation in *J. blancoi* suggest that understanding rare species and their habitat is complex. As a consequence, special considerations for its conservation must be made, some of which are suggested in the present study.

Agradecimientos

Los agradecimientos de las tesis, por lo menos de las de biología, son no sólo la parte más leída, sino la mejor. No ha pasado tanto tiempo desde la primera colecta, poco más de año y medio. Se me figura remoto, remotísimo. No es la desesperación del tesista que no ve el final del camino. No es la suma, que algo debe de pesar, de 47 millones de segundos. Es, hasta donde me da la piel para sentir, el hecho de que la vida avanza y nos lleva en su montura mientras uno cree estar sólo *haciendo la tesis*. Me doy cuenta ahora, debo mucho más que estas páginas. Por eso, ante todo, entiéndase que estos agradecimientos son una muestra injusta de un universo que no lograré abarcar. Que comience el desfile:

De entrada, sin la familia, imposible. Mis padres y hermanas, las tías y los primos, las primas y los tíos, los abuelos y abuelas, y también los que no necesitan ni los genes ni el apellido, que pasen todos, vivos y muertos. Qué quieren que les diga, la filogeografía me hace pensar en la ancestría-descendencia.

Sin la familia escogida tampoco podría. El Clan, las chicas Montessori, las amistades de Ciencias, los Chajuleros, los equipos de fut, la gente del Lab y los, llamémoslos trabajadores independientes, que no entran en los grupos anteriores pero que se saben mis amigos, y a quienes, cuando menos una vez, molesté con algo de la tesis. No, Miguelángela, eres amiga fiel pero entrabas en categoría de cuadrúpeda, pero tienes razón, encajas también aquí, pásale ya, que te sigan el resto de seres que me alegran la vida. No se preocupen, la perra no rompe el orden, no estamos siguiendo jerarquía alguna.

Reflectores por favor sobre todos los integrantes del laboratorio de Genética y Evolución por quienes aprendí que la ciencia es cosa seria y a su vez fuente inagotable de escenas para PhD comics. Sin su ayuda (Ale Ortíz y la distribución potencial, por ejemplo), seminarios, salidas al campo, anécdotas, música, comidas, tesis, recomendaciones y hasta sola presencia este trabajo sería inexistente. Personajes.

Vienen llegando ya los profesores de la carrera en cuyas clases entendí el significado de estudiar Biología en la Facultad de Ciencias y que marcaron de algún modo mi profesión. Muy pragmáticos vienen formados según los conocí: Miguel Torre Blanco, José Luis Gutiérrez, Alicia Negrón, Georgina Santos, Álvaro Chaos, Rosa Luz Tavera, Sara Frias, Bertha Molina, Pedro García, Judith Márquez, Margarita Collazo, María de Jesús Vázquez, Pilar de la Garza, Daniel Piñero, Julia Carabias, Cláudia Serrano, Marisol Montellano, Antonio Lazcano, Miguel Ángel Palomino, José Ignacio Fernández y Daniela Terán.

Que pasen ahora mis sinodales, que se portaron como verdaderos maestros y no sólo examinadores. David Gernandt con el herbario y el formato; Alejandra Vázquez Lobo, gran gurú del laboratorio y los análisis filogenéticos; Socorro González, bótanica de verdad a quien le debo el Cerro Mohinora; y Alejandra Moreno quien me introdujo, sin saberlo, a los paleoclimas y las explicaciones múltiples. Empezando el grupo del apoyo extraoficial menciono gratamente a Robert Adams, quien me contagió la pasión por los juníferos y me ha abierto todas las puertas para acercarme a su conocimiento.

Sin la labor diaria de los trabajadores del Instituto de Ecología, de su unidad en Hermosillo y del CIDIR-Durango el trabajo de laboratorio y las colectas no hubieran sido posibles. Y sin la paciencia de las señoritas de ventanillas no hubiera superado trámite alguno.

Debo decirles que mis ojos se enamoraron de *Juniperus blancoi* gracias a la alcahuetada de Felipe y Pilar, y a la iniciativa de Álvaro. Que pasen pues todos los maestros y compañeros del INIFAP.

Su atención un momento más que esto se pone bueno. Los pobladores de La Preciosita Sangre de Cristo Sálvame y de Huachichiles no sólo nos guiaron y permitieron realizar las colectas en sus terrenos, sino que es gracias a UMAs como las suyas que la conservación de los bosques es posible, no sólo yo, todos los estamos en deuda. Que se acerquen pues, Luis Landeros Mogollán, Armando López Martínez, Juan Landeros Mogollón, Gregorio Landeros Mogollón y el comité actual de la Reserva Ecológica Campesina La Preciosita; y Tomás Escobedo Hernandez y Manuel Apolinar Avitia de la Participativa El Huehuento.

Ya están entre los presentes, pero hay que mencionar que son mis mayores cómplices de todo esto: Ana Wegier, quién algún día entenderá cuanto influye en nuestras vidas y Daniel Piñero, mi asesor y tutor más allá de la tesis.

Este trabajo fue financiado por el proyecto SEMARNAT CONACYT 0201-A-1 y es con lo que cierro mis estudios de licenciatura en la UNAM. Decirlo es una manera de invitar a todos los mexicanos (y anexos culturales) a esta lista de agradecimientos.

Ahora sí, mucha gente. Están también aquí incorpóreamente el arte y las distracciones que nos mantienen cuerdos; la profundidad de los paisajes naturales; y las ideas de los grandes científicos y pensadores sobre los que construimos lo cotidiano.

Gran desfile, mejor fiesta, más grata vida. Aprovecho que están todos en estas letras para quitarme el sombrero e inclinarme frente a ustedes. Muchas gracias.

Glosario

ADNcp ácido desoxirribonucleico (ADN) del cloroplasto

acuminado largamente agudo o terminado en punta larga

ascendente que toma primero una dirección horizontal o próxima a ella para luego empinarse hasta alcanzar aproximadamente la vertical

dasometría estudio de la medida de los árboles y de las masas forestales

denticulado con dientes pequeños

dístico que está inserto o colocado en dos filas y dispuesto de manera que cada fila forma aproximadamente un plano

escuamiforme que tiene forma de escama

FVTM Faja Volcánica Transmexicana

indel inserción-delección

imbricado dicho de una serie de hojas, que, estando muy próximas, llegan a solaparse de manera parcial

kb kilo bases

Ma millones de años

MP máxima parsimonia

msnm metros sobre el nivel del mar

mucronado con una punta abrupta, corta y angosta en el ápice

MV máxima verosimilitud

NCPA *Nested Clade Analysis*; Análisis de Clados Anidados

pb pares de bases

pedúnculo ramilla que sostiene una inflorescencia, fruto o cono ovulado tras su fecundación.

peltado dicho de una estructura, que tiene la lámina redondeada y sostenida por el cnetro a modo de sombrilla

postrado hábito de crecimiento horizontal, con los tallos rastreros, tendidos sobre el suelo

procumbente hábito de crecimiento de planta postrada, que tiene tallos rastreros cuyos ápices son ascendentes y casi erectos

RAPD *Random Amplification of Polymorphic DNA*; amplificación al azar de ADN polimórfico

SMO Sierra Madre Occidental

Índice de contenido

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes teóricos.....	3
2.1	La rareza como característica de una especie.....	3
2.2	La filogeografía y sus herramientas moleculares.....	4
2.2.1	Secuencias de cloroplasto como marcador molecular	4
2.2.2	Diversidad genética	5
2.2.3	Diferenciación y estructuración genética	8
2.2.4	Demografía histórica.....	9
2.2.5	Análisis filogeográfico de clados anidados.....	11
2.2.6	Análisis filogenéticos.....	12
2.3	Los bosques presentes: resultado de un proceso histórico	13
2.4	Historia natural de <i>Juniperus blancoi</i>	17
2.4.1	El género <i>Juniperus</i>	17
2.4.2	<i>Juniperus blancoi</i>	18
2.4.2.1	Descripción	18
2.4.2.2	Distribución y hábitat.....	20
2.4.2.3	Antecedentes de estudios genéticos.....	22
3	Objetivos.....	25
3.1	Objetivo general.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
3.3	Hipótesis.....	25
4	Área geográfica de estudio.....	26
5	Métodos.....	27
5.1	Colecta de material biológico	27
5.2	Identificación del tipo de rareza.....	27
5.3	Generación de la distribución potencial.....	27
5.4	Registro de características dasométricas.....	28
5.5	Extracción de ADN, PCR y secuenciación.....	28
5.6	Análisis de la región <i>trnC-trnD</i>	30
5.6.1	Diversidad genética.....	30

5.6.2 Diferenciación y estructuración genética.....	30
5.6.3 Análisis filogenéticos.....	31
5.6.4 Análisis filogeográfico de clados anidados.....	31
5.6.5 Demografía histórica	32
5.6.6 Prueba de Mantel.....	32
5.7 Evaluación de las características socioeconómicas y del estado de conservación.....	33
6 Resultados.....	34
6.1 Tipo de rareza en <i>Juniperus blancoi</i>	34
6.2 Distribución potencial de <i>Juniperus blancoi</i>	34
6.3 Variación de características dasométricas.....	36
6.4 Descripción de las regiones secuenciadas.....	36
6.5 Análisis de la región <i>trnC-trnD</i>	37
6.5.1 Diversidad, diferenciación y estructura genética.....	37
6.5.2 Análisis filogenéticos.....	40
6.5.3 Análisis filogeográfico de clados anidados.....	40
6.5.4 Demografía histórica	43
6.6 Condiciones socioeconómicas, ambientales y estado de conservación	44
7 Discusión.....	50
7.1 La rareza de <i>Juniperus blancoi</i>	50
7.2 ¿Hay más poblaciones de <i>Juniperus blancoi</i> ?	51
7.3 Variación de características dasométricas.....	52
7.4 Diversidad, diferenciación y estructura genética	53
7.5 Análisis filogenéticos.....	56
7.6 Análisis filogeográfico de clados anidados.....	59
7.7 Demografía histórica	62
7.8 Hipótesis filogeográfica.....	65
7.9 Influencia de factores socioeconómicos y ambientales en el estado de conservación.....	67
8 Conclusiones.....	69
9 Referencias.....	71
10 Anexos.....	83

1 Introducción

Desde sus primeras definiciones hasta la más actualizada de las clasificaciones la vida ha mantenido una característica: es heterogénea. Según el Convenio de Diversidad Biológica (United Nations, 1992) la biodiversidad es entonces la variedad de vida sobre la Tierra en todos sus niveles: los diferentes ecosistemas y las interacciones bióticas que los rigen, las millones de especies que se han descrito más las que faltan por descubrir y, en el nivel más básico, las diferencias genéticas dentro de cada especie, entre sus poblaciones e individuos.

La diversidad genética es el elemento más básico de la diversidad biológica ya que es la materia prima sobre la que opera la evolución. Por lo tanto su estudio involucra aspectos biológicos como evolución molecular, demografía y etología, que suelen relacionarse con procesos geológicos, como los cambios climáticos y orográficos. Analizar los componentes históricos y filogenéticos de la distribución geográfica de los linajes de genes es por ende una tarea multidisciplinaria, y corre a cargo de un área de reciente aparición llamada filogeografía.

Los estudios filogeográficos suelen ser muy complejos y contribuyen a la investigación en aspectos que van desde definir tasas de mutación hasta la discusión vicarianza-dispersión en la formación de taxa, pero también pueden ser un elemento importante para la biología de la conservación. Por supuesto que el entendimiento evolutivo de la biodiversidad juega desde hace tiempo un papel en la definición de áreas destinadas a la conservación. Tal acercamiento se ha hecho en su mayoría con estudios a niveles taxonómicos superiores y se le ha prestado poca atención a los linajes de genes y lo que éstos pueden decirnos sobre: el impacto de los cambios climáticos; los efectos de la fragmentación pasada y presente; la existencia de barreras geográficas para el flujo genético o de refugios; la capacidad de colonización; los tamaños demográficos históricos y la relevancia histórica de cada población; entre varios otros. Describir lo anterior en varias especies nos brinda pistas sobre la evolución de un ecosistema o región, lo que después podría traducirse como recomendaciones y puntos prioritarios para la conservación y manejo de los recursos naturales (ver por ejemplo Rosel y Rojas-Bracho, 1999; Crandall et al., 2000; Molina-Freaner et al., 2001; Chassin-Noria et al., 2004; Solórzano et al., 2004; Vianna et al., 2006; Delgado et al., 2008b).

Desde esta óptica ya se tienen estudios en varias coníferas y encinos de los bosques mexicanos (ver una revisión en Piñero et al. (2008)). Sin embargo, no se ha incluido al género *Juniperus*, del que México posee, acorde a la última revisión del género por Adams (2008), el 25% de los taxa: cuenta con 18 especies y 7 variedades de las 67 especies y 28 variedades que existen y con un nivel de endemismo del 58%. Lo anterior nos coloca, empatados con China, en el primer lugar de diversidad del grupo (Anexo 1), e implica que el territorio mexicano es un sitio prioritario para la conservación del género y de sus hábitats asociados, así como para el entendimiento de su historia evolutiva reciente.

Juniperus blancoi Martínez es endémico de México, crece casi exclusivamente junto a arroyos permanentes y temporales, posee alta variación morfológica (se reconocen 2 variedades además de la tipo: *J. blancoi* var. *huehuentensis* y *J. blancoi* var. *mucronata*, y se le describe tanto como arbusto como árbol superior a los 25 metros), y tiene una distribución geográfica amplia y restringida a la vez, ya que se le encuentra desde Sonora hasta Puebla, en altitudes de 1350 a 3250 msnm, pero en tan sólo 8 poblaciones con pocos individuos, lo que lo vuelve una especie rara. Su rareza, alta fragmentación entre sus poblaciones y hábitat restringido, hacen de esta especie un modelo particularmente interesante para la filogeografía, pues es idóneo para estudiar la fragmentación, el flujo génico y el aislamiento, la especiación misma e incluso procesos relacionados con la adaptación.

Por otro lado, el estudio de la diversidad y evolución de los bosques de coníferas de nuestro país no sólo necesita incorporar este género, sino también prestar atención a taxa ribereños y raros, condiciones que *J. blancoi* comparte. Especies como ésta no sólo enfrentan una amenaza mayor por lo restringido de su hábitat y la fragilidad que esto implica ante el cambio de uso del suelo, sino que pueden haber atravesado procesos históricos distintos o con consecuencias más marcadas que en grupos de mayor distribución. Así, el estudio de la filogeografía mediante uso de marcadores moleculares de *J. blancoi* puede brindar resultados importantes para el entendimiento de la evolución de los bosques de coníferas de México y las implicaciones para su conservación.

2 Antecedentes teóricos

2.1 La rareza como característica de una especie

La presencia es sólo una alucinación que dura un cierto tiempo

- Roberto Calasso

La rareza puede definirse, y por ende entenderse, en niveles muy distintos y aplicarse a situaciones de índole muy diversa. Como calificativo de las especies fue categorizada en distintos tipos por Rabinowitz (1981) desde un punto de vista espacial. La autora determinó que no puede haber una única definición pues las especies se vuelven raras por diferentes caminos y con consecuencias evolutivas y ecológicas distintas. Siguiendo dicha lógica, son tres las características de las que depende la rareza de una especie: su distribución geográfica, lo específico de su hábitat y el tamaño sus poblaciones.

Cada uno de los factores anteriores tiene dos posibilidades (amplia y restringida, amplio o específico y grande o pequeño, respectivamente) lo que genera una matriz de ocho posibles interacciones, de las cuales siete son algún tipo de rareza:

- Distribución amplia con poblaciones locales grandes (dominantes) en un hábitat muy específico
- Distribución amplia con poblaciones de pocos individuos (no dominantes) en varios hábitats distintos
- Distribución amplia con poblaciones de pocos individuos (no dominantes) en un hábitat específico
- Distribución restringida con poblaciones locales grandes (dominante) en varios hábitats
- Distribución restringida con tamaños de poblaciones locales grandes (dominantes) en un hábitat muy específico
- Distribución restringida con poblaciones de pocos individuos (no dominantes) en varios hábitats distintos
- Distribución restringida con poblaciones de pocos individuos (no dominantes) en un hábitat específico

Los anteriores puntos describen a la rareza muy bien en términos espaciales, sin embargo no hay que olvidar que la rareza es también un fenómeno en el tiempo (Harper, 1981). Esto evidentemente se relaciona con su origen: lo que es raro hoy pudo no serlo antes y viceversa.

Por otro lado, la rareza puede ser una consecuencia de las actividades humanas y estar encaminando a la especie hacia la extinción, o bien puede ser natural y deberse a los procesos históricos por los que han atravesado las poblaciones y todo lo que eso implica desde el punto de vista evolutivo.

De ahí que la rareza en cualquiera de sus acepciones sea una característica que vuelve a algunas especies de particular interés para los ojos de la filogeografía y para los de estudios encaminados a entender los procesos históricos por los que han atravesado los paisajes.

2.2 La filogeografía y sus herramientas moleculares

If you will, we can now see genes in space and time

--Godfrey Hewitt

La filogeografía es una rama de la biogeografía y por ende trata con la dimensión espacial de la evolución, pero lo hace a nivel de poblaciones y especies cercanamente relacionadas entre sí: estudia la distribución geográfica de linajes de genes. Para esto puede ocupar información de genética de poblaciones, evolución molecular, demografía, biología filogenética, paleontología, geología y geografía histórica, lo que la convierte en una disciplina que vincula dos grandes áreas del entender del mundo natural: la micro y la macroevolución (Avice, 2000).

Se han mencionado ya algunos antecedentes de la historia natural de *J. blancoi* y de su hábitat, pero la filogeografía requiere además elementos teóricos y prácticos de la genética de poblaciones, mismos que se abordan de manera general a continuación.

2.2.1 Secuencias de cloroplasto como marcador molecular

El genoma del cloroplasto es una molécula circular de doble cadena de ADN haploide que varía de 119 a 160 kb (Hartl y Clark, 2007), en *Pinus* y *Welwitschia* es de al rededor de 119 kb (Wakasugi et al., 1994;

McCoy et al., 2008) y en *Cryptomeria* de 132 kb aproximadamente (Hirao et al., 2008). Su estructura y su secuencia se encuentran bien conservadas a pesar de que las deleciones e inserciones son comunes. Para plantas en general, la tasa de sustitución nucleotídica es aproximadamente 1×10^{-9} sustituciones sinónimas por sitio por año (Curtis y Clegg, 1984), lo que es mayor que su similar en ADN mitocondrial y nuclear (Wolfe et al., 1987). Dada las características anteriores los fragmentos de ADN de cloroplasto (ADNcp) se han utilizado recientemente como marcadores moleculares para construir filogenias y hacer análisis de genética de poblaciones (Shaw et al., 2005).

Según diversos estudios en coníferas, y particularmente en miembros de la familia Cupressaceae, el cloroplasto se hereda paternamente (Neale et al., 1989; Mogensen, 1996). Además, la tasa de sustitución en *Pinus*, según un estudio que la calibra con fósiles, es de $0.22-0.42 \times 10^{-9}$ por sitio por año (Willyard et al., 2006).

Se han utilizado distintas regiones del cloroplasto para estimar la variación en plantas con semilla, particularmente los espaciadores intergénicos (Demesure et al., 1995). El locus *trnC-trnD* se localiza en la región gran copia única (*large single copy*: LSC) del ADN de cloroplasto entre los genes *trnC* y *trnD* (Demesure et al., 1995). En *Nicotiana* tiene un tamaño aproximado de 3200 pb (Wakasugi et al., 1998) y en *Cryptomeria japonica* de 2800 pb aproximadamente (Hirao et al., 2008). Dicha región contiene a el espaciador intergénico *trnC-petN*, el gen *petN*, el espaciador intergénico *petN-psbM*, el gen *psbM* y el espaciador intergénico *psbM-trnD* (Figura 1). Los genes *petN* y *psbM* codifican para la subunidad VIII del citocromo b6/f fotosintético y para la proteína M del fotosistema II, respectivamente (Lee y Wen, 2004). Este locus, o alguna de sus partes, ha sido secuenciado en diversos grupos de plantas donde ha demostrado ser polimórfico (Shaw et al., 2005). Se ha utilizado en estudios filogenéticos entre especies cercanas, incluyendo coníferas (Ran et al. 2006; Adams, 2007), y se ha propuesto que puede utilizarse también para realizar análisis a nivel intraespecífico (Lee y Wen, 2004), tal como el realizado entre las poblaciones de *Taxodium mucronatum* (Hernández-Leal, 2009).

2.2.2 Diversidad genética

La existencia de dos o más alelos (o haplotipos) con una frecuencia relativa substancial (1%) en una población se conoce como polimorfismo genético. Éste es generado por mutaciones como sustituciones nucleotídicas e inserciones/deleciones (Nei y Kumar, 2000) y constituye la base de la diversidad genética,

misma que también incrementa gracias a procesos como la recombinación y --a nivel poblacional-- el flujo génico. Así mismo, las fuerzas que pueden disminuirla son la selección natural y la deriva génica.

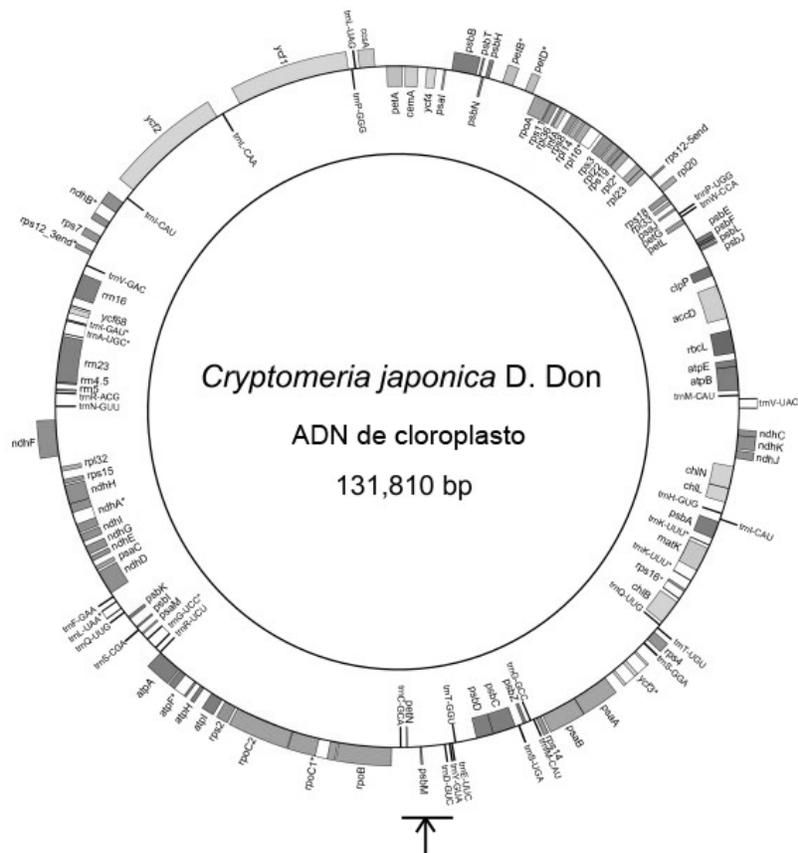


Figura 1. Organización génica del genoma del cloroplasto de *Cryptomeria japonica*. Los genes fuera del círculo son transcritos en el sentido de las manecillas del reloj y los de dentro en sentido contrario. Se señala la región *trnC-trnD* (modificado de Hirao et al., 2008).

Existen varias maneras de cuantificar la diversidad genética en secuencias de ADN, entre ellas el número de haplotipos, número de sitios polimórficos o segregantes, diversidad genética, diversidad nucleotídica y el parámetro θ .

El *número de haplotipos* (k) se refiere simplemente a cuántos haplotipos diferentes se encontraron en la muestra. Un haplotipo es una combinación particular de bases nucleotídicas que un individuo hereda de uno de sus padres. Así, los haplotipos se distinguen entre sí si su secuencia de

nucleótidos tiene cuando menos un estado diferente en alguno de los sitios polimórficos que se comparan.

El *número de sitios segregantes* (S) es el total de sitios nucleotídicos polimórficos, es decir cualquiera que presente dos o más estados (nucleótidos o *indels*) en la muestra de secuencias homólogas.

La *diversidad genética* en secuencias de cloroplasto o mitocondria es llamada diversidad haplotípica (h) y es el equivalente de la heterocigosidad esperada en organismos diploides (Nei y Kumar, 2000). Si la población se encuentra dividida en subpoblaciones, entonces puede calcularse h_s que es la media ponderada de las diversidades haplotípicas estimadas en las subpoblaciones y h_t que es un estimado de la diversidad haplotípica en la población total (Hudson et al., 1992a). Estos índices pueden calcularse a partir de las frecuencias haplotípicas utilizando las ecuaciones 1 (Nei, 1987) 2 y 3 (Hudson et al., 1992b).

$$h = H_i = \frac{n_i}{n_i - 1} \left(1 - \sum_{j=1}^k p_{ij}^2 \right) \quad (1)$$

$$h_s = H_s = \sum_{i=1}^L w_i H_i \quad (2)$$

$$h_T = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^k p_j^2 \right) \quad (3)$$

Donde p_{ij} es la frecuencia del j -ésimo haplotipo en la muestra de la localidad i , w_i es un factor de ponderación ($w = (n_i - 2) / (n_1 + n_2 - 4)$) para la población i , n es el tamaño total de la muestra, L es el número de poblaciones y k es el número de haplotipos de la muestra total.

La *diversidad nucleotídica promedio entre los loci* (π) es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos escogidos al azar sean diferentes, en cierto modo es el equivalente de la heterocigosidad esperada pero a nivel nucleotídico. Está definida por (Nei, 1987):

$$\pi = \sum_{ij}^k \hat{x}_i \hat{x}_j d_{ij} \quad (4)$$

Donde x_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo en la muestra y x_j del j -ésimo, k es el número de haplotipos diferentes y d_{ij} es el número de diferencias nucleotídicas entre el i -ésimo y el j -ésimo haplotipo.

Normalmente π se construye considerando sólo la variación generada por sustituciones, pero puede también calcularse si otro tipo de mutaciones generadas por eventos únicos se codifican como quinto estado. Dicha diversidad nucleotídica modificada (π_M) resulta útil cuando existen inserciones-deleciones que diferencien los haplotipos entre sí y que se tomaron en cuenta para calcular la diversidad haplotípica.

El parámetro Θ relaciona al tamaño efectivo poblacional (N_e) con la tasa de mutación por sitio por generación (μ) bajo la siguiente ecuación:

$$\Theta = x N_e \mu \quad (5)$$

En dicha expresión x depende de la ploidía de la molécula y de si la herencia es uniparental o biparental, de ahí que: $x = 4$ en diploides monoicos, $x = 2$ en haploides monoicos y $x = 1$ en haploides dioicos. En el caso del género *Juniperus* la herencia es uniparental (paterna), y los machos y las hembras son individuos separados, por lo anterior $x = 1$.

El valor de Θ puede estimarse a partir de Θ (estimado de Watterson) o del número de sitios segregantes (S) siguiendo los métodos propuestos por Tajima (1996).

2.2.3 Diferenciación y estructuración genética

La distribución de una especie generalmente se encuentra dividida en subpoblaciones cuyas frecuencias haplotípicas pueden diferir del equilibrio de Hardy-Weinberg. Wright (1951) propuso que las desviaciones de las frecuencias genotípicas en una población subdividida podría medirse con los llamados índices de fijación: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} que están relacionados por la siguiente ecuación (Nei y Kumar, 2000) :

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) \quad (6)$$

En la idea original de dichos índices se desarrollan bajo el concepto de correlación entre gametos, pero posteriormente se redefinieron y se demostró que podían calcularse utilizando los índices de diversidad genética mencionados anteriormente (Nei, 1977; Hudson et al., 1992b):

$$\hat{F}_{IS} = 1 - \frac{h}{h_S} \quad (7a)$$

$$\hat{F}_{IT} = 1 - \frac{h}{h_T} \quad (7b)$$

$$\hat{F}_{ST} = 1 - \frac{h_S}{h_T} \quad (7c)$$

La F_{IS} puede interpretarse como la diferenciación entre los individuos de una subpoblación, mientras que la F_{IT} como la diferenciación entre los individuos de toda la población y finalmente la F_{ST} como la diferenciación entre las subpoblaciones de una población.

2.2.4 Demografía histórica

La cantidad de diversidad genética en las poblaciones se ve influida, entre otras cosas, por los eventos demográficos importantes: con el decremento poblacional la diversidad se pierde por deriva génica y con el crecimiento se retiene (Harpending, 1994), por lo tanto, la diversidad genética puede utilizarse para entender la demografía histórica. Esto se hace a través de diversos análisis: de la distribución de las diferencias pareadas entre secuencias (distribución *mismatch*), de la distribución de frecuencias de los alelos y de las genealogías de genes (Harpending y Rogers 2000; Templeton, 2001).

La distribución *mismatch* es una herramienta para inferir los tamaños poblacionales pasados a partir de las diferencias pareadas entre sitios nucleotídicos. En una población de tamaño constante, la distribución *mismatch* se desvía substancialmente de la distribución geométrica, porque la historia de los eventos de coalescencia en una sola muestra de genes impone una correlación en las diferencias pareadas, mientras que en una población de crecimiento exponencial los eventos de coalescencia ocurren relativamente temprano y en un rango restringido de tiempo, lo que crea una genealogía en forma de “estrella” y la distribución de las diferencias pareadas se asemeja a una distribución de Poisson (Slatkin y Hudson, 1991). De este modo, cuando hay un crecimiento poblacional repentino la distribución

es unimodal, mientras que si el tamaño es estable o decreciente se encuentran distribuciones con más de una moda (Figura 2, (Harpending y Rogers, 2000)

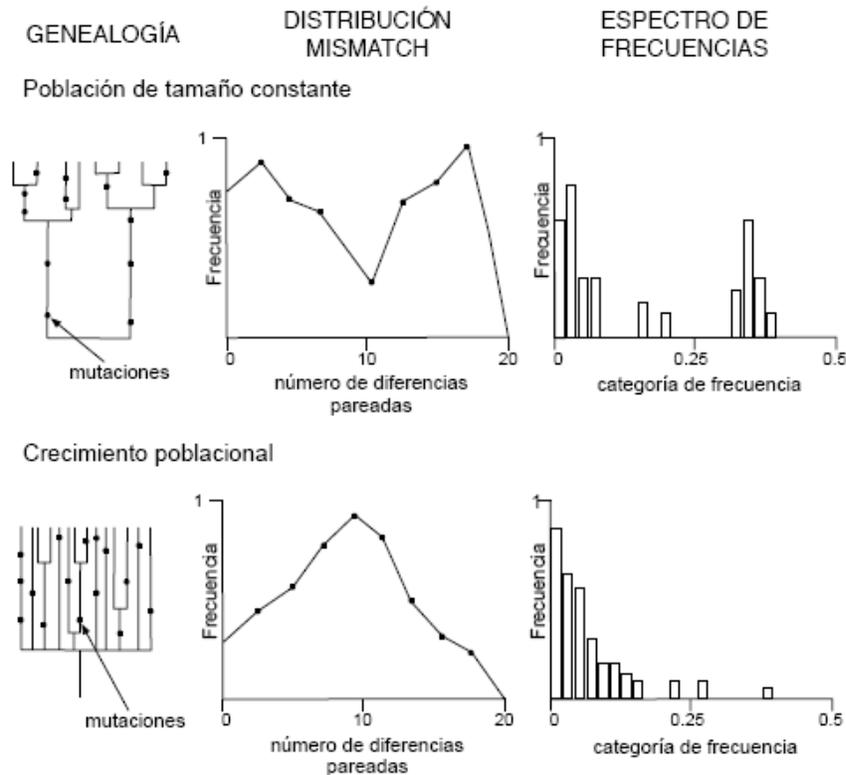


Figura 2. Genealogía, distribución de diferencias pareadas y espectro de frecuencias bajo un tamaño de población constante y de crecimiento poblacional (Harpending y Rogers, 2000, tomado de Moreno-Letelier, 2009).

Otra herramienta para inferir cambios en los tamaños poblacionales es la D de Tajima (Tajima, 1989). Originalmente diseñada para distinguir entre una secuencia que evoluciona neutralmente y una que sigue un proceso selectivo, esta prueba también puede aplicarse a otros procesos como una expansión o contracción demográfica. Se basa en la predicción del modelo neutral de que existe un equilibrio entre la mutación y la deriva génica, por lo que el número de sitios segregantes y la media de diferencias nucleotídicas debieran ser iguales. De este modo, una D de Tajima negativa significa un exceso de polimorfismos de baja frecuencia, lo que indica una expansión demográfica si se afecta todo el genoma o un barrido selectivo si el efecto es sólo local. Mientras que una positiva señala que existen

bajos niveles de polimorfismo tanto de alta como de baja frecuencia, lo que se interpreta como un decremento o estabilidad en el tamaño poblacional si el efecto es en todo el genoma o selección estabilizadora si es sólo en algunos genes. Aunque el método estadístico es más complejo, la prueba D de Tajima se basa en la siguiente expresión:

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}} \quad (8)$$

La prueba de F_s de Fu (Fu, 1997) es un método similar a la D de Tajima, se basa en que las mutaciones más antiguas deberían encontrarse con mayor probabilidad en las ramas más internas de la genealogía y las más recientes en las ramas más externas o *singletons* (Fu y Li, 1993). Al comparar el número de mutaciones en las ramas internas y externas con lo esperado según el modelo neutral se obtiene una prueba estadística; si el valor de la prueba es negativo quiere decir que existe un exceso de *singletons*, suceso que puede ser causado por una expansión demográfica o por selección negativa purificadora.

2.2.5 Análisis filogeográfico de clados anidados

El análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA por sus siglas en inglés; Templeton, 2004) es un método que establece que la distribución geográfica de la variación genética es producto tanto de procesos históricos como contemporáneos, fenómenos que pueden identificarse y sostenerse estadísticamente a través del análisis integral de redes de haplotipos y frecuencias haplotípicas y su localización geográfica (Templeton, 2001; Templeton, 2004).

El anidamiento de los clados consiste (Templeton et al., 1987; Templeton et al., 1992) en agrupar en el primer nivel de anidamiento (clado) a los haplotipos que están a un paso mutacional de otros, en el siguiente nivel a los clados formados y así sucesivamente.

La hipótesis nula en el NCPA es que no hay asociación geográfica, de manera que la distribución espacial de los haplotipos obedece al azar. Actualmente existen pruebas de asociación geográfica que mediante permutaciones dan un componente estadístico a la agrupación y distancia geográfica entre clados (Posada et al., 2000) con lo que puede determinarse cuáles son significativamente distintas de una distribución azarosa para después mediante una clave de inferencias, determinar los procesos históricos

que podrían haber formado tal patrón: flujo génico restringido, aislamiento por distancia, expansión contigua del rango de distribución, fragmentación alopátrica y dispersión a larga distancia (Templeton, 2004).

2.2.6 *Análisis filogenéticos*

La filogenia de los organismos es la historia evolutiva de los linajes a través del tiempo, es decir de sus relaciones de ancestría-descendencia. Las filogenias se representan gráficamente mediante árboles filogenéticos que son hipótesis cuyo patrón de ramificación, o topología, indica el último ancestro común de cada grupo de linajes (Ridley, 2004).

Los árboles filogenéticos pueden construirse con datos morfológicos, secuencias de ADN, proteínas o una combinación de éstos. Una ventaja de utilizar datos genéticos es que la tasa de evolución de las secuencias varía lo suficiente entre diferentes segmentos de ADN como para poder abordar las relaciones evolutivas desde el nivel de reinos hasta el de poblaciones (Nei y Kumar, 2000).

Existen varios métodos para construir los árboles filogenéticos, dos de los más usados son la máxima verosimilitud (MV) y la máxima parsimonia (MP). En el primer caso construyen diferentes topologías a partir de un conjunto de secuencias con un modelo específico de sustitución, y se escoge el árbol que obtuvo la mayor verosimilitud. El parámetro que se considera es la longitud de las ramas de cada topología y la verosimilitud se maximiza para calcularla. Como los *indels* no tienen una tasa de mutación establecida, este método no puede tomarlos en cuenta, sin embargo, el método de MP supone que las mutaciones ocurren en todas las direcciones entre los nucleótidos, por lo que pueden incluir a los *gaps* como quinto estado, siempre y cuando las mutaciones que remuevan más de un nucleótido a la vez se consideren como un sólo evento. Este método se basa en el principio filosófico de que la mejor hipótesis para explicar un proceso es aquella que requiere el menor número de supuestos, así el menor número de sustituciones que explique el proceso evolutivo de la topología es el computado (Nei y Kumar, 2000).

2.3 Los bosques presentes: resultado de un proceso histórico

*Hill. Yes, that was it. But it is a hasty word for a thing that has
stood here ever since this part of the world was shaped*

---The Two Towers III 4, Treebeard

Las condiciones ambientales de la Tierra han cambiado mucho a lo largo del tiempo debido a fenómenos climatológicos globales y a los movimientos orogénicos que transforman la superficie terrestre. La distribución de los organismos está íntimamente ligada con las condiciones ambientales, por lo que si éstas se modifican las especies pueden extinguirse, adaptarse o migrar.

El clima del Cuaternario, que es el período geológico que empezó hace 2.4-2.7 millones de años y que continúa a la fecha, se ha caracterizado por tener ciclos de glaciaciones separadas entre sí por apenas decenas de miles de años (Gibbard et al., 2007). Durante los períodos glaciales los casquetes polares cubrieron gran parte de Norteamérica, Europa y los mares del Sur, y en latitudes más bajas crecieron los glaciares de montaña y disminuyó la temperatura en general (Porter, 2000; Metcalfe, 2006). Además de las menores temperaturas, las glaciaciones generaron condiciones de humedad distintas a las actuales, ya que los patrones de circulación atmosférica y oceánica se modificaron y ocasionaron estaciones y distribución espacial de lluvias distintas (Peterson et al., 2000; Herbert et al., 2001; Metcalfe, 2006).

La consecuencia biológica de estas eras glaciales es una serie de cambios drásticos en la distribución de los organismos, mismos que se expresaron de manera diferente en zonas boreales, templadas y tropicales (Hewitt, 2000). En general, con el avance de las masas de hielo la vegetación migró y se comprimió en el Ecuador, posteriormente, en el período interglacial, las especies afines a climas templados y fríos recolonizaron los extremos norte y sur, y las de climas tropicales ocuparon su lugar, y así progresivamente en cada ciclo (Hewitt, 2000; Hewitt, 2001). La repetición sucesiva de esta clase de eventos ocasionó una serie de fragmentaciones, aislamientos, recolonizaciones, hibridaciones y expansiones demográficas que no sólo dejaron una huella genética dentro de las poblaciones, sino que favorecieron la diferenciación y la especiación de muchos linajes de plantas y animales (Hewitt, 2001).

Los llamados refugios del pleistoceno son las áreas al sur de Europa y de Norteamérica donde las especies de climas templados sobrevivieron los períodos glaciales para, en los períodos más cálidos,

recolonizar las áreas antes cubiertas con hielo (Hewitt, 2001; Petit et al., 2003). Sin embargo, los bosques templados que existen más cerca de los trópicos, como en México, pudieron seguir un patrón completamente distinto. Durante las glaciaciones las condiciones en la Sierra Madre Occidental, el Noroeste de México y el actual desierto de Sonora fueron más templadas y húmedas (McAuliffe y Van Devender, 1998; Herbert et al., 2001); más frías y secas en la Faja Volcánica Transmexicana (Caballero y Guerrero, 1998; Metcalfe et al., 2000); y más frías pero húmedas en la Sierra Madre Oriental (Rogers y Wang, 2002). Esto propició que durante los máximos glaciales los bosques de coníferas se extendieran por el país a altitudes de incluso 500 msnm, cuando hoy se les encuentra por encima de los 1000 msnm (McAuliffe y Van Devender, 1998; Lozano-García et al., 2002; Ortega-Rosas et al., 2008). Diversos estudios que han encontrado polen de *Juniperus*, *Pinus*, *Pseudotsuga* y *Abies* en madrigueras de ratón a lo largo de distintos puntos del país sostienen dicha aseveración (Metcalfe et al., 2000; Herbert et al., 2001; Metcalfe et al. 2002; Lozano-García et al., 2002; Lozano-García et al., 2005; Ortega-Rosas et al., 2008b). De este modo, las poblaciones de especies de climas templados en sitios como México podrían descender de las montañas durante los períodos fríos y refugiarse en éstas durante los cálidos (Hewitt, 2001), el resultado de esto sería la oscilación entre una distribución extensa similar a la que ocurrió en el último máximo glacial (Figura 3a) y una más restringida, como la actual (Figura 3b), esto repetido varias veces conforme a los ciclos glaciales.

Otro elemento histórico que ha contribuido al cambio en la distribución de los tipos de vegetación es la actividad orogénica pues la presencia de montañas y sierras genera climas distintos y crea barreras biogeográficas. En cuanto a los sitios que atañen al presente estudio, sabemos que el origen de la Sierra Madre Occidental (SMO) ocurrió como consecuencia de actividad tectónica y procesos volcánicos en el Cretácico superior (hace más de 99-65 Ma) que continuaron durante el Paleogeno (hace 65-23 Ma), momento en que se dieron los primeros levantamientos de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) (Waitz 1943; Maldonado-Koerdell 1964; West 1964; Graham, 1998; Ferrusquía-Villafranca, 1998; Gesundheit y Macías-García, 2005). Posteriormente, durante el Neogeno (hace 23-2.4 o 2.7 Ma) concluyó la formación de la SMO, --aunque los eventos de magmatismo siguieron hasta el Plioceno y Pleistoceno (Ferrari et al., 2007)-- y se intensificó la de la FVTM, donde el vulcanismo continuó durante el Pleistoceno (que inició hace 2.4-2.7 Ma y concluyó hace 10 ma) y formó los volcanes más grandes del área (Waitz 1943; Maldonado-Koerdell 1964; West 1964; Graham, 1998; Ferrusquía-Villafranca, 1998; Gesundheit y

Macías-García, 2005). Dichos movimientos del relieve forzosamente se traducen en cambios en la distribución y dirección de los escurrimientos que forman los cuerpos de agua. Aunque la historia hidrográfica de México no se conoce con exactitud, se han estudiado algunos eventos generales que la moldearon. En el centro del país, según un estudio realizado por de Cserna y Álvarez (1995), durante el Mioceno temprano-medio (hace 23-15 Ma) el centro-oeste de México era drenado por los sistemas Tepalcatepec-Balsas-Mexcala, Verde-Naranjo y Armería (Figura 4a). Posteriormente hacia el Mioceno tardío-Plioceno temprano (hace al rededor de 7-5 Ma) la actividad volcánica bloqueó el cauce del Verde-Naranjo y causó la desviación del río Verde y el nacimiento del río Grande de Santiago, así mismo se bloquearon muchas corrientes que fluían hacia el sur, dando origen al Lerma (Figura 4b). Dicha cuenca ancestral del Lerma durante el Pleistoceno contuvo un cinturón lacustre con una serie de lagos (Figura 4c) que formaron cuerpos continuos y fragmentados en distintos períodos y cuya mayor extensión fue durante la última etapa pluvial del Pleistoceno (West, 1964); posteriormente el paleolago Jalisco fue alcanzado por los ríos Ameca, Armería y por un tributario del Verde que finalmente lo capturaron y drenaron hasta formar el sistema Lerma-Santiago que conocemos hoy en día (Figura 4d). En el noroeste existieron, también durante el Pleistoceno, lagos que fueron drenados hacia el océano o hacia el este por corrientes que posteriormente desaparecieron con la desecación de la zona (West, 1964), de hecho es posible que muchas corrientes del noroeste mexicano que fluían hacia el Río Bravo hayan sido capturadas por corrientes de la SMO, evidencia de lo anterior son las afinidades ictiológicas entre dicho río y algunas corrientes modernas de la sierra, como el Yaqui y la parte alta del San Pedro.

El resultado del vaivén de los glaciales y de la complejidad orográfica e hidrológica de México son nuestros bosques actuales: montes con varias especies de coníferas en vez de una única dominante, niveles elevados de endemismo, una amalgama de linajes genéticos que se han fragmentado y expandido varias veces en los últimos millones de años, e historias filogeográficas intrincadas. Los dos primeros aspectos se reflejan en que nuestro territorio es, considerando tanto número de especies como cantidad de endemismos, uno de los centros de diversidad más importantes no sólo de *Juniperus*, sino también de *Pinus* y *Quercus*. En cuanto a estudios de genética de poblaciones y filogeografía que sostengan los otros puntos, hasta ahora se han analizado diferentes especies de *Pinus*, *Abies*, *Picea* y una de *Taxodium* (Cuenca et al. 2003; Delgado et al. 2007; Delgado et al. 2008; Jaramillo-Correa et al. 2008; Ortiz-Medrano et al. 2008; Moreno-Letelier y Piñero 2009; Hernández-Leal 2009, entre otros).

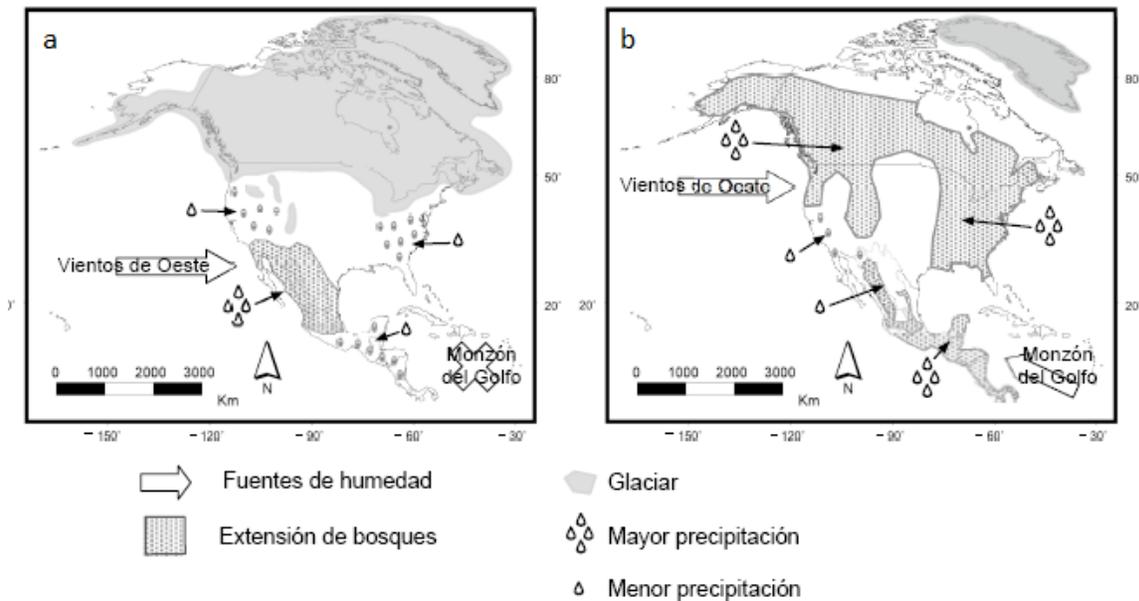


Figura 3. Condiciones ambientales y distribución de los bosques de coníferas en América del Norte durante a) el último máximo glacial y b) en la actualidad (tomado de Moreno-Letelier, 2009).

En general se han encontrado niveles medios de diversidad genética con microsátélites de cloroplasto ($He = 0.296$ promedio para pinos) y relativamente bajos con isoenzimas ($He = 0.251, 0.0975$ y 0.110 promedio para *Pinus*, *Abies* y *Picea*, respectivamente). Por otro lado, sobresalen los altos niveles de diferenciación entre las poblaciones pues la mayoría son superiores a $R_{ST}/F_{ST} = 0.15$ y sugieren que existe una marcada estructura genética (Piñero et al., 2008)

Los estudios filogeográficos que se han realizado sugieren escenarios complejos y particulares para cada especie. En *Pinus montezumae* se detectó crecimiento poblacional y una antigua expansión contigua del rango de distribución que sugiere una propagación este-oeste desde Hidalgo hacia Puebla, Tlaxcala y Morelos. En *P. pseudostrobus* se encontró flujo genético restringido, mismo que ocurrió ancestralmente en el oeste y centro de la FVTM (Delgado et al., 2007). En *P. nelsonii* se encontraron tamaños poblacionales estables a pesar de que ocurrió una colonización a gran distancia en el centro de su distribución (Cuenca et al., 2003). En *P. ayacahuite* se identificaron dos crecimientos poblacionales, uno para toda la especie y otro en las poblaciones más sureñas, y se identificó al Istmo de Tehuantepec como un corredor durante los períodos glaciales y como una barrera durante los cálidos (Ortiz-Medrano et al., 2008). En *P. strobiformis* se definieron dos grupos separados por el Desierto de Chihuahua pero con

poca diferenciación dentro de ellos (Moreno-Letelier y Piñero, 2009). En *Abies flinckii*, *A. guatemalensis*, *A. hickelii*, y *A. religiosa* con microsátélites de cloroplasto se encontró una alta diversidad con poca diferenciación pero con una estructura filogeográfica significativa y las poblaciones de la FVTM de las últimas tres especies divergen del anidado principal (Jaramillo-Correa et al., 2008). Un estudio en *Taxodium mucronatum* con secuencias de cloroplasto sugiere que ocurrió una expansión demográfica durante el Pleistoceno en un periodo de clima templado con alto índice de precipitación ya que los cambios climáticos unen o separan las cuencas donde habitan (Hernández-Leal, 2009)

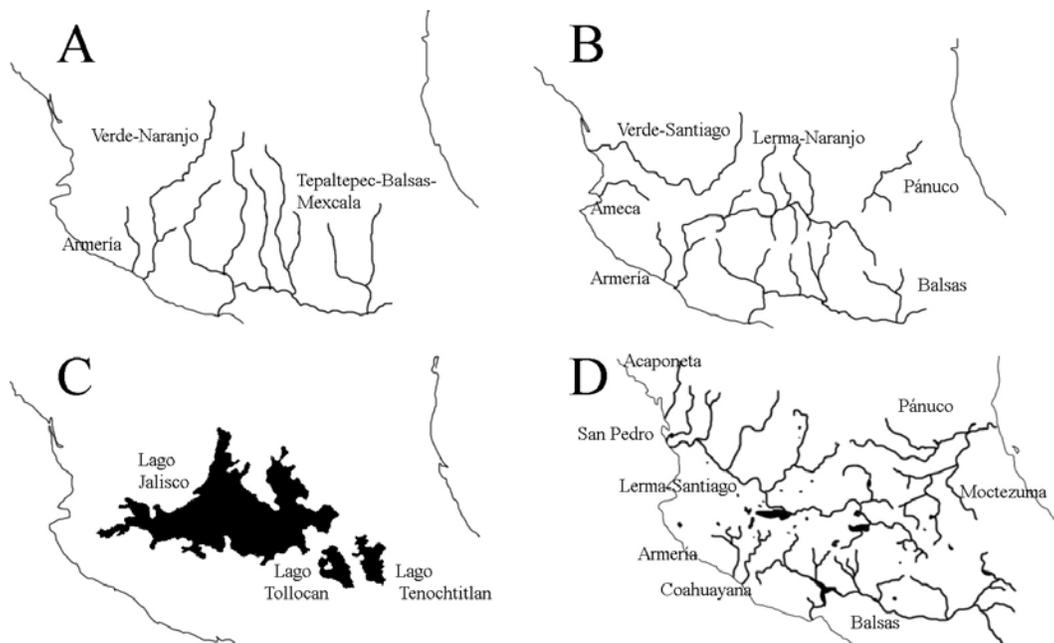


Figura 4. Reconstrucción parcial de la hidrografía del centro de México durante a) Mioceno temprano-medio b) Mioceno tardío-Plioceno c) Pleistoceno y d) actualidad. A partir de de Cserna y Álvarez (1995).

2.4 Historia natural de *Juniperus blancoi*

2.4.1 El género *Juniperus*

El género *Juniperus* es el segundo más diverso dentro de las coníferas (Farjon, 2006). Pertenece a la familia Cupressaceae, es monofilético y su grupo hermano es el género *Cupressus* en sentido estricto (Little, 2006) pues dicho género recientemente se separó en *Cupressus* (Viejo Mundo) y *Callitropsis* (América) (Little, 2006). *Juniperus* está descrito por Adams (2008) como arbustos o árboles siempre

verdes, dioicos o rara vez monoicos; últimas ramificaciones extendidas, alternas, en ocasiones dísticas, ascendentes o colgantes; ramillas rollizas, tetragonales, subtetragonales o hexagonales; hojas opuestas o ternadas, variables en forma y tamaño, generalmente escumiformes e imbricadas, margen entero o denticulado, dotadas dorsalmente de una glándula de resina aromática; conos polínicos terminales sobre las últimas ramillas, con 3-7 pares o tríos de esporófilos, cada uno con 2-8 sacos de polen; cono ovulado en la madurez irregularmente ovoide o globoso, indehiscente, fibroso o carnoso (abayado), resinoso, de 3-20 mm de diámetro, formado por la fusión de escamas; semillas 1 a 3 por escama; $2n = 22$ pero existen tetraploides $4n = 44$.

Existen tres secciones para el género (Adams, 2008): *Caryocedrus*, *Oxycedrus* y *Sabina*. En América *Caryocedrus* no tiene representantes; *J. communis* es de *Oxycedrus* y el resto de las especies americanas pertenece a la sección *Sabina*.

Los juníperos de ésta última sección se caracterizan por tener hojas adultas opuestas o alternadas tipo escama; escamas peltadas en los conos polínicos y conos ovulados en pedúnculos. La sección se divide en dos subsecciones: los juníperos con margen aserrado y los juníperos con margen liso, presuntamente monofiléticos (Adams, 2008).

Según la última revisión del género (Adams, 2008), los *Juniperus* comprenden 67 especies y 28 variedades. Se encuentran, con excepción de *J. procera*, ampliamente distribuidos en regiones templadas del Hemisferio Norte; en América habitan desde Canadá hasta Guatemala. México tiene 18 especies y 7 variedades, con un total de 15 endemismos, lo que lo convierte en el país con mayor diversidad de *Juniperus* del mundo. Le siguen China igualmente con 18 especies, 7 variedades y 11 endemismos; y EEUU con 13 especies, 5 variedades y 8 endemismos.

2.4.2 *Juniperus blancoi*

2.4.2.1 Descripción

Linaje: Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Coniferophyta; Coniferopsida; Coniferales; Cupressaceae; *Juniperus*. Pertenece a la sección *Sabina* y a la subsección de hojas con el margen liso.

Juniperus blancoi Martínez, Anales Inst. Biol. UNAM 17 (1):73 (1946). Tipo: México: Durango; arroyo de Peñuelas, El Salto C.E. *Blanco A-500* (Holotipo: MEXU).

Sinonimia: *Juniperus mucronata*

Nombre común: sabino, táscate.

Dioico. Arbusto o árbol de hasta 26 m, el tronco principal ramifica varios metros después de la base o desde el principio, copa irregular o cónica. Corteza delgada (5 mm), café, longitudinalmente estriada. Las ramillas terminales esparcidas y dísticas, rollizas o subtetrágonas. Las hojas en su mayoría son opuestas, ovaladas o subelípticas, agudas a obtusas, con el margen entero. Conos ovulados bilobulados reniformes, cuando maduros son de azul oscuro a púrpura y algo glaucos y cuando inmaduros son grises o verde claro, tienen una cubierta ligeramente rugosa. Semillas (1-)2, raramente 3-5, de color café o café amarillento, angulosas y subpiramidales, ovoides o con una cara plana y otra convexa, ápice obtuso, con canales de resina dispuestos longitudinalmente en la base, de 3.5-4 mm de largo y 2-3 mm de diámetro (adaptado de Adams 2008).

Se reconocen formalmente dos variedades: *J. blancoi* var. *blancoi* y *J. blancoi* var. *huehuentensis* (Adams et al., 2006). Y aunque *J. mucronata* fue descrito originalmente como una especie diferente (Adams, 2000) ahora se considera a nivel de variedad: *J. blancoi* var. *mucronata* (R. P. Adams) Farjon (Adams, com. pers.). Para distinguir entre dichas variedades se propone la siguiente clave:

1. Hojas acuminadas, mucronadas:.....*Juniperus blancoi* var. *mucronata*

1. Hojas obtusas a acuminadas pero no mucronadas:

2. Árbol o árbol arbustivo; conos femeninos no en la cara inferior de las ramas aplanadas; follaje no denso..... *Juniperus blancoi* var. *blancoi*

2. Arbusto postrado formando parches, de uno a varios metros de diámetro, conos femeninos en la cara inferior de las ramas, follaje denso..... *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis*

Aunque la altura no es un carácter diagnóstico, llama la atención la alta variación que se tiene reportada para *J. blancoi* en este sentido. Fue descrito por primera vez por Martínez (1946) en su obra *Los Juniperus Mexicanos* como un arbusto de 2-4 m, pero se le ha encontrado como árbol pequeño de 6-8 m de altura (Pérez y Carrillo, 2003), de 10 m (Zamudio y Carranza, 1994), o hasta de 15 m (Adams y

Zanoni, 1979) y en una de las poblaciones del presente estudio (La Preciosita, Puebla) se encuentran árboles de más de 25 m de altura.

En la Figura 5 se muestran algunas fotografías que ilustran las características morfológicas, el hábitat y la forma de crecimiento de la especie.

Esta especie tiene un ciclo de vida que inicia con la germinación entre los meses de junio y julio y probablemente tiene un crecimiento marcado durante la época de lluvias entre junio y octubre. Muchos individuos muestran huellas de haber crecido en condiciones muy adversas como en el propio cauce de los ríos o riachuelos lo que hace difícil estimar su longevidad y por lo mismo la edad a la primera reproducción y el tiempo generacional. La liberación masiva del polen ocurre normalmente entre enero y abril aunque pueden encontrarse conos de ambos sexos durante todo el año. Considerando la gran cantidad de plántulas y plantas jóvenes de *J. blancoi* cerca y alrededor de madrigueras de tuzas (Alicia Mastretta, observación personal), la dispersión de las semillas de esta especie se puede llevar a cabo, al menos en parte, por especies probablemente de los géneros *Cratogeomys* y *Pappogeomys* cuya distribución está localizada especialmente en la FVTM y del género *Thomomys* en el norte de la SMO. En estos tres géneros de mamíferos, el alto nivel de diferenciación genética ha impedido tener una taxonomía aceptada (Demastes et al., 2002; Hafner et al., 2004; Hafner et al., 2005; Hafner et al., 2008; Hafner et al., 2009).

2.4.2.2 Distribución y hábitat

Juniperus blancoi es una especie ribereña de bosques de coníferas y encinos. En las colectas del presente estudio se le encontró siempre en las márgenes o dentro de arroyos (La Preciosita, San José del Rincón, Presa Brockman, El Salto) o ríos (Río Patitos, Yécora) estacionales, creciendo incluso dentro del cuerpo de agua mismo. Las excepciones son la población del Cerro Huehuento y del Cerro Mohinora (*J. blancoi* var. *huehuentensis*) que habitan a 3150-3250 msnm en formaciones rocosas de la cima de cerros.

Su distribución es amplia y restringida a la vez. Se le encuentra desde Sonora, en la Sierra Madre Occidental, hasta Puebla y Tlaxcala en la Faja Volcánica Transmexicana (Figura 6). Sin embargo esto ocurre en sólo ocho poblaciones de pocos individuos, por lo que no es sorprendente que (Zamudio y Carranza (1994) hayan sugerido que las poblaciones de Michoacán y Estado de México fueran árboles escapados de cultivo y no ejemplares silvestres.

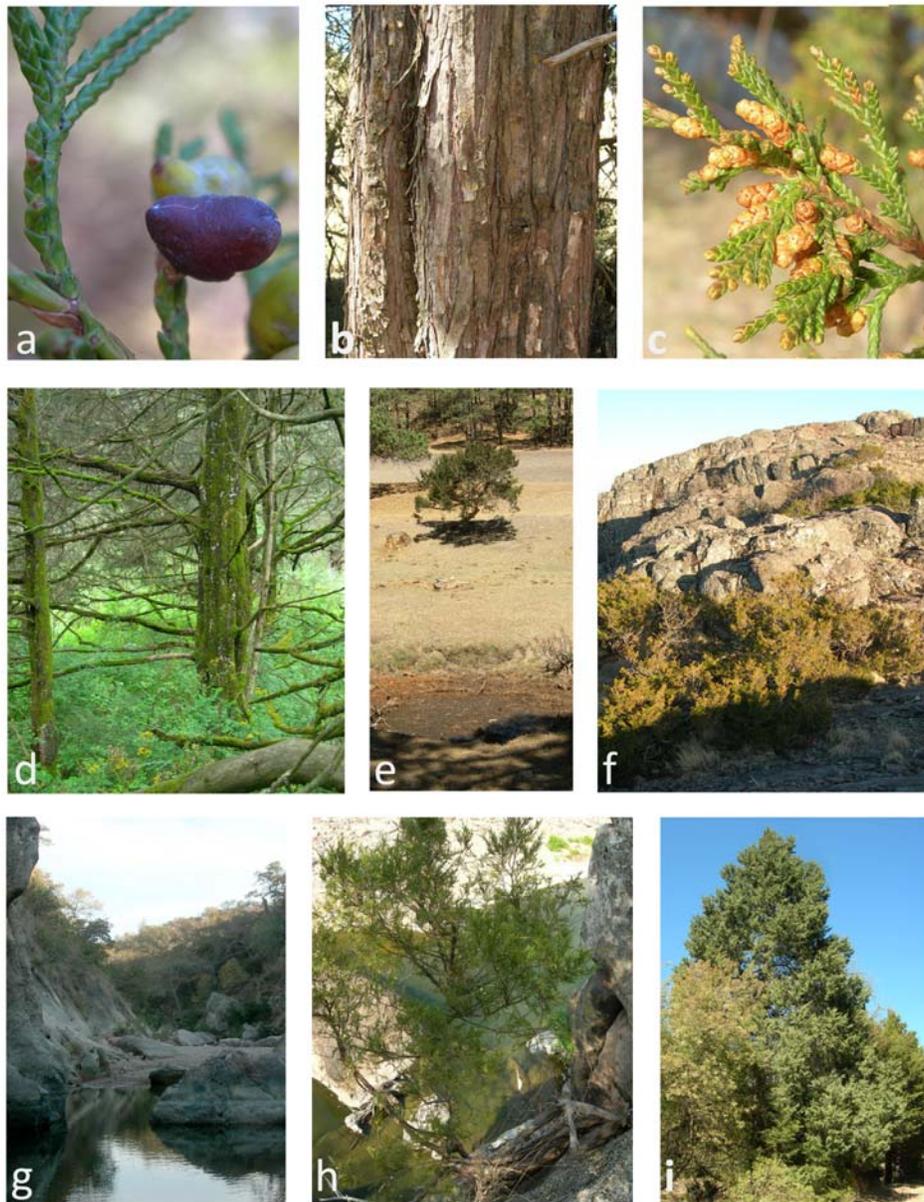


Figura 5. Características morfológicas (a-c), forma de crecimiento y hábitat (d-i) de *J. blancoi*. a) hojas y cono ovulado maduro, b) corteza longitudinalmente estriada, c) conos polínicos y ramillas, d) arroyo en cañada muy húmeda en La Preciosita, Pue. con árboles mayores a los 20 m, e) crecimiento arbóreo de 2-6 m de longitud en un potrero en El Salto, Dgo. f) cima del Cerro Huehuento, Dgo. con arbustos rastreros y procumbentes (*J. blancoi* var. *huehuentensis*), g) márgenes rocosas del Río Patitos, Zac. con árboles (2-7 m) creciendo en dirección a la corriente de agua, h) márgenes rocosos de río estacional, Yécora, Son. con árboles y arbustos de 1-7 m (*J. blancoi* var. *mucronata*), i) árboles de 10-20 m en las márgenes de un arroyo en la P. Brockman, Mich.

La especie habita en un rango altitudinal grande: de 1350 a 3250 msnm, aunque dichos extremos corresponden respectivamente a las variedades *J. blancoi* var. *mucronata* y *J. blancoi* var. *huehuentensis*, mientras que el resto de las poblaciones se mantienen alrededor de 2700 msnm. Otras condiciones ambientales se muestran en la Tabla 1.

2.4.2.3 Antecedentes de estudios genéticos

Los estudios genéticos que se han realizado en *J. blancoi* hasta ahora se han centrado en cuestiones sistemáticas como la descripción de sus variedades y su relación filogenética con los otros juníperos.

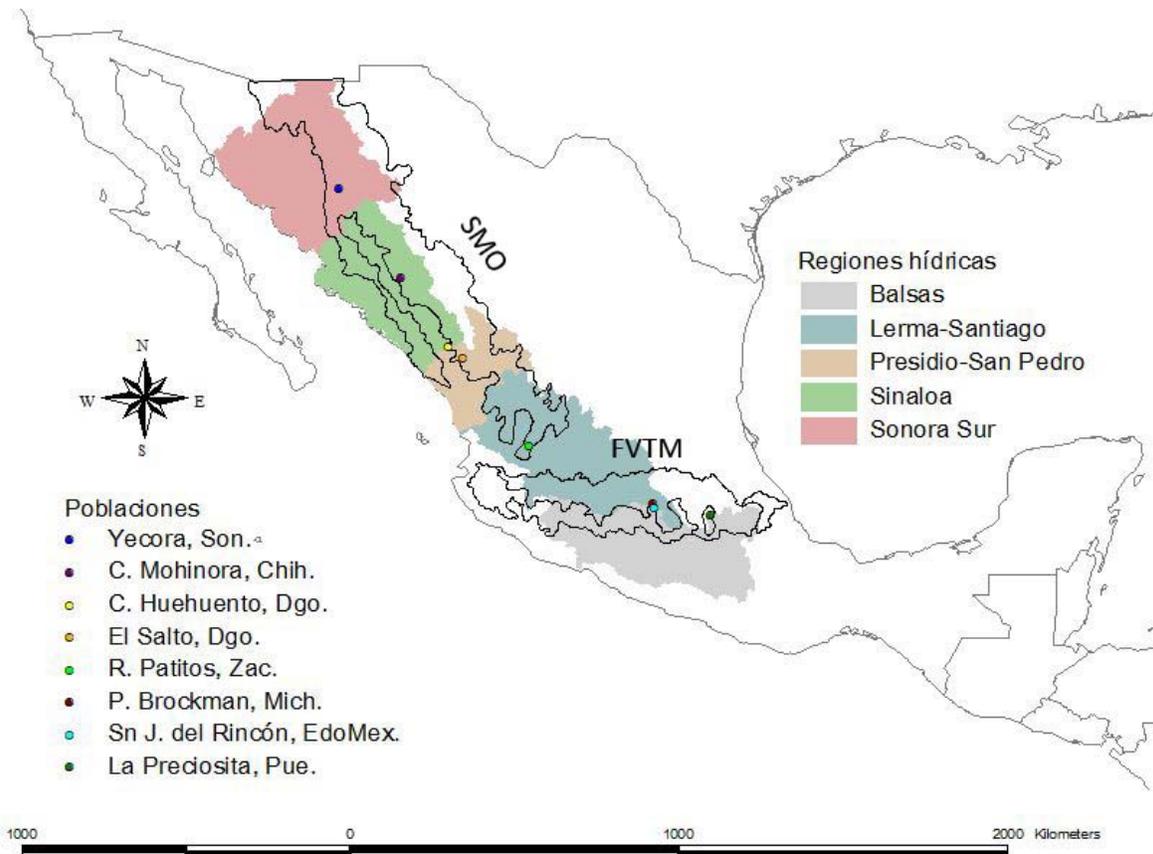


Figura 6. Localización de las poblaciones de *J. blancoi* conocidas. Se muestra la región hídrica que habitan y la provincia biótica con caracteres morfotectónicos, SMO: Sierra Madre Occidental, FVTM: Faja Volcánica Transmexicana.

Juniperus blancoi var. *huehuentensis* fue descrito con base en un análisis morfológico, de terpenoides de las hojas y de RAPDs por (Adams et al., 2006). La red de tendido mínimo con 93 RAPDs agrupó primero a *J. blancoi* var. *huehuentensis* con *J. blancoi* var. *blancoi* (El Salto y San José del Rincón) y después con *J. blancoi* var. *mucronata* y por último con *J. scopulorum*.

Juniperus blancoi se encuentra dentro de la subsección de juníferos con el margen de hoja liso del hemisferio Oeste. Este grupo parece ser monofilético e incluye a las especies continentales *J. blancoi*, *J. scopulorum*, *J. virginiana* y *J. horizontalis* y a las especies del Caribe *J. barbadensis*, *J. bermudiana*, *J. gracilior* y *J. saxicola*. El árbol Bayesiano de dichas especies y sus variedades realizado con la combianción de secuencias de ADNn y ADNcp (*trnC-trnD*) muestra a *J. blancoi* var. *huehuentensis* y a *J. blancoi* var. *mucronata* en una rama junto con *J. horizontalis* y *J. scopulorum* separados de *J. blancoi* var. *blancoi*, es decir una relación polifilética (Adams, 2008). Dicha topología difiere de la encontrada por una red de tendido mínimo realizada con 132 RAPDs y terpenoides (Adams, 2000) en la que *J. blancoi* var. *blancoi* y *J. blancoi* var. *mucronata* son monofiléticos y más cercanos a *J. scopulorum* que a *J. virginiana* (Figura 7; Adams, 2008).

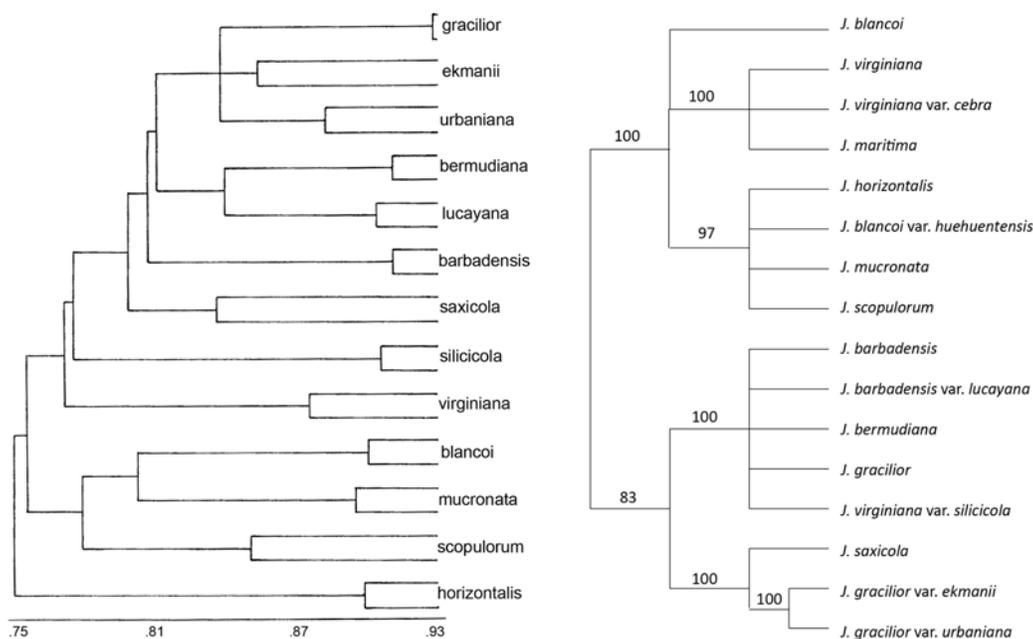


Figura 7. Relaciones entre los juníferos de hoja entera de América del Norte. Derecha: red de tendido mínimo utilizando 132 RAPDs (Adams 2000). Izquierda: Árbol bayesiano utilizando secuencias de ADNn y ADNcp (*trnC-trnD*), los números sobre las ramas son las probabilidades expresadas en porcentaje (Adams, 2008; Schwarzbach et al. in prep.).

Tabla 1. Ubicación y principales condiciones ambientales de las poblaciones de *J. blancoi*.

Clave	Población	Estado	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Suelo ¹	Precipitación total anual ²	Temperatura media anual ^{3,4}	Clima ⁵
Yec	Yécora	Sonora	-108.763056, 28.374722	1350	Lc	800 - 1000	12° a 18°C	C(w1)x'
Moh	Cerro Mohinora	Chihuahua	-107.050288, 25.96011	3200	I	1000-1200	5° a 7°C	Cb'(w2)
Hue	Cerro Huehuento	Durango	-105.7395, 24.075028	3150	Be	1200-1500	5° a 7°C	Cb'(w2)
Sl	El Salto	Durango	-105.378333, 23.756317	2500	Bv	1000 A 1200	5° a 12°C	Cb'(w2)
Zh	Río Patitos Huitzila	Zacatecas	-103.567389, 21.351944	1700	Be	600 - 800	18° a 22°C	(A)C(wo)
PB	Presa Brockman	Michoacán	-100.149361, 19.762528	2800	To	1000 - 1200	12° a 18°C	Cb'(w2)
Sn	San José del Rincón	Edo. de México	-100.124083, 19.652639	2800	To	800 - 1000	12° a 18°C	C(w2)
Pre	La Preciosita	Puebla	-98.574342, 19.445106	2700	Th	600 - 800	12° a 18°C	C(w2)

Lc: luvisol crómico, I: litosol, Be: cambisol eútrico, Bv: cambisol vertico, To: andosol ótrico, Th: andosol húmico. Para notación del clima ver texto.

¹ INIFAP (1995); ² García (1998b); ³ Vidal-Zepeda (1990); ⁴ En los picos de los cerros Huehuento y Mohinora la temperatura debe ser ajustada debido a la diferencia de altitud con la estación metereológica más cercana, se hizo una estimación Gómez et al. (2008); ⁵ García (1998).

Tabla 2. Zona geográfica y cuencas hidrológicas de las poblaciones de *J. blancoi*.

Población	Cuenca	Región hidrológica	Provincia fitogeográfica
Yec	Río Yaqui	Sonora Sur	SMO
Moh	Río Sinaloa	Sinaloa	SMO
Hue	Río Piaxtla-Elota-Quelite	Sinaloa	SMO
Sl	Río Presidio	Presidio-San Pedro	SMO
Zh	Río Santiago Guadalajara	Lerma-Santiago	SMO
PB	Río Lerma-Toluca	Lerma-Santiago	FVTM
Sn	Río Lerma-Toluca	Lerma-Santiago	FVTM
Pre	Río Atoyac	Balsas	FVTM

SMO: Sierra Madre Occidental, FVTM: Faja Volcánica Transmexicana. Acorde a Comisipon Nacional del Agua (1998)

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

El objetivo general del presente estudio es determinar mediante marcadores moleculares parámetros de genética de poblaciones para hacer un análisis filogeográfico que permita entender los procesos históricos por los que han pasado las poblaciones de *J. blancoi*. Se espera que lo anterior pueda contribuir al entendimiento de la evolución de los bosques de coníferas de México, pero desde el punto de vista de las especies ribereñas y altamente fragmentadas, y que brinde información útil para la conservación de la especie y su hábitat asociado.

3.2 Objetivos específicos

Para cumplir con lo anterior son necesarios una serie de objetivos intermedios:

- Describir la distribución actual de la especie y su tipo de rareza
- Realizar un mapa de distribución potencial de la especie
- Encontrar un marcador molecular (secuencia de ADNcp) polimórfico para la especie y estandarizar su amplificación
- Obtener mediante técnicas de genética de poblaciones índices como diversidad, estructuración y diferenciación genética, entre otros, y determinar parámetros de demografía histórica como tamaño histórico poblacional, crecimiento poblacional, entre otros.
- Determinar si existe una estructuración geográfica de la variación genética y cómo ésta puede responder a los procesos históricos por los que ha pasado la especie.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de *J. blancoi* y muestras de *J. scopulorum* y *J. virginiana*
- Describir las condiciones ambientales y sociales en las que se encuentra cada población

3.3 Hipótesis

Juniperus blancoi es una especie altamente fragmentada, con pocas poblaciones y tres de ellas diferenciadas al nivel de variedad. La hipótesis es que dicha distribución es natural y que se debe a los procesos históricos por los que atraviesan los bosques de coníferas en México, cuyo efecto podría ser más drástico en especies raras. Si esto fuera así se esperaría encontrar una alta diferenciación entre sus poblaciones y evidencia filogeográfica de expansión de la distribución seguida de fragmentación.

4 Área geográfica de estudio

Las ocho poblaciones conocidas de *J. blancoi* se encuentran en el Noroeste y Centro del país en Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Michoacán, Estado de México y Puebla-Tlaxcala (Tabla 1). Pueden dividirse en dos grupos según la provincia geográfica en que habitan: los de la Sierra Madre Occidental (SMO) y los de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM), sin embargo, dado que se trata de una especie ribereña, es necesario incluir otro elemento en la regionalización: la cuenca en la que habitan (Figura 6).

El agua de los ríos y los arroyos escurre hacia un área determinada según la conformación del relieve y termina en el mar o en un lago. A dicha área se le llama cuenca hidrológica y a la agrupación de éstas región hidrológica. En este sentido, cuatro de las ocho poblaciones se encuentran en cuencas distintas y sólo un grupo de tres y otro de dos comparten la misma región hidrológica (Tabla 2).

Por otro lado, aunque todas las localidades se encuentran en bosques de coníferas y encinos, el rango de latitud y altitud es tal que presentan condiciones ambientales distintas (Tabla 1) que se traducen en variantes sobre todo de los climas templados y semifríos (García, 1998):

- $C(w1)x'$: Templado subhúmedo. Temperatura media anual entre 12°C y 18°C. Temperatura del mes más frío entre -3°C y 18°C y del más caliente menor a 22°C. Precipitación en el mes más seco menor de 40 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2% del total anual.
- $Cb'(w2)$: Semifrío subhúmedo. Temperatura media anual entre 5°C y 12°C. Temperatura del mes más frío entre -3°C y 18°C y del más caliente menor a 22°C. Precipitación en el mes más seco menor de 40 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal del 5 al 10.2% del total anual.
- $(A)C(wo)$: Semicálido subhúmedo del grupo C. Temperatura del mes más frío menor de 18°C y del más caliente mayor de 22°C. Precipitación del mes más seco menor de 40 mm; lluvias de verano con índice P/T menor de 43.2 y porcentaje de lluvia invernal del 5% al 10.2% del total anual.
- $C(w2)$: Templado subhúmedo. Temperatura media anual entre 12°C y 18°C. Temperatura del mes más frío entre -3°C y 18°C y del más caliente menor a 22°C. Precipitación en el mes más seco menor de 40 mm; lluvias de verano con índice P/T mayor de 55 y porcentaje de lluvia invernal del 5 al 10.2% del total anual.

5 Métodos

5.1 Colecta de material biológico

Se muestrearon las ocho poblaciones conocidas de *Juniperus blancoi* y sus variedades. Los detalles de cómo llegar a cada punto se encuentran en el Anexo 2.

En cada localidad se tomaron notas ambientales y del estado de la vegetación, coordenadas geográficas, altitud y una muestra para el herbario (MEXU, AMY No. 001-009). Se colectó en un transecto a ambos lados del arroyo en aproximadamente 1km y se colectaron en bolsas de plástico muestras de tejido (ramillas terminales con hojas jóvenes y conos), de entre 20 y 22 individuos, mismas que se mantuvieron en hielo hasta su llegada al laboratorio donde se le almacenaron a -70°C para su uso posterior.

Para realizar los análisis filogenéticos se consiguieron tres muestras de tejido de *J. virginiana* de Marion, Arkansas, EEUU y tres de *J. scopulorum* de Santa Fe, New Mexico, EEUU colectadas por Robert P. Adams para el Herbario de la Universidad de Baylor (No. 10220-10222 y No. 10933-10935 respectivamente), así como una de *Callitropsis forbesii* de El Dieciseis, Baja California, México colectada por Patricia Rosas y David Gernandt del Instituto de Biología de la UNAM.

5.2 Identificación del tipo de rareza

El tipo de rareza de *J. blancoi* se identificó a partir de la tipología propuesta por Rabinowitz (1981) según la interacción de tres características: distribución geográfica; especificidad del hábitat y tamaño de cada población. Además de conocer la distribución total de la especie y la separación entre sus poblaciones se realizaron observaciones de campo para determinar la abundancia de individuos y la presencia de otras especies arbóreas en el hábitat.

5.3 Generación de la distribución potencial

La distribución potencial de *J. blancoi* se generó con el programa *Maxent* ver. 3.2.19 (Phillips et al., 2006) con las coordenadas de las ocho poblaciones y 19 capas ambientales de World Clim (Hijmans et al., 2005), las cuales se basan en datos de temperatura y precipitación en diferentes temporadas del año. La

distribución obtenida se restringió a las áreas que presentaran una probabilidad mayor o igual al 0.55 de presentar las condiciones adecuadas para que habite la especie.

El objetivo de realizar este análisis es determinar si existen áreas que supuestamente presenten las condiciones ambientales adecuadas para que la especie pudiera existir, pues la discontinuidad de condiciones podría ser el elemento que determinara lo reducido y fragmentado de sus poblaciones

5.4 Registro de características dasométricas

De cada individuo colectado se obtuvo el diámetro normal, la altura y el sexo. Estos datos fueron agrupados por población y se realizó una ANOVA para cada variable. Las poblaciones de *J. blancoi* var. *huehuentensis* (los cerros Huehuento y Mohinora) no se consideraron ya que su forma de crecimiento arbustivo y muy ramificado no permitía realizar las mediciones.

5.5 Extracción de ADN, PCR y secuenciación

La extracción de ADN de cada individuo se realizó a partir del tejido colectado (hojas) con un método "MINI-PREP" (Anexo 3) modificado de Vázquez-Lobo (1996), los productos de la extracción se almacenaron a -20°C para su uso posterior. La calidad del ADN extraído se confirmó mediante electroforesis de 2 µl de cada muestra en un gel de TBE-agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.1%. Se utilizó un buffer de TBE al 0.5% y los geles se corrieron durante 20-25 minutos con un voltaje de 110 W y una intensidad de 150 A.

Se exploraron tres regiones del ADNcp: *trnC-trnD*, *trnS-trnG2S* y *trnT-trnL-trnF*. Las condiciones de amplificación se estandarizaron a partir de otros protocolos utilizados para especies del género *Pinus* en el Laboratorio de Genética y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM y de protocolos reportados por Shaw et al., (2005).

- *trnC-trnD*: se amplificó la región completa (Figura 8). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 35 µl con las siguientes concentraciones de reactivos: 5X Buffer de PCR (Invitrogen), MgCl₂ al 25 mM (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), 0.2 µM de los cebadores *trnC*[tRNA-Cys^(GCA)] y *trnD*[tRNA-Asp^(GUC)] (Invitrogen), 2U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) y aproximadamente 1 ng de ADN genómico (4 µl). Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: 1) desnaturalización inicial a 80°C por 5 min; 2) 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 95°C, 4 min de alineación y extensión a

58°C en un mismo tiempo; y 3) extensión final a 66°C por 10 minutos. El producto de PCR se diluyó al 50%. Para *C. forbesii* se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos con las siguientes condiciones de PCR: 1) 94°C durante 5 mins 2) 30 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 2 min y 72°C durante 2 mins 3) extensión final a 72°C por 5 min. Se purificó la banda deseada con el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se realizó un segundo PCR con las primeras condiciones de PCR mencionadas por 25 ciclos.

- *trnS-trnG2S*: se utilizaron los primers trnS^{GCU} y trnG2S (Anexo 4) en idénticas condiciones y concentraciones de reactivos que en el primer caso, pero en un volumen de 25 μl y no se diluyó el producto final.
- *trnT-trnL-trnF*: se utilizaron los primers Taberlet tabA y tabD (Anexo 4) en un volumen de 25 μl con las mismas concentraciones del primer inciso y las siguientes condiciones de PCR: 1) desnaturalización inicial a 94°C por 3 mins, 2) 35 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94°C, 50 s de alineación a 50°C y 1 min de extensión a 72°C, y 3) extensión final a 72°C por 5 min.

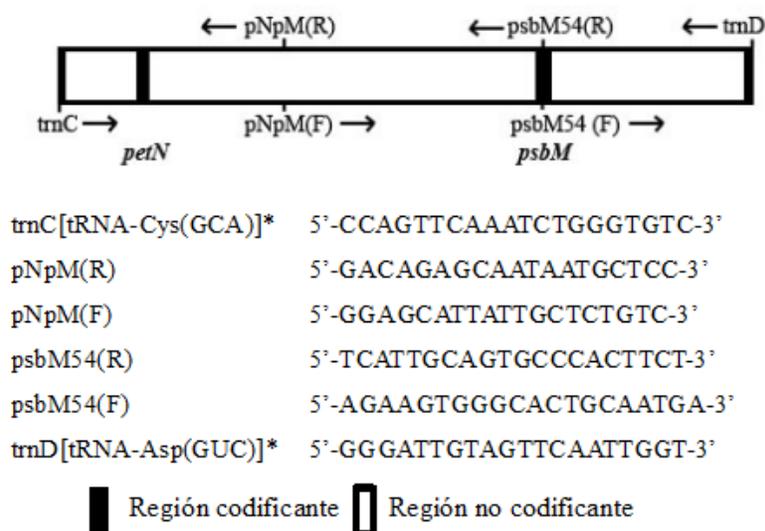


Figura 8. Organización génica de la región *trnC-trnD* de ADNcp y primers utilizados para su secuenciación.

Para detectar polimorfismo significativo se secuenciaron ambas hebras para cada región en 5 individuos por población. En el caso de la región *trnC-trnD* se diseñaron los cebadores internos pNpM y psbM54 a partir de la secuencias de *J. scopulorum* con números de acceso de NCBI EF608988.1,

EF608989.1 y EF608990, y se utilizaron durante la secuenciación (Figura 8). Mientras que la región *trnT-trnL-trnF* fue secuenciada con los cebadores *tabA*, *tabB*, *tabC*, *tabD* y el *trnS-trnG2S* con los mismos utilizados para la amplificación (Anexo 4). La purificación y las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el *High-Throughput Genomics Unit* (HTGU), del *Department of Genome Sciences*, Univ. of Washington, Seattle.

Las secuencias se armaron y alinearon manualmente con el programa BioEdit ver 7.0.9.0 (Hall 1999) siguiendo las recomendaciones de Müller (2006) para las inserciones-delecciones.

5.6 Análisis de la región *trnC-trnD*

5.6.1 Diversidad genética

Las 160 secuencias de *J. blancoi* divididas en sus correspondientes 8 poblaciones se analizaron con el programa DNAsp ver. 5 (Rozas et al., 2003) y Arlequin ver. 2.000 (Schneider et al., 2000) para calcular diferentes indicadores de diversidad genética en cada población y en el total de la especie: diversidad haplotípica (h), número de haplotipos (k), número de sitios polimórficos incluyendo *indels*, sustituciones y otros eventos (S) y diversidad nucleotídica (π) utilizando las ecuaciones 1-4. Los *indel* de más de un par de bases y las inversiones se consideraron un evento único y fueron manejados como *gaps*. Se analizaron como quinto estado para definir los haplotipos y calcular la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica modificada (π_M). Para los valores de θ y π no se tomaron en cuenta. Se utilizaron sólo las regiones no codificantes (*trnC-petN*, *petN-psbM*, *psbM-trnD*) con un total de 1351 pb.

5.6.2 Diferenciación y estructuración genética

La diferenciación genética entre pares de poblaciones (F_{ST}) se calculó con DNAsp ver. 5 (Rozas et al., 2003) acorde a la ecuación 7a. Las poblaciones de *J. blancoi* se dividieron en grupos genéticamente diferentes por medio de SAMOVA ver. 1.0. (Dupanloup et al., 2002) programa que simula diferentes particiones de n poblaciones en K grupos e indica la agrupación con el valor mayor de F_{CT} , lo que implica que las poblaciones dentro de cada grupo son lo más parecidas y que la diferencia entre los grupos es la más grande. La prueba se realizó con 100 condiciones iniciales, se probaron valores de K de 2 a 6 y se

eligió el caso que presentó un valor mayor de F_{CT} . Con dicha agrupación se realizó una prueba de AMOVA utilizando el mismo programa.

5.6.3 Análisis filogenéticos

Se realizó un análisis filogenético entre los ocho haplotipos de *J. blancoi*, y las secuencias encontradas con los tres individuos de *J. scopulorum* y *J. virginiana* para la región concatenada *trnC-trnD*. Se utilizaron los métodos de máxima verosimilitud (MV) y de máxima parsimonia (MP) con los programas RAxML 7.0.4 (Stamatakis et al., 2008) y PAUP ver. 4.0b10 (Swofford, 2003), respectivamente. Como grupo externo se utilizó a *Callitropsis forbesii*.

El análisis de MV se realizó en el servidor web del programa (RaxML BlackBox en <http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/>) con búsqueda por máxima verosimilitud, los parámetros del modelo se calcularon automáticamente (pi-A: 0.333798 pi-C: 0.147021 pi-G: 0.132672 pi-T: 0.386509). Los *indels* y las inversiones no fueron consideradas. Del mejor árbol se obtuvieron los valores de *bootstrap* usando 100 replicas.

Para el análisis de MP se utilizó un criterio de búsqueda *Branch and bound*. Los *indels* de más de un par de bases y una inversión se consideraron como eventos únicos (Müller, 2006) y se codificaron como *gaps*, mismos que se utilizaron como quinto estado en el análisis. Se obtuvieron los valores de *bootstrap* usando 1000 réplicas.

5.6.4 Análisis filogeográfico de clados anidados

Con las secuencias mencionadas se construyó una red de haplotipos utilizando la distancia absoluta entre las secuencias, primero manualmente (sólo *J. blancoi*) y luego (las tres especies) con TCS ver. 1.21 (Clement et al., 2000) un programa que implementa el algoritmo de parsimonia estadística descrito por Templeton et al. (1992). El programa se corrió con un límite de conexiones de 95% y los *gaps* se tomaron como quinto estado.

El anidamiento de los clados se realizó para los haplotipos de *J. blancoi* según los principios de Templeton et al. (1987). Las pruebas de asociación geográfica se hicieron con *Geodis 2.5* (Posada et al., 2000) y se utilizó la clave de inferencias de Templeton (2004) más reciente disponible (15 diciembre del 2008).

5.6.5 Demografía histórica

El análisis de diferencias pareadas (*mismatch*) se realizó tomando en cuenta sólo las sustituciones con Arlequin 2.000 para toda la especie y para el grupo de la FVTM. El poder del estimado se evaluó con la distribución de la suma de diferencias cuadradas (SSD, por sus siglas en inglés) obtenida con un *bootstrap* de 10,000 réplicas.

El tamaño efectivo de la población (N_e) y el tiempo al ancestro común más cercano (t_{mrc} por sus siglas en inglés) de los haplotipos de *J. blancoi*, se calcularon utilizando el programa BEAST v1.4.8 (Drummond y Rambaut, 2007), mismo que utiliza un modelo Bayesiano con el método de muestreo de Cadenas Markov de Monte Carlo (MCMC por sus siglas en inglés) para estimar una distribución posterior de los parámetros mencionados a partir de secuencias de ADN dado un modelo determinado de sustitución nucleotídica y un reloj molecular estricto o relajado (Drummond y Rambaut, 2007). Como modelo de sustitución se eligió el GTR (*General Time Reversible*), sin heterogeneidad por sitio (todos evolucionan a la misma velocidad), bajo una tasa de mutación fija de 0.22×10^{-9} sustituciones por sitio por año (Willyard et al., 2006), bajo un modelo de tamaño de población constante. Se utilizó la región *trnC-trnD* sin las regiones codificantes.

5.6.6 Prueba de Mantel

Para determinar si la dinámica poblacional se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia, es decir, si existe una relación lineal significativa entre la distancia genética y la geográfica, se realizó una prueba de Mantel para diferentes agrupaciones: toda la distribución, poblaciones de la FVTM y poblaciones de la FVTM más Río Patitos (ya que dicho grupo se encuentra en un mismo clado, ver resultados más adelante). La matriz de las distancias geográficas se calculó a partir de las coordenadas de las colectas con el programa Geographic Distance Matrix Generator ver. 1.2.3. (Ersts, 2009) y para la matriz de la distancia genética se tomaron los valores de F_{ST} calculados con DNAsp (Tabla 5). La prueba de Mantel se realizó en Arlequin ver. 3.1. (Excoffier et al., 2007) con 10,000 permutaciones y se utilizó el logaritmo natural de las distancias geográficas (Rousset, 1997).

5.7 Evaluación de las características socioeconómicas y del estado de conservación

El contexto socioeconómico y geográfico son dos elementos que influyen, y con frecuencia definen, los procesos de cambio de uso del suelo y con ello el presente y futuro de la vegetación. Para realizar un acercamiento a las condiciones socioeconómicas y de manejo de los recursos naturales bajo las que cada población del presente estudio se encuentra se determinó para cada localidad: el uso de suelo, la actividad a la que se destina la tierra, el tipo de propiedad (privada o ejidal), la información geopolítica (Estado, Municipio, Localidad y Núcleo agrario cuando aplicable). Además se incluyeron diversos factores socioeconómicos que en un estudio en Áreas Naturales Protegidas (ANP) resultaron ser importantes (Figueroa, 2008) y posibles de adquirir: nivel de marginidad, densidad poblacional del municipio y número de asentamientos humanos cercanos. Para obtener dicha información se utilizaron distintas fuentes: datos brindados por los pobladores locales; consulta del *Cuaderno Municipal* y los *Núcleos Agrarios tabuladores básicos por municipio* (INEGI) según cada población; y localización en un Sistema de Información Geográfica (ArcView 3.2) de cada localidad e intersección con los mapas de Uso de Suelo según CONABIO (1999) y Grado de marginación a nivel localidad en el 2000 (CONABIO, 2006). Cuando fue posible obtener en campo la localidad o municipio a la que pertenecía la población colectada se utilizó dicha información, y cuando no, se le adjudicó a la localidad más cercana según los límites municipales de INEGI.

La condición ambiental de cada población de *J. blancoi* se determinó con base en observaciones de campo. Se consideró como buena si tanto la vegetación ribereña y la vegetación del resto del ecosistema se encontraban poco perturbadas (presencia de especies arbóreas locales y de otros estratos de vegetación, suelos no erosionados y cobertura vegetal esperada); y si además existían varios individuos (la referencia fue 70 en 1 km, que fue la mayor densidad y se encontró en La Preciosita) de *J. blancoi* de diversos grupos de edades, con plántulas y de ambos sexos. Del mismo modo, se definió como mala si cualquiera de las consideraciones anteriores no se cumplía. Por otro lado, con base en la condición ambiental, el uso del suelo, el destino del terreno y los indicadores sociales mencionados anteriormente se definió el estado de conservación según las categorías y criterios de la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN, 2009) de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés).

6 Resultados

6.1 Tipo de rareza en *Juniperus blancoi*

La distribución geográfica de *J. blancoi* es relativamente amplia ya que sus poblaciones se localizan desde Sonora hasta Puebla. Su hábitat es muy específico: a pesar de que se encuentran en condiciones ambientales con diferencias (Tabla 1). Los individuos de *J. blancoi* var. *blancoi* y de *J. blancoi* var. *mucronata* se encontraron sólo en la orilla o dentro del cuerpo de agua mismo, y de *J. blancoi* var. *huehuetensis* en la cima y ladera rocosa de cerros de más de 3000 msnm con poco suelo (Figura 5). En los dos primeros casos ninguna otra conífera ni especie arbórea crece junto al cuerpo de agua, por lo que la especie de estudio es dominante. En las poblaciones de *J. blancoi* var. *huehuentensis* existen escasos individuos de *J. deppena* var. *robusta* y *Pinus* aff. *cooperi* (este último sólo en el Cerro Mohinora). Numéricamente ninguna de las poblaciones de *J. blancoi* es especialmente abundante, ni siquiera en La Preciosita o en los cerros Mohinora y Huehuento (las tres mayores y en mejor estado de conservación) se contaron más de 300 individuos adultos en toda el área (aproximadamente 2.2 ha en La Preciosita y 2.7 ha en el Cerro Mohinora). En un estudio previo en La Preciosita (Nepomuceno-Martínez et al., 2007) el 95% de los árboles mayores a un metro muestreados a 20 metros a cada lado del arroyo fueron *J. blancoi*, y el índice de mezcla de Gadow (que utiliza el método del vecino más cercano, (del Río et al., 2003) fue cercano a cero ($DM = 0.0625$) lo que confirma que se trata prácticamente de una masa pura de la especie mencionada. Aunque no se realizó un estudio similar en cada población, era evidente que *J. blancoi* era más abundante y dominaba respecto a otras especies arbóreas en las márgenes de los arroyos o las formaciones rocosas en la cima de los cerros.

Por todo lo anterior se determinó que *J. blancoi* es una especie rara del tipo: de distribución geográfica amplia pero con pocas poblaciones en un hábitat muy restringido aunque localmente dominante. Se concluyó así mismo que la rareza de la especie es de origen natural, los motivos se discuten más adelante.

6.2 Distribución potencial de *Juniperus blancoi*

Las áreas que según el modelo de Maxent presentan las condiciones adecuadas para que pueda habitar la especie se encuentran básicamente en la SMO y en la FVTM (Figura 9). Sin embargo se detectaron

puntos con condiciones adecuadas más al sur, hasta las montañas de Guatemala, sin embargo parece ser que la especie restringe su distribución a la SMO y FVTM.

En general, la distribución obtenida se encuentra fragmentada pero es mucho mayor que la distribución reportada para la especie, incluso si se sumara la limitante de las corrientes de agua. Cabe mencionar que el punto de la población de Yécora quedó en un área asignada con un valor de probabilidad 0.20, lo cual es bajo.

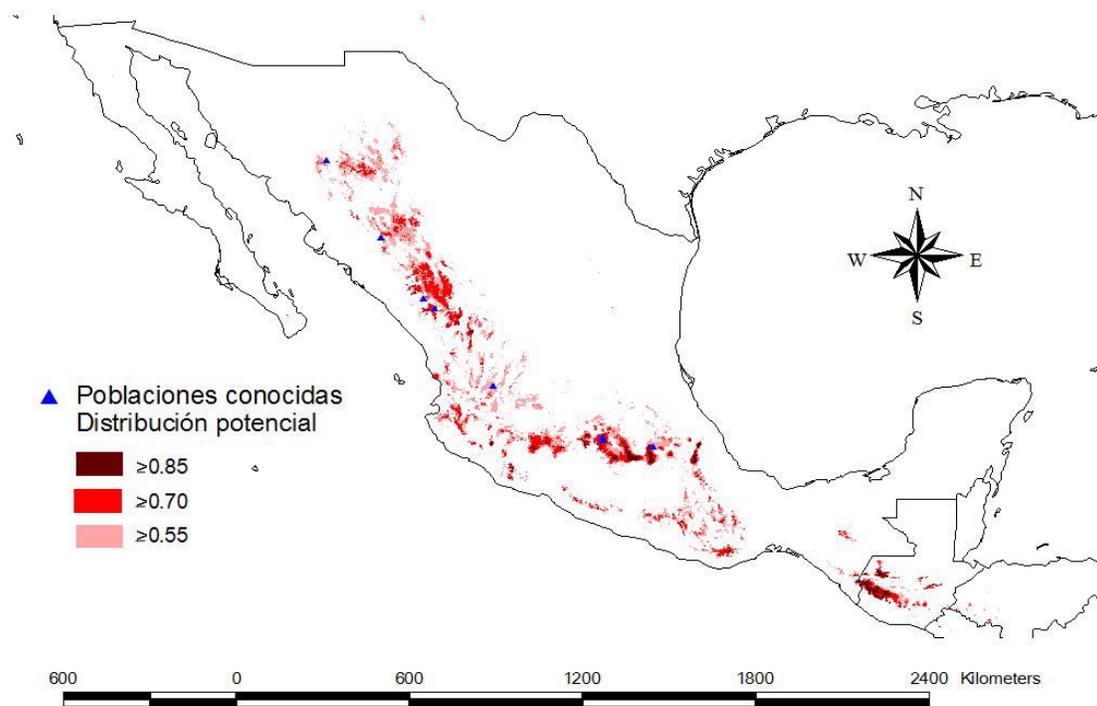


Figura 9. Áreas con condiciones adecuadas para la existencia de *J. blancoi* con valores de probabilidad ≥ 0.55 .

6.3 Variación de características dasométricas

Considerando los valores máximos encontrados, *J. blancoi* puede encontrarse como árboles que van de los 5 a los 26 metros, y con diámetros desde 28 hasta 82 cm (Tabla 3), tal rango se encuentra distribuido heterogéneamente entre sus poblaciones pues se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la media del diámetro y de la altura entre las seis localidades analizadas (Tabla 3). La Preciosita y San José del Rincón se agrupan juntos y presentan los tamaños mayores: alrededor de 15 metros de altura y 45 de diámetro. El Salto presentó los valores más pequeños ($h = 2.73$ y $D = 8.32$) y no es estadísticamente diferente de Yécora. Río Patitos y la Presa Brockman se encuentran en valores intermedios.

Debido a su hábito arbustivo, *J. blancoi* var. *huehuentensis* no fue considerado en el registro de características dasométricas, pero es importante resaltar que esto lo vuelve diferente a las poblaciones arbóreas medidas.

Tabla 3. Diferencias en la altura y diámetro entre seis poblaciones de *J. blancoi*

Población	Altura (m)		Diámetro (cm)	
	Media	Máximo	Media	Máximo
La Preciosita	15.76 a	26	42.73 a	81.81
Sn J. Rincón	14.12 a	18	46.31 a	89.76
P. Brockman	7.4 b	10	22.27 b	32.79
R. Patitos	5.67 bc	15	22.75 b	50.29
Yécora	4.76 cd	9	12.96 c	28.33
El Salto	2.73 d	5	8.32 c	28.01

Letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de cada población

6.4 Descripción de las regiones secuenciadas

La región *trnS-trnG2S* tuvo un tamaño de 720 pb, la *trnT-trnF* de 900 pb aproximadamente y la *trnC-trnD* de 1555 pb. En ésta última fue donde se encontró polimorfismo significativo, por lo que se utilizó para los subsecuentes análisis.

Dentro de dicho fragmento en *J. blancoi* el espaciador *trnC-petN* tiene un tamaño de 295-296 pb, el gen *petN* está formado por 90pb, el espaciador *petN-psbM* tiene una longitud de 643 pb, el gen *psbM* mide 112 pb; y el espaciador *psbM-trnD* mide 414 pb. Se encontraron 3 tipos distintos de mutaciones

que en total generan 12 sitios polimórficos y 10 haplotipos distintos (Tabla 4). Se encontraron: 8 *indels* de los cuales 2 involucran más de un par de bases pero un sólo evento de mutación (parecen ser una repetición tandem de la secuencia contigua); 3 sustituciones y 2 inversiones que parecerían sustituciones pero no lo son (Tabla 4).

6.5 Análisis de la región *trnC-trnD*

6.5.1 Diversidad, diferenciación y estructura genética

El total de individuos secuenciados entre las 8 poblaciones de *J. blancoi* fue de 160. La diversidad haplotípica total de la especie fue alta ($h_T = 0.86266$). El número de individuos por haplotipo encontrados en cada población, así como los diferentes índices de diversidad genética calculados, se registran en la Tabla 6.

Tabla 5. Matriz de distancia genética (valores significativos de F_{ST} , diagonal superior) y geográfica (km, diagonal inferior) entre poblaciones de *Juniperus blancoi*. Todos los valores de F_{ST} son significativos ($P < 0.01$)

	Yécora	Mohinora	Huehuento	El Salto	Patitos	Brockman	Sn.J. Rincón	Preciosita
Yec	0	0.88826	1.00000	0.92568	0.45000	0.90672	0.91285	0.95042
Moh	207.77	0	0.50833	0.50523	0.48818	0.76700	0.75358	0.79860
Hue	365.07	157.46	0	0.50000	0.48113	0.82976	0.82571	0.89464
Salto	405.61	198.3	41.32	0	0.48438	0.78824	0.77729	0.82985
Pat	616.97	410.4	253.6	212.36	0	0.54680	0.49368	0.51926
Brock	985.72	784.07	631.09	589.98	382.19	0	0.15634	0.24946
SnJR	989.06	787.35	634.29	593.17	385.23	3.54	0	0.17433
Pres	1154.97	955.68	804.34	763.42	557.24	175.42	172.56	0

El haplotipo más abundante fue el H5 (20%) seguido por el H7 (19.37%) y el H1 (17.5%). La población con mayor diversidad fue la de la Presa Brockman, seguida de las de San José del Rincón, el Cerro Mohinora y La Preciosita ($h_e = 0.70562, 0.62745, 0.54412$ y 0.52857 respectivamente) en donde el número de haplotipos es de 4 para la primera y 3 para las otras. Mientras que en Yécora se encuentra fijo el haplotipo H5 y en el Cerro Huehuento el H7, de manera que la diversidad en ambos casos y para las secuencias analizadas es nula. La diversidad nucleotídica total fue de $\pi_M = 0.002416$, el valor más alto se encuentra en la población del Río Patitos ($\pi_M = 0.001943$) ya que aunque en dicha población se encontraron sólo dos haplotipos éstos difieren entre sí por varios sitios polimórficos.

Tabla 4. Sitios variables de la alineación de la región de ADNcp *trnC-trnD* en los ocho haplotipos encontrados para *J. blancoi* y las secuencias de *J. virginiana* y *J. scopulorum*. Los guiones (-) representan ausencia de un nucleótido. Se indica la posición para el fragmento completo y en las tres regiones neutras, la numeración corresponde a la alineación con *C. forbesii*.

Haplotipo	Posición																				
	75	271	282-286	296-297	600-602	721	793-810	817	857-859	932	991-997	1018-1023	1024	1047-1051	1054	1274-1280	1293	1296	1301-1307	1450	1474
<i>J. blancoi</i> H01	-	C	-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	GTAATTA	AAAA	T	TTTTA	-	-----	-	-	-----	T	C
<i>J. blancoi</i> H02	-	C	-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	-----	AAAA	T	TTTTA	-	-----	-	-	-----	T	C
<i>J. blancoi</i> H03	-	C	-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	AAA	-	-----	AAAA	T	TTTTA	-	-----	-	-	-----	T	C
<i>J. blancoi</i> H04	T	C	-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	-----	AAAA	T	TTTTA	-	-----	-	-	-----	T	C
<i>J. blancoi</i> H05	-	A	-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	A	GTAATTA	AAAA	T	-----	-	-----	-	-	-----	-	-
<i>J. blancoi</i> H06	-	C	-----	--	TTC	T	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	GTAATTA	AAAA	T	TTTTA	-	-----	-	T	-----	-	-
<i>J. blancoi</i> H07	-	C	-----	--	TTC	T	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	GTAATTA	AAAA	T	TTTTA	-	-----	-	-	-----	-	-
<i>J. blancoi</i> H08	-	C	-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	-----	AAAA	T	TTTTA	-	-----	-	-	-----	C	C
<i>J. blancoi</i> H09	-	A	-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	A	GTAATTA	AAAA	T	-----	C	-----	-	-	-----	-	-
<i>J. blancoi</i> H10	-	A	-----	--	GAA	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	A	GTAATTA	AAAA	T	-----	-	-----	-	-	-----	-	-
<i>J. virginiana</i> 10222	-	A	TTTTT	TT	TTC	C	TAATATCTC-----	-	TTT	-	GTAATTA	----	A	-----	-	-----	-	-	ATATATT	-	-
<i>J. virginiana</i> 10221	-	A	TTTTT	TT	TTC	C	TAATATCTC-----	-	TTT	-	GTAATTA	----	A	-----	-	TATTATA	G	-	ATATATT	-	-
<i>J. virginiana</i> 10220	-	A	TTTTT	TT	TTC	C	TAATATCTC-----	-	TTT	-	GTAATTA	----	A	-----	-	-----	-	-	ATATATT	-	-
<i>J. scopulorum</i> 10935	-	C	T-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	GTAATTA	AAAA	T	-----	-	-----	-	-	-----	T	-
<i>J. scopulorum</i> 10934	-	C	T-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	GTAATTA	AAAA	T	-----	-	-----	-	-	-----	-	-
<i>J. scopulorum</i> 10933	-	C	T-----	--	TTC	C	-----GAGA-TATT	A	TTT	-	GTAATTA	AAAA	T	-----	-	-----	-	-	-----	-	-
<i>Callitropsis forbesii</i>	-	T	-----	TT	TTC	C	-----GAAAATATT	A	---	-	GTAATTA	AAAA	T	-----	-	-----	-	-	-----	T	-
	75	271	282-286	296-297	185-187	306	378-395	402	442-444	517	576-582	603-606	607	632-635	637	73-80	93	96	101-107	250	279
	trnC-petN								petN-psbM				psbM-trnD								

Tabla 6. Número de individuos por población encontrados para cada haplotipo en *Juniperus blancoi* en el fragmento de ADNcp *trnC-trnD* e índices de diversidad genética.

Población	Haplotipo											<i>h</i>	<i>S</i>	<i>k</i>	π_M	π	Θ_s
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total						
Yécora, Son.	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	21	0.00000	0	1	0.000000	0.000000	0.00000
C. Mohinora, Chih.	0	0	0	0	0	0	2	0	11	4	17	0.54412	2	3	0.000645	0.000000	0.00000
El Salto, Dgo.	0	0	0	0	0	11	10	0	0	0	21	0.00000	0	1	0.000389	0.000000	0.00000
C. Huehuento, Dgo.	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	19	0.52381	1	1	0.000000	0.000000	0.00000
R. Patitos, Jal.	10	0	0	0	11	0	0	0	0	0	21	0.52381	5	2	0.001943	0.000389	0.00021
P. Brockman, Mich.	3	2	8	9	0	0	0	0	0	0	22	0.70562	3	3	0.000918	0.000360	0.00020
Sn. J. Rincón, Edo. Mex.	8	2	8	0	0	0	0	0	0	0	18	0.62745	2	2	0.000776	0.000388	0.00004
Preciosita, Pue.	7	13	0	0	0	0	0	1	0	0	21	0.52857	2	3	0.000417	0.000071	0.00021
Total	28	17	16	9	32	11	31	1	11	4	160	0.86266	12	10	0.002416	0.000564	0.00040

h diversidad haplotípica; *k* número de haplotipos; *S* número sitios polimórficos (incluye *indels* e inversiones); π_M diversidad nucleotídica promedio tomando en cuenta mutaciones distintas de sustituciones (como evento único y codificadas como gaps); π diversidad nucleotídica promedio; Θ_s Theta por sitio.

Tabla 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de *J. blancoi* con el fragmento *trnC-trnD* de ADNcp.

Fuente de variación	gl	SC	CV	PV	Índices de fijación
Entre grupos	4.00	197.39	1.56	73.93	$F_{SC}=0.21259^{**}$
Entre poblaciones dentro de los grupos	3.00	8.38	0.12	5.54	$F_{ST}=0.79469^{**}$
Entre las poblaciones	152.00	65.88	0.43	20.53	$F_{CT}=0.73926^*$
Total		271.64	2.11		

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CV: componentes de la varianza PV: porcentaje de variación: *P=0.0000, **P<0.005

En la Figura 10 se aprecia que aunque las poblaciones no son muy diversas tienen frecuencias y composición haplotípica distinta de las demás. Esto concuerda con que los valores de la F_{ST} calculados entre los pares de poblaciones fueron altos (Tabla 5) y con que la obtenida con todas las poblaciones (Tabla 7) fue de $F_{ST} = 0.79469$ y altamente significativa ($P = 0.0000$). En las pruebas con SAMOVA, resultó que la mayor F_{CT} se obtuvo con cinco grupos ($F_{CT} = 0.73926$) y las poblaciones se agruparon de la siguiente manera: Yécora (Grupo Yécora); Cerro Mohinora (Grupo Cerro Mohinora); El Salto y Huehuento (Grupo Durango); Río Patitos (Grupo R. Patitos) y P. Brockman, San José del Rincón y La Preciosita (Grupo Faja Volcánica Trans-Mexicana). El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra que la mayor parte de la variación (73.94%) se debe a las diferencias entre dichos grupos, mientras que el 20.53% se debe a diferencias dentro de las poblaciones (Tabla 7). Dentro de los grupos de SAMOVA (Tabla 8) la mayor diversidad se encontró en el conjunto de la FVTM ($h = 0.75683$ y $k = 5$).

6.5.2 Análisis filogenéticos

Se encontraron dos haplotipos distintos en *J. scopulorum* y dos en *J. virginiana*. Aunque hay pocos sitios con sustituciones se encontraron más *indels* informativos y dos microsatélites (regiones 272-286 y 279-298, siguiendo la numeración del alineado con *C. forbesii*, Tabla 4). El árbol obtenido con máxima verosimilitud (Figura 11) no resuelve la relación entre muchos de los haplotipos de *J. blancoi*, mientras que el de máxima parsimonia (Figura 12) es más informativo en este sentido. En ambos casos se encontró que con este marcador *J. blancoi* es un grupo parafilético.

6.5.3 Análisis filogeográfico de clados anidados

Se encontró una asociación geográfica significativa entre todos los clados que incluían haplotipos muestreados (Figura 13 y Figura 14). El clado 1-3 se encuentra en las poblaciones de Durango (El Salto y Cerro Huehuento) y en el Cerro Mohinora, Chihuahua, sus haplotipos punta (H6, H9 y H10) se diferencian del H7 por un sólo paso mutacional (dos por eventos de inserción/delección y otro por una inversión), en el Cerro Huehuento se encuentra fijo el H7, mientras que los H9 y H10 son exclusivos del Cerro Mohinora y el H7 se encuentra en las tres poblaciones. En las localidades de la FVTM se encuentran los haplotipos H1, H2, H3, H4 y H8. Los dos últimos son haplotipos privados de la P. Brockman, Mich. y de La Preciosita, Pue., respectivamente, mientras que el H3 se encuentra en San José del Rincón, EdoMex. y P. Brockman,

Mich. Estos tres haplotipos descienden por un sólo paso mutacional del H2, presente en todas las poblaciones del sur, y que se separa del H1 por una delección. El haplotipo H1 conecta a dichas poblaciones con el resto, ya que además se encuentra presente en el Río Patitos, de manera que el clado 1-1 es exclusivo de la FVTM y el 2-1 lo comparte con Río Patitos en la SMO. El clado 1-2 se encuentra también en esta última población y está fijo en Yécora, Son., curiosamente, a pesar de que el H5 es una punta es también el más abundante.

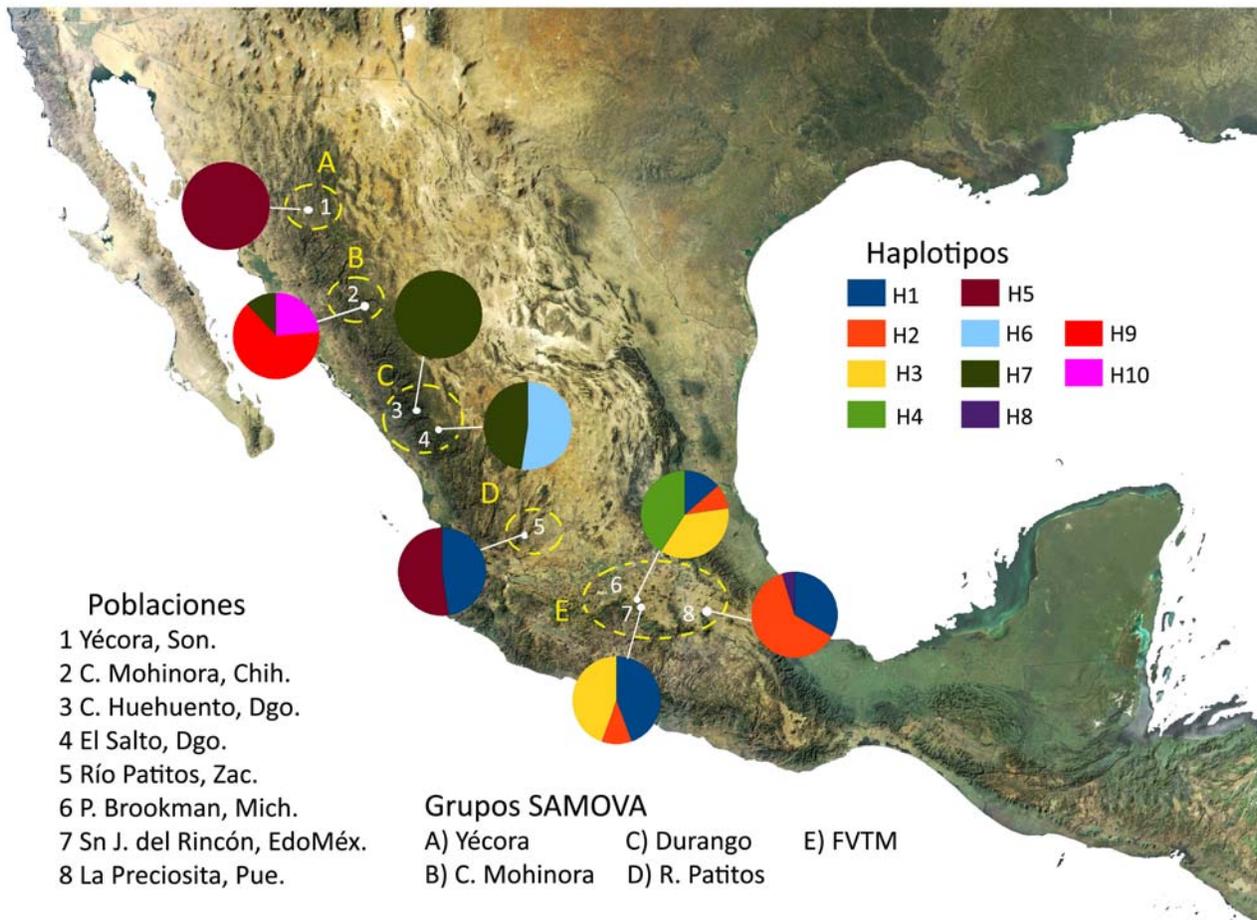


Figura 10. Composición haplotípica de las poblaciones de *Juniperus blancoi* y su agrupación según el análisis SAMOVA.

Por otro lado, la conexión entre los clados 1-3; 1-2 y 2-1 involucra varios haplotipos no muestreados, lo que coincide con la separación en tres clados por el árbol de relaciones filogenéticas entre los haplotipos (Figura 12).

La cadena de inferencias para los clados con resultados significativos (Tabla 9) indica eventos de aislamiento por distancia con flujo genético restringido en los clados 1-1 y 2-1, mientras que en el 1-3 no fue posible distinguir entre a) un movimiento a larga distancia o b) una expansión gradual de la distribución seguida de fragmentación o de extinción en las áreas intermedias. Para el clado 2-2 se infirió fragmentación alopátrica. Para el cladograma total se llegó a tres escenarios posibles: colonización a larga distancia, mayor área distribución en el pasado combinada con subsecuentes extinciones en algunas áreas geográficas intermedias o expansión continua del área de distribución seguida de fragmentación.

Tabla 8. Índices de diversidad genética para cada grupo SAMOVA de *J. blancoi* en el marcador *trnC-trnD*

Grupo	<i>h</i>	<i>S</i>	<i>k</i>
Yecora	0.00000	0	1
C. Mohinora	0.54412	2	3
R. Patitos	0.52381	5	2
Durango	0.40897	1	2
FVTM	0.75683	4	5

h diversidad haplotípica, *S* número sitios polimórficos e indels, *k* número de haplotipos; FVTM: Faja Volcánica Trans-Mexicana

La prueba de Mantel para toda la distribución de la especie reveló una asociación significativa entre la diferenciación genética y las distancias geográficas ($r = 0.671214$, $P < 0.0005$, Figura 15). Al realizar la prueba entre las poblaciones del grupo de la FVTM más la de R. Patitos, Zac. se obtuvo la misma conclusión ($r = 0.783646$) pero al hacerlo sólo entre las poblaciones del Grupo FVTM los resultados no fueron significativos ($P = 0.167600$).

Tabla 9. Resultados de la prueba de contingencia de asociación geográfica y cadena de inferencia para los clados con resultados significativos para D_c , D_n .

Clado	χ^2P	Cadena	Evento*
1-1	0.0000	1,2,3,4 No	ADFR
1-3	0.0000	1,2,11,12,13,21 No	MLD EGF
2-1	0.0000	1,2,3,4 No	ADFR
2-2	0.0000	1, 19 No	FA
total	0.0000	1,2,11, 12, 13 Sí	°

ADFR: aislamiento por distancia con flujo génico restringido. MLD: movimiento a larga distancia. EGF expansión gradual del área de distribución pasada con fragmentación o extinción intermedia. FA: fragmentación alopátrica. °Colonización a larga distancia, mayor área distribución en el pasado combinada con subsecuentes extinciones en algunas áreas geográficas intermedias o expansión continua del área de distribución seguida de fragmentación.

Tabla 10. Cálculos del tiempo al ancestro común más cercano entre los haplotipos de *J. blancoi* y del tamaño efectivo de la población.

	t_{mrca}	N_e
Media	3,593,600	3,318,800
DS de la media	25,963	31,269
Mediana	3,238,000	2,758,100
Media geométrica	3,089,100	2,681,400
95% HPD límite inferior	618,160	341,400
95% HPD límite superior	7,556,500	7,830,500

t_{mrca} : tiempo al ancestro común más cercano, en años. N_e : tamaño efectivo de la población, se refiere al número efectivo de individuos machos en la población. 95% HPD límite: la densidad posterior más alta (HPD por sus siglas en inglés) es el intervalo más corto que contiene el 95% de los valores de la muestra.

6.5.4 Demografía histórica

Los análisis de demografía histórica resultaron difíciles de realizar con las secuencias analizadas debido a que aunque había varios eventos de mutación se encontraron pocas sustituciones.

No se obtuvieron valores significativos en la prueba D de Tajima y F de Fu y Li ($D = 0.79776$, $P > 0.1$ y $F = 1.12552$, $P > 0.1$ respectivamente).

La distribución *mismatch* para todas las poblaciones fue unimodal (Figura 16), y el valor de suma del cuadrado de las diferencias entre el modelo y la muestra fue significativo ($SCD = 0.02115268$, $p(SCD) < 0.05$) por lo que se rechaza la hipótesis de expansión demográfica súbita.

El tamaño efectivo de la población presentó una media de $N_e = 3,318,800 (\pm 31,269)$ individuos y una mediana de $N_e = 2,758,100$, así mismo se calculó que la media del tiempo al ancestro común más cercano entre los haplotipos de *J. blancoi* es de $t_{mrca} = 3,593,600 (\pm 25,963)$ años y la mediana de $t_{mrca} = 3,238,000$ (Tabla 10).

6.6 Condiciones socioeconómicas, ambientales y estado de conservación

En la Tabla 11 se especifican la localidad, municipio, grado de marginación, número de asentamientos humanos cercanos, uso del suelo y destino del terreno, así como el grado de conservación de cada población estudiada. Todas se localizan en zonas rurales del país, y en términos generales tienen un grado de marginidad alto o muy alto. Tres de las colectas se hicieron en tierras ejidales (Cerro Huehuento, El Salto, P. Brockman), dos en propiedad privada (La Preciosita, Cerro Mohinora) y del resto no fue posible conseguir dicha información (Yécora, Río Patitos, San José del Rincón). El uso del suelo de algunas poblaciones (Cerro Mohinora, Cerro Huehuento y La Preciosita) es aún de vegetación primaria (bosque de coníferas y encinos) o de vegetación perturbada (Yécora y Río Patitos) pero que no ha sufrido un cambio grave; mientras que en otras es de cobertura antrópica, es decir están en medio de zonas agropecuarias (sembradíos o potreros) donde sobreviven prácticamente sólo individuos adultos muy cercanos al arroyo, espaciados entre sí y sin restos de vegetación original (El Salto, Presa Brockman, San José del Rincón). Por otro lado, en Puebla, Michoacán y el Estado de México la cantidad de asentamientos humanos en un área de 10 km a la redonda es drásticamente mayor que en el resto.

Destaca que el Cerro Huehuento y La Preciosita se encuentran dentro de una Unidad de manejo para la conservación y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre (UMA) y el Cerro Mohinora dentro de un Área Natural Protegida (ANP), específicamente el Área de Protección de Flora y Fauna “Cerro del Mohinora” decretada en el 2005. A pesar de que no fue posible obtener mayor información sobre las localidades de Yécora y Río Patitos, sabemos que éstas se encuentran en zona federal (10 m contiguos al cauce de las corrientes, artículo 3, sección XLVII de la Ley de Aguas Nacionales).

Según la *IUCN Red List of Threatened Species* (IUCN, 2009) *J. blancoi* se encuentra en la categoría de vulnerable D2. Por otro lado, siguiendo los estándares de la IUCN para especies, pero analizando cada población de manera independiente se determinó mediante observación directa que *J. blancoi*:

- En la Presa Brockman y El Salto está en peligro crítico de extinción (CR A1). En la primera se encontraron sólo 21 individuos maduros y en la segunda no más de 50, lo que implica (considerando que las poblaciones en mejor estado tienen al rededor de 300 ejemplares adultos) que en las últimos tres generaciones debió reducirse la población en más de un 80%. Las poblaciones cruzan respectivamente un campo de cultivo y un potrero, por lo que no sólo el futuro de los árboles existentes depende de las actividades humanas, sino que las condiciones se encuentran tan deterioradas que difícilmente podrán establecerse sus plántulas.
- En San José del Rincón está en peligro de extinción (EN A1). A pesar de que se contaron más individuos que en el caso anterior (al rededor de 80), la población se encuentra en un arroyo que cruza diversos campos de cultivo donde la vegetación ribereña ha sido destruída en su mayor parte y donde bajo las condiciones actuales la regeneración será difícil, por lo que podría esperarse que la población haya disminuido en un 50% en los últimos 10 años o en las últimas tres generaciones de la especie.
- En Yécora y Río Patitos se encuentra en la categoría de riesgo mínimo pero cerca a vulnerable (LR nt). Aunque se encuentran en riberas poco accesibles y rocosas, no tienen ninguna protección especial y podrían verse afectadas por cambios de uso de suelo en la región o por el sobrepastoreo.
- En La Preciosita está también en el riesgo mínimo, pero dependiente de las medidas de conservación (LR cd). Se encuentra en una de las regiones más transformadas del país pero dentro de una UMA que garantiza que no habrá un cambio de uso de suelo y que representa un fragmento de bosque conservado dentro de un territorio muy erosionado. La “Reserva Ecológica Campesina La Preciosita”, mejor conocida como “La Preciosita, es un predio de 416 ha que se encuentra registrado como UMA (DFYFS-CR-EX0095-PUE SEMARNAT), bajo propiedad comunal de la comunidad La Preciosita Sangre de Cristo Sálvame, Municipio de Santa Rita Tlahuapan, Puebla, México.
- En el Cerro Mohinora y el Huehuento están en la categoría riesgo más bajo y consideración mínima (LR lc). Parecen tener garantizado su futuro, ya que se encuentran respectivamente en un ANP y en una UMA, en un área poco propensa a la destrucción de la vegetación original (cima de cerros).

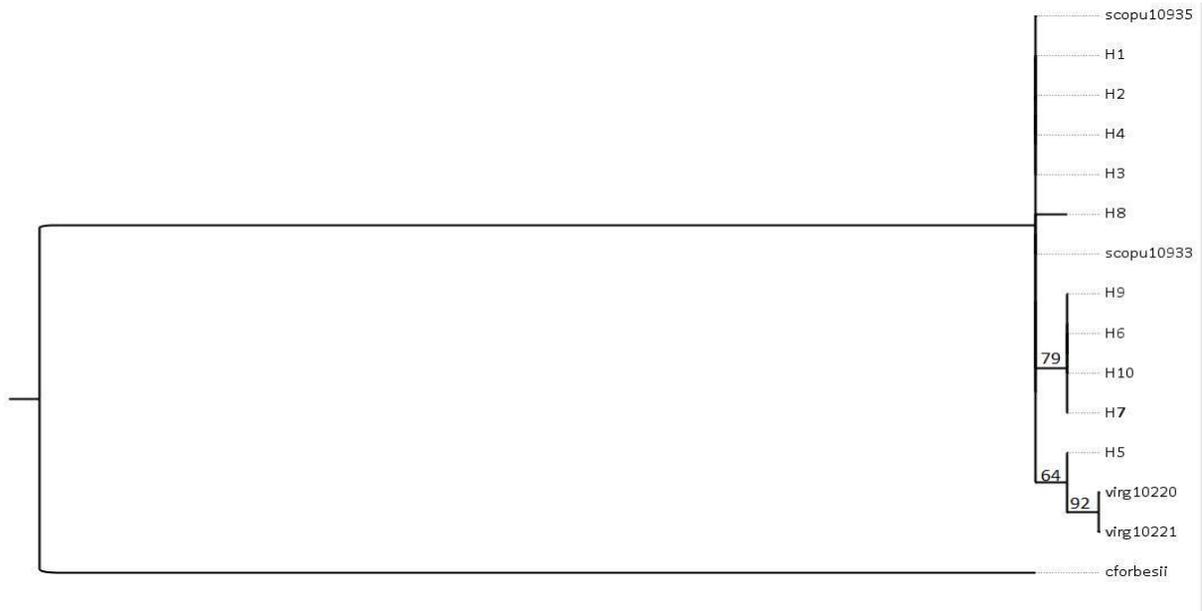


Figura 11. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas de los haplotipos de la región *trnC-trnD* en *J. blancoi* (H1-H10), *J. scopulorum* (scopu10933, 10935) y *J. virginiana* (virg10220, 10221) utilizando máxima verosimilitud. Los valores de bootstrap basados en 100 réplicas se muestran sobre las ramas.

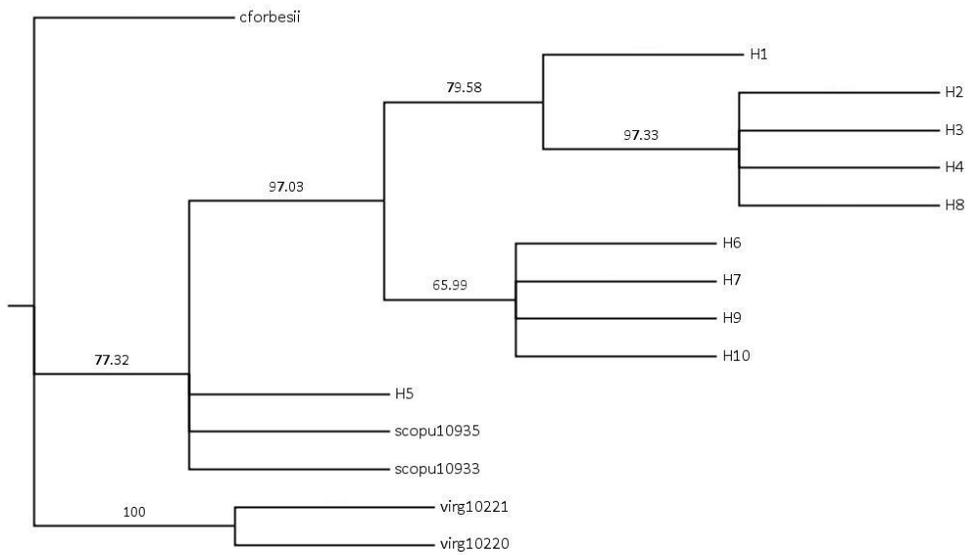


Figura 12. Relaciones filogenéticas de la región *trnC-trnD* en los haplotipos de *J. blancoi* (H1-H10), *J. scopulorum* (scopu10933, 10935) y *J. virginiana* (virg10220, 10221) utilizando máxima parsimonia. Los valores de bootstrap basados en 1000 se muestran sobre las ramas.

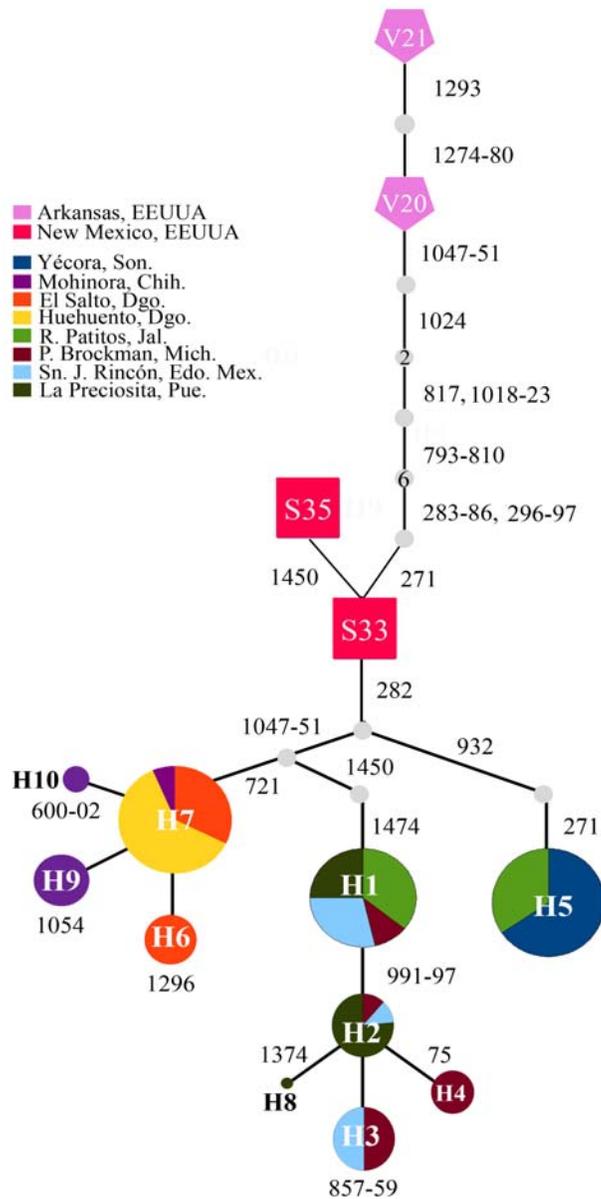


Figura 13. Red de haplotipos de *J. blancoi* (círculos) con *J. scopulorum* (cuadrados) y *J. virginiana* (pentágonos). Los círculos grises son haplotipos no muestreados. El tamaño de los círculos corresponde a la abundancia relativa de cada haplotipo y los colores a la frecuencia relativa con la que se encuentran en cada población. El tamaño de los cuadrados y los pentágonos no corresponde a la abundancia. Cada haplotipo se encuentra separado por un paso mutacional, se indica la posición del evento (Tabla 4).

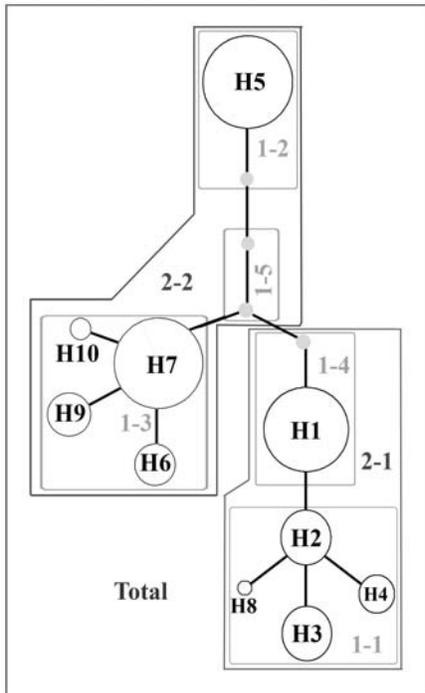


Figura 14. Red de clados anidados de *Juniperus blancoi*. El tamaño de los círculos corresponde a la abundancia relativa del haplotipo, los círculos grises son haplotipos no muestreados.

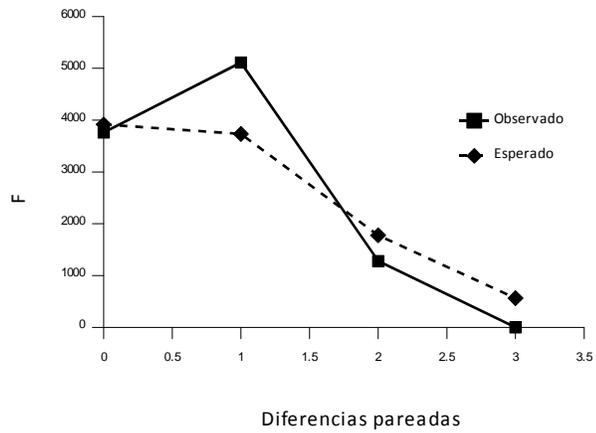


Figura 16. Distribución de diferencias pareadas para *J. blancoi*.

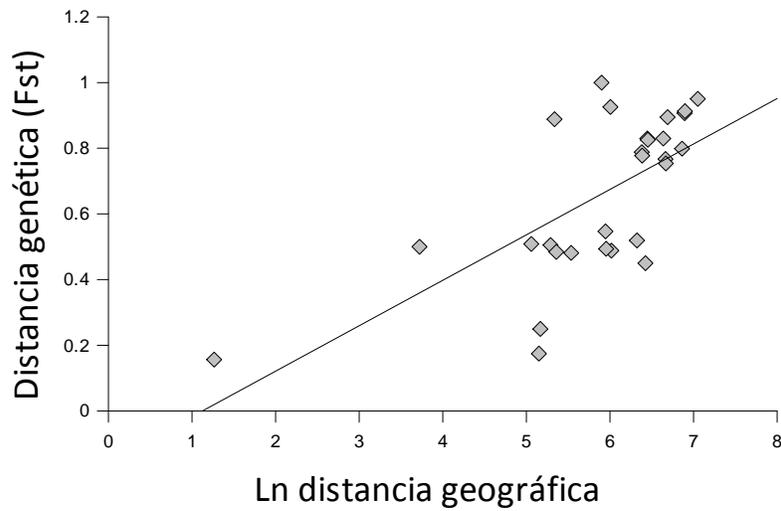


Figura 15. Prueba de Mantel para todas las poblaciones $r=0.671214$, $P<0.0005$)

Tabla 11. Condiciones socioambientales y estado de conservación de las poblaciones de *J. blancoi*.

Población	Uso del suelo registrado	Destino del terreno	Propiedad	Estado	Municipio	Localidad	Núcleo agrario	Marginidad*	Asentamientos humanos cercanos [°]	Condición ambiental ¶	Estado de conservación ±
YecSon	Bosque de encino	Zona federal Río	NR	Sonora	Yécora	San Francisco	NR	Muy alta	6	Buena	LR nt
MohChi	Bosque de pino	ANP	Privada	Chihuahua	Guadalupe y Calvo	Mesa del Riyito	NA	Alta	20	Buena	LR lc
HueDgo	Bosque de pino	UMA	Ejido	Durango	San Dimas	Huachichiles	San Bartolo	Alta	18	Buena	LR lc
SalDgo	Manejo agrícola	Potrero	Ejido	Durango	Pueblo Nuevo	El Salto	El Salto	Baja	23	Mala	CR
PatZh	Manejo agrícola	Zona federal Río	NR	Zacatecas	Teúl de González Ortega	Milpillas de Allende	NR	Media	7	Buena	LR nt
BroMic	Manejo agrícola	Sembradío agrícola	Ejido	Michoacán	Contepec	Guanajuatito (Pintizuelas)	San Pedro Tarímbaro	Muy alta	96	Mala	CR
SJEdoM	Manejo agrícola	Sembradío agrícola	NR	México	San José del Rincón	La Desviación	NR	Alta	84	Mala	EN
PrePue	Bosque de pino	UMA	Privada, reserva comunitaria	Puebla	Tlahuapan	La Preciosita Sangre de Cristo Sálvame	NA	Alta	70	Buena	LR cd

° Uso del suelo registrado según CONABIO (1999). ANP: Área Natural Protegida, UMA: Unidad de manejo para la conservación y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre, NR: No registrado, NA: No aplica. * Para el grado de marginidad se consideró a la localidad propietaria de la tierra donde está la población o a la más cercana, datos de CONABIO (2006). ° El número de asentamientos humanos se calculó con base en las localidades reportadas en CONABIO (2006) que se encontraban en un área de 10 km a la redonda. ¶: Se refiere a la condición en que se encontraba la población estudiada tomando en cuenta la calidad de la vegetación y el estado del ecosistema en general. ± Se refiere al estado de conservación de cada población aplicando los estándares de la IUCN (2009) según las características biológicas y el nivel de amenaza por actividades humanas. Ver texto para una mayor explicación.

7 Discusión

7.1 La rareza de *Juniperus blancoi*

Hay tres puntos a discutir sobre la, por supuesto evidente, rareza de *J. blancoi*.

Primero, el resultado al que se llegó siguiendo el cuadro de Rabinowitz (1981) fue distribución amplia con poblaciones locales grandes (dominantes) pero en un hábitat muy específico, sin embargo esto no describe por completo las características espaciales de la especie. Faltaría mencionar que su amplia distribución, de más de 1150 km de extremo a extremo, ocurre en tan sólo ocho poblaciones muy espaciadas entre sí (Tabla 6). Su hábitat es muy específico pero no explica por completo su ausencia/presencia: aunque es posible que se descubran más poblaciones de esta especie, es un hecho que en las localidades registradas súbitamente dejaban de observarse individuos cuando a los pocos metros dominaban la vegetación, y no se les volvió a encontrar en arroyos cercanos y de condiciones, cuando menos en apariencia, muy similares. Este fenómeno es sumamente interesante y puede comprenderse sólo si agregamos el componente temporal y entendemos la distribución actual como la consecuencia de una serie de procesos de fragmentación y aislamiento que se discuten más adelante.

El segundo punto sigue por la misma línea: no es sencillo acotar la rareza de *J. blancoi*. El tipo de rareza que se escogió dentro de las siete opciones posibles cambia si en vez de considerar a la especie como un sólo conjunto la analizáramos separándola en sus variedades. El resultado sería entonces algo que podríamos considerar una rareza múltiple, y que como ya se ha mencionado, puede explicarse sólo si se considera un fenómeno en el espacio-tiempo. Esto no debe entenderse sólo en términos del pasado, pues lo que se observa hoy no es más que una instantánea de un proceso evolutivo que continúa.

Lo tercero a tratar se relaciona con un punto que ya se ha mencionado: la rareza de *J. blancoi* es consecuencia de su historia y por ende un fenómeno natural. Evidencia de esto es la alta diferenciación genética entre las poblaciones (que se hace más evidente con la presencia de haplotipos únicos distintos aún entre localidades cercanas, ver Figura 10); y también morfológica, que se observa como diferencias no sólo en caracteres taxonómicos (Figura 5), sino también en características dasométricas que bien podrían no ser simple plasticidad fenotípica. Desde el punto de vista temporal, es posible que la rareza

espacial de la especie sea una situación que ha sido distinta en el pasado, cuando la especie pudo tener tamaños de población muy grandes (ver discusión más adelante).

Siguiendo con el punto de que *J. blancoi* es naturalmente raro hay consideraciones pragmáticas que hacer: la rareza es una espada de doble filo. Por un lado tiene la ventaja de que se esperaría que las especies raras históricamente estuvieran mejor adaptadas a ciertos problemas de la rareza, como la depresión por endogamia o la dificultad de encontrar otros individuos para reproducirse sexualmente, que aquellas que se vuelven raras súbitamente (decenas de años) debido a las actividades humanas. Además, la rareza no implica necesariamente que el taxón sea un mal competidor, pues se han realizado experimentos con pastos donde las especies poco abundantes resultaron ser competidores superiores en relación a otras comunes (Rabinowitz, 1981). Otro ejemplo es *P. radiata*, que sólo tiene 5 poblaciones naturales pero en el hemisferio sur, donde fue introducido, crece como invasor (Lavery y Mead, 1998). El otro lado de la navaja es una amenaza seria, pues especies como *J. blancoi* son altamente sensibles a la destrucción de su hábitat: un incendio pequeño o el cambio de uso de suelo de tan sólo dos hectáreas puede ser suficiente para terminar con una población completa y todo su acervo genético.

7.2 ¿Hay más poblaciones de *Juniperus blancoi*?

Hasta ahora las ocho poblaciones consideradas en este estudio son las únicas conocidas de *J. blancoi* y como se ha mencionado no se extienden por más de una cañada o la ladera y cima de un cerro. El que no se hayan reportado en otro sitio puede significar tres cosas: 1) No se han encontrado más poblaciones pero sí existen, 2) existen las condiciones adecuadas pero la especie efectivamente no se distribuye ahí, 3) no existen las condiciones adecuadas para la especie y por ende no está ahí.

Como se mencionó en los resultados, a pesar de que la distribución potencial generada con Maxent está fragmentada, es mucho mayor que la distribución conocida actual de la especie. Sin embargo, hay que mencionar que cinco de las poblaciones del presente estudio se descubrieron en los últimos años: Yécora en el 2000 (Adams, 2000), Río Patitos en el 2003 (Pérez y Carrillo, 2003), Cerro Huehuento en el 2005 (Adams et al., 2006), La Preciosita en el 2007 y el Cerro Mohinora en el 2008. Con semejante tendencia cabría suponer que hay muchas más poblaciones de las hasta ahora encontradas y que simplemente han pasado desapercibidas, por lo que con ayuda del mapa de distribución potencial podrían hallarse más. Sin embargo los puntos con mayores valores para presentar condiciones

adecuadas para la especie (≥ 0.85 Figura 9) se encuentran principalmente en zonas que han sido bastante exploradas por botánicos y forestales (los volcanes de la FVTM), por lo que tal vez se trate más bien del caso mencionado en el segundo punto. Por otro lado, existen áreas en la SMO que tienen valores también bastante altos (≥ 0.70 , Figura 9) y que, aunque también han sido estudiados por botánicos, se encuentran aún mucho más aislados e inexplorados, por lo que debiera ser ahí el sitio a dónde dirigir la búsqueda. Las áreas más al sur de la FVTM y de Guatemala donde según el análisis existen las condiciones para que habite la especie deben ser descartadas, ya que aunque se encuentran las condiciones no hay registros de esta especie más al sur de La Preciosita, por lo que podemos suponer que por motivos históricos su distribución se restringe a la FVTM y la SMO.

En cuanto al tercer punto, la distribución potencial de *J. blancoi* realizada en este estudio debe considerarse una primera aproximación, pues el hecho de que una de las poblaciones (Yécora) se localice en un área con valores bajos (0.20) puede indicar que: a) en este análisis no se utilizaron las capas ambientales que realmente caracterizan la distribución de la especie b) el nicho que ocupa la especie está determinado por otros factores además, por lo que sería necesario un análisis a una escala mucho menor (considerando, por ejemplo, las microcondiciones de las cañadas y su distribución) o c) que sus poblaciones se encuentran lo suficientemente separadas y diferenciadas entre sí como para habitar en condiciones contrastantes.

Finalmente, tomando en cuenta la alta diferenciación y estructuración genética que se encontró en la especie en cuestión (ver discusión más adelante), si existiera un número mucho mayor de poblaciones de *J. blancoi* probablemente el flujo génico sería mayor (o existiría siquiera), por lo que podemos considerar que la distribución conocida de la especie es ciertamente rara y muy probablemente no muy distinta de la real. Respondiendo, pues, a la pregunta título de esta apartado: sí es posible que existan más poblaciones de *J. blancoi*, pero esto no implica que la especie dejaría de ser rara. En otras palabras, si hay más poblaciones estas serán parecidas a las actuales: dominantes localmente pero pequeñas, separadas entre sí y, lo más posible, diferenciadas genéticamente.

7.3 Variación de características dasométricas

Las diferencias encontradas en los diámetros y alturas entre las poblaciones o grupos de ellas (Tabla 3) puede atribuirse a dos elementos: plasticidad fenotípica y diferencias genéticas.

En términos generales la FVTM tiene mayor humedad, suelos con más humus y períodos de frío menos intensos al año, lo que podría permitir a los árboles desarrollarse más. En este sentido sorprende que la población de la Presa Brockman tenga tamaños significativamente más pequeños que La Preciosita y San José del Rincón, sin embargo, esto podría ser una consecuencia del precario estado de conservación en que se encuentra debido a las actividades humanas, de modo que los árboles más grandes podrían haber sido eliminados.

Independientemente de lo anterior, el hecho es que la especie se presenta como arbustos rastreros o procumbentes (*J. blancoi* var. *huehuentensis*) hasta árboles que van de uno o dos metros hasta otros que sobrepasan los 25. Hasta qué punto estas diferencias se deben al ambiente y son únicamente parte de la plasticidad fenotípica de toda especie y hasta qué punto tienen su origen en posibles diferencias genéticas entre las poblaciones es una cuestión que el presente trabajo no puede resolver, sin embargo es importante mencionar que esta especie representaría un buen modelo biológico para realizar análisis de procedencias (jardines comunes) y estudiar el comportamiento de genes relacionados con el crecimiento, la sequía y la resistencia a bajas temperaturas.

7.4 Diversidad, diferenciación y estructura genética

La diversidad haplotípica encontrada en *J. blancoi* es mayor que la reportada para *J. przewalskii* ($h_T = 0.568$, Zhang et al., 2005) en un estudio parecido con secuencias de ADNcp y para *J. phoenica* ($h_T = 0.148$, (Meloni et al., 2006) con ISSRs. Esta alta variación tiene dos orígenes: el primero es la alta diversidad que se encontró en las poblaciones de la FVTM y el segundo es la gran diferenciación entre las poblaciones y entre los grupos que forman. Como veremos a continuación, ambos son producto de la biología misma de la especie y de los procesos históricos por los que ha atravesado.

Debido a que una parte importante de la variación encontrada son mutaciones distintas de sustituciones, la diversidad nucleotídica es mucho mayor cuando se les considera ($\pi_M = 0.002416$), que cuando no ($\pi = 0.000564$). En general, la baja diversidad nucleotídica (π_M) encontrada contrasta con la alta diversidad haplotípica, esto se debe a que a pesar de que se analizaron más de 1500 pb se encontraron sólo 12 sitios polimórficos en total (Tabla 6).

Zamudio y Carranza (1994) propusieron las poblaciones de P. Brockman, Mich. y San José del Rincón, Edomex eran árboles escapados de cultivo. Sin embargo *J. blancoi* no tiene valor comercial ni

existen registros de que se hayan realizado plantaciones. De cualquier modo, si dichas poblaciones fueran restos de algún tipo de cultivo, se esperaría encontrar una diversidad haplotípica nula o muy baja y compuesta por haplotipos presentes en otra población de la que presuntamente se hubieran extraído los organismos fundadores. El resultado es el contrario: las localidades del sur son en general las más diversas de toda la distribución e incluso cuentan con haplotipos únicos (Figura 10). Este hecho no sólo implica que dichas poblaciones son en naturales, sino que probablemente constituyeron un refugio (ver más adelante, hipótesis filogeográfica).

En cuanto a la diferenciación, se considera que con valores entre $0.15 < F_{ST} < 0.25$ ésta es alta y de $F_{ST} > 0.25$ muy alta (Hartl y Clark, 2007) por lo que la encontrada para la especie sobresa.

Hasta donde sabemos, la herencia del cloroplasto en los *Juniperus* es vía paterna (Neale et al., 1989; Mogensen, 1996) y la polinización se lleva a cabo por el viento, por lo que sería de esperarse que con un marcador de ADNcp los niveles de diferenciación entre poblaciones no fueran tan drásticos como los encontrados con *J. blancoi*, cuando menos entre las poblaciones San. J. del Rincón y la Presa Brockman, que son cercanas entre sí. Sin embargo, no se sabe con exactitud la distancia que realmente puede viajar el polen de estos árboles y menos si es capaz de sortear barreras como cerros y montañas. Se sabe que en *Pinus* un sólo grano de polen no viaja más de 300 m (Lian et al., 2001) y que en *J. tibetica* el movimiento del de una población no excede los 2 km (Miehe et al., sin publicar, mencionado en (Zhang et al., 2005). Otro punto importante es que, al menos actualmente, todas las poblaciones de *J. blancoi* no son especialmente abundantes y los individuos se encuentran confinados a una cañada, por lo que la probabilidad de que el polen encuentre otro árbol a varios kilómetros se antoja escasa, además, se trata de una especie dioica, por lo que la probabilidad de encuentro debe dividirse a la mitad. En cuanto a la dispersión de las semillas de *J. blancoi* tampoco se sabe mucho. Aparentemente, la gálbula propia del género es el alimento de aves y en menor medida de mamíferos pequeños (Santos et al., 1999) y las semillas pueden germinar después de pasar por su tracto digestivo, lo que explica, por ejemplo, la presencia de *J. virginiana* bajo cercas y cables donde las parvadas se posan (Adams, 2008). Sin embargo, para el caso específico de la especie en cuestión no hay ningún estudio que lo corrobore o lo ligue a una especie de ave en particular, en cambio, y a manera de observación puramente especulativa, en La Preciosita se ha encontrado que los retoños de *J. blancoi* son muy abundantes en los alrededores de madrigueras de tuzas y se han encontrado semillas en sus heces y en las de ratones (Alicia Mastretta obs.

pers.). Estos mamíferos se caracterizan de igual modo por tener una estructuración genética y una variación morfológica muy marcada, ver por ejemplo el trabajo de Patton y Yang (1977) en *Thomomys bottate*. Dentro del área de distribución de *J. blancoi* existen tres géneros de tuzas (*Thomomys* en la parte norte de la Sierra Madre Occidental y *Cratogeomys* y *Pappogeomys* en la Faja Volcánica Transmexicana). Si la relación con las tuzas fuera muy estrecha y explicara una proporción importante de su dispersión, sería una coevolución difusa (aún considerando la diversidad taxonómica de las tuzas, ver (Demastes et al., 2002; Hafner et al., 2004; Hafner et al., 2005; Hafner et al., 2008; Hafner et al., 2009)) y podría proponerse un escenario de diferenciación genética paralela entre ambos grupos de taxa que comparten un movimiento limitado y un alto nivel de diferenciación en poblaciones de pequeño tamaño, lo que produciría la existencia de varias subespecies a lo largo del rango de distribución. Sin embargo, sería necesario corroborar esta hipótesis.

Otra característica particular de *J. blancoi* que podría explicar tal diferenciación es su hábitat ribereño, de manera que aunque los dispersores transporten las semillas varios kilómetros, los árboles no se establecerán al menos que coincidan con un arroyo. Además, al menos en la SMO, los escurrimientos corren de manera transversal y no longitudinal, de modo que los cauces no se conectan entre sí sino que son paralelos. De este modo, aunque las poblaciones sean geográficamente cercanas se encuentran ecológicamente mucho más aisladas, tal fenómeno debe tomarse en cuenta cuando se realicen análisis que involucren distancias geográficas. Por otro lado, la diferenciación entre las poblaciones de *J. blancoi* contrasta con la poca estructura encontrada en el ahuehuate (*T. mucronatum*) donde además ocurrió una expansión hace al rededor de 376 000 años (Hernández-Leal, 2009). Ambas especies son una conífera ribereña, por lo tanto la diferencia entre sus historias puede deberse a otras particularidades de su biología, como la longevidad, el modo de dispersión y el reclutamiento. Aunque no existen mediciones para *J. blancoi*, se sabe que los individuos de *J. scopulorum* por lo común viven entre 250 y 300 años (Cronquist et al., 1972; Zarn, 1977) y que en *J. virginiana* alcanzan más de 800 años (National Climatic Data Center, 2009), así mismo, en *T. mucronatum* la media del intervalo de edades en distintas poblaciones es de 340 años, sin embargo frecuentemente se encuentran individuos milenarios (Villanueva et al., 2007) mientras que en *J. scopulorum* y *J. virginiana* son poco comunes. Por otro lado, las semillas de los ahuehuetes se dispersan por las corrientes de agua y el recambio en sus poblaciones ocurre con mayor intensidad en condiciones de sequías fuertes y grandes inundaciones ya que es cuando

los árboles “padre” mueren y dejan un claro donde surgen los nuevos individuos (Hernández-Leal, 2009). Aunque en *J. blancoi* no hay información precisa sobre estos datos, es posible que su dispersión sea mucho más restringida (lo que apoya la hipótesis de las tuzas). Así mismo, es posible que *J. blancoi* sea más sensible a cambios ambientales que *T. mucronatum*.

Por lo pronto, de manera independiente a la causa, podemos afirmar que no existe flujo genético actual entre las poblaciones, lo cual favorece que por deriva génica estas se diferencien entre sí.

En cuanto al análisis realizado con SAMOVA, las poblaciones de la SMO (Tabla 2) fueron subdivididas en cuatro grupos, mientras que las de la FVTM permanecieron juntas (Tabla 8). Dicho resultado no es inesperado ya que todas las poblaciones de la FVTM comparten cuando menos dos haplotipos, mientras que la composición haplotípica de las poblaciones de la SMO se caracteriza por una alta frecuencia de haplotipos únicos o fijos (Figura 10). Los grupos SAMOVA de la SMO en realidad son prácticamente uno por población, sólo el Cerro Huehuento y El Salto forman un grupo (Durango) que no incluye al Cerro Mohinora ya que en dicha población, si bien existe el H7, dominan otros haplotipos únicos. Por otro lado, el que Yécora y el Río Patitos sean grupos distintos a pesar de su parecida composición haplotípica tiene sentido geográfico, ya que se encuentran separados por más de 600 km. La formación de tantos grupos SAMOVA en la SMO en comparación con la mayor cohesión de la FVTM es un indicador de que han ocurrido procesos evolutivos distintos en cada región, mismos que requieren una óptica histórica para explicarse mejor. Es decir, las anteriores características biológicas de la especie sin duda contribuyen a la distribución espacial de su variación, sin embargo la distancia entre las poblaciones y la estructuración genética es tal que no puede entenderse meramente en términos ecológicos, sino que requiere un análisis filogeográfico, mismo que se aborda con mayor detalle más adelante.

7.5 Análisis filogenéticos

La topología del árbol hecho con máxima verosimilitud está poco resuelta mientras que la del de máxima parsimonia brinda más información. Esto se debe a que en el primer caso el número de caracteres informativos (sustituciones) es muy bajo y no permite distinguir entre los haplotios H1, H2, H3, H4 y H8 ni entre el H6, H7, H9 y H10, distinción que es posible en el segundo análisis gracias a la codificación como *gap* e inclusión como quinto estado de las mutaciones distintas a sustituciones. El que una parte importante de la variación se tratara de inserciones y deleciones (*indels*), coincide con lo reportado para

secuencias de cloroplasto de otras coníferas (Zhang et al., 2005; Moreno-Letelier, 2009; Hernández-Leal, 2009). Descartar este tipo de variación cada vez más se considera una pérdida de información, pues han resultado ser caracteres filogenéticos útiles con poca homoplasia (Graham et al., 2000; Kelchner, 2000; Simmons et al., 2001).

Una importante diferencia entre los dos árboles presentados es que el de máxima verosimilitud (Figura 11) muestra al H5 en un clado con *J. virginiana* mientras que en el de máxima parsimonia (Figura 12) lo hace con *J. scopulorum*. En cualquier caso resulta que *J. blancoi* es parafilético con el marcador *trnC-trnD*.

Dada la escasa cantidad de variación disponible para la máxima verosimilitud es posible que la agrupación del H5 con *J. virginiana* sea artificial, ya que está dada únicamente por la posición 271 (Tabla 4) y ésta bien podría ser homoplásica. En el análisis con máxima parsimonia tal sitio no tiene tanto peso ya que los *gaps* aportan información suficiente para resolver el árbol. Para comprobar esta suposición se repitieron las pruebas pero excluyendo la posición 271: con máxima verosimilitud el nodo que mostraba al H5 y al clado de *J. virginiana* dejó de sostenerse y el H5 quedó no resuelto junto con los H1 a H4, H8 y *J. scopulorum*; mientras que la topología con máxima parsimonia no se alteró. Por dichos motivos se eligió el árbol de máxima parsimonia como una mejor reconstrucción.

Los haplotipos de *J. blancoi* para la región *trnC-trnD* son al parecer monofiléticos, pero dado que el nodo del H5 no se resuelve no podemos afirmarlo por completo ya que queda la posibilidad de que la relación con *J. scopulorum* lo vuelva polifilético. De cualquier modo estos resultados difieren de árbol bayesiano mencionado en la introducción (Figura 3; Adams, 2008) a pesar de que comparten uno de los marcadores.

Es bastante probable que *J. scopulorum* y *J. virginiana* sean efectivamente las especies hermanas de *J. blancoi* dado que morfológica, genética y geográficamente se agrupan juntos (Adams, 2008). El que en el presente análisis *J. scopulorum* y *J. virginiana* estén definidos en grupos monofiléticos (y separados por varias autapomorfías en el segundo caso) es un indicio de que son taxa que divergieron más temprano, lo cual se apoya a su vez con el hecho de que, si se toman en cuenta los *indels*, no hay polimorfismo compartido: en otras palabras se ha generado mediante mutación suficiente variación en sus poblaciones para que la deriva génica (dados el aislamiento y el bajo flujo génico) la haya repartido en linajes distintos (Avice, 2000) Sin embargo, si tomamos en cuenta únicamente las sustituciones

entonces sí existe polimorfismo compartido y resulta que no ha pasado suficiente tiempo para que se complete el reparto de linajes.

Por otro lado, tanto el número de individuos utilizados (Maddison y Knowles, 2006) como su representación dentro de la distribución de la especie se consideran elementos que pueden alterar de manera importante los resultados de un análisis filogenético, sobre todo en especies de reciente divergencia que pueden tener polimorfismo compartido. Por lo tanto, los resultados encontrados podrían ser el efecto del muestreo: se incluyeron todas las poblaciones de *J. blancoi* con más de 20 individuos, mientras que las secuencias de las otras especies se obtuvieron de sólo tres y de la misma área geográfica por taxa, cuando la distribución de estas especies es de las más extensas y contiguas en los juníferos americanos, sobretodo si se le compara con *J. blancoi*. *Juniperus scopulorum* habita desde Canadá hasta México, a lo largo de 14 estados de EEUU en las Montañas Rocallosas y áreas contiguas; y *J. virginiana* se encuentra en prácticamente todo el este de EEUU.

Los RAPDs y los terpenoides tienen sus propios problemas metodológicos (Hadrys et al., 1992) por lo que la comparación con resultados obtenidos con secuencias no puede hacerse directamente. Sin embargo, también podemos sumar la variante del muestreo a las diferencias entre las topologías de la Figura 7. El primer análisis se hizo con muestras de Durango, Colorado y Soda Springs, Idaho, EEUU para *J. scopulorum* y Washington, D.C. y Waco, Texas, EEUU para *J. virginiana*. El segundo con individuos de Kamas, Utah para *J. scopulorum* (Adams, 2007) y Hewitt, Texas para *J. virginiana* (Adams et al., 2008). De igual modo, en el presente estudio se ocuparon muestras de Marion, Arkansas y Santa Fe, New Mexico, EEUU para *J. virginiana* y *J. scopulorum*.

Como hemos visto, las relaciones filogenéticas entre *J. blancoi* y sus especies hermanas sugeridas hasta ahora no han sido definidas por completo y requieren de un análisis de filogeografía comparada mucho más amplio que los que se han realizado. Por otro lado, obtener esta clase de resultados con secuencias de ADN no es del todo inesperado, ya que las genealogías de genes no necesariamente reflejan la genealogía de la especie si los taxa han divergido hace poco tiempo (Maddison y Knowles, 2006; Degnan y Rosenberg, 2009; Pleines et al., 2008), como podría ser el caso de este grupo de especies.

Sin embargo, el objetivo inicial de incluir este análisis en el presente estudio era determinar las relaciones filogenéticas de los haplotipos de *J. blancoi*. Bajo esta óptica puede concluirse que el haplotipo

más basal sería el H5; que los más derivados son los H2, H3 y H4 y que existen dos clados donde están los H1 a H4 y H8 por un lado y los H6 y H7 por el otro.

7.6 Análisis filogeográfico de clados anidados

La distribución geográfica de los haplotipos coincide bastante con el anidamiento de los clados y éste con los grupos delimitados por SAMOVA. Esto no sólo implica que la asociación geográfica es real, sino que podemos analizar la distribución actual en función de los grupos detectados.

En los clados 1-1 y 2-1 el análisis realizado con *Geodis* llevó a la inferencia de aislamiento por distancia con flujo génico restringido. Un argumento a favor del flujo génico restringido es que existen haplotipos privados (y en una frecuencia alta) entre poblaciones cercanas, por lo que puede afirmarse que no existe flujo génico al menos en la actualidad. La prueba de Mantel entre las poblaciones de la FVTM más Río Patitos, Zac. también favorece esta hipótesis, y el que no fuera significativa al hacerla sólo entre las de la FVTM puede deberse a tres factores: 1) al reducido tamaño (3x3) de las matrices comparadas, 2) a la manera de medir la distancia geográfica o 3) a que el aislamiento sea por barreras geográficas. Al respecto del segundo punto, Fetzner y Crandall (2003) sugieren que en el caso de las especies ribereñas y costeras las distancias geográficas no pueden calcularse simplemente con las coordenadas geográficas, sino que debe medirse el cauce del río o costa hasta conectar las dos poblaciones entre sí (distancias río), ya que esto describe mejor la realidad geográfica y puede llevar a conclusiones diferentes a la hora de hacer, por ejemplo, una prueba de Mantel. De este modo, aunque con las distancias geográficas las poblaciones de *J. blancoi* ya están bastante separadas entre sí, con las distancias río esto sería mucho mayor. Por ejemplo, entre San José del Rincón y P. Brockman la distancia geográfica es de 12.5 km y la $F_{ST} = 0.1563$, pero si fuera posible medir la distancia río ésta sería mucho mayor, es decir, aunque las poblaciones estén geográficamente cercanas se encuentran ecológicamente aisladas. El método mencionado no pudo aplicarse ya que incluso entre las poblaciones que se encuentra en la misma cuenca conectar los arroyos entre sí resultó imposible. Esto puede favorecer al tercer punto pues nos habla del papel de la hidrografía como barrera geográfica y la importancia de la deriva génica y el pequeño tamaño efectivo de población en la historia de la especie.

La inferencia del clado 1-3, formado por las dos poblaciones de Durango y la de Cerro Mohinora, no pudo discernir entre movimiento a larga distancia y expansión continua de la distribución seguida de

fragmentación. La variedad *J. blancoi* var. *huehuentensis* se encuentra sólo en dos cerros: el Huehuento y el Mohinora. En estos, el primero es monomórfico (H7) en el marcador *trnC-trnD*, lo cual sugiere que es producto de un cuello de botella que permaneció aislado, de manera que la diversidad disminuyó por deriva génica y la falta de flujo génico la mantuvo (Ledig, 2000) mientras que el segundo tiene también al H7 más otros dos únicos; la tercera población presente en el clado 1-3 (El Salto) se divide entre el H7 y el H6. La distancia geográfica entre las poblaciones involucradas va de 41 a 157 km (Tabla 5) y el movimiento a larga distancia podría imaginarse sólo como dispersión por aves, si esto sucediera se esperaría una mayor presencia de la especie en las áreas intermedias con condiciones favorables entre dichas poblaciones (Figura 9). Dado lo anterior, es más factible pensar que ocurrió una expansión continua de la distribución seguida de fragmentación. Siguiendo esta hipótesis, puede plantearse que el aislamiento, más que por distancia o por discontinuidad de condiciones ambientales, se debiera a que el relieve conduce los arroyos por microcuencas distintas, lo que constituye una barrera geográfica. Por otro lado, hay que mencionar que las plantas de los cerros Huehuento y Mohinora tienen un hábitat peculiar (en la cima y laderas del cerro, sin asociarse a un arroyo) y presentan diferencias morfológicas importantes que podrían interpretarse como una adaptación al frío (Adams et al., 2006) diferenciada genéticamente o que podrían ser plasticidad fenotípica. Modelo interesante para jardines comunes.

En el clado 2-2 se llegó a la inferencia de fragmentación alopátrica, misma que podría entenderse como una división Este-Oeste dentro de la SMO: el clado 1-2 geográficamente corresponde a la vertiente Oriente, ya que ahí se encuentra la población del Río Patitos y la de Yécora, que actualmente está en el lado occidente, pero en una zona cuyas corrientes se piensa fluían antes hacia el Río Bravo hasta que fueron capturadas por la SMO (West 1964; de Cserna y Álvarez 1995); mientras tanto, el clado 1-3 está en El Salto y en los cerros Huehuento y Mohinora, en la vertiente occidente (poblaciones que pertenecen a la variedad *J. blancoi* var. *huehuentensis* y que tienen un hábitat distinto del resto). El Salto está en la vertiente oriente fisiográficamente (gran meseta de la SMO) pero en la occidente desde el punto de vista hidrográfico, flanco en que también se localizan las poblaciones de los cerros. Considerando esto, la barrera geográfica sería no sólo la orografía misma de la sierra, sino la consecuencia que ésta tiene sobre los escurrimientos de agua. La separación parece ser drástica y muy antigua, ya que hay varios haplotipos no muestreados (que incluso forman un clado, el 1-5) separando los linajes.

La inferencia en el cladograma total no fue clara entre a) colonización a larga distancia, b) mayor área de distribución en el pasado combinada con subsecuentes extinciones en algunas áreas geográficas intermedias o c) expansión continua del área de distribución seguida de fragmentación. Las dos últimas opciones parecen más adecuadas para la especie: podría plantearse una migración Norte-Sur con subsecuentes extinciones hasta llegar a la fragmentación actual. Lo anterior dado que parece que los mecanismos de dispersión de la especie no le permitirían realizar colonizaciones a larga distancia, mientras que una expansión continua o una mayor área de distribución seguidas de fragmentación son más plausibles. Para tal hipótesis Río Patitos resulta un factor importante, ya que sus haplotipos se encuentran tanto en el clado 2-1 como en el 2-2, lo cual la vuelve un vínculo entre la SMO y la FVTM.

De forma independiente al anidamiento de clados la red de haplotipos de *J. blancoi* brinda por sí misma resultados interesantes. Acorde a predicciones de la teoría de genética de poblaciones, se ha planteado que es más probable que el haplotipo ancestral sea el que: tenga una mayor distribución geográfica, sea el más abundante, tenga el mayor número de conexiones y esté al centro de la red; mientras que más recientes serán aquellos que se encuentren en las puntas, en menor frecuencia y menos distribuidos geográficamente (Posada y Crandall, 2001). En este caso el haplotipo más abundante (H5, con 32 individuos) es una punta y se encuentra únicamente en dos poblaciones cuya distancia geográfica es alta. Además, otros dos haplotipos (H1 y H7 con 28 y 31 individuos, respectivamente) son casi igual de abundantes. El H1 tiene la mayor representación geográfica y se encuentra al centro de la red, mas no es el más conectado (Tabla 6 y Figura 13). Gracias a los árboles filogenéticos (Figura 11 y Figura 12) podemos plantear la hipótesis de que el H5 es el ancestral y de no ser por dicho análisis no hubiera sido posible determinarlo, pues ninguno cumple cabalmente con las mencionadas características de los haplotipos ancestrales. Este tipo de incongruencias coincide con lo encontrado con una serie de simulaciones donde sólo ocasionalmente el haplotipo ancestral coincide con el más abundante (Alavez Gómez, 2008), por lo que podría plantearse como un ejemplo de dicho fenómeno. Así mismo, ese mismo estudio surgiere que la tasa de mutación y el tamaño efectivo influyen en dicha proporción, pues la probabilidad de que el haplotipo más ancestral sea el más abundante incrementa mientras menor sea el tamaño efectivo de las poblaciones y más lenta sea la tasa de mutación (Alavez Gómez, 2008).

Por otro lado, si se observa el origen de la abundancia de los haplotipos de *J. blancoi* se encuentra un patrón interesante: el H5 y el H7 elevan sus números gracias a que se encuentran hijos

respectivamente en las poblaciones de Yécora y Cerro Huehuento, localidades que justo fueron diferenciadas a nivel de variedad según análisis morfológicos, de terpenoides y RAPDs (Adams 2000; Adams et al., 2006). Al final, más allá de las consideraciones teóricas, tal vez el origen de la discrepancia en las características del haplotipo ancestral en esta muestra sea que existen tres linajes que se separaron o que se están separando.

7.7 Demografía histórica

Realizar análisis de demografía histórica en *J. blancoi* con la región *trnC-trnD* resultó ser complicado debido a la naturaleza de los datos. A pesar de que los análisis serían más claros con un marcador más variable, los presentes resultados sí pueden discutirse y encaminarse a una conclusión sobre los procesos históricos por los que han atravesado sus poblaciones.

Si analizamos a la especie en toda su distribución ni la prueba *D* de Tajima ni el análisis de diferencias pareadas fueron significativos. Esto último significa que la hipótesis de crecimiento poblacional se rechaza e implica cualquiera de las dos cosas: o que el tamaño poblacional se ha mantenido constante o que está disminuyendo.

La anterior información se basa únicamente en las sustituciones ya que el modelo teórico en que se enmarcan tanto las pruebas de neutralidad como el análisis de diferencias pareadas es el modelo de sitios infinitos, y por ende están ligadas a la tasa de mutación. La frecuencia con la que ocurren las sustituciones ha sido estudiada en diversas especies y en distintos tipos de genomas (Hartl y Clark 2007) pero aún desconocemos la tasa de mutación de las inserciones-delecciones, debido entre otras cosas a que pueden originarse por varios tipos de cambios microestructurales (Müller, 2006) todavía no bien estudiados. Por lo tanto los *gaps* se excluyen de los análisis de demografía histórica que requieren de una tasa de mutación, sin embargo, los datos del presente estudio permiten realizar algunas conjeturas:

Si dibujáramos nuevamente la red de haplotipos considerando únicamente las sustituciones tendríamos tres haplotipos (el H8 está en un sitio que tiene una inserción, por lo que se descarta) que se unirían del siguiente modo: H7'-H1'-H5'. El haplotipo H1' incluiría a los originales haplotipos H1, H2, H3, H4; el H7' al H6, H7, H9 y H10 y el H5' al H5. La primera consecuencia es que el número de sitios polimórficos y de haplotipos se reduce de $S = 10$ a $S = 2$ y $k = 8$ a $k = 3$, y la segunda es que desaparecen los haplotipos no muestreados. En otras palabras el mayor número de mutaciones está dada por los

indels, esto, si bien no nos permite establecer una tasa de mutación (más considerando que no todos los *indels* de la muestra son del mismo tipo) sí nos habla de que la frecuencia con que ocurren en este fragmento probablemente sea mayor que la de las sustituciones.

Diferentes tasas de sustitución nos cuentan diferentes historias, o la misma, pero en distintos tiempos (Pleines et al., 2008). De modo que la conclusión del análisis de diferencias pareadas de que no hay una expansión demográfica debe plantearse como un fenómeno histórico más antiguo que el que posiblemente tuvo lugar en la FVTM.

Como se mencionó, la mayor diversidad se encontró en las poblaciones del sur que conforman el grupo de la FVTM. El crecimiento poblacional retiene la diversidad genética que de otra manera se perdería por deriva génica (Harpending, 1994) por lo que lo común es que la mayor diversidad se encuentre en las poblaciones que han mantenido históricamente tamaños poblacionales grandes y flujo génico entre ellas (Eckert et al., 2008). Dichas condiciones se cumplen con mayor frecuencia en el centro de la distribución de la especie (Eckert et al., 2008), mismo que suele asociarse con el centro de origen, por un lado, y por el otro en refugios o en frentes de colonización provenientes de distintos refugios (Petit et al., 2003). Dado que las coníferas, incluidos los juníperos, llegaron a México en una migración desde el Norte (Qian 2002; Adams et al., 2008) podemos descartar que la FVTM sea el centro de origen, además, como hemos visto la mayoría de los haplotipos presentes ahí (H2, H3, H4 y H8) son más derivados que los de los grupos de poblaciones de la SMO, y además el ancestral (H5) es también el más norteño (Figura 12 y Figura 13). De modo que podríamos manejar que la especiación ocurrió en la SMO de un ancestro que llegó del norte y que la FVTM constituye una especie de refugio. Una evidencia a favor sería demostrar que en esta última área hubo un crecimiento poblacional, pero como hemos visto ni la prueba de diferencias pareadas ni las pruebas de neutralidad pueden realizarse considerando los *gaps*, por lo que se requeriría de un marcador distinto para hacer dichas pruebas. Sin embargo, la red de clados anidados (Figura 14) muestra una ligera forma de estrella en el clado 1-1, formado por haplotipos exclusivos del sur. Esto sugiere, si bien no una gran explosión demográfica, tamaños poblacionales mayores que los encontrados en los clados 1-2 y 1-3.

Por otro lado, los resultados del análisis con BEAST son sumamente interesantes aunque deben manejarse con cuidado. El tamaño efectivo de la población, de aproximadamente 3.3 millones (Tabla 10), debe considerarse como el número efectivo de individuos machos, ya que el marcador de ADNcp

utilizado se hereda paternamente y la especie es dioica (en una proporción 1:1 entre ambos sexos, según las observaciones de campo). Esto implica que el de la población total sería el doble, es decir, al rededor de $N_e = 6.6$ millones de individuos. Esto es muy grande y distinto de la realidad actual de la especie.

El tamaño efectivo de una población moderna es el número de individuos que tendría una población ideal (población Wright-Fisher) bajo las condiciones de deriva génica por las que ha pasado la ancestral (Hartl y Clark, 2007). El tamaño efectivo de la población por lo general se encuentra por debajo del número presente de individuos (Hartl y Clark, 2007) ya que es un dato histórico que refleja el efecto de la deriva génica a lo largo de las fluctuaciones de tamaño de las poblaciones. De ahí se desprende que la media aritmética ($N_e = 3.3$ Ma) y la media geométrica ($N_e = 2.6$ Ma) difieren entre sí (Tabla 10): la geométrica tiende a ser dominada por los valores pequeños y por ende es más sensible a los cuellos de botella o momentos de menor tamaño poblacional. Esto, sumado a la demografía actual de la especie, es un indicador de que han existido fluctuaciones drásticas en su tamaño poblacional: aunque hoy se cuenta en a penas miles de individuos puedo llegar a ser una especie de millones. Esto pudo ocurrir durante la primera parte del Pleistoceno, cuando existía una presencia más grande de cuerpos y corrientes de agua en la SMO y en la FVTM (Figura 4b). Sin embargo, hay que señalar que tanto el estimado y el programa con el que se obtuvo (BEAST), no toman en cuenta la estructura, es decir consideran el número de haplotipos y tamaño de muestra como si pertenecieran a una única población panmíctica, por lo que posiblemente el verdadero tamaño efectivo de la población sea mucho menor. Por otro lado, la cantidad de variación (sustituciones) con que se realizó, no fue muy grande. Consideraciones como estas son importantes al realizar este tipo de análisis.

Independientemente de lo anterior, la especie posiblemente tuvo un tamaño de población más grande que el presente. Esto no implica que la realidad actual sea una clase de decadencia; aunque de escasos individuos y aisladas entre sí, el que las poblaciones de *J. blancoi* generen un tamaño efectivo tan alto indica que desde el punto de vista de su diversidad genética la especie no se encuentra erosionada. Siguiendo este punto de vista, su rareza actual puede verse también como una rareza temporal, tal vez parte de varias fluctuaciones en el tiempo.

Ya en la línea temporal, un aspecto pendiente de discutir y que está relacionado con el tamaño efectivo de la población es el tiempo al ancestro común más cercano. Según el análisis de BEAST éste sería en promedio de $t_{mrcA} = 3.5$ MA (Tabla 10). Este valor debe entenderse como la edad de la raíz del

árbol de los haplotipos, es decir como el punto temporal en el que la variación actual coalesce en un sólo ancestro (que no es lo mismo que la edad de divergencia de la especie). En este caso, el tiempo al ancestro común señala algún momento durante el Plioceno medio y tardío, hace entre 3.5 y 3 Ma, lo que favorece la hipótesis de que durante los inicios del Pleistoceno existió un tamaño de población tal que permitió la generación de la diversidad genética que genera el tamaño efectivo de la población que vemos hoy.

7.8 Hipótesis filogeográfica

Concretar en una sola explicación la información discutida en los puntos anteriores es precisamente el objetivo final de la filogeografía y pasa por incluir varias historias dentro de una misma:

La población ancestral de *J. blancoi* se estableció en el noroeste de México en la SMO. La inferencia según el NCPA es que existía una mayor área distribución en el pasado donde ocurrieron extinciones en algunas áreas geográficas intermedias, o bien, que hubo una expansión continua del área de distribución seguida de fragmentación (escenarios que no se contradicen del todo). El análisis de diferencias pareadas señala que no ocurrió un crecimiento poblacional, sin embargo puede ser que éste haya sido menos duradero que lo que la tasa de sustitución nos permite ver y que haya sido seguido por una fuerte fragmentación y extinción de poblaciones, de modo que la deriva génica eliminó gran parte de la variación. Dicho escenario se apoya con la presencia de haplotipos no muestreados (formados por *indels*) para unir al H5, H1 y al clado 1-3 y por la separación en tres grupos distintos según el SAMOVA de las poblaciones de la SMO. De este modo podría plantearse que la población original quedó dividida desde muy temprano al Oeste y al Este de la SMO, y que posteriormente un linaje del Este se extendió hacia el sur por el sistema del Lerma. Las barreras geográficas podrían entenderse como cambios en la configuración de los arroyos, ya que aunque la historia hidrográfica de la SMO está poco estudiada sabemos que durante el Pleistoceno existieron lagos en el noroeste de México que fueron drenados hacia el Pacífico y hacia el este por corrientes que desaparecieron al desecarse la región (West, 1964) y que además el Río San Pedro ha sido tributario del Río Grande de Santiago en varios momentos del pasado (Barbour, 1973).

Juniperus blancoi var. *mucronata*, es decir la población de Yécora en el límite norte de la distribución puede interpretarse como un remanente que quedó aislado cuando la distribución se

fragmentó por la desecación, lo cual concuerda con su diferenciación morfológica al grado de variedad y el que tenga fijo un haplotipo. Si esta localidad fuera efectivamente una especie diferente podríamos plantear al H5 como polimorfismo compartido con *J. blancoi*, fenómeno común entre especies de reciente divergencia (Maddison y Knowles, 2006; Degnan y Rosenberg, 2009). Del mismo modo, *J. blancoi* var. *huehuentensis*, puede estar también en la frontera de un proceso de especiación como consecuencia de la introgresión, el aislamiento y las diferencias ambientales. Esta variedad, originalmente se creía endémica del Cerro Huehuento en Durango (Adams et al., 2006), pero la población colectada para este estudio en el Cerro Mohinora presenta las mismas características morfológicas y comparte uno de sus haplotipos (H7), por lo que fue considerada como *J. blancoi* var. *huehuentensis*. Sobre esta línea, sobresale que el Cerro Mohinora presenta mayor diversidad genética en comparación con el Cerro Huehuento y contiene haplotipos únicos, lo que coincide con el patrón de decremento de la diversidad Norte-Sur esperado para poblaciones de una conífera y apoya la idea de que esta variedad es un linaje que podría estar siguiendo un camino evolutivo independiente del resto de las poblaciones. Sin embargo, no es posible realizar tal aseveración con tan sólo dos puntos de muestreo, pues dicho patrón podría ser sólo un artefacto.

En cambio, la población del Río Patitos puede representar los restos de una distribución de *J. blancoi* más amplia que se vio fuertemente fragmentada, de modo que la deriva génica eliminó la mayoría de los haplotipos (que podrían ser los no muestreados entre el H5 y el H1) y dejó sólo los probablemente más abundantes en ese entonces. En cambio las poblaciones de la FVTM parecen haberse mantenido en mejores condiciones que sus símiles de la SMO ya que hay menos evidencia de cuellos de botella.

El que el tamaño efectivo de la población encontrado (a pesar de los problemas del método) sea tan grande (al rededor de 6.6 millones de individuos entre individuos machos y hembras, ver Tabla 10) favorece la hipótesis de que existieron poblaciones extensas que posteriormente se fragmentaron, y no soporta la de que la distribución actual se deba a eventos de colonización a larga distancia, pues bajo tal escenario se esperaría un tamaño efectivo de la población mucho más pequeño causado por efecto fundador.

Si bien actualmente existe una discontinuidad entre los bosques de coníferas y encinos de la SMO y los de la FVTM dada por la Altiplanicie Mexicana (misma que presenta selva baja caducifolia y matorral

xerófilo en dicho límite) la evidencia paleoclimática mencionada en los antecedentes sugiere que dicha área pudo estar cubierta por bosques de coníferas y encinos que incluyeran juníperos (Lozano-García et al., 2005), dentro de los que podríamos esperar encontrar ya establecidas poblaciones de *J. blancoi*, pues el tiempo al ancestro común más cercano entre los haplotipos estudiados es de $t_{mrcá} = 3.5$ Ma. Actualmente, la población de Río Patitos y dos de las de la FVTM se encuentran en la misma región hídrica (Lerma-Santiago) cuya historia podría bien dictar cómo se fragmentó la especie: sabemos que durante la última etapa pluvial del Pleistoceno (Figura 4c) existían una serie de lagos menores, un gran lago y mayores sistemas de arroyos en las actuales depresiones del Bajío, Chapala y Sayula (West, 1964), que es justo el área intermedia entre la población de Río Patitos y las de la FVTM. Después, hace menos de un millón de años, la actividad volcánica transformó la hidrografía de dicha zona pues el cauce del antiguo Río Lerma fue bloqueado y separó a las cuencas de los ríos Naranjo-Coahuayana y Lerma, esta última formó durante un tiempo al paleolago Jalisco que finalmente fue capturado por un tributario del Río Verde y drenado hasta formar el actual sistema Lerma-Santiago (de Cserna y Álvarez, 1995).

La separación de la población de La Preciosita en una región hidrográfica distinta (Balsas) (Figura 6) es más difícil de explicar geológicamente ya que el Balsas y el Lerma se separaron durante el Mioceno Tardío-Plioceno Temprano (hace al rededor de 7-5 Ma) lo cual se remonta demasiado atrás en el tiempo. Sin embargo, la población mencionada se encuentra separada de la región hidrográfica del Lerma-Santiago por la Cuenca del Valle de México, que hasta hace 700 000 años (Pleistoceno Medio) fluía aún hacia el Balsas (Mooser, 1975) y que probablemente durante el Pleistoceno tardío (100 000 años) tenía una conexión por el noroeste hacia los Llanos de Puebla y de Apan (Barbour, 1973).

7.9 Influencia de factores socioeconómicos y ambientales en el estado de conservación

Según la Lista Roja del IUCN *J. blancoi* se encuentra en un estado vulnerable, es decir no está en peligro de extinción pero existe el riesgo de que lo esté en un futuro próximo, ya que sus poblaciones son pocas, pequeñas y ocupan un área reducida. Como consecuencia de tal rareza en su distribución espacial, *J. blancoi* podría ser especialmente sensible a los efectos de las actividades humanas y así extinguirse o quedar en peligro crítico de hacerlo. Conocer el presente social y ambiental de las poblaciones es una herramienta necesaria para evitar lo anterior, pues permite no sólo identificar las localidades más amenazadas, sino además discernir entre los factores que han favorecido la conservación de los que no.

La principal amenaza que enfrenta *J. blancoi* es el cambio de uso de suelo y no, a diferencia de en muchas otras coníferas, la tala para obtención de madera. Lo anterior se debe a que la especie presenta en su mayoría troncos sin un fuste recto, por lo que a pesar de que su madera no se pudre con dificultad, no es un árbol explotado comercialmente. El cambio de uso de suelo de bosques a terrenos agrícolas o pecuarios, en cambio, implica la destrucción la vegetación original. Si bien gran parte de los arroyos que cruzan parcelas agropecuarias han perdido la vegetación ribereña de los 5 metros reglamentarios de zona federal (artículo 3, sección XLVII de la Ley de Aguas Nacionales), algunos propietarios la conservan para proteger al cuerpo de agua de la erosión. El hecho de que *J. blancoi* no sea una especie maderable comercialmente y que crezca en la orilla de arroyos puede ser la combinación de factores por los que poblaciones de tan reducido tamaño hayan sobrevivido hasta ahora aún en zonas agropecuarias.

Por otro lado, para el país en general se ha encontrado que las zonas con mayor cobertura antrópica (cultivos, pastizales ganaderos y asentamientos agrícolas) y vegetación secundaria están generalmente cerca de las poblaciones humanas, pues son más accesibles y han sido utilizadas históricamente para actividades económicas, mientras que las barrancas y las cúspides de montañas y cerros permanecen con su vegetación original (Semarnat, 2003). Lo anterior coincide en gran medida con la situación de *J. blancoi* (Tabla 11), pues justamente las poblaciones con menos asentamientos humanos cercanos y en terrenos difíciles de acceder (cimas de cerros, cañadas de ríos muy rocosas) son las que se encuentran en buenas condiciones y que están en una categoría de bajo riesgo (Cerro Huehuento, Cerro Mohinora, Río Patitos y Yécora); mientras que las que están en una zona mucho más rodeada de asentamientos y que se utiliza para la agricultura o ganadería son las más amenazadas (Presa Brockman, San José del Rincón y El Salto, aunque ésta última no está entre tantos pueblos, se encuentra en las cercanías de uno muy grande).

Sin embargo, se encontró que dichos factores, si bien influyen sustancialmente, no determinan por completo la situación, pues la historia particular de cada localidad es también muy determinante, y está dada por la tenencia de la tierra y el destino que localmente se le asignó. En este sentido sobresale La Preciosita, pues a pesar de estar en una de las zonas más transformadas del país (más del 60% del territorio con cobertura antrópica, (Semarnat, 2003), se encuentra dentro de un bosque de pino-encino bien conservado.

8 Conclusiones

Juniperus blancoi es una especie distribuida en tan sólo ocho poblaciones muy separadas entre sí y formadas por pocos individuos, tal rareza es natural y responde a los procesos históricos por los que ha atravesado.

La especie demostró ser un gran modelo biológico para la filogeografía que puede seguir siendo abordado para responder otras preguntas. A pesar de que la región de ADNcp *trnC-trnD* presentó pocas sustituciones (pues con más hubiera sido posible realizar un mejor análisis de la demografía histórica y de las relaciones filogenéticas) se encontró otro tipo de variación que resultó muy útil para cuantificar la estructura y diferenciación entre las poblaciones y para realizar un análisis filogeográfico de clados anidados.

Probablemente a finales del Plioceno *J. blancoi* contaba con poblaciones de tamaño muy grande (sugerido por un $N_e = 3.3 \times 10^6$ de machos y un $t_{mrcA} = 3.5$ Ma) que se mantuvieron durante un tiempo, pero que posteriormente se vieron fragmentadas de modo drástico y en diferentes eventos durante el Pleistoceno. Lo anterior se refleja en una fuerte diferenciación genética ($F_{ST} > 0.5$ en la mayoría de las comparaciones pareadas y $F_{ST} = 0.79469$ global), en la estructuración de la especie en cinco grupos SAMOVA y en el reconocimiento de dos variedades además de la tipo.

Los factores que influyeron en tal proceso de fragmentación parecen ser una combinación de su hábitat ribereño y de los aspectos biológicos de su dispersión. En los últimos 3.5 Ma han ocurrido cambios orográficos y climáticos en la FVTM y la SMO, de modo que la dirección de los escurrimientos y los límites de las cuencas han variado hasta alcanzar su conformación actual, las poblaciones de *J. blancoi* pudieron separarse entre sí por barreras geográficas causadas por la formación de las cuencas, y reducir su tamaño tras la desecación de las condiciones al final del Pleistoceno, lo que favoreció la diferenciación causada por deriva génica. Por otro lado, la dispersión de la especie parece ser reducida y podría explorarse la hipótesis de que ésta no sólo esté restringida por las corrientes de agua, sino que dependa de mamíferos pequeños (como las tuzas) que se caracterizan por tener poca movilidad y altos niveles de diferenciación. La red de clados anidados y la reconstrucción filogenética muestran que existen tres linajes que marcan la estructuración y diferenciación de la especie. Pero además se encontró una alta frecuencia de haplotipos únicos, lo que indica que, cuando menos recientemente, no existe flujo génico

entre las poblaciones, por lo que aún las más cercanas se encuentran aisladas. Dado todo lo anterior, es recomendable evaluar su inclusión en la NOM-059.

Por otro lado, la localidad tipo (El Salto) no sólo se encuentra en malas condiciones, sino que su diversidad genética acorde al marcador utilizado en este estudio es baja. Esto implica dos cosas: los individuos que deberían utilizarse como referencia taxonómica podrían desaparecer, y el "*J. blancoi* de referencia" es una población aislada dentro de la SMO que representa sólo una parte de la variación y de la historia de la especie.

Plantear que una especie rara es un conjunto de "poblaciones solitarias" altamente fragmentadas y diferenciadas entre sí tiene consecuencias para el entendimiento y la conservación no sólo del grupo taxonómico sino de su hábitat en general: 1) la rareza puede ser de origen natural y caracterizarse por niveles altos de diversidad genética, tamaño efectivo de la población y diferenciación, 2) especies como esta son un gran modelo para los estudios filogeográficos y brindan buena información sobre la historia de sus hábitats, 3) las poblaciones fragmentadas y aisladas son más proclives a diferenciarse entre sí y pueden estar cerca de procesos de especiación, 4) cada población tiene relevancia evolutiva y la extinción de cualquiera es una pérdida importante, lo que torna a la especie más vulnerable y hace que sea inane proteger a sólo un subconjunto de sus poblaciones, 5) la distribución geográfica de especies como esta responde más a procesos históricos que a su capacidad de dispersión reciente, por lo que debería considerarse como un elemento que eleve la importancia biológica la región, y 6) conservar unas poblaciones pequeñas de una especie aparentemente poco relevante es resguardar una historia evolutiva muy compleja.

Por otro lado, además de la historia filogeográfica, la escala temporal debe ajustarse a los tiempos humanos y prestar atención a las condiciones socioeconómicas y ambientales bajo las que persiste cada población, pues es información relevante que rara vez se considera en este tipo de estudios, pero que se requiere para construir estrategias de conservación y manejo. Particularmente en México necesitamos conocer y comprender el entorno geográfico y social de las zonas donde se encuentra la mayor diversidad genética de cada ecosistema, pues dichos espacios han sido cruciales durante los cambios orográficos y climáticos que caracterizan -y moldean- la historia evolutiva de nuestra biodiversidad, y su futuro depende del contexto humano que actualmente las rodea.

9 Referencias

- Adams, R.P. (2000) Systematics of smooth leaf margin *Juniperus* of the western hemisphere based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 (2), págs. 149-162.
- Adams, R.P. (2008) *Junipers of the world: The genus Juniperus*. Segunda Edición. Trafford Publishing.
- Adams, R.P., González Elizondo, M.S., González Elizondo, M. y Slinkman, E. (2006) DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34 (3), págs. 205-211.
- Adams, R.P. (2007) *Juniperus maritima*, the seaside juniper, a new species from Puget Sound, North America. *Phytologia*, 89 (3), págs. 263-283.
- Adams, R.P., Morris, J.A. y Schwarzbach, A.E. (2008) The evolution of Caribbean *Juniperus* (Cupressaceae): terpenoids, RAPDS and DNA SNPs DATA. *Phytologia*, 90 (1), págs. 103-119.
- Adams, R.P. y Zanoni, T. (1979) The distribution, synonymy and taxonomy of three junipers of southwestern United States and northern Mexico (*Juniperus*, Cupressaceae). *Southwestern Naturalist*, 24, págs. 323-329.
- Alavez Gómez, V. (2008) Evolución de microsátélites de cloroplasto en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae*: efecto del ligamiento en la estimación de parámetros poblacionales y aplicaciones en genética de poblaciones. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.
- Avice, J.C. (2000) *Phylogeography the history and formation of species*. Harvard University Press Cambridge, MA.
- Barbour, C.D. (1973) A biogeographical history of *Chirostoma*: a species flock from the Mexican Plateau. *Copeia*, 3, págs. 533-556.
- Caballero, M. y Guerrero, B.O. (1998) Lake levels since about 40,000 years ago at Lake Chalco, near Mexico City. *Quaternary Research*, 50 (1), págs. 69-79.
- Chassin-Noria, O., Abreu-Grobois, A., Dutton, P.H. y Oyama, K. (2004) Conservation genetics of the east pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacan, Mexico. *Genetica*, 121 (2), págs. 195-206.
- Clement, M., Posada, D. y Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9 (10), págs. 1657-1659.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO] (2006) Grado de marginación a nivel localidad, 2000. Disponible en:

- <http://conabioweb.conabio.gob.mx/metacarto/info_completa.pl?id=508> [Accedido 23 Julio 2009].
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO] (1999) Uso de suelo y vegetación modificado por CONABIO.
- Comisión Nacional del Agua (1998). Cuencas hidrológicas. Escala 1:250000. Versión digital CONABIO.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R., Mace, G.M. y Wayne, R.K. (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology y Evolution*, 15 (7), págs. 290–295.
- Cronquist, A., Holmgren, A., Holmgren, N.H. y Reveal, J. (1972) *Intermountain flora: Vascular plants of the Intermountain West USA*. Vol. 1: Geological and botanical history of the region, its plant Geography and a glossary. New York, EEUU, Hafner Publishing Company, pág. 717.
- de Cserna, Z. y Álvarez, R. (1995) Quaternary drainage development in Central Mexico and the threat of an environmental disaster: A geological appraisal. *Environmental and Engineering Geoscience*, 1, págs. 29-34.
- Cuenca, A., Escalante, A.E. y 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), págs. 2087-2097.
- Curtis, S. y Clegg, M. (1984) Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1 (4), págs. 291-301.
- Degnan, J.H. y Rosenberg, N.A. (2009) Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology y Evolution*, 24 (6), págs. 332-340.
- Delgado, P., Eguiarte, L., Molina-Freaner, F., Alvarez-Buylla, E. y Piñero, D. (2008) Using phylogenetic, genetic and demographic evidence for setting conservation priorities for Mexican rare pines. *Biodiversity and Conservation*, 17 (1), págs. 121-137.
- Delgado, P., Salas-Lizana, R., Vázquez-Lobo, A., Wegier, A., Anzidei, M., Alvarez-Buylla, E.R., Vendramin, G.G. y Piñero, D. (2007) Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae): Morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences*, 168 (6), págs. 861-875.
- Demastes, J.W., Spradling, T.A., Hafner, M.S., Hafner, D.J. y Reed, D.L. (2002) Systematics and phylogeography of pocket gophers in the Genera *Cratogeomys* and *Pappogeomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22 (1), págs. 144-154.

- Demesure, B., Sodji, N. y Petit, R.J. (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4 (1), págs. 129-134.
- Drummond, A. y Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7 (1), pág.214.
- Dupanloup, I., Schneider, S. y Excoffier, L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11 (12), págs. 2571-2581.
- Eckert, C.G., Samis, K.E. y Loughheed, S.C. (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17 (5), págs. 1170-1188.
- Ersts, P.J. *Geographic Distance Matrix Generator*. American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Disponible en: <http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg> [Accedido 26 Marzo 2009].
- Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. (2007) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 2005 (EBO-1-Excoffier(Sc)), pág.0.
- Farjon, A., 2008. *A natural history of conifers*, EEUU: Timber Press.
- Ferrari, L., Valencia-Moreno, M. y Bryan, S. (2007) Magmatism and tectonics of the Sierra Madre Occidental and its relation with the evolution of the western margin of North America. En: S. A. Alaniz-Álvarez y A. F. Nieto-Samaniego eds. *Geology of Mexico: celebrating the centenary of the Geological Society of Mexico*. Geological Society of America (Geological Society of America special papers, no. 442), págs. 1-39.
- Ferrusquía-Villafranca, I. (1998) Geología de México: una sinopsis. En: *Ramamoorthy, T.P. et al (comps). Diversidad biológica de México: Orígenes y distribución*. México, D.F., Instituto de Biología, UNAM.
- Fetzner, J.W. y Crandall, K.A. (2003) Linear habitats and the nested clade analysis: An empirical evaluation of geographic versus river distances using an Ozark crayfish (Decapoda: Cambaridae). *Evolution*, 57 (9), págs. 2101-2118.
- Figueroa Díaz Escobar, M.F. (2008) El contexto socioeconómico y la efectividad de las áreas naturales protegidas de México para contener procesos de cambio en el uso del suelo y la vegetación. Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://132.248.9.9:8080/tesdig2/Procesados_tesis_2008/noviembre/0635611/Index.html> [Accedido 4 Agosto 2009].
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147 (2), págs. 915-925.

- Fu, Y.X. y Li, W.H. (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133 (3), págs. 693-709.
- García, E. (1998a) Climas (clasificación de Koppen, modificado por García). Escala 1:1000000. Versión digital CONABIO, México.
- García, E. (1998b) Precipitación total anual. Escala 1:1000000. Versión digital CONABIO, México.
- Gesundheit, P. y Macías-García, C. (2005) Biogeografía cladística de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes). En: *Llorente-Bousquets J. y Morrone J. (eds). Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y trópicos afines*. págs. 319-338.
- Gibbard, P., Boreham, S., Cohen, K.M. y Moscarrello, A. (2007) Global chronostratigraphical correlation table for the last 2.7 million years v. 2007. Disponible en: <http://www.quaternary.stratigraphy.org.uk/correlation/POSTERSTRAT_v2007b_small.jpg> [Accedido 3 Mayo 2009].
- Gómez, J.D., Etchevers, J.D., Monterroso, A.I., Gay, C., Campo, J. y Martínez, M. (2008) Spatial estimation of mean temperature and precipitation in areas of scarce meteorological information. *Atmósfera*, 21, págs. 35-56.
- Graham, A. (1998) Factores históricos de la diversidad biológica de México. En: *Ramamoorthy, T.P. et al (comps). Diversidad biológica de México: Orígenes y distribución*. México, D.F., Instituto de Biología, UNAM.
- Graham, S.W., Reeves, P.A., Burns, A.C.E. y Olmstead, R.G. (2000) Microstructural changes in noncoding chloroplast DNA: Interpretation, evolution, and utility of indels and inversions in basal angiosperm phylogenetic inference. *International Journal of Plant Sciences*, 161 (6), págs. S83-S96.
- Hadrys, H., Balick, M. y Schierwater, B. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1 (1), págs. 55-63.
- Hafner, D.J., Hafner, M.S., Hasty, G.L., Spradling, T.A. y Demastes, J.W. (2008) Evolutionary relationships of pocket gophers (*Cratogeomys castanops* Species Group) of the Mexican Altiplano. *Journal of Mammalogy*, págs. 190-208.
- Hafner, M.S., Hafner, D.J., Demastes, J.W., Hasty, G.L., Light, J.E. y Spradling, T.A. (2009) Evolutionary relationships of pocket gophers of the genus *Pappogeomys* (Rodentia: Geomyidae). *Journal of Mammalogy*, 90 (1), págs. 47-56.
- Hafner, M.S., Light, J.E., Hafner, D.J., Brant, S.V., Spradling, T.A. y Demastes, J.W. (2005) Cryptic species in the mexican pocket gopher *Cratogeomys merriami*. *Journal of Mammalogy*, 86 (6), págs. 1095-1108.

- Hafner, M.S., Spradling, T.A., Light, J.E., Hafner, D.J. y Demboski, J.R. (2004) Systematic Revision of pocket gophers of the *Cratogeomys gymnurus* species group. *Journal of Mammalogy*, págs. 1170-1183.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, págs. 98, 95.
- Harpending, H. y Rogers, A. (2000) Genetic perspectives on human origins and differentiation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1, págs. 361-85.
- Harpending, H.C. (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology; an International Record of Research*, 66 (4), págs. 591-600.
- Harper, J.L. (1981) The meaning of rarity. En: *The Biological aspects of rare plant conservation*. págs. 190-203.
- Hartl, D.L. y Clark, A.G. (2007) *Principles of population genetics*. Cuarta edición. Sunderland, MA, EEUU, Sinauer Associates.
- Herbert, T.D., Schuffert, J.D., Andreasen, D., Heusser, L., Lyle, M., Mix, A., Ravelo, A.C., Stott, L.D. y Herguera, J.C. (2001) Collapse of the California current during glacial maxima linked to climate change on land. *Science*, págs 71-76.
- Hernández-Leal, M.S. (2009) Variación genética de *Taxodium mucronatum* en las cuencas de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hewitt, G.M. (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography -or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10 (3), págs. 537-549.
- Hewitt, G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405 (6789), págs. 907-913.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. y Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25 (15).
- Hirao, T., Watanabe, A., Kurita, M., Kondo, T. y Takata, K. (2008) Complete nucleotide sequence of the *Cryptomeria japonica* D. Don. chloroplast genome and comparative chloroplast genomics: diversified genomic structure of coniferous species. *BMC Plant Biology*, 8 (1), pág.70.
- Hudson, R.R., Boos, D.D. y Kaplan, N.L. (1992a) A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution*, 9 (1), págs. 138-151.
- Hudson, R.R., Slatkin, M. y Maddison, W.P. (1992b) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132 (2), págs. 583-589.

- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (1995) Edafología.
- IUCN (2009) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. [Internet]. Disponible en: <<http://www.iucnredlist.org>> [Accedido 11 Agosto 2009].
- Jaramillo-Correa, J.P., Aguirre-Planter, E., Khasa, D.P., Eguiarte, L.E., Piñero, D., Furnier, G.R. y 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 (10), págs. 2476-2490.
- Kelchner, S.A. (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87 (4), págs. 482-498.
- Lavery, P.B. y Mead, D.J. (1998) *Pinus radiata*: a narrow endemic from North America takes on the world. En: D. M. Richardson ed. *Ecology and biogeography of Pinus*. EEUU, Cambridge University Press, págs. 432-449.
- Ledig, F. (2000) Founder effects and the genetic structure of Coulter pine. *Journal of Heredity*, 91 (4), págs. 307-315.
- Lee, C. y Wen, J. (2004) Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31 (3), págs. 894-903.
- Lian, C., Miwa, M. y Hogetsu, T. (2001) Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity*, 87 (1), págs. 88-98.
- Little, D.P. (2006) Evolution and circumscription of the true cypresses (Cupressaceae: *Cupressus*). *Systematic Botany*. 31 (3), págs. 461-480.
- Lozano-García, M.S., Ortega-Guerrero, B. y Sosa-Nájera, S. (2002) Mid- to Late-Wisconsin Pollen Record of San Felipe Basin, Baja California. *Quaternary Research*, 58 (1), págs. 84-92.
- Lozano-García, S., Sosa-Nájera, S., Sugiura, Y. 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 (1), págs. 70-82.
- Maddison, W.P. y Knowles, L.L. (2006) Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 55 (1), págs. 21-30
- Maldonado-Koerdell, M. (1964) Geohistory and paleogeography of Middle America. En: *Handbook of Middle American Indians*. Austin, USA, University of Texas Press, págs. 3-32.

- Martínez, M. (1946) Los *Juniperus* Mexicanos. *Anales del Instituto de Biología México*, 17, págs. 3-128.
- McAuliffe, J.R. y Van Devender, T.R. (1998) A 22,000-year record of vegetation change in the north-central Sonoran Desert. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 141 (3-4), págs. 253-275.
- McCoy, S., Kuehl, J., Boore, J. y Raubeson, L. (2008) The complete plastid genome sequence of *Welwitschia mirabilis*: an unusually compact plastome with accelerated divergence rates. *BMC Evolutionary Biology*, 8 (1), pág.130.
- Meloni, M., Perini, D., Filigheddu, R. y Binelli, G. (2006) Genetic Variation in Five Mediterranean Populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Ann Bot*, 97 (2), págs. 299-304.
- Metcalfe, S., Say, A., Black, S., McCulloch, R. y O'Hara, S. (2002) Wet Conditions during the Last Glaciation in the Chihuahuan Desert, Alta Babicora Basin, Mexico. *Quaternary Research*, 57 (1), págs. 91-101.
- Metcalfe, S.E., O'Hara, S.L., Caballero, M. y Davies, S.J. (2000) Records of Late Pleistocene–Holocene climatic change in Mexico — a review. *Quaternary Science Reviews*, 19 (7), págs. 699-721.
- Metcalfe, S.E. (2006) Late Quaternary environments of the northern deserts and central Transvolcanic Belt. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93 (2), págs. 258-273.
- Mogensen, H.L. (1996) The hows and whys of cytoplasmic Inheritance in seed plants. *American Journal of Botany*, 83 (3), págs. 383-404.
- Molina-Freaner, F., Delgado, P., Piñero, D., Pérez-Nasser, N. y Álvarez-Buylla, E. (2001) Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany*, 79 (2), págs. 131-138.
- Mooser, F. (1975) Historia geológica de la Cuenca de México. En: *Memoria de las obras del sistema de drenaje profundo del Distrito Federal*. México, D.D.F.
- Moreno-Letelier, A. y Piñero, D. (2009) Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography*, 36 (1), págs. 121-131.
- Moreno-Letelier, A.C. (2009) Estructura filogeográfica de *Pinus strobiformis* y su relación con los cambios climáticos durante el Pleistoceno. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Müller, K. (2006) Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38 (3), págs. 667-676.

- National Climatic Data Center (2009) *Juniperus virginiana* Leatherwood Creek, Missouri - MO043 [Internet]. Disponible en:
 <ftp://ftp.ncdc.noaa.gov/pub/data/paleo/treering/measurements/correlation-stats/mo043.txt>
 [Accedido 18 Septiembre 2009].
- Neale, D.B., Marshall, K.A. y Sederoff, R.R. (1989) Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D. Don Endl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (23), págs. 9347-9349.
- Nei, M. (1977) *F*-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 41 (2), págs. 225-233.
- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, EEUU.
- Nei, M. y Kumar, S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, EEUU.
- Nepomuceno-Martínez, F., de la Garza López de Lara, P., Mastretta-Yanes, A. y Novelo-Fortanel, P. (2007) Población nativa de *Juniperus blancoi* Martínez en el estado de Puebla, México. En: *Modalidad Oral*. Zacatecas, México.
- Ortega-Rosas, C.I., Peñalba, M.C. y Guiot, J. (2008) Holocene altitudinal shifts in vegetation belts and environmental changes in the Sierra Madre Occidental, Northwestern Mexico, based on modern and fossil pollen data. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 151 (1-2), págs. 1-20.
- Ortíz-Medrano, A., Moreno-Letelier, A. y Piñero, D. (2008) Fragmentación y expansión demográfica en las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 83, págs. 25-36.
- Patton, J.L. y Yang, S.Y. (1977) Genetic variation in *Thomomys bottate* pocket gophers: macrogeographic patterns. *Evolution*, 31, págs. 697-720.
- Pérez de la Rosa, J.A. y Carrillo Reyes, P. (2003) Primer reporte de *Juniperus blancoi* Martínez en Nueva Galicia. *Ibugana Boletín del Instituto de Botánica*, 11 (1), págs. 5-10.
- Peterson, L.C., Haug, G.H., Hughen, K.A. y Rohl, U. (2000) Rapid changes in the hydrologic cycle of the tropical atlantic during the last glacial. *Science*, 290 (5498), págs. 1947-1951.
- Petit, R.J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Muller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palme, A., Martin, J.P., Rendell, S. y Vendramin, G.G. (2003) Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, 300 (5625), págs. 1563-1565.

- Phillips, S.J., Anderson, R.P. y Schapire, R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190 (3-4), págs. 231-259.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C.E., Casas, A., América Castañeda-Sortibrán, R., Cerritos, R., Chassin-Noria, O., Colunga-GarcíaMarín, P., Delgado, P., Díaz-Jaimes, P., Eguiarte, L.E., Escalante, A.E., Espinoza, B., Fleury, A., Flores-Ramírez, S., Fragoso, G., González-Astorga, J., Islas-Villanueva, V., Martínez, E., Martínez, F., Martínez-Castillo, J., Mastretta-Yanes, A., Medellín, R., Medrano-González, L., Molina-Freaner, F., Morales-Vela, B., Murguía-Vega, A., Cruz, E.P.D.L., Reyes-Montes, M.D.R., Robles-Saavedra, M.R., Rodríguez-Arellanes, G., Rojas-Bracho, L., Romero-Martínez, R., Sahaza-Cardona, J.H., Salas-Lizana, R., Sciutto, E., Scott-Baker, C., Schramm-Urrutia, Y., Silva, C., Souza, V., Taylor, M.L., Urbán-Ramírez, J., Uribe-Alcocer, M., Vázquez-Cuevas, M.D.J., Vázquez-Domínguez, E., Vovides, A.P., Wegier, A., Zaldívar-Riverón, A. y Zúñiga, G. (2008) La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En: *Capital natural de México*. México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, pág.619.
- Pleines, T., Jakob, S. y Blattner, F. (2008) Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. *Plant Systematics and Evolution*. 282 (3-4), págs. 281-294.
- Porter, S.C. (2000) Snowline depression in the tropics during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews*, 20 (10), págs. 1067-1091.
- Posada, D., Crandall, K.A. y Templeton, A.R. (2000) GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9 (4), págs. 487-488.
- Posada, D. y Crandall, K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology y Evolution*, 16 (1), págs. 37-45.
- Qian, H. (2002) Floristic relationships between Eastern Asia and North America: Test of Gray's Hypothesis. *The American Naturalist*, 160 (3), págs. 317-332.
- Rabinowitz, D. (1981) Seven forms of rarity. En: H. Synge, editor. *The biological aspects of rare plant conservation*. John Wiley, Chichester, UK.
- Ran, J., Wei, X. y Wang, X. (2006) Molecular phylogeny and biogeography of *Picea* (Pinaceae): Implications for phylogeographical studies using cytoplasmic haplotypes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41 (2), págs. 405-419.
- Ridley, M. (2004) *Evolution*. Tercera Edición. Wiley-Blackwell. Malden, EEUU, 751 págs.
- del Río, M., Montes, F., Cañellas, I. y Montero, G. (2003) Revisión: Índices de diversidad estructural en masas forestales. *Investigación Agrararia: Sistemas y Recursos Forestales*, 12 (1), págs. 159-176.

- Rogers, K.L. y Wang, Y. (2002) Stable isotopes in pocket gopher teeth as evidence of a late Matuyama climate shift in the southern Rocky Mountains. *Quaternary Research*, 57 (2), págs. 200-207.
- Rosel, P.E. y Rojas-Bracho, L. (1999) Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* Norris and Macfarland, 1958. *Marine Mammal Science*, 15 (4), págs. 990–1003.
- Rousset, F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145 (4), págs. 1219-1228.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. y Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19 (18), págs. 2496-2497.
- Santos, T., Tellería, J.L. y Virgós, E. (1999) Dispersal of Spanish juniper *Juniperus thurifera* by birds and mammals in a fragmented landscape. *Ecography*, 22 (2), págs. 193-204.
- Schneider, S., Roessli, D. y Excoffier, L. *Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT] (2003) *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México 2002*. México. Disponible en: <http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/estadisticas_2000/informe_2000/index.shtml> [Accedido 3 Agosto 2009].
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. y Small, R.L. (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92 (1), págs. 142-166.
- Simmons, M.P., Ochoterena, H. y Carr, T.G. (2001) Incorporation, relative homoplasy, and effect of gap characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 50 (3), págs. 454-462.
- Slatkin, M. y Hudson, R.R. (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129 (2), págs. 555-562.
- Solórzano, S., Baker, A.J. y Oyama, K. (2004) Conservation prioritization for resplendent quetzals based on analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. *The Condor*, 106 (3), págs. 449-456.
- Stamatakis, A., Hoover, P. y Rougemont, J. (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, 57 (5), págs. 758-771.
- Swofford, D.L. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Sunderland, MA, EEUU, Sinauer Associates.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123 (3), págs. 585-595.

- Tajima, F. (1996) The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, 143 (3), págs. 1457-1465.
- Templeton, A.R., Boerwinkle, E. y Sing, C.F. (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117 (2), págs. 343-351.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. y Sing, C.F. (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132 (2), págs. 619-633.
- Templeton, A.R. (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13 (4), págs. 789-809.
- Templeton, A.R. (2001) Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10 (3), págs. 779-791.
- United Nations (1992) Convention on biological diversity. En: *Treaty Series*. Río de Janeiro, Brasil, págs. 142-382.
- Vázquez-Lobo, A. (1996) Filogenia de hongos endófitos del género *Pinus*: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Vianna, J.A., Bonde, R.K., Caballero, S., Giraldo, J.P., Lima, R.P., Clark, A., Marmontel, M., Morales-Vela, B., De Souza, M.J., Parr, L., Rodríguez-Lopez, M.A., Mignucci-Giannoni, A.A., Powell, J.A. y Santos, F.R. (2006) Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. *Molecular Ecology*, 15 (2), págs. 433-447.
- Vidal-Zepeda, R. (1990) Temperatura media anual. En: *Temperatura media IV.4.4. Atlas Nacional de México*. Vol. II. Escala 1:4000000. Instituto de Geografía, UNAM, México. Versión digital de la CONABIO.
- Villanueva, D., Stahle, D.W., Luckman, B.H., Paredes, J.C., Therrell, M.D., Morán, R.M. y Cleavelly, M.K. (2007) Potencial dendrocronológico de *Taxodium mucronatum* Ten. y acciones para su conservación en México. *Ciencia forestal*, 32, págs. 9-39.
- Waitz, P. (1943) Reseña geológica de la cuenca del Lerma. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Geografía y Estadística*, 58, págs. 123-138.
- Wakasugi, T., Sugita, M., Tsudzuki, T. y Sugiura, M. (1998) Updated Gene Map of Tobacco Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16 (3), págs. 231-241.

- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T. y Sugiura, M. (1994) Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (21), págs. 9794-9798.
- West, R.C. (1964) Surface configuration and associated geology of Middle America. En: *Handbook of Middle American Indians*. Austin, USA, University of Texas Press, págs. 33-83.
- Willyard, A., Syring, J., Gernandt, D.S., Liston, A. y Cronn, R. (2006) Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Molecular Biology and Evolution*, pág.131.
- Wolfe, K.H., Li, W.H. y Sharp, P.M. (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (24), págs. 9054-9058.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15, págs. 323-354.
- Zamudio, S. y Carranza, E. (1994) Familia Cupressaceae. *Flora del Bajío y regiones adyacentes*. Fascículo 29. págs. 1-20.
- Zarn, M. (1977) *Ecological characteristics of pinyon-juniper woodlands of the Colorado Plateau: A literature survey*. Denver, CO, EEUU, Department of the Interior, Bureau of Land Management, Denver Service Center.
- Zhang, Q., Chiang, T.Y., George, G., Liu, J.Q. y Abbott, R.J. (2005) Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation. *Molecular Ecology*, 14 (11), págs. 3513-3524.

10 Anexos

Anexo 1.

Taxa del género *Juniperus* en los tres países con mayor diversidad del grupo, acorde a la revisión taxonómica y a las distribuciones mostradas en Adams (2008).

	México	China	EEUU
1	e <i>J. angosturana</i>	<i>J. chinensis</i>	<i>J. arizonica</i>
2	<i>J. arizonica</i>	<i>J. chinensis</i> var. <i>sargentii</i>	e <i>J. ashei</i>
3	e <i>J. blancoi</i>	<i>J. convallium</i>	e <i>J. ashei</i> var. <i>ovata</i>
4	e <i>J. blancoi</i> var. <i>huehuentensis</i>	<i>J. coxi</i>	<i>J. californica</i>
5	<i>J. californica</i>	e <i>J. erectopatense</i>	<i>J. coahuilensis</i>
6	<i>J. coahuilensis</i>	e <i>J. formosana</i>	<i>J. comunis</i> var. <i>depressa</i>
7	<i>J. comitana</i>	<i>J. formosana</i> var. <i>mairei</i>	<i>J. comunis</i> var. <i>jackii</i>
8	<i>J. compacta</i>	<i>J. indica</i>	e <i>J. comunis</i> var. <i>saxatilis</i>
9	<i>J. deppeana</i>	<i>J. jarkendensis</i>	<i>J. grandis</i>
10	<i>J. deppeana</i> var. <i>gamboana</i>	e <i>J. komarovii</i>	<i>J. horizontalis</i>
11	e <i>J. deppeana</i> var. <i>patoniana</i>	e <i>J. microsperma</i>	e <i>J. maritima</i>
12	e <i>J. deppeana</i> var. <i>robusta</i>	e <i>J. pingii</i>	<i>J. monosperma</i>
13	e <i>J. deppeana</i> var. <i>zacatecensis</i>	e <i>J. pingii</i> var. <i>carinata</i>	e <i>J. occidentalis</i>
14	<i>J. deppeana</i> var. <i>sperry</i>	e <i>J. pingii</i> var. <i>miehei</i>	e <i>J. osteosperma</i>
15	e <i>J. durangensis</i>	e <i>J. przewalskii</i>	<i>J. pinchotii</i>
16	<i>J. flaccida</i>	<i>J. pseudosabina</i>	e <i>J. virginiana</i>
17	e <i>J. jaliscana</i>	<i>J. recurva</i>	e <i>J. virginiana</i> var. <i>silicicola</i>
18	e <i>J. martinezii</i>	<i>J. rigida</i>	
19	e <i>J. monticola</i>	<i>J. sabina</i>	
20	e <i>J. monticola</i> var. <i>orizabensis</i>	<i>J. sabina</i> var. <i>davurica</i>	
21	e <i>J. mucronata</i>	e <i>J. saltuaria</i>	
22	<i>J. pinchotii</i>	<i>J. semiglobosa</i>	
23	e <i>J. poblana</i>	<i>J. squamata</i>	
24	e <i>J. saltillensis</i>	e <i>J. squamata</i> var. <i>wilsonii</i>	
25	<i>J. scopulorum</i>	e <i>J. squamata</i> var. <i>fargesii</i>	

e: endémico del país en cuestión

Anexo 2.

Indicaciones para llegar a cada localidad muestreada.

1. Yécora, Sonora. Tomar la carretera federal 16 desde Hermosillo en dirección a Chihuahua. La población se encuentra en el km 19 desde Maicoiba hacia Yécora, el río es cruzado por el Puente Tlayote.

2. Cerro Mohinora, Chihuahua. Desde Parral, Chihuahua, seguir hacia el oeste hacia Guadalupe y Calvo por la carretera 41 y a partir de Sta. Bárbara por la 24. De Guadalupe y Calvo tomar la carretera rumbo a Baborigami, al llegar a El Pinito tomar la brecha hacia la cima del Cerro Mohinora, en El Llano tomar a la derecha arriba en las desviaciones. El camino llega hasta la cima.

3. Cerro Huehuento, Durango. Tomar la carretera 40 de Durango a Mazatlán. 10 kms antes de El Salto tomar la desviación hacia San Miguel de las Cruces o Coyotes. Alrededor del km 31 está el poblado Nueva Patria (también conocido como Santo Domingo), tomar ahí el camino de terracería hacia Tayoltita (izquierda). Pasar los poblados Las Flechas y San Luis de Villa Corona. Al salir de este último dar a la derecha en el puente de un arroyo. Pasar el poblado de Piedra Rajada y continuar hasta Huachichiles. Es recomendable pedir a alguien del pueblo que los guíe hasta la cima del cerro. Se cruza completamente el pueblo y se toma la brecha izquierda en vez de continuar por el camino principal, se puede llegar en camioneta hasta una meseta previa a la cima.

4. El Salto, Durango. Llegar a El Salto por la carretera 40 Durango-Mazatlán. En el pueblo tomar la carretera hacia Pueblo Nuevo. La población se encuentra en un arroyo adelaño a la carretera aproximadamente a 2 km del pueblo (últimas casas en la calle Fresnos) cerca del Vivero Forestal la Victoria. Los árboles se encuentran dentro de potreros y en menor medida en una cañada dentro del bosque.

5. Río Patitos, Zacatecas. Desde Guadalajara tomar la carretera federal 23 a Fresnillo. Poco antes de Teúl de González Ortega (aproximadamente 26 km desde La Ceja, junto a una instalación de CFE) tomar la desviación a Huitzila, continuar por 9-10 km. Hay un puente (angosto) que cruza el Río Patitos, donde se encuentra la población.

6. Presa Brockman, Michoacán. Desde Toluca tomar la autopista 55 a Atlacomulco y de ahí la carretera 128 a El Oro. Tomar la calle León Guzmán que sale por el suroeste del pueblo y se transforma en un camino de terracería que llega hasta la Presa Brockman (aproximadamente 3.5 km). Seguir por el camino hacia el suroeste de la presa, hacia el Balneario "Las Cañadas". La población se encuentra en un arroyo que cruza campos de cultivo a la izquierda del camino (menos de un kilómetro de distancia del límite occidental de la Presa).

7. San José del Rincón, Estado de México. Desde Toluca tomar la autopista 55 a Atlacomulco y de ahí la carretera 128 a El Oro. Desde ahí tomar la carretera de Carmona a San José del Rincón o a Agangeo.

La población está a 5.5 km de Carmona después de la gasolinera ES0975 (0.7 km), el arroyo fue desviado pero la línea de árboles de la población puede observarse del mismo lado que la gasolinera. El arroyo conduce finalmente a la Presa Tepetitlan.

8. La Preciosita, Puebla. Desde la Ciudad de México tomar la autopista México-Puebla y en Río Frío continuar por la carretera federal en la misma dirección. Pasando el Puente El Emperador (Apapaxco) tomar la desviación hacia Guadalupe de Zaragoza. Atravesar dicho poblado, sigue Juárez de Coronaco y después Reyes. La siguiente localidad es La Preciosita Sangre de Cristo Sálvame. Preguntar por el presidente del comité de vigilancia de “La Reserva Ecológica Campesina La Preciosita” para que los conduzca al predio de la UMA. La población se encuentra en una cañada conocida como “El Sabinal”, cerca de la cabaña rosa.

Anexo 3.

Protocolo de extracción de ADN “MINI-PREP” Modificado de Vázquez-Lobo (1996):

1. Moler en un mortero 100 mg (aprox 4 cm) de tejido con nitrógeno líquido.
2. Al tejido ya pulverizado sin nitrógeno agregar 1.3 ml de buffer de CTAB 2x (This-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20mM, CTAB 2% y b-ME 0.3% (este ultimo se agrega el día de la extracción).
3. Recuperar todo en un tubo eppendorf de 2 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos a 4°C.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 µl de buffer CTAB 2X. Incubar en un baño a 60°C durante 10 minutos.
5. Agregar a cada tubo 600 µl de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogenizar y centrifugar a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante debe quedar trasparente.
6. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 µl) y precipitar el ADN con 2/3 del volumen final de isopropanol frio (600 µl aprox volumen final, agregar 400 µl isopropanol). Dejar reposar en frio de 30 minutos a 12 horas.
7. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
8. Limpiar el pellet: agregar 0.5 ml de etanol 70% frío y centrifugar a 13 000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
9. Eliminar el sobrenadante y repetir el paso anterior.

10. Eliminar el sobrenadante y dejar a secar (evaporación del etanol) los pellets en la campana de flujo laminar (10 minutos aprox).

11. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 200 µl de H₂O.

12. Una vez que el pellet se disuelve las muestras de ADN pueden refrigerarse a -20°C para su uso posterior.

Anexo 4.

Cebadores utilizados para amplificar y/o secuencias distintas regiones de cloroplasto en *J. blancoi*

Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
*trnS-trnG2S	AGA TAG GGA TTC GAA CCC TCG GT TTT TAC CAC TAA ACT ATA CCC GC	Shaw <i>et al.</i> 2005
*tabC-tabD	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	Taberlet <i>et al.</i> 1991
*tabA-tabB	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT	Taberlet <i>et al.</i> 1991