

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Instituto de Ecología

**FILOGEOGRAFÍA DE PINOS DE LA
SUBSECCIÓN *AUSTRALES* (LOUDON) EN LA
CUENCA DEL CARIBE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LEV ORLANDO JARDÓN BARBOLLA

Director de Tesis: Dr. Daniel Piñero



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

México, D.F.

Abril de 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A la memoria de mi papá,
Raúl Jardón,
quien me enseñó a vivir luchando,
a vivir por la alegría.*

Comprendí, metido en el escenario de las luchas de América, que mi misión humana no era otra sino agregarme a la extensa fuerza del pueblo organizado, agregarme con sangre y alma, con pasión y esperanza, porque sólo de esa henchida torrentera pueden nacer los cambios necesarios a los escritores y a los pueblos.

Pablo Neruda.

Agradecimientos

Intenté agradecer a tod@s, pero son tant@s que sería otra tesis. Agradezco pues, en una lista sumamente incompleta.

A Daniel Piñero que se aventuró a dirigir este proyecto, compartiendo la curiosidad por estos remotos linajes a pesar de los kilómetros para llegar a ellos.

A quienes revisaron este trabajo, lo enriquecieron y mejoraron, Daniel Piñero, Luis Eguiarte, Ken Oyama, Juan Pablo Jaramillo, Carla Gutierrez-Rodríguez y David Gernandt.

A mi comité tutorial, a Ken Oyama y a Diego González Halphen, que ayudaron a dotar de estructura al trabajo y sugirieron caminos en medio de la maraña de cosas que les decía en los tutorales.

A mi compañera Alejandra, por tu amor y paso de corazón sencillo, por el camino que juntos construimos.

A mi mamá, que me formó en libertad y en las dudas más bonitas, esas que hacen que uno camine.

A mi hermana Lari a quien tanto admiro y de quien siempre aprendo.

A mi familia toda, por su cariño, por su tejido, por las raíces que me alimentan.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución/ Ecología y Genética.

A decenas de estudiantes, investigadores, trabajadores, amigos y colaboradores involuntarios; a todos los que me ayudaron a coleccionar, procesar, analizar y aprender.

A todos mis compañeros y amigos con los que he compartido andares, desbroces y siembras en los campos multicolores.

A los compañeros de las comunidades zapatistas, porque cada día nos siguen enseñando con su resistencia y con su lucha, porque ahí efectivamente, se mira el horizonte.

A mis compañeros de La Otra Campaña, a nadie en particular, con mucho cariño porque con ustedes he compartido los mejores momentos de la lucha, que es la construcción de la vida misma. Por todo lo que deberemos aprender en el camino.

A todos los que luchan, a todos los que forman esa henchida torrentera.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de CONACyT a través de la beca 185586, y de los proyectos SEP-CONACYT # 44373, SEP-CONACYT #46925 y SEMARNAT-CONACYT 2002-C01-201 en el laboratorio de Genética y Evolución luego Laboratorio de Ecología y Genética del Instituto de Ecología, bajo la dirección de Daniel Piñero.

Filogeografía de pinos de la subsección *Australes* (Loudon) en la Cuenca del Caribe

Índice

	Pág.
Capítulo 1	
Introducción General	
1.1 La filogeografía	1
1.2 La distribución de la biota en las islas	7
1.3 El Género <i>Pinus</i> y la Subsección <i>Australes</i>	16
1.4 Hipótesis	23
1.5 Objetivos	23
1.6 Referencias	24
Capítulo 2	
Historia Geológica de la Cuenca del Caribe y su impacto sobre la distribución de la vegetación terrestre	
2.1 Historia Geológica de la Cuenca del Caribe	29
2.2 Paleogeografía de la Cuenca del Caribe	35
2.3 Biogeografía vegetal de las Antillas Mayores	38
2.4 Referencias	55
Capítulo 3	
Phylogeography of <i>Pinus</i> subsection <i>Australes</i> in the Caribbean Basin (Artículo)	63
Capítulo 4	
Flujo génico a larga distancia y demografía histórica en la Cuenca del Caribe	
4.1 Introducción	79

4.1.1 Condiciones de no equilibrio	80
4.1.2 El Análisis filogeográfico de clados anidados	87
4.2 Material y métodos	91
4.3 Resultados	95
4.4 Discusión	105
4.5 Conclusiones	114
4.6 Referencias	105

Capítulo 5

Conclusiones generales

5.1 Colonización, flujo génico y expansión poblacional en la Cuenca del Caribe.....	123
5.2 Perspectivas	127
5.3 Referencias	129

Anexo 1

A1 Composición alélica de los haplotipos y frecuencia alélica de cada haplotipo de cloroplasto	131
---	-----

Introducción general

1.1 La filogeografía

La distribución actual de la variación genética en las poblaciones de una misma especie, o bien entre especies muy cercanamente emparentadas, es el resultado tanto de procesos contemporáneos, como de eventos históricos de diversa naturaleza (deriva génica, flujo génico, desplazamiento del intervalo de distribución, cambios demográficos, etc.). La huella genética que dejan estos procesos es estudiada por la filogeografía para abordar la historia reciente de la distribución de las poblaciones y explicar los patrones de distribución de la variación genética (Avise, 2000; Cruzan & Templeton, 2002; Avise 2009).

La posibilidad creciente de contar con datos provenientes de marcadores moleculares de DNA variables, así como el desarrollo de un cuerpo teórico coherente (la teoría de coalescencia) para poder inferir las genealogías de genes abrió la posibilidad de estudiar de manera integrativa la historia de la distribución de los linajes genéticos (Emerson & Hewitt, 2005). La filogeografía permite estudiar las relación entre las genealogías de genes y la distribución espacial de la variación genética para inferir la historia evolutiva de poblaciones, variedades, subespecies y especies cercanamente emparentadas. Para ello, es necesario integrar la información proveniente de diferentes fuentes como el registro fósil, la paleoclimatología, las genealogías de genes y la morfología para reconstruir los procesos históricos que han dado origen a la distribución geográfica actual de la diversidad genética dentro de una misma especie o entre especies cercanamente relacionadas (Avise, 2000; Carstens & Knowles, 2007).

Los fragmentos o regiones del DNA más informativos para estudiar la variación genética en este nivel (grupos de muy reciente divergencia) son aquellos que presentan tasas de mutación relativamente altas. En el caso de los animales el genoma más utilizado para inferir este tipo de procesos relativamente recientes ha sido el DNA

mitocondrial, mientras que en las plantas el DNA del cloroplasto ha servido de base para muchos estudios (Hewitt & Emmerson, 2005; Avise, 2009; Pleines *et al.* 2009; Qiu *et al.*, 2009) en los que sus tiempos de coalescencia relativamente cortos han resultado útiles para realizar inferencias sobre procesos muy recientes. Por otra parte, algunos genes nucleares de copia única han sido de utilidad en el estudio de patrones filogeográficos en diversos organismos (Pleines *et al.*, 2009); este tipo de marcadores permiten aproximarse a procesos de divergencia más antiguos.

En todos los casos, los marcadores moleculares de utilidad para la filogeografía son aquéllos que son neutrales, presentan variación a nivel intraespecífico y presentan estados de carácter que pueden ser ordenados (lo cual es necesario para poder establecer relaciones de ancestría-descendencia entre los diferentes estados de carácter (Pons & Petit, 1996; Schaal *et al.*, 1998; Posada & Crandall, 2001). Las relaciones genealógicas entre las diferentes variantes genéticas (haplotipos en el caso de los marcadores moleculares de herencia uniparental) pueden inferirse empleando las predicciones y supuestos de la *teoría de coalescencia*.

Los alelos que componen la variación genética actual en una muestra descienden de un ancestro común que existió generaciones atrás; el estado actual de los alelos en esa muestra es el resultado de la historia genealógica y mutacional que subyace a esa muestra (Nordborg, 2001). A cada evento en el que dos linajes genéticos convergen hacia un ancestro común en el pasado se le llama evento de coalescencia y la teoría de coalescencia permite modelar, empleando algunos supuestos acerca de las fuerzas evolutivas actuantes, la secuencia de eventos de coalescencia que unen a una muestra de genes tomada en la actualidad con un ancestro común en el pasado (Nordborg, 2001).

La teoría de coalescencia describe las relaciones de ancestría y descendencia de una muestra de genes bajo un modelo y permite hacer predicciones acerca de los patrones de variación genética (Wakeley, 2009). El tiempo de coalescencia hacia el ancestro común más reciente (Most Recent Common Ancestor, MRCA, por sus siglas en inglés) y las formas de las genealogías se ven modificados por los procesos demográficos (reflejados en la deriva génica), selectivos y de flujo génico que han afectado a la población o conjunto de poblaciones de las que proviene una muestra; lo anterior posibilita inferir a partir de los patrones de variación actuales, parte de la

historia que les ha dado origen. De este modo, la teoría de coalescencia procede de manera retrospectiva, “yendo hacia atrás en el tiempo”, reconstruyendo genealogías de genes y permitiendo inferir parte de la historia de las poblaciones en las que éstos se encuentran.

La genealogía de un locus en particular no necesariamente refleja de modo preciso la historia de la genealogía de las poblaciones de una especie (Posada & Crandall, 2001; Rosenberg & Nordborg, 2002). Esto se debe a que los linajes de un gen pueden coalescer antes del último evento de divergencia entre dos poblaciones o bien, tener tiempos de coalescencia más antiguos que la divergencia entre poblaciones (sobre todo cuando ésta es muy reciente); lo anterior ocasiona que los árboles de genes y los árboles de las especies o poblaciones no sean completamente congruentes.

El hecho de que las genealogías de genes no diverjan de manera absolutamente sincrónica con las poblaciones resulta de utilidad, pues los genomas de herencia uniparental (como aquéllos del cloroplasto o la mitocondria), que no presentan recombinación y que tienen tamaños efectivos poblacionales más pequeños que el núcleo son más sensibles a procesos de deriva génica (Schaal et al., 1998; Templeton, 2004). Esto ocasiona que incluso entre linajes de reciente divergencia sea posible inferir los procesos históricos que los han afectado. Al alcanzar monofilia recíproca más rápidamente que los genes diploides, los marcadores haploides permiten detectar de mejor manera eventos recientes de especiación o de separación entre poblaciones. En general, para un locus dado, las inferencias sobre la historia evolutiva son más confiables si el tiempo medio de coalescencia para los alelos muestreados es menor que el tiempo transcurrido entre los posibles eventos de separación geográfica entre linajes (Avice, 2000; Wakeley, 2000; Rosenberg & Nordborg, 2002; Broughton & Harrison, 2003).

Una vez que dos poblaciones quedan aisladas entre sí, la deriva génica ocasiona que exista un arreglo aleatorio de linajes (en inglés, *lineage sorting*), en el que paulatinamente se van extinguiendo al interior de cada una de ellas linajes que estaban presentes antes del inicio de la separación (Avice, 2000). Eventualmente, cada población queda constituida por descendientes de un ancestro común propio, alcanzando la condición de monofilia recíproca. Visto el proceso desde el pasado hacia el presente, los

linajes genéticos de las poblaciones aisladas geográficamente pasan de una condición de polifilia (en la que en ambas poblaciones se encuentran linajes que comparten un ancestro común primero con miembros de la otra población) a una de parafilia (en la que en una de las poblaciones se encuentran algunos linajes que tienen su ancestro común más reciente en la otra) y sólo finalmente alcanzan la monofilia recíproca (Figura 1.1).

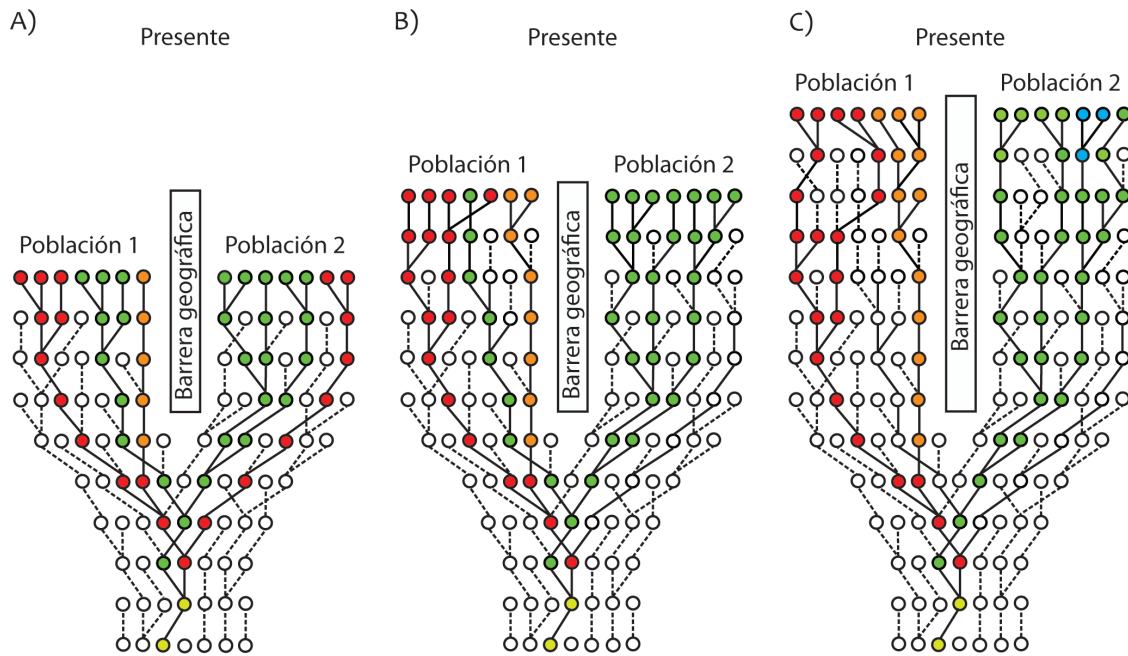


Figura 1.1. Cambio en las relaciones genealógicas entre los linajes genéticos presentes en dos poblaciones a partir de que surge una barrera geográfica entre ellas: A) Relaciones tempranas de polifilia; B) La población del lado derecho es monofilética, pero la población del lado izquierdo de la barrera es parafilética respecto a ella; c) Ambas poblaciones son recíprocamente monofiléticas. El tiempo que transcurre entre la separación geográfica y el establecimiento de la monofilia recíproca depende del tamaño efectivo de la población N , por lo que los procesos demográficos que ocurran a ambos lados de la barrera son relevantes.

En términos de la teoría de coalescencia, para poblaciones que han divergido muy recientemente, el tiempo medio de coalescencia al último ancestro común más reciente (TMRCA) de una muestra de linajes antecede al evento de separación (las relaciones serían por tanto polifiléticas entre las poblaciones). El siguiente tipo de relaciones que se pueden presentar entre los linajes de dos poblaciones es la parafilia; en poblaciones en las que la separación geográfica es más antigua se esperaría encontrar que solamente una parte de los linajes presentes en una población tienen su ancestro

común más reciente dentro de la misma, mientras que otros coalescen primero con linajes genéticos de otra población. Por último, poblaciones con divergencia antigua -en términos generales con una divergencia superior a $2N_e$ generaciones para un marcador haploide (donde N_e es el tamaño efectivo de cada población) tienen una alta probabilidad de ser recíprocamente monofiléticas (Avice, 2000).

Cuando dos o más poblaciones presentan divergencias antiguas (como las resultantes de proceso de vicarianza), la presencia de variación genética compartida podría interpretarse como evidencia de flujo génico reciente. Sin embargo, en poblaciones de reciente divergencia, un fenómeno que puede llevar a inferencias erróneas es la presencia de polimorfismo ancestral compartido, el cual puede confundirse con flujo génico reciente. Efectivamente, cuando una población ancestral es altamente polimórfica, las poblaciones resultantes pueden conservar dicho polimorfismo en promedio durante un número $2N_e$ (para marcadores haploides) de generaciones, lo cual ocasiona que las poblaciones resultantes puedan compartir algunos alelos, aún cuando éstos se hallen en baja frecuencia (por azar) en alguna de las dos. Este patrón puede interpretarse como evidencia de flujo génico restringido o esporádico entre las poblaciones, a pesar de ser resultado del polimorfismo ancestral (Ver Figura 1.2). Distinguir el flujo génico reciente del polimorfismo ancestral compartido requiere complementar la información genética con información ecológica, del registro fósil, paleogeográfica y en general de la historia de vida del organismo de interés (Knowles & Carstens, 2007), de manera que se cuente con información independiente que permita estimar aspectos como el tiempo de divergencia entre las poblaciones, y así determinar qué tan plausibles escenarios de divergencia muy reciente (polimorfismo ancestral compartido) o bien de flujo génico posterior a una separación.

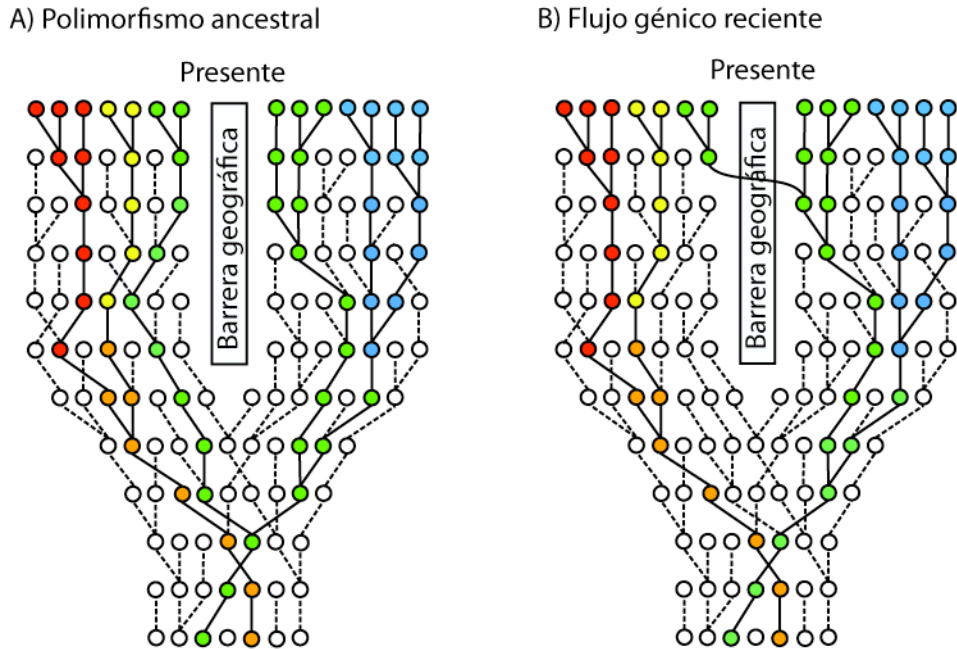


Figura 1.2. Dos procesos diferentes pueden subyacer a la presencia de variación genética compartida entre dos poblaciones; A) La variación común a ambas poblaciones se debe a arreglo incompleto de linajes (*incomplete lineage sorting*), que ocasiona que ambas poblaciones compartan polimorfismo ancestral; B) La variación común a ambas poblaciones se debe a eventos de flujo génico reciente, el polimorfismo compartido no es ancestral.

Lo anterior lleva a que para un locus dado, las inferencias de la historia evolutiva que se hagan a partir de él, serán más confiables si el tiempo de coalescencia para los alelos de una muestra son menores que el tiempo de separación entre linajes (Broughton & Harrison, 2003), pues ello garantizaría en principio una mayor probabilidad de que los linajes poblacionales o específicos se hayan convertido en grupos monofiléticos. Estos grupos monofiléticos se forman en diferentes escalas, dependiendo de los niveles de comparación en los que se realiza un estudio. La utilidad de un marcador molecular está por tanto determinada por el grado de variabilidad genética que presenta, la escala temporal de interés y la naturaleza de los eventos de separación o flujo que se presume podrían haber ocurrido entre las poblaciones de interés. Se han desarrollado diferentes métodos de análisis que buscan identificar grupos de linajes relacionados dentro de una misma especie en el contexto de la distribución espacial, así como la asociación geográfica de linajes de genes.

1.2 Distribución de la biota en las islas

1.2.1 Tipos de islas y origen de su biota

A partir de la conjugación de los métodos de la sistemática filogenética con el estudio de la tectónica de placas, la biogeografía filogenética consideró tradicionalmente a la vicarianza como que el proceso más importante en la conformación de los patrones de distribución de las especies, lo cual explicaría el origen de distribuciones disjuntas. En este contexto, se supondría que la ampliación en la distribución de una especie antecedería al surgimiento de las barreras geográficas que hacen que en la actualidad la distribución de un linaje sea discontinua, lo cual sería explicado como un proceso de vicarianza clásico (De Queiroz, 2005). Los procesos de vicarianza, asociados a la separación de masas continentales, han sido postulados como los únicos capaces, por lo menos en esta escala, de producir patrones generales de distribución para varios grupos de taxa –incluyendo la similitud/disimilitud de la biota entre regiones-, cuya explicación sería uno de los objetivos centrales de la biogeografía (Patterson, 1981; Nelson & Platnick, 1981; Morrone & Crisci, 1995)

Stace (1989) señaló que tanto la vicarianza como la dispersión a larga distancia han sido relevantes en la historia de la distribución de los organismos, por lo que deberían ser tomados en cuenta al trazar hipótesis sobre a distribución de taxa. Así, desde hace ya algunos años, se considera importante el papel de la dispersión a larga distancia (De Queiroz, 2005; Heany 2007), particularmente para linajes de reciente arribo a islas y/o en casos en los que la edad de una isla es menor a la edad de los clados que en habitan en ella.

La relevancia de diferentes procesos relacionados con el origen de la distribución de una especie o conjunto de ellas en las islas está intrínsecamente relacionados con dos grandes aspectos: 1) la naturaleza geológica de las islas y 2) la edad de los linajes que habitan hoy en día en ellas.

En términos generales existen tres tipos de islas marinas según de su origen geológico: las *islas oceánicas*, las *islas de plataforma* continental y los *fragmentos continentales* (Whittaker & Fernandez-Palacios, 2007).

Las *islas oceánicas* (Ver Figura 1.3) suelen tener un origen volcánico y nunca han estado conectadas a masas continentales; en ocasiones el desplazamiento tectónico

es importante en su conformación o en cambios en su posición respecto a las masas continentales. La dispersión a larga distancia, ha sido detectada como una fuerza relevante en la distribución de especies en islas oceánicas, pues al tratarse de islas cuyo origen no tiene que ver con el desprendimiento desde masas continentales adyacentes, en ellas la vicarianza no juega un papel importante (De Queiroz, 2005; Heany 2007). Ejemplos de este tipo de islas con el archipiélago de las Canarias y el archipiélago de Hawaii.

Las *islas continentales* son islas formadas por fragmentos emergentes de la plataforma continental sobre la cual se ubican (Figura 1.3; Whittaker & Fernandez-Palacios, 2007), por lo general son de menor tamaño que los fragmentos continentales. Estas islas están separadas de las masas continentales por franjas de agua estrechas y poco profundas, lo cual permite que durante algunos periodos glaciales estas islas queden unidas al continente por puentes terrestres. Por el origen de su biota, las islas continentales están mucho más relacionadas con los continentes cercanos y tanto la dispersión sobre la franja relativamente pequeña de agua como el contacto recurrente con los continentes a través de puentes terrestres suelen ser procesos relevantes. Islas como las Vancouver o Terranova son ejemplos de islas continentales (Whittaker & Fernandez-Palacios, 2007).

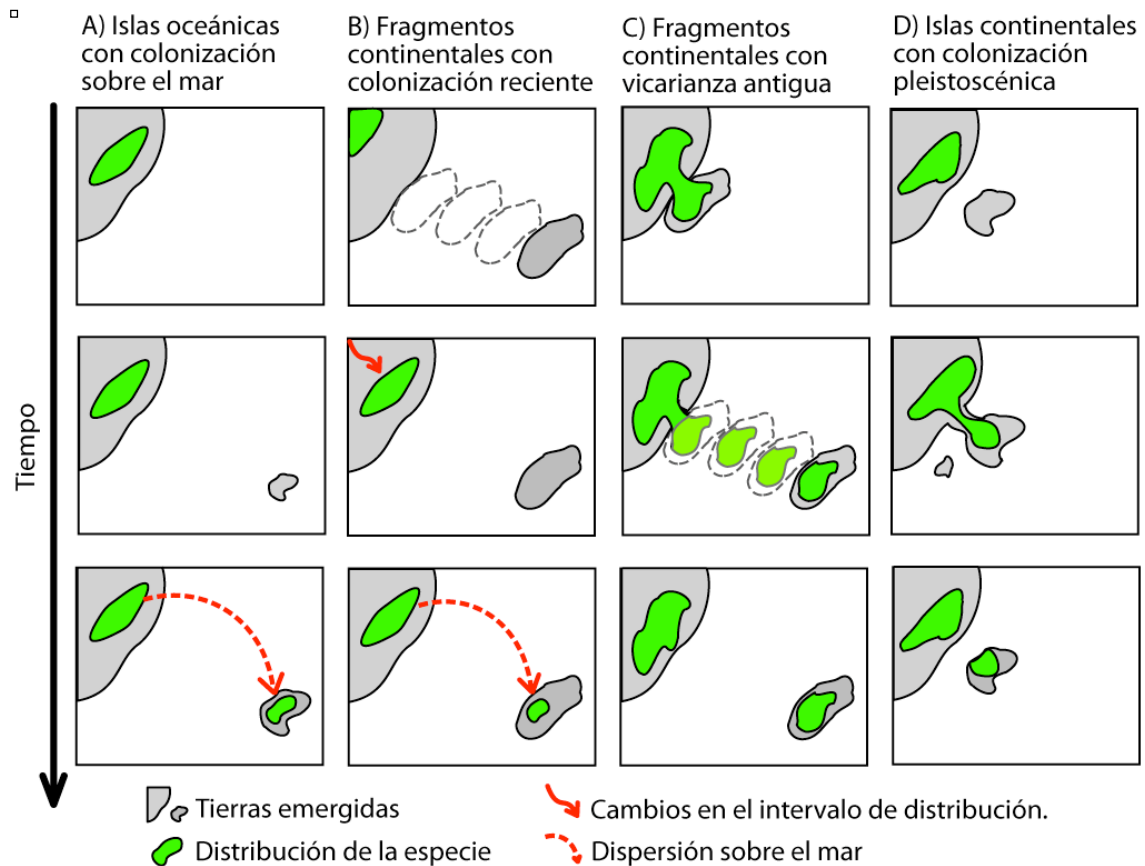


Figura 1.3 Diferentes tipos de islas y los procesos que determinan la presencia de taxa en ellas. Las islas oceánicas, de origen mayormente volcánico, surgen separadas de las masas continentales, son colonizadas (A) por los taxa terrestres que son capaces de dispersarse a través la distancia que las separa de tierra firme. Los fragmentos continentales (B y C), originados principalmente por plegamiento, son islas que se han separado de la masa continental por desplazamiento tectónico desde hace millones de años; cuando el origen de un taxa es posterior a la separación su distribución en la isla se origina por dispersión sobre el mar (B); cuando el taxa existía en la zona desde antes de la separación, el origen puede explicarse por vicarianza (C). Las islas continentales, cercanas a la costa, son fragmentos elevados de la plataforma continental, pueden establecer conexiones temporales con el continente durante periodos de disminución en el nivel global del mar (isostasia) durante los periodos glaciales; en estos casos ciclos de expansión/fragmentación reciente de las poblaciones originan la distribución actual en las islas (Whittaker & Fernandez-Palacios, 2007).

Los *fragmentos continentales* son islas que se han originado por la separación de pedazos de roca continental debido al desplazamiento tectónico, el cual es el principal proceso que afecta su conformación. Éstas islas pueden asemejarse a islas oceánicas por su localización pero son islas que se originaron a partir de fragmentos viejos de roca

continental, arrastrada desde hace millones años a su posición actual por procesos tectónicos (Whittaker & Fernández Palacios, 2007; las islas de Cuba y La Española son ejemplos de este tipo de fragmentos). Debido a su origen, estas islas heredan parte de su biota de los continentes desde los cuales se formaron, aunque la especiación *in situ* puede ser intensa (Whittaker & Fernández Palacios, 2007; Ricklefs & Bermingham, 2008). Recientemente se ha revalorado también la importancia de la dispersión a larga distancia en las islas del tipo *fragmentos continentales* que han estado separadas durante mucho tiempo de las masas que les dieron origen (Cook & Crisp, 2005; Whittaker & Fernández Palacios, 2007). En este contexto el arribo de algunos linajes de organismos es reciente en comparación con la edad de las islas y en los casos en los que no ha habido conexiones terrestres (por ejemplo debidas al descenso en el nivel del mar), la dispersión sobre el agua es el mecanismo más plausible para explicar la distribución de ellos. Lo anterior hace que la historia que subyace los patrones de distribución de las especies que habitan en este tipo de islas sea compleja (Zink *et al.*, 2000; Cook & Crisp, 2005).

El caso de la flora de Nueva Zelanda es un ejemplo claro de la relevancia de los procesos de colonización desde los continentes. Si bien Nueva Zelanda es un fragmento continental, la evidencia fósil señala que la mayor parte de su flora actual arribó a estas islas durante el Terciario después de que la deriva continental las separó de Australia durante el Cretácico (hace más de 60 millones de años; Pole, 1994, 2001; Jordan, 2001).

Diversos factores y procesos pueden incidir sobre la diversidad y patrones de distribución de las especies en las islas, entre otros: la diversificación a partir de una población fundadora en un grupo de especies, posiblemente adaptadas a diferentes medios físicos; muchas colonizaciones exitosas desde una masa continental cercana; diversificación de la población fundadora por procesos de vicarianza posteriores, asociados a la fragmentación de la distribución; procesos de especiación acelerados por cuellos de botella y efecto fundador (Emerson, 2002). La importancia relativa de los procesos de dispersión y vicarianza ha variado dependiendo de la edad de las islas, del tipo de origen que tengan y de la historia ambiental de cada archipiélago (Emerson, 2002; Whittaker & Fernández Palacios, 2007).

El caso de la biota de la Cuenca del Caribe ha sido utilizado para ilustrar esta diversidad de procesos (Buskirk, 1985; Whittaker & Fernández Palacios, 2007; Ricklefs & Birmingham, 2008). En las Antillas mayores se ha encontrado evidencia de que la mayor parte de la fauna arribó por dispersión a través del mar, siendo factores ecológicos los principales determinantes de la posibilidad de colonización; al mismo tiempo, los procesos tectónicos y ambientales habrían afectado tanto la distancia a la que fue posible dicha colonización como la posibilidad de mantener o no contacto con las poblaciones continentales de las cuales se originaron (Buskirk, 1985; Dávalos, 2007). En el segundo capítulo de esta tesis se revisará con más detalle la relación entre la historia geológica y la biogeografía de las plantas de esta región, que es el centro de este trabajo.

Así, los estudios recientes de la biota en las islas han comenzado a modificar el paradigma predominante en la biogeografía, que solía negar *a priori* la relevancia de los procesos de dispersión sobre el mar (Heaney, 2007). La cuestión debatida en la actualidad tiene que ver más con la frecuencia relativa de ambos procesos (Zink *et al.*, 2000), así como con la escala espacial en la que la dispersión puede ocurrir en diferentes linajes, fluctuando de unos cuantos kilómetros para los peces de agua dulce, hasta miles de kilómetros en el caso de los murciélagos, pasando por el intervalo de 1000 km para las gimnospermas (*Juniperus* y *Taxus*; citado en Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). La flora de la región de Macaronesia (Azores, Cabo Verde y las Canarias; Kim *et al.*, 2008; Galbany-Casals *et al.*, 2009) indica que la colonización a grandes distancias suele ocurrir desde los continentes hacia las islas, aunque en ventanas de tiempo relativamente reducidas y no como un fenómeno continuo (siendo la limitación de estas ventanas de tiempo lo que permite radiaciones adaptativas independientes en los archipiélagos; Galbany-Cassals *et al.* 2009). Al mismo tiempo, el movimiento posterior de taxa entre las propias islas (incluso entre los archipiélagos) es otro fenómeno que ha moldeado la diversidad de las islas (si bien no sus radiaciones adaptativas).

1.2.2 Colonización de islas y distribución de la variación genética

En los casos de eventos relativamente recientes de colonización, una aproximación filogenética clásica, a nivel del análisis del área de distribución de las

especies, puede no tener suficiente resolución. Es en estos casos donde se puede sacar ventaja de los métodos de análisis de la filogeografía, incorporando las genealogías de genes, para explicar la forma en que la distribución de plantas y animales se ha visto afectada por procesos históricos (Beebee & Rowe, 2008). Aprovechando el escenario que plantean los ambientes insulares, con poblaciones relativamente pequeñas separadas por barreras geográficas, los genetistas han usado los marcadores moleculares para examinar fenómenos como las tasas de flujo génico, el grado de aislamiento genético, la magnitud de los efectos fundador y la tasa de evolución para diferentes grupos en estos ambientes (Franks, 2010). Cuando hay colonización a grandes distancias, se esperaría encontrar huellas genéticas de estos eventos, que al llevar asociados procesos de evento fundador, dejarían una marca en la estructura de las poblaciones en las islas; de la misma manera, los patrones de flujo génico observados en la actualidad, pueden arrojar luz sobre la importancia relativa de las barreras acuáticas en la historia de la distribución de organismos terrestres que habitan en las islas.

Los eventos históricos que moldean la distribución espacial de las poblaciones de una especie tienen efectos genéticos transitorios (Epperson, 2004); cuando ha pasado suficiente tiempo, si los eventos históricos que ocasionan cuellos de botella o de efecto fundador no son repetitivos (p. ej., reducciones cíclicas en la cantidad de hábitat disponible), el flujo génico recurrente termina por diluir estos efectos y las condiciones de equilibrio (en el sentido de Wright, 1951; Malécot, 1975) se establecen. La escala temporal en la que se analizan los procesos tiene que ver justamente con el periodo en el que los efectos genéticos transitorios producto de los eventos históricos, aún prevalece; es una escala de tiempo y espacio en la que es posible usar la evidencia genética para detectar rastros de eventos del pasado y dilucidar características del pasado para un contexto-espacio-temporal particular (Epperson, 2004). La filogeografía permite entonces poner a prueba diferentes hipótesis asociadas al proceso de colonización de islas desde continentes, abordando el problema de la dispersión y colonización a largas distancias en un marco teórico y escala temporal tales que estos procesos no son hipótesis *ad-hoc*, sino parte del conjunto de eventos históricos que pueden haber afectado la distribución de la variación genética en linajes de reciente divergencia. Así, cuando una especie llega a un área nueva (p. ej. una isla) atraviesa por reducciones en

su tamaño demográfico que ocasionan pérdida de variación (Nei, 1975; Barton & Charlesworth, 1984).

Dentro de un mismo archipiélago los niveles y patrones de flujo génico y/o de dispersión entre las poblaciones de las islas suelen variar dependiendo de las características de los organismos estudiados, lo cual parece indicar que la forma y el grado en el que la historia geológica de una región afecta los patrones de diversificación está mediado por las características ecológicas (vagilidad, grado de especialización, plasticidad fenotípica, etc.) de cada organismo (Heany, 2007). Un ejemplo claro de lo anterior es el caso de los murciélagos de la Subtribu Stenodermatina en las Antillas Mayores y Menores, en el cual algunos linajes muestran escasa divergencia y alto flujo génico, mientras que otros se han encontrado completamente aislados entre las diferentes islas, llevando a la monofilia recíproca entre éstas (Carstens *et al.*, 2004; Dávalos, 2007).

Franks (2010) ha sintetizado una serie de hipótesis acerca de las consecuencias genéticas del arribo a hábitats insulares y su posterior evolución. En general, se esperaría observar un menor flujo génico entre las islas que dentro de ellas, resultando en una estructura genética significativa en la que parte importante de la varianza genética se encuentra entre las islas y una parte menor dentro de las islas. Al mismo tiempo, dado que poblaciones isleñas surgidas de la colonización sobre el mar habrían sido probablemente fundadas por individuos provenientes de un continente, mostrarían la huella de un efecto fundador en la forma de una menor diversidad genética en comparación con lo observado en el continente. Es importante señalar que la proporción de disminución en la diversidad genética que se observe estará afectada por la magnitud y la duración del cuello de botella, así como el tiempo transcurrido desde que éste ocurrió (Epperson, 2004). Sería plausible esperar que si el flujo génico posterior a la colonización se ha mantenido pero la distancia entre las poblaciones lo limita, se observaría un gradiente en el que las islas más distantes y/o más pequeñas, contendrían una menor diversidad genética (Franks, 2010). Por lo tanto, si los eventos de dispersión son poco frecuentes y el flujo génico a grandes distancias es esporádico, la magnitud de la diferenciación genética sería directamente proporcional a la distancia (Rousset, 1997, 2001).

Estas hipótesis pueden ser contrastadas de forma bastante clara en casos en los que una misma especie presenta una distribución que abarca tanto una fracción continental como una insular, pues éste es un marco de referencia adecuado para ponderar los efectos de la insularidad en la diversidad genética.

Respecto a la existencia de cuellos de botella en las poblaciones que han colonizado islas, la evidencia señala que la biología de cada organismo afecta de manera importante la intensidad del proceso. Así, en algunos casos se ha encontrado evidencia que sustenta que la intensidad y frecuencia de los cuellos de botella es alta (Avice & Marick, 1996), mientras que otros estudios han arrojado que muchas plantas invasoras o introducidas no pasan por cuellos de botella o no sufren pérdidas significativas en su adecuación (Hollingsworth & Bailey, 2000; Richards *et al.*, 2008; Ross & Shoemaker, 2008; Suarez *et al.*, 2008).

La filogeografía ha aportado evidencia genética sólida acerca de los procesos recientes que han afectado a las poblaciones insulares. Así, se han podido reconocer casos en los que la fragmentación del hábitat por pérdida de conexiones entre las islas o entre éstas y el continente ha jugado un papel importante para diferentes plantas en las islas Ryukyu al sur de Japón (Kyoda & Setoguchi, 2010; Nakamura *et al.* 2010). Por otra parte, estudios filogeográficos han permitido reconocer casos de flujo génico por encima del mar, superando una aparente barrera geográfica durante el Pleistoceno, en una especie de Rubiaceae en las islas Ryukyu (Nakamura *et al.*, 2010), en la llegada del género *Anolis* a Dominica desde Puerto Rico (Eales *et al.*, 2010) y en múltiples eventos de colonización de las Antillas Menores desde Sudamérica por peces del género *Rivulus* (Walter *et al.*, 2010). En el otro extremo, las poblaciones de *Nigella arvensis* (Ranunculaceae) en islas continentales del Mar Egeo han evolucionado predominantemente por deriva génica posterior a la fragmentación por cambios en el nivel del mar, sin que el flujo génico o la colonización a largas distancias hayan desempeñado un papel importante (Bikttau & Comes, 2005).

En especies del género *Pinus*, este enfoque ha provisto de algunos ejemplos con patrones interesantes. En particular, la colonización de islas de naturaleza diversa desde las poblaciones continentales ha sido documentada para algunas especies de pinos en Asia y África. Por ejemplo, en *Pinus luchuensis*, una especie distribuida en el sudeste de

China, las islas Ryukyu y Taiwán, análisis filogeográficos empleando marcadores de DNA mitocondrial y de cloroplasto han mostrado evidencia filogeográfica de eventos repetidos de colonización desde el continente hacia las islas (Chiang *et al.*, 2006). Este estudio también soporta la existencia de un patrón de colonización reciente desde un refugio glacial (Taiwán), hacia las islas del norte, sin que ello tenga correlación con la edad de las islas, como normalmente ocurre (Emerson, 2002) debido a que todas estas islas tienen la misma edad. Los altos niveles de diversidad genética encontrados en las poblaciones isleñas de *P. luchuensis* sugieren que permanecieron relativamente estables durante las glaciaciones, resultando menos sujetas a cuellos de botella que las poblaciones del continente, las cuales presentan niveles de variación genética en cloroplasto y mitocondria inesperadamente bajos (Chiang *et al.*, 2006). Un patrón similar fue encontrado en la única población de *Callitrosis guadalupensis* en la isla de Guadalupe, donde los niveles de variación en la isla son mayores a los de las especies del continente (Norteamérica) probablemente debido a una historia demográfica más estable en la isla (Rosas *et al.*, 2011).

Mientras las islas al sudeste de China pueden considerarse como claramente continentales en su origen, en el otro extremo tenemos el caso de las Islas Canarias, las cuales son de origen volcánico y corresponden claramente a islas oceánicas (Ancochea *et al.*, 1990). En ellas habita *Pinus canariensis*, cuya demografía histórica y genética de poblaciones ha sido ampliamente estudiada a partir de microsátélites de cloroplasto (Gómez *et al.*, 2003; Vaxevanidou *et al.*, 2006; Navascués *et al.*, 2006, 2009). La evidencia de estos trabajos indica que una vez colonizadas las islas, se ha mantenido flujo recurrente entre varias de ellas incluso a larga distancia (sin necesidad de “piedras de paso”), resultando en que la mayor parte de la varianza genética se encuentra contenida en poblaciones dentro de las mismas islas y muy poca entre las islas (Gómez *et al.* 2003). Al mismo tiempo se ha sugerido que *P. canariensis* se originó a partir de un solo evento de colonización de las Islas Canarias desde la Cuenca del Mediterráneo. Más aún, el patrón de colonización observado en ésta especie es concordante también con la dirección predominante de los vientos (Gómez *et al.*, 2003), dado que las poblaciones más occidentales del archipiélago (y alejadas del continente) muestran también los linajes más jóvenes, sugiriendo un patrón de colonización este-oeste.

El patrón de distribución de la variación genética en *Pinus pumila* – si bien ha sido menos estudiado que *P. canariensis*– permite ilustrar la naturaleza compleja del flujo génico en contextos insulares. *P. pumila* se distribuye en Siberia, el Noreste de China, la península de Corea y en las islas de Hokkaido y Honshu en el archipiélago Japonés. En esta especie, las poblaciones no muestran disminución en la diversidad genética (a nivel de isoenzimas) en Hokkaido y en la porción norte de Honshu; sin embargo al interior de la isla de Honshu, se ha encontrado una disminución de la diversidad en la región sur (Tani *et al.*, 1996). Se ha sugerido que esta especie extendió su intervalo de distribución durante los periodos glaciales y que el factor clave en la determinación de la magnitud del fenómeno de cuello de botella dependió de la presencia cadenas montañosas que permitiesen un flujo génico más extenso a lo largo de ellas (Tsumura, 2003). Estos ejemplos ilustran como las expectativas descritas por Franks (2010) respecto a la magnitud de los cuellos de botella, el flujo génico dentro y entre las poblaciones de la islas pueden ser corroboradas o no, dependiendo de la naturaleza, no sólo biológica, sino geológica del sistema de estudio. La subsección *Australes* del género *Pinus* ofrece, en la Cuenca del Caribe un modelo interesante para estudiar los procesos históricos que han afectado la distribución de la variación genética en un archipiélago.

1.3 El género *Pinus* y la Subsección *Australes*

El género *Pinus* es el grupo de coníferas más diverso en la actualidad, con 115 especies (Farjon & Styles, 1997; Eckenwalder, 2009). Las sinapomorfias morfológicas que distinguen al género de otras coníferas son la presencia de hojas secundarias tipo aguja, comúnmente agrupadas en fascículos y con una vaina en la base constituida por escamas del brote (la vaina puede ser perenne o caduca); por otra parte, los conos ovulíferos compuestos presentan los extremos de las escamas ovulíferas engrosados en la forma de una apófisis, mientras que la bráctea adosada a cada escama se encuentra muy reducida (Farjon & Styles, 1997).

Los pinos se originaron en el hemisferio norte, probablemente en el este de Asia o el Oeste de Norteamérica hace alrededor de 155 millones de años [MA] (Gernandt *et al.*, 2008). Aunque su presencia en Norteamérica es antigua, el género *Pinus* se

diversificó notablemente a partir de su llegada a México, hace 21 millones de años (Farjon & Styles, 1997; Styles, 1997; Graham, 1991; Gernandt *et al.*, 2006, 2008). La dirección general de la colonización de México y Centroamérica por los pinos fue nortesur.

La circunscripción de *Pinus* subsección *Australes* (Loudon, 1838) ha cambiado a lo largo del tiempo, siendo la propuesta de Gernandt *et al.* (2004) la que seguiremos en este trabajo. En esta definición, la Subsección *Australes* es un grupo monofilético dentro de la Sección *Trifoliae* (Figura 1.4); aunque por otra parte diversos trabajos no han logrado resolver completamente las relaciones filogenéticas al interior de este grupo (Dvorak, 2000; Geada-López, 2005; Eckert & Hall, 2006; Gernandt *et al.*, 2008). De acuerdo a Gernandt *et al.* (2008) dentro del grupo monofilético de la Subsección *Australes* están incluidas especies del Oeste de Norteamérica (*Pinus attenuata*, *P. radiata* y *P. muricata*), especies del este y Sureste de Estados Unidos (*P. echinata*, *P. elliotii*, *P. palustris*, *P. pungens*, *P. rigida*, *P. taeda*,) así como especies con distribución en México, Centroamérica y la Cuenca del Caribe (*P. caribaea*, *P. cubensis*, *P. elliotii*, *P. greggii*, *P. lawsonii*, *P. leiophylla*, *P. lumholtzii*, *P. oocarpa*, *P. occidentalis*, *P. patula*, *P. pringlei*, *P. teocote*; ver figura 1.4). Se ha estimado que la edad de la divergencia que dio origen a la Subsección *Australes* es reciente, oscilando entre hace aproximadamente 11 MA (Willyard *et al.*, 2007) y 5 MA (Gernandt *et al.*, 2008).

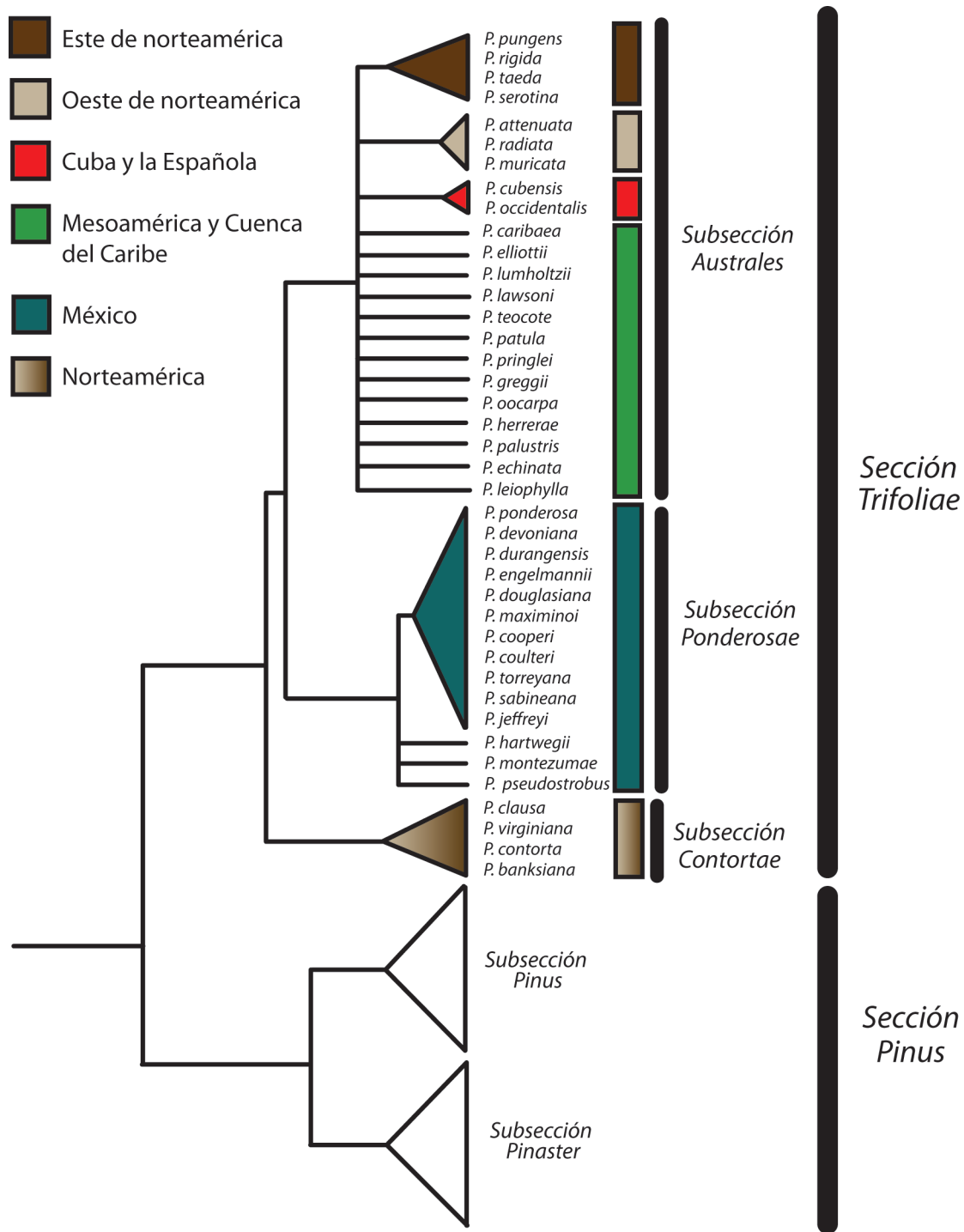


Figura 1.4 Filogenia reconstruida utilizando secuencias de *rbcL* y *matK* totalizando 2817 pb, modificada de Gernandt y colaboradores (2005). Se incluye en esta figura solamente la parte que corresponde al subgénero *Pinus*, sin detallar las relaciones al interior de la Sección *Pinus*. Las franjas de color del lado derecho indican las áreas geográficas donde se distribuyen los diferentes grupos.

Autores como Mirov (1967) o Price (1998) han propuesto un posible origen centroamericano para la distribución de la Subsección *Australes* en la Cuenca del Caribe. Hipótesis similares han sido planteadas por Little y Dorman (1954) y por Dorman (1974), sosteniendo que *P. elliottii* var. *densa*, distribuída en Florida, se habría originado a partir de poblaciones de *P. caribaea*. En un sentido ligeramente diferente, Dvorak (2000) planteó, a partir de análisis filogenéticos basados en caracteres moleculares, que el linaje de *P. caribaea* habría colonizado las islas del Caribe y posteriormente originado *P. elliottii* var. *elliottii*, compartiendo la hipótesis de una colonización de las islas del Caribe desde el sur, a partir de la posición relativamente derivada de la especie de Florida.

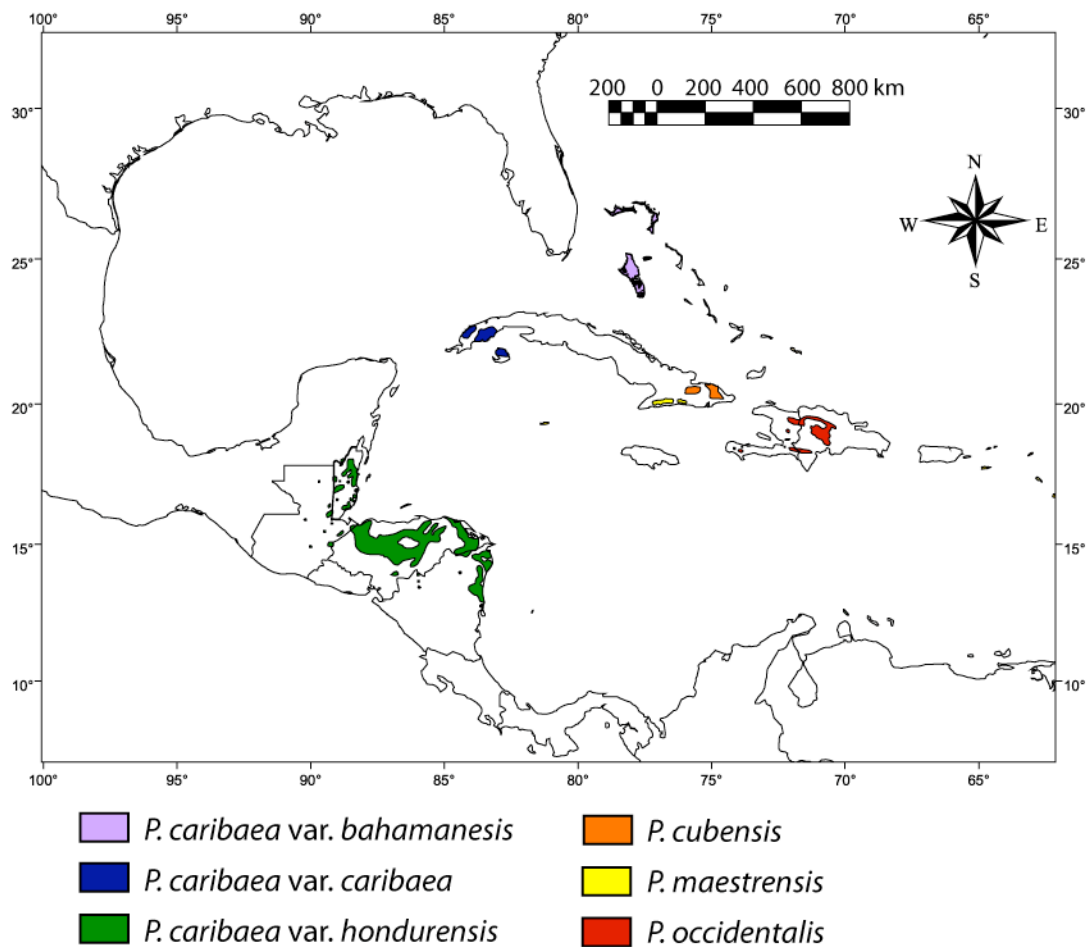


Figura 1.5 Distribución geográfica de las especies de la Subsección *Australes* en la Cuenca del Caribe. Las áreas de distribución corresponden al trazo de Critchfield & Little (1966), distinguiéndose el área de distribución que corresponde a *P. maestrensis* de acuerdo a López-Almirall (1982).

Por otra parte tanto Farjon (1996) como Adams y Jackson (1997) han propuesto un origen Norteamericano para la distribución de la Subsección *Australes* en la Cuenca del Caribe. El trabajo de Adams y Jackson (1997) basó el análisis filogenético en caracteres del cono ovulífero. En este análisis, se recuperó a *P. occidentalis*, *P. cubensis* y *P. caribaea* como grupos sucesivamente más derivados, mientras los grupos basales en la filogenia corresponden a *P. elliottii*, lo cual llevó a inferir una colonización de las Antillas y luego de Centroamérica desde Norteamérica siguiendo el patrón norte-sur.

En la Cuenca del Caribe se distribuyen cuatro especies diferentes de *Pinus* correspondientes a la subsección *Australes* (Figuras 1.5 y 1.6). Con un origen relativamente reciente, la subsección *Australes* ha evolucionado en la cuenca del Caribe ocupando hábitats completamente tropicales, siendo el linaje de pinos con distribución más meridional en América. Al contar con especies como *P. caribaea* (Figura 1.6), cuya distribución abarca tanto tierras continentales en Centroamérica como parte las Antillas Occidentales, el grupo permite analizar la historia de la distribución entre el continente y las islas. Al mismo tiempo, la distribución contrastante entre las especies del grupo, (la amplia distribución de *P. caribaea* por un lado y la distribución mucho más restringida de *P. cubensis*, *P. maestrenesis* y *P. occidentalis* por el otro) el grupo también permite comparar la distribución de la variación genética entre estos dos casos. Por último, se trata de un grupo de evolución reciente, con una tasa de diversificación mayor a la de otros linajes del género (Gernandt *et al.*, 2008). Las especies caribeñas se distribuyen en islas cuya historia geológica sugiere, como veremos en el segundo capítulo de esta tesis, que están separadas de las masas continentales desde antes de que la Subsección *Australes* hubiese divergido. Por lo que es posible pensar que las especies de esta subsección, hubiesen llegado a la parte insular de la distribución a través de colonización sobre el mar.

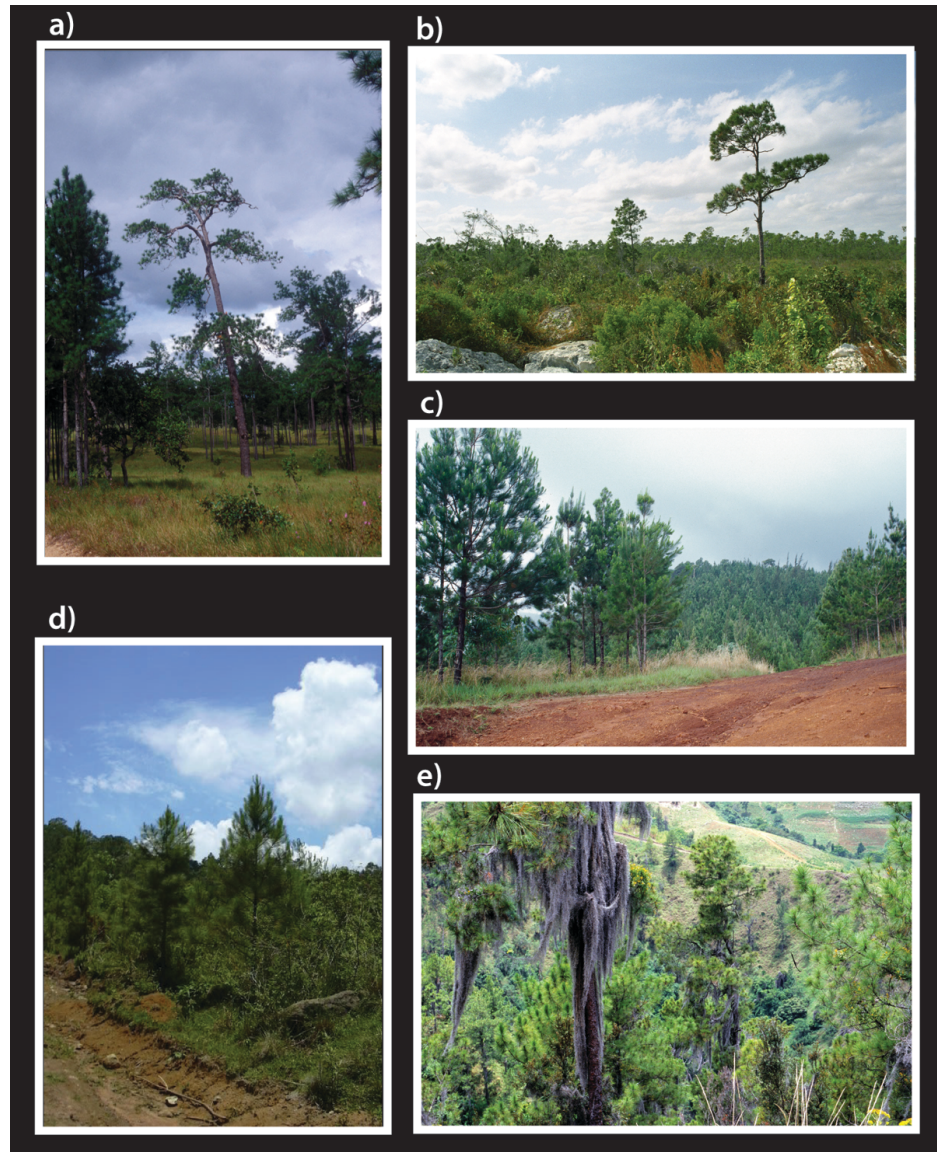


Figura 1.6 Pinos de la subsección *Australes* en la Cuenca del Caribe: *Pinus caribaea* en una Sabana de Pinos madura (a), y colonizando un afloramiento de coral (b); *P. cubensis* en la zona de Cabonico, Cuba (c); *P. maestrensis* en las vertiente sur de la Sierra Maestra; *P. occidentalis* en un bosque húmedo en el centro de La Española.

El objetivo de este trabajo es aportar elementos a la comprensión de los procesos históricos que han dado origen a la distribución de las especies de pinos en esta región y al mismo tiempo, utilizar éstas especies como un grupo modelo para el estudio de algunos procesos relevantes en la distribución de la variación genética, tales como el flujo genético a larga distancia y los procesos demográficos asociados a los cambios ambientales durante los periodos glaciales propios del Pleistoceno. La distribución de

estos linajes en la Cuenca del Caribe proporciona un modelo interesante para estudiar el tipo de factores que ha moldeado la distribución de un grupo de especies afines en un contexto de continentes e islas de tipo *fragmentos continentales*. Por otra parte, *Pinus caribaea* y los linajes del Oriente de la Cuenca tienen patrones de distribución contrastantes, teniendo la primera una amplia distribución y los segundos están restringidos a una sola isla. Por lo anterior, este modelo permite contrastar los procesos que afectan diferentes tipos de especies, con hábitos ecológicos diferentes. Al mismo tiempo, la naturaleza de la distribución de *Pinus caribaea* permite comparar la variación genética entre la parte continental de la distribución y las poblaciones de las islas.

La historia geológica de la Cuenca del Caribe resulta relevante en la medida en que, como resultado de ésta, quedó configurado el escenario en el que el género *Pinus* evolucionó en esta región. En general, la historia de las islas que componen el archipiélago de las Antillas Mayores, así como las islas adyacentes sobre la Plataforma de Las Bahamas ha sido relevante para la historia biogeográfica de la región. Por ello, el segundo capítulo de esta tesis revisa la historia geológica y biogeográfica de la Cuenca del Caribe, con énfasis en dos aspectos: 1) la paleogeografía de la Cuenca, relacionada directamente con la cantidad de tierras emergidas disponibles a la colonización de *Pinus* y 2) el origen geográfico de los linajes de plantas que viven en la actualidad en las islas del Caribe, particularmente en las Antillas Mayores.

A partir de se contexto general, realicé un análisis filogeográfico basado en marcadores moleculares de cloroplasto, mismo que fue publicado como un artículo independiente y que se incluye en esta tesis como tercer capítulo.

Para profundizar en esta línea realicé un análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA), el cual sirvió como matriz para realizar una serie de análisis de demografía histórica y para contrastar de manera explícita el papel del flujo génico a larga distancia a través de análisis de gráfica de poblaciones. Estos análisis se desarrollan en el cuarto capítulo de esta tesis, enfatizando los procesos generales en cuya inferencia coinciden diferentes aproximaciones.

Finalmente, en el capítulo 5 se elaboran algunas conclusiones generales y perspectivas para posteriores trabajos.

1.4 Hipótesis

La Subsección *Australes* es más reciente que la conformación de la placa del Caribe y que la edad estimada para la emergencia de las islas del Caribe en las que en la actualidad se distribuyen *P. caribaea*, *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*. Por lo que se espera encontrar un patrón de colonización desde el continente (Centroamérica) hacia las islas. Ello debería reflejarse tanto en la distribución de los niveles de variación genética, como en la distribución de los haplotipos probablemente ancestrales.

Pinus caribaea es una especie que se distribuye en regiones sujetas a incendios periódicos, los cuales se incrementan durante los periodos más secos. Considerando que durante los máximos glaciales la precipitación en Centroamérica y el Caribe habría disminuido, al tiempo que la superficie emergida de las islas se incrementó debido al descenso en el nivel del mar (Iturralde-Vinent, 2006), esperaríamos encontrar evidencia de incrementos demográficos en las poblaciones asociados a las fechas de alguno de los máximos glaciales.

Los patrones contrastantes en la distribución de las especies en el Occidente y en el Oriente de la Cuenca del Caribe se verán reflejados en diferentes niveles de estructura y de variación, prevaleciendo mayor variación y mayor grado de estructuración en *P. caribaea* que en las especies con distribución más restringida.

1.5 Objetivos

1. Identificar las formas de flujo génico y de aislamiento que se presentan en los pinos de la subsección *Australes* en la Cuenca del Caribe, en particular poner a prueba las hipótesis de aislamiento por distancia, dispersión a larga distancia y fragmentación alopatrica de las poblaciones.
2. Inferir el origen de los linajes cloroplásticos de la subsección *Australes* que se distribuyen en la actualidad en las islas de la Cuenca del Caribe.

3. Analizar la evidencia genética de expansión poblacional durante los periodos glaciales, a partir de la comparación de los patrones de variación observados en los haplotipos de cloroplasto, con los esperados bajo un modelo genealógico que suponga dicha expansión.

4. Comparar los niveles de variación genética y de estructura geográfica de dicha variación entre los linajes de pinos que se distribuyen en el occidente y en el oriente de la Cuenca del Caribe

1.6 Referencias

- Adams DC & Jackson JF (1997) A phylogenetic analysis of the southern pines (*Pinus* subsect. *Australes* Loudon): biogeographical and ecological implications. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **110**: 681–692.
- Ancochea E, Fúster JM, Ibarrola E, Cenrdero A, Coello J, Hernán F *et al.* (1990). Volcanic evolution of the island of Tenerife (Canary Islands) in the light of new K-Ar data. *Journal of Vulcanology and Geothermal Research*, **44**: 231-249.
- Avise JC (2000) *Phylogeography. The history and formation of species*. Cambridge, EU, Harvard University Press.
- Avise JC (2009) Phylogeography, retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, **36**: 3-15.
- Barton NH & Charlesworth B (1984) Genetic revolutions, founder effects and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**:133–164.
- Beebee TJ & Rowe G. (2008) *An introduction to molecular ecology*. New York, EU, Oxford University Press.
- Bittkau C & Comes HP. (2005) Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA. *Molecular Ecology*, **14**: 4065-4083.
- Broughton RE & Harrison RG. (2003) Nuclear gene genealogies reveal historical, demographic and selective factors associated with speciation in field crickets. *Genetics*, **163**: 1389–1401.

- Buskirk RE (1985) Zoogeographic patterns and tectonic history of Jamaica and northern Caribbean. *Journal of Biogeography*, **12**: 445-461
- Carstens, BC, Sullivan J, Davalos LM, Larsen PA & Pedersen SC (2004) Exploring population genetic structure in three species of Lesser Antillean bats. *Molecular Ecology*, **13**: 2557–2566.
- Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, GeřT XJ, Hsu W & Chiang TY (2006) Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Molecular Ecology*, **15**: 765-779
- Cook LG & Crisp MD (2005) Directional assymetry of long-distance dispersal and colonization could mislead reconstructions of biogeography. *Journal of Biogeography*, **32**: 741-754.
- Critchfield WB & Little EL (1966) Geographic distribution of the pines of the world. *US Department of Agriculture, Forest Service Miscellaneous Publication*, **991**:1-96.
- Cruzan MB & Templeton AR (2000) Paleoecology and coalescence: phylogeographic analyses of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**: 491-496
- Dávalos LM (2007) Short-faced bats (Phyllostomidae: Stenodermatina): a Caribbean radiation of strict frugivores. *Journal of Biogeography*, **34**: 364–375.
- De Queiroz A (2005) The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**: 68-73.
- Dorman K (1974) Genetics and Breeding of Southern Pines. *US Department of Agriculture, Agricultural Handbook 471*. 407 pp.
- Dvorak WS, Jordon AP, Hodge GP & Romero JL (2000). Assessing the evolutionary relationships of the pines in the Oocarpae and Australes subsections using RAPD markers. *New Forests*, **20**: 163–192.
- Dvorak WS, Hamrick JL & Gutierrez EA (2005) The origin of the Caribbean pine in the seasonal swamps of the Yucatán. *International Journal of Plant Sciences*, **166**: 985–994.
- Eales J, Thorpe RS & Malhorta A. (2010). Colonization history and genetic diversity: adaptive potential in early stage invasions. *Molecular Ecology*, **19**: 2858-2869.
- Eckenwalder JF (2009) Conifers of the world: the complete reference. Portland, EU, Timber Press.
- Emerson BC (2002) Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to

- understanding pattern and process. *Molecular Ecology*, **11**: 951-966.
- Epperson BK (2004) *Geographical genetics*. Nueva Jersey, EU, Princeton University Press.
- Farjon A (1996) Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleoendemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **121**: 365–384.
- Farjon A & Styles BT (1997) *Flora Neotropica*, *Pinus* (Pinaceae). Nueva York, EU, The New York Botanical Garden.
- Franks SJ. (2010) Genetics, evolution and conservation in islands. *International Journal of Plant Sciences*, **53**: 1-9.
- Galbany-Cassals M, Garcia-Jaquas N, Sáez L, Benedí C & Susana A (2009) Phylogeny, biogeography and character evolution in Mediterranean, Asiatic and Macaronesian *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) inferred from nuclear phylogenetic analyses. *International Journal of Plant Sciences*, **170**: 365-380.
- Gernandt D, Geadá-López G, Ortiz-García S & Liston A (2005). Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, **54**: 29–42.
- Gernandt D, Magallón S, Geadá-López G, Zeron-Flores O, Willyard AS & Liston A (2008) Use of simultaneous analyses to guide fossil-based calibrations of Pinaceae phylogeny. *International Journal of Plant Sciences*, **169**: 1086–1099.
- Graham A (1999) Studies in neotropical palaeobotany. XIII. An Oligo-Miocene palynoflora from Simojovel (Chiapas, Mexico). *American Journal of Botany*, **86**: 17–31.
- Kim SC, Mc Gowen MR, Lubinsky P, Barber JC, Mort ME, Santos-Guerra A (2008) Timing and tempo of early and successive adaptive radiations in Macaronesia. *PLOS One*, **3**: 1-7.
- Knowles L & Carstens B, 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, **56**: 887–895.
- Kyoda S & Setoguchi H (2010) Phylogeography of *Cycas revoluta* Thunb. (Cycadaceae) on the Ryukyu islands: very low genetic diversity and geographical structure. *Plant Systematics and Evolution*, **288**: 177-189.
- Heany LR (2007) Is a new paradigm emerging for oceanic island biogeography? *Journal of Biogeography*, **34**: 751-754.
- Iturralde-Vinent M (2006) Meso-Cenozoic Caribbean Paleogeography: implications for historical biogeography of the region. *International Geology Review*, **48**: 791-827.

- Little EL & Dorman KW (1954) Slash pine (*Pinus elliottii*), including south Florida slash pine. *Southeastern Forest Experimental Station Paper No. 36*. Asheville, EU.
- López-Almirall A (1982) Variabilidad del género *Pinus* (Coniferales: Pinaceae) en Cuba. *Acta Botánica Cubana*, **12**: 1–32.
- Loudon JC (1838) *Pinus*. Pp. 2152–2192 En: *Arboretum et Fructicetum Britannicum*, vol. 4. Londres, RU, Publicado por el autor.
- Malécot G (1975) Heterozygosity and relationship in regularly subdivided populations. *Theoretical Population Biology*, **8**: 212-241.
- Morrone JJ & Crisci JV (1995) Historical biogeography: introduction to methods. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **26**: 373–401
- Mirov NT (1967) *The Genus Pinus*. Nueva York, The Ronald Press Company.
- Nakamura K, Denda T, Kokubugata G, Suwa R, Yang TY, Peng C-I & Yokota M, (2010). Phylogeography of *Ophiorrhiza japonica* (Rubiaceae) in continental islands. *Journal of Biogeography*, **37**: 1907-1918.
- Nordborg M (2001) Coalescent theory. En: Balding DJ, Bishop M & Cannings C, 2001 *Handbook of statistical genetics*. Nueva York, EU, John Wiley & Sons LTD.
- Pleines T, Jakob S & Blattner FR (2009) Application of noncoding DNA regions in intraspecific analysis. *Plant Systematics and Evolution*, **282**: 281-294.
- Qiu Y-X, Fu C-H & Comes HP (2011) Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **59**: 225-244.
- Ricklefs R, Bermingham E. 2008. The West Indies as a laboratory of biogeography and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)*, **363**: 2393–2413.
- Rosas-Escobar P, Gernandt DS, Piñero D & Garcillán GP (2011) Plastid DNA diversity is higher in the island endemic Guadalupe cypress than in the continental Tecate cypress. *PLoS One*, **6**: e16133
- Rosenberg NA & Nordborg M (2002) Genetical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* **3**: 380-390.
- Rousset, F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-Statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**: 1219-1228.

- Rousset (2001) Genetic approaches to the estimation of dispersal rates. En: Clobert J, Danchim E, Dhondt AA & Nichols JD, 2001 *Dispersal*. Oxford, RU, Oxford University Press.
- Schaal B, Hayworth D, Olsen K, Rauscher J & Smith W (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**: 465–474.
- Schaal B & Olsen K (2000) Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 7024–7029.
- Tani N, Tomaru N, Araki M & Ohba K (1996) Genetic diversity and differentiation in populations of Japanese stone pine (*Pinus pumila*) in Japan. *Canadian Journal of Forest Research*, **26**: 1454-1462.
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, **13**: 789-809.
- Tsumura Y. (2006) The phylogeographic structure of Japanese coniferous species as revealed by genetic markers. *Taxon*, **55**: 53-66.
- Wakeley J. (2000) The effects of population subdivision on the genetic divergence of populations and species. *Evolution*, **54**: 1092-1101.
- Wakeley J. (2009) *Coalescent theory*. Greenwood Village, EU, Robertson & Company Publishers.
- Whittaker RJ & Fernández-Palacios JM (2007) *Island Biogeography: ecology, evolution and conservation*. Nueva York, EU, Oxford University Press
- Willyard A, Syring J, Gernandt DS, Liston A & Cronn R (2007) Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 90-101
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**: 323-354.
- Zink R. M., Blackwell-Rago R. & Ronquist F (2000) The shifting roles of dispersal and vicariance in biogeography. *Proceedings of the Royal Society of London (B)*, **267**: 497-503.

Historia geológica de la Cuenca del Caribe y su impacto sobre la distribución de la vegetación terrestre

2.1 Historia geológica del Caribe

Tectónica de la Placa del Caribe y placas vecinas

La historia tectónica tiene clara relevancia en el estudio de la distribución de los seres vivos en la medida en que ha afectado la distribución y la cantidad de hábitats disponibles para los mismos. En el caso de la vegetación terrestre de la que se distribuye alrededor y dentro de la Cuenca del Caribe las relaciones geológicas entre las islas y los continentes han afectado la conectividad y aislamiento entre las diferentes zonas de la actual Cuenca. Por ello, es importante comenzar tratando brevemente los movimientos tectónicos más importantes en la región.

El origen geológico de la Cuenca del Caribe se remonta a la fractura de la antigua placa de Farallones y el posterior desplazamiento del fragmento correspondiente a la placa del Caribe, el cual se inicia en el Cretácico superior, hace alrededor de 95 millones de años (López-Ramos, 2001). En términos estrictos, la corteza que conforma el piso del actual mar Caribe no existió sino hasta el Cretácico tardío, hace unos 70 MA (Pindell, 1990; Escobar 2005). El desplazamiento subsecuente dio origen a la formación del arco magmático del que surgieron las Antillas mayores y menores. Este arco magmático surgió, al parecer, a unos 1000 km al oeste-sudoeste de su posición actual y hacia el Eoceno medio (hace 49 millones de años) comenzó a desplazarse hacia el noreste (Iturralde-Vinent & Mc Phee, 1999; López-Ramos, 2001; Graham, 2003a, b). El vulcanismo ha jugado un papel importante en la conformación temprana de las Antillas mayores, sin embargo los procesos de plegamiento por subducción en esta región han sido más importantes que en las Antillas menores (Iturralde-Vinent, 2006). Lo anterior ha derivado en una diversidad mayor de tipos de roca madre en las primeras, esto último

asociado a una mayor diversidad de suelos y como consecuencia una mayor heterogeneidad de hábitats (Lewis & Draper, 1990; Hedges, 2001; López-Ramos, 2001; Santiago-Valentin & Olmstead, 2004).

Los procesos geológicos que afectan la Cuenca del Caribe abarcan por lo menos cuatro placas tectónicas adicionales a la Placa del Caribe, la Placa de Cocos, la Placa Nazca, la Placa Sudamericana y la Placa Norteamericana (Figura 2.1). Dentro de la Placa de Norteamericana, las unidades morfotectónicas del bloque Yucatán y la Plataforma de Bahamas han sido importantes en la conformación de la cuenca del Caribe al haber sido obstáculos al desplazamiento del arco magmático en diferentes épocas (Iturralde-Vinent, 2006; Pindell & Kennan, 2009). En general la historia de las Antillas se explica en función del desplazamiento de dos arcos magmáticos, siendo el de las Antillas mayores el más viejo (Pindell & Kennan, 2009). Es importante señalar que al ser el objeto central de esta sección el abordar la historia de la cuenca del Caribe, el desplazamiento al que se prestará mayor atención es el de la Placa del Caribe en relación con las ya mencionadas en este párrafo; sin embargo, se sabe que este movimiento relativo es el resultado de que el desplazamiento hacia el oeste es más rápido para las Placas Sudamericana y Norteamericana (Pindell & Kennan, 2009).

La rotación en sentido contrario a las manecillas del reloj del bloque de Yucatán abrió una zona de fractura que determinó la ruta que siguió el desplazamiento de la placa de corteza que dio origen a la Placa del Caribe, el cual se ubicaría en el actual Océano Pacífico, (Pindell *et al.*, 2006). A lo largo del Terciario, el bloque de Chortis se desplazó detrás de la placa de Caribe; las tierras emergidas del Bloque de Chortis y posteriormente el arco magmático surgido de la subducción en el borde de la placa Centroamericana terminaría por delimitar la cuenca del mar Caribe como una unidad separada y aislada del océano Pacífico (Iturralde-Vinent, 2006; Meschede & Frisch, 1998). La mencionada rotación del bloque de Yucatán, al mismo tiempo que delimitó el subsistema de la Cuenca del Golfo de México, permitió la delimitación noroccidental del actual mar Caribe. A la fecha ambas cuencas se consideran subsistemas acoplados del Mar Intra-Americano (*Intra-Americas Sea*) por la intensidad del flujo de agua entre ambas cuencas y su grado de integración a nivel ecosistémico (Escobar 2005).

La dirección inicial del desplazamiento de la placa ProtoCaribe fue predominantemente hacia el Este, tendencia que se mantuvo hasta el Paleoceno (hace aproximadamente 54 Ma; Iturralde-Vinent, 2006). Este desplazamiento llevó al choque con la placa del Atlántico, formándose un borde de subducción a lo largo del cual se elevó la cresta de Aves, con importante actividad volcánica, como resultado del hundimiento de la placa del Atlántico bajo la placa ProtoCaribe (Giunta *et al.*, 2006). Esta etapa ha sido llamada la Segunda EoCaribe. La placa del Caribe, como la conocemos hoy en día incluye a los bloques de Chortis, y Chorotega, los cuales conforman el límite occidental de la Placa del Caribe a partir de un proceso de rotación ocurrido del Cretácico-tardío al Paleógeno (Pindell & Kennan, 2009).

Se ha calculado que es hacia el Eoceno Medio o inmediatamente después (hace 49 millones de años) que comenzaron a emerger los primeros fragmentos de lo que hoy son las Antillas Mayores, aunque como hemos dicho, esto ocurrió lejos de su ubicación actual (Graham, 2003a; Iturralde-Vinent, 2006). Es hasta unos 30 millones de años después, en el Mioceno medio (hace unos 10 Ma) que los fragmentos de las Antillas Mayores y el arco volcánico de las Antillas quedaron en una posición muy cercana a la de nuestros días, en relación con las masas continentales de Norteamérica y Sudamérica.

En el Eoceno Tardío (hace unos 38 Ma) ocurrió un cambio en el régimen tectónico que acentuó el levantamiento de tierras en la porción norte del arco de las Antillas. La placa de Farallones alteró la dirección de su desplazamiento del hacia el este a hacia el noreste. Este cambio (Engbertson *et al.*, 1985; Meschede, 1994) ha sido interpretado como consecuencia de alteraciones en el plegamiento del margen norte de la Placa del Caribe debido a la transmisión de la tensión a lo largo de la frontera tectónica Farallones/Caribe (Meschede *et al.*, 1997; Meschede & Frisch 1998; Iturralde-Vinent, 2006). Respecto a la causa del cambio en la dirección del desplazamiento, parece haber consenso en que justamente en esta época (50-38 MA) habría comenzado el choque de la placa del Caribe con la plataforma de las Bahamas (Mann & Burke, 1984; Buskirk, 1985; Pindell & Barret, 1990; Iturralde-Vinent & Mac Phee, 1999). Este choque está relacionado con el incremento en la elevación del Arco de las Antillas Mayores en esa época, de Cuba a Puerto Rico. Es importante señalar que en ese momento, la isla de Jamaica se habría encontrado en su mayor parte sumergida cientos

de kilómetros al este de su posición actual, iniciando el desplazamiento hacia el Este junto con el Bloque Chortis hasta el Mioceno temprano (hace alrededor de 23 MA), conforme el borde noreste de la placa del Caribe se convirtió en borde de transformación (Buskirk, 1985).

Las consecuencias del cambio en el desplazamiento de la Placa Caribe también afectaron el desarrollo de la Cresta de Aves, la cual describe un arco casi paralelo a las Antillas Menores actuales y estuvo expuesta como un continuo de tierras emergidas solamente por un breve periodo (alrededor de 4 millones de años, Iturralde-Vinent, 2006). Aunque la importancia biogeográfica como un puente para la biota terrestre de esta cresta es debatida aún por Hedges (2006), su existencia, al menos como un archipiélago durante el Eoceno tardío-Oligoceno temprano (35-33 Ma) coincide entre diferentes investigadores (Meschede & Frisch, 1998; Iturralde-Vinent & MacPhee, 1999; Iturralde-Vinent, 2006; Pindell, 1990, 2006). En última instancia, durante el Oligoceno (33.7 a 23.8 Ma), el incremento en el nivel del mar resultó en la inundación de tierras bajas y el fraccionamiento de las porciones emergidas de la Cresta de Aves (llamada GAARlandia como acrónimo laxo de los nombres “Greater Antilles” y “Aves Ridge” por Iturralde-Vinent, 1999, 2006).

A partir de la transición del Mioceno al Plioceno (alrededor de 5.3 Ma atrás) el movimiento predominante que se ha mantenido en la Placa del Caribe ha sido hacia el Este. De esta manera el arco de las Antillas Menores es un borde de subducción (ver Figura 2.1), mientras que la frontera norte de la Placa, que corre al sur de Cuba es predominantemente un borde de transformación (Meschede & Frisch, 1998; Kerr *et al.*, 1999, Iturralde-Vinent, 2006). Entonces es importante señalar que el actual arco volcánico de las Antillas Menores se originó recientemente, mientras que el paleo-arco, la Cresta de Aves, se encuentra hoy completamente sumergido (Iturralde-Vinent, 2006).

En el extremo sudoccidental de la placa del Caribe desde hace unos 12 millones de años comenzó la colisión de la Placa de Cocos desde el Pacífico (MacMillan *et al.*, 2004). Esta colisión es el origen de la subducción de la Placa de Cocos debajo de la placa del Caribe, misma que se fue desarrollando y originó actividad volcánica importante. En la parte sur de este arco volcánico se originaron las porciones de Tierra que hoy conforman Costa Rica y Panamá, cerrándose el Istmo de Panamá hace unos 3

millones de años (MacMillan *et al.*, 2004; Pindell & Keenan, 2009). Este hecho geológico terminó de delimitar la Cuenca del Caribe en su forma actual, con implicaciones geográficas y para la distribución de la biota que se discutirán en un apartado subsiguiente.



Figura 2.1. Mapa tectónico de la Cuenca del Caribe (modificado a partir de Iturralde-Vinent, 2006 y Pindell & Kennan, 2009).

Cambios en el nivel del mar

Los cambios en el nivel del mar pueden deberse tanto a cambios en el volumen real del océano (eustasia) o a cambios en el nivel de “flotación” de la corteza sobre el manto (isostasia, Schopf, 1980). El papel relativo de estos dos procesos en la Cuenca del Caribe ha sido poco estudiado.

En el caso del hundimiento de la Cresta Aves y de algunos de los procesos de hundimiento de la isla de Jamaica, es posible que los cambios isostáticos hayan jugado un papel de alguna relevancia (Buskirk, 1985, Iturralde-Vinent, 2006). Por otra parte, los cambios en el volumen del océano han jugado un papel importante, sobre todo en los últimos 5 millones de años (Miller *et al.*, 2005; Iturralde-Vinent, 2006).

El efecto de las glaciaciones del Pleistoceno en las tierras emergidas del Caribe debió ser distinto al de las zonas que estuvieron sujetas a la formación de los cascos de hielo, como Norteamérica y Europa. Los máximos glaciales implican una reducción del volumen global de agua en estado líquido en la Tierra, reduciendo el nivel del mar (eustasia). Esta reducción en el nivel del mar se vio parcialmente compensada en Europa y en Norteamérica debido al peso de los bloques de hielo, cuyo espesor se calcula hasta en 4000 m. Estos bloques cubrieron gran parte de dichos continentes lo cual habría modificado su flotabilidad por el incremento en el peso (Tinkler, 1983). La ausencia de este tipo de masas de hielo en las islas del Caribe y la mayor parte de Centroamérica, habría ocasionado que el cambio en el nivel del mar fuese más acentuado (Schopff, 1980). De modo concordante durante los interglaciares recientes, así como en épocas de mayor calidez (p. ej. el Oligoceno), la tendencia predominante habría sido el incremento en el nivel del mar (Dodge *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 2005; Iturralde-Vinent, 2006), incluso más acentuado que en las costas de zonas templadas. Por ejemplo, se ha documentado para hace 130 mil años, un ascenso de hasta 40 metros respecto al nivel actual en la costa de Haití (Dodge *et al.*, 1983). Los incrementos en el nivel del mar durante los interglaciales ocasionaron reducciones significativas en la superficie de tierras emergidas en las islas (Dodge *et al.*, 1983; Iturralde-Vinent, 2006)

En el caso del Golfo de México, con el cual la Cuenca del Caribe guarda una estrecha relación, se ha propuesto que las costas norteamericanas, incluyendo las del Sur de EU, habrían sido afectadas tanto por la baja en el nivel del mar como por el peso del hielo sobre la corteza (Simms *et al.*, 2007). De esta manera el descenso aparente (isostático) tal y como es leído en la distribución de isótopos de carbono en el Golfo de México hace 20 mil años, fue hasta 35 metros menor que en regiones ecuatoriales, aún así, las estimaciones realizadas a partir de datos de núcleos de diferentes puntos de la costa del Golfo, indican una disminución en hasta 100m respecto al nivel actual del mar para hace 20 mil años (Fairbanks, 1987; Simms *et al.*, 2007).

La historia reconstruida para las islas de la Cuenca del Caribe indica que el cambio en el nivel del mar fue intenso en la medida en que no fueron afectadas de forma importante por el peso del hielo. Así, tanto las inferencias de Dodge *et al.* (1983) como de Iturralde-Vinent y MacPhee (1999) ubican un descenso importante en el nivel del mar

en las costas de Cuba y Haití durante los periodos glaciales, de hasta 100m menos que el nivel actual. Estos descensos, de naturaleza eustática, formaron algunas conexiones entre islas, pero de corta duración y que no volvieron a poner en contacto a las Antillas mayores entre sí ni con Bahamas o Caimán, así como tampoco generaron conexiones con los continentes (Iturralde Vinent & MacPhee, 1999). Aunque el Canal de Yucatán ciertamente debió estrecharse.

Entre hace 15 y 10 millones de años, durante el Mioceno medio, comenzó la separación entre la parte oriental de Cuba y la parte noroccidental de La Española; este hecho es importante pues al parecer dio origen a procesos de vicarianza comunes a varios grupos, como se tratará más adelante. En esta misma época, Puerto Rico se separó de La Española manteniéndose emergida y en su posición actual desde hace unos 21 millones de años (Iturralde-Vinent & Mc Phee, 1999).

Es hasta el Mioceno tardío (10-5 millones de años) que se formó un continuo terrestre desde el occidente de Cuba (la actual Pinar del Río) hasta la parte occidental de la isla (Graham, 2003b). Antes de este periodo, hace 36 millones de años, la parte occidental de la isla de Cuba, aún no emergida, junto con la parte oriental de la misma y la Plataforma de Las Bahamas había quedado separada de las Antillas Mayores y Menores por el “Paso del Caimán”, falla geológica que colocó el frente de subducción cerca del borde sur de la isla de Cuba (Figura 2.1; López-Ramos, 2001).

2.2 Paleogeografía de la Cuenca del Caribe

He señalado que en la época de su surgimiento, hace unos 49 millones de años, el arco volcánico de las Antillas mayores se ubicaba unos 1000 km al sudoeste de su posición actual. En el Eoceno medio (hace 50-40 millones de años), la parte central de la isla de Cuba no estaba emergida, mientras que el extremo oriental de la isla formaba un continuo de tierras emergidas con la isla de la Española (Iturralde-Vinent & Mac Phee, 1999). En esta región encontramos en la actualidad algunas de las rocas más viejas dentro de las Antillas mayores. Como he mencionado, durante el Oligoceno muchas de las tierras emergidas dentro del Caribe estuvieron sumergidas debido al incremento en el nivel del mar. La importancia atribuida a la conectividad entre Sudamérica y las Antillas mayores debida a la existencia de una faja de tierra llamada GAARlandia por Iturralde-

Vinent (1999, 2006) ha disminuido. Aún así el debate permanece acerca de si la elevación de la Cresta de Aves afectó sensiblemente la circulación del agua dentro de la Cuenca; para Hedges (1992, 1996 y 2001), esta elevación habría tenido un papel menor y el patrón de dirección de las corrientes dominantes en El Caribe habría sido en términos generales desde este hacia el oeste.

Entre hace 15 y 10 millones de años, durante el Mioceno medio, comenzó la separación entre la parte oriental de Cuba y la parte noroccidental de La Española, el proceso está asociado. Este hecho es importante pues al parecer dio origen a procesos de vicarianza comunes a varios grupos, como se tratará más adelante. En esta misma época, Puerto Rico se separó de La Española manteniéndose emergida y en su posición actual desde hace unos 10 millones de años (Iturralde-Vinent & Mc Phee, 1999). Por último, es importante señalar que el proceso de levantamiento de generalizado de la isla de La Española corresponde al Plioceno-Plesitoceno (Mann *et al.*, 1984).

Posteriormente al choque entre la Placa del Caribe y la plataforma de Bahamas, Cuba existió como un archipiélago en el que la división más importante estuvo dada por el Canal Habana-Matanzas, que existió como una barrera marítima durante todo el periodo entre el Eoceno (40 millones de años) y el Mioceno tardío (Roughgarden, 1998; Iturralde-Vinent, 2006).

Es hasta el Mioceno tardío (10-5 millones de años) que se formó un continuo terrestre desde el occidente de Cuba (la actual Pinar del Río) hasta la parte occidental de la isla (Graham, 2003b). Antes, hace 36 millones de años, la parte occidental de la isla de Cuba, aún no emergida, junto con la parte oriental de la misma y la Plataforma de Las Bahamas había quedado separada de las Antillas Mayores y Menores por el “Paso del Caimán”, falla geológica que colocó el frente de subducción cerca del borde sur de la isla de Cuba (López-Ramos, 2001). Este borde hoy en día es un borde de transformación, Cuba se encuentra sobre la placa Norteamericana y en relación a ella la Placa del Caribe se desliza a lo largo de la falla en dirección al Oriente.

La historia geológica de Jamaica presenta peculiaridades respecto a la del resto de las islas. De entrada, los bloques que la conforman en la actualidad tienen dos orígenes diferentes. La porción que conforma hoy en día el oriente de la isla, donde se encuentran las Blue Mountains, habría formado parte del arco de las Antillas, con una

historia asociada a la de La Española, con la cual habría formado un continuo terrestre hasta el Oligoceno temprano (Buskirk, 1984; Iturralde-Vinent, 2006). Durante el Mioceno temprano y medio (hasta hace unos 14 millones de años) esta porción habría estado completamente sumergida, por lo que la biota actual debió llegar posteriormente a esa época. El resto de Jamaica proviene de una porción de la placa Protocaribe que después de chocar con el Bloque de Yucatán, fue empujado hacia el centro del Caribe por el desplazamiento del Bloque Chortis.

Ambas porciones quedaron unidas para el Mioceno medio y solamente para el Mioceno tardío (unos 10 millones de años) los primeros fragmentos de Jamaica comenzaron a emerger, con lo que, es la última isla de las Antillas mayores en emerger hace menos de 10 millones de años. Sin embargo, la tendencia a levantarse de modo sostenido proviene de los últimos 3 millones de años (Buskirk, 1984). La compleja historia geológica de Jamaica parece haber afectado la composición de la flora esta isla, con la ausencia de representantes de varios grupos presentes en el resto de las islas, entre ellos el género *Pinus*.

Las Bahamas son islas relativamente recientes y emergieron durante las glaciaciones del Pleistoceno, hace menos de 1.9 millones de años. Esta ausencia, así como el hecho de que la porción más meridional de la península de Florida emergió posteriormente a las Antillas Mayores influyó en los patrones de distribución de algunos grupos de plantas.

En el terreno geológico, el impacto del meteorito al final del Cretácico tuvo tener un efecto mayor en la composición de la biota de las Antillas Mayores, borrando la huella de eventos de vicarianza anteriores (Iturralde-Vinent & McPhee, 1996), al quedar sujeta la región a tsunamis de más de un kilómetro de altura (Maurasse, 1991). A partir de esto, la forma de vicarianza posible entre las Antillas Mayores y las masas continentales tendría que haber estado mediada por expansión/fragmentación del intervalo de distribución, asociada a cambios en el nivel del mar; sin embargo, las reconstrucciones paleoclimáticas y lo que se conoce de la eustasia en la región, no ha habido conexiones terrestres entre Norte o Centroamérica y las Antillas Mayores en los últimos 12 millones de años. Por otra parte, la posibilidad de una conexión terrestre

entre Sudamérica y Las Antillas mayores a partir de un paleoarco (la Cresta de Aves) es muy polémica.

Si los eventos posteriores corresponden principalmente a vicarianza (debida a la expansión/fragmentación del hábitat) o a dispersión/colonización es aún materia de debate. Para sus defensores la hipótesis de una conexión terrestre entre Sudamérica y las Antillas Mayores durante el Oligoceno permitiría explicar mediante vicarianza el origen sudamericano de parte de la biota de las Antillas, sin recurrir al mecanismo de la dispersión sobre o a través del mar (Iturralde-Vinent & McPhee, 1999). Por su parte, Hedges (1992, 1996 y 2001) ha insistido en el papel de las vegetación flotante, constituida por troncos, pedazos de raíces y diversos restos vegetales que se aglutinan formando pequeños “islotos flotantes” arrancados de márgenes de ríos y de las costas de Sudamérica principalmente durante huracanes, como posible vehículo de dispersión de plantas y animales; de esta misma forma, Hedges ha insistido en la incidencia de huracanes como agentes de dispersión de varios grupos.

El papel de los cambios recurrentes en el nivel del mar en la distribución de la biota del Caribe está aún por discernirse y es probable que estos cambios, de los cuales los mayores se habrían dado en el Oligoceno (-160 metros con respecto al nivel actual) y en el Pleistoceno (alrededor de -100 metros; Fairbanks, 1989; Simms, *et al.* 2007) hayan generado procesos de expansión/fragmentación de la distribución de diferentes grupos.

2.3 Biogeografía vegetal de las Antillas Mayores

Las islas del Caribe destacan por su elevada diversidad vegetal en relación a su superficie de tierras emergidas (alrededor de 220 000 km²), habiéndose estimado en 12000 especies de las cuales alrededor de 7000 son endémicas (Myers et al., 2000). A nivel de géneros, la región presenta 2500 de los cuales 100 son endémicos (Santiago-Valentin & Olmstead, 2004). Las Antillas constituyen adicionalmente el segundo archipiélago en extensión del mundo después de Indonesia. Hay consenso en que la rica composición de su biota se debe, tanto su cercanía a diferentes masas continentales, como a una compleja historia geológica donde la actividad tectónica y volcánica han jugado un papel importante, a las cuales se suma la existencia de procesos de diversificación *in situ*.

La cantidad de grupos de plantas para los que se posee información biogeográfica en la región del Caribe es claramente reducida, en particular si se contrasta con la diversidad vegetal que presenta la región. Sin embargo, a partir de los grupos que han sido estudiados, es posible señalar algunos patrones generales de relación entre las Antillas mayores y los continentes, así como al interior de las islas que conforman el mencionado archipiélago.

En contribución relativa de Norte, Centro y Sudamérica a la biota de estas islas parece haber variado dependiendo del grupo de que se trate. En el caso de *Pinus*, no existe evidencia de presencia natural del género en Sudamérica o Las Antillas menores. El área geográfica y el tipo de procesos que dieron origen a la distribución actual de los diferentes grupos de plantas (vicarianza y dispersión) son el objeto central de esta sección, enfocándonos a la porción occidental del archipiélago, conocida como Antillas Mayores. Las Antillas Mayores (Cuba, La Española, Puerto Rico y Jamaica) son todas islas de tipo *fragmentos continentales* (Whitaker & Fernández Palacios, 2007; véase la introducción) habitando pinos en las dos primeras; inmediatamente al norte se encuentran islas continentales (ubicadas sobre la plataforma continental) más pequeñas, como los archipiélagos secundarios de Las Bahamas y de las islas Turks & Caicos, que forman parte de la distribución de *P. caribaea* var. *bahamensis*.

La composición de la flora de las Antillas mayores y en particular para algunos ecosistemas (bosques mesófilos, Luna-Vega *et al.*, 2001), la distribución de orquídeas (Trejo-Torres & Ackerman, 2001) permiten sostener una relación cercana entre la flora de Centroamérica y la de las Antillas mayores sin que sea necesario apelar a la llegada de taxa desde Sudamérica. Las relaciones filogenéticas al interior de varios grupos brindan evidencia en este mismo sentido: Ericaceae (Judd, 2001); Rubiaceae (McDowell & Bremer, 1998; Negrón Ortiz & Watson, 2002, 2003); Fabaceae (Lavín *et al.*, 2001, 2003); algunas especies de Lythraceae (Graham 2003) y Dryopteridaceae (Davis *et al.*, 2003). A pesar de la relación cercana entre las floras, la evidencia que se tiene hasta hoy indica que la divergencia entre linajes centroamericanos y antillanos para muchos grupos, ha ocurrido muchas veces en diferentes épocas.

En otros casos, los grupos distribuidos en las Antillas mayores parecen haber llegado desde las Antillas menores y, en última instancia desde Sudamérica (p- ej.

algunas especies de Rubiaceae, McDowell & Bremer, 1998; Styraceae, Fritsch 2003; algunas especies de Lythraceae, Graham 2003). Entre estos grupos de plantas encontramos algunos que arribaron temprano en el Terciario (*Styrax*: Styraceae; Fritsch 2003) al archipiélago de las Antillas, y algunos otros de reciente llegada o diversificación (algunas especies de Lythraceae; Graham, 2003).

2.3.1 Relaciones entre las áreas

Existen diversos esfuerzos para identificar a los componentes de la región biogeográfica del Caribe así como su relaciones con otras áreas (Santiago-Valentin y Olmstead, 2004). Uno de los trabajos más sintéticos proveniente de distintos taxa es el de Morrone (2001) quien identificó a partir de una aproximación panbiogeográfica una región Caribeña amplia, que incluye el centro y el sur de México, Mesoamérica, las Antillas y el noroeste de América del Sur, Ecuador, Venezuela y Trinidad y Tobago. Varios trazos específicos vinculan a las Antillas Mayores con Centroamérica y muchos sugieren un vínculo entre el norte de Sudamérica y las Antillas Menores.

Las Antillas Menores, tanto en su porción sur como norte, han tenido una relación cercana con la flora sudamericana, misma que ha sido explicadas mediante las relaciones entre áreas (Warren & Crother, 2001), así como en términos de la posible ruta de colonización de un grupo en particular (Rivera-Ocasio *et al.*, 2002). Las relaciones de las Antillas Mayores con los continentes y con las propias Antillas Menores responden a una historia más compleja, donde la vicarianza y la dispersión parecen haber jugado papeles complementarios en la configuración de los patrones actuales de distribución. Es interesante que aproximaciones tan disímboles como las anteriores lleguen a conclusiones similares.

Algunos estudios de biogeografía cladística, como los de Warren y Crother (2001), Luna-Vega y colaboradores (2002), Trejo-Torres y Ackerman (2001) y Judd (2001) ofrecen algunas hipótesis de relación de estas islas con varias partes de América.

Por ejemplo, Warren y Crother (2001) analizando datos de distribución de cuatro géneros de peces (*Rivulus*, *Gambusia*, *Trachemys* y *Sphaerodactylus*) mediante diferentes enfoques cladísticos, encontraron de manera consistente que Cuba es un clado basal con respecto a La Española y Puerto Rico; asimismo, Jamaica osciló entre ser un

clado hermano de Cuba y estar en una posición más basal como hermano de las otras tres Antillas Mayores. Aunque no se trata de un trabajo de biogeografía vegetal, se incluye en esta revisión por la consistencia que presenta el patrón con respecto a los reportados en varios trabajos de biogeografía vegetal.

Además de las diferencias operativas entre los diferentes métodos, la inconsistencia en la posición de Jamaica podría deberse a la peculiar historia de esta isla, que ha ocasionado patrones de distribución discordantes incluso entre géneros cercanamente emparentados (p. ej. Negrón-Ortiz & Watson, 2003). En su trabajo, Warren y Crother (2001) encontraron que la relación del grupo de las Antillas con los continentes no quedaba completamente resuelta en los diferentes análisis.

En el caso de la flora de los bosques mesófilos de montaña, Luna Vega et al. (2002), empleando herramientas panbiogeográficas y análisis de simplicidad de endemismos, encontraron una clara relación entre las islas del Caribe y Centroamérica. Todos los bosques mesófilos neotropicales que fueron incluidos en el trabajo formaron un grupo monofilético. Los bosques del pico Turquino en Cuba y las Blue Mountains en Jamaica aparecieron como grupo hermano de un conjunto de bosques de México y Centroamérica. Esta relación fue confirmada por los trazos generalizados construidos a partir de la distribución de cinco géneros vegetales (*Begonia*, *Epiglosssum*, *Epidendrum*, *Miconia* y *Peperomia*). Las relaciones de la isla de Puerto Rico no fueron completamente resueltas por este trabajo ya que la posición de esta isla en el extremo oriente de las Antillas Mayores puede afectar la afinidad de la biota de la misma.

Por su parte, Trejo-Torres y Ackerman (2001a y 2001b) reconstruyeron las relaciones entre las Antillas basados en la distribución de las orquídeas en la región encontrando que las Antillas Menores son un grupo parafilético con afinidades diversas. Por otro lado, observaron dos grandes grupos monofiléticos que aportan un patrón interesante: el archipiélago de las Bahamas y las Antillas Mayores. Las islas que conforman las Antillas Mayores comparten una edad mayor, montañas mayores a los 600 msnmm y poseen una diversidad climática y de hábitats en general mayor; los suelos de estas islas se formaron en su mayor parte a partir de roca madre volcánica. Mientras tanto, las Bahamas son islas de menor altitud, de origen calcáreo y más jóvenes; estas características también se presentan en la Isla de la Juventud, la cual a

pesar de su proximidad geográfica con Cuba (Antillas Mayores), se agrupa con las Bahamas en cualquiera de las reconstrucciones elaboradas (Trejo-Torres y Ackerman, 2001 a y b). Este grupo de las Bahamas estaría relacionado con Yucatán y Florida (Figura 2.2). A partir de esta información, estos autores discuten la posibilidad de que la dispersión haya jugado un papel importante en la distribución de las orquídeas, toda vez que la relación entre las islas parece estar relacionada con los tipos de suelo que se presentan en éstas, siendo éste el factor determinante, en lugar de la cercanía geográfica, el factor determinante de la distribución de las orquídeas. El que Trejo-Torres y Ackerman (2001) hayan encontrado que el archipiélago de las Bahamas comparta solo una especie restringida con Florida, mientras que comparte siete con las Antillas Mayores, parecería indicar una dirección sur-norte de los procesos que dieron origen a la distribución de las orquídeas en esta parte del Caribe, sean estos resultado de la vicarianza o de la dispersión.

Un patrón similar fue para el género *Lyonia* en el cual los niveles de endemismo se asocian a los tipos de suelo de las islas (Judd, 2001). Al estudiar la relación entre las islas a partir de la distribución de las especies del género *Lyonia* (Ericaceae) y de su filogenia, Judd (2001) encontró un patrón según el cual todas las especies que habitan las islas del Caribe se agrupan en un solo clado con la excepción de la región de La Trinidad, en el centro de Cuba. Este patrón parece significativo en vista de que la región central de Cuba, a la cual pertenece La Trinidad, fue la última en emerger. Por otro lado, la distribución de endemismos entre las islas sugiere que el oriente de Cuba y el norte de La Española son centros de diversificación monofiléticos uno respecto al otro y relacionados en cada caso con otras especies dentro de la misma isla. La ausencia de estimaciones del tiempo de divergencia entre estos dos grandes clados impide corroborar en este caso la hipótesis de que la separación de Cuba y La Española hace entre 10-15 millones de años ocasionó la vicarianza para varios grupos, como lo presenta Graham (2003b). A pesar de estar del todo resuelta la relación de las islas con las masas continentales, es interesante el efecto de factores ambientales en la distribución de *Lyonia*. Buena parte del endemismo en áreas pequeñas está relacionado con condiciones edáficas y diferencias altitudinales que delimitan qué áreas están relacionadas entre sí (Judd, 2001). Esto indica eventos de dispersión a larga distancia, que habrían sido

seguidos de procesos de diversificación dentro de cada isla marcados por diferenciación de hábitats.

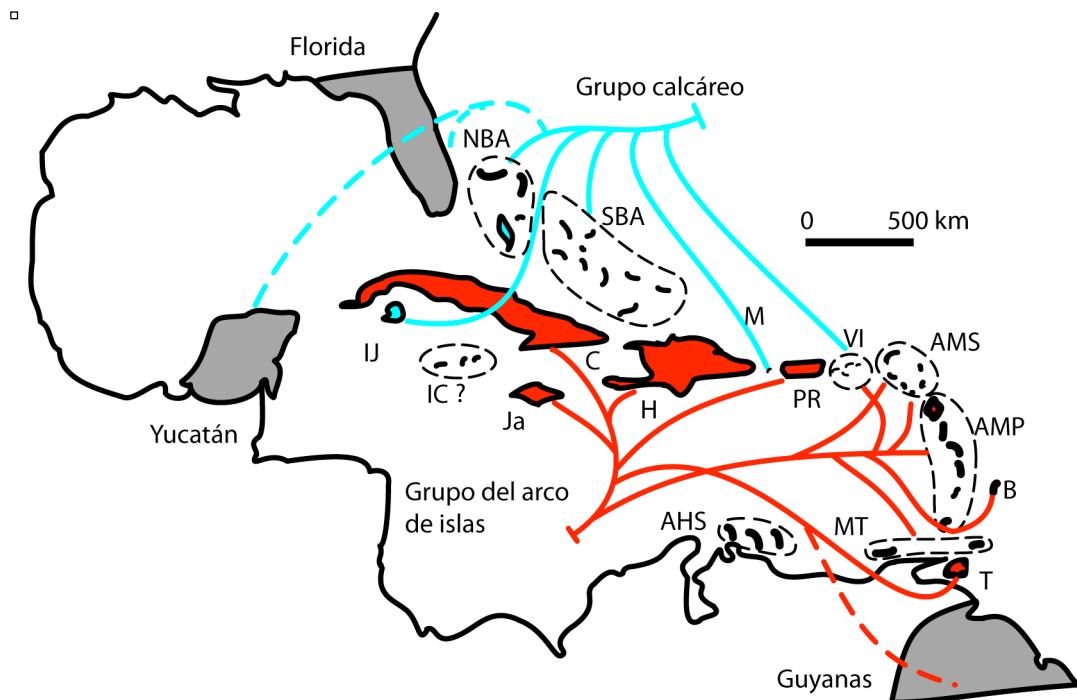


Figura 2.2. Afinidad entre las diferentes áreas (modificado de Trejo-Torres & Ackerman, 2001). Las líneas punteadas en negro indican grupos de islas; las líneas punteadas en color, relaciones entre islas y continentes. A partir de la distribución de orquídeas, los autores encontraron dos grupos al interior de la Cuenca del Caribe, denominados “Grupo Calcáreo” y “Grupo del arco de islas”. Las abreviaturas corresponden a: AMP = Antillas menores principales, AMS = Antillas menores secundarias, B = Barbados, C = Cuba, IC = Islas Caimán, H = La Española, IJ = Isla de la Juventud, J= Jamaica, , M = Mona, MT = Margarita y Tobago, NBA= Noroeste de las Bahamas, PR = Puerto Rico, SBA= Sudeste de las Bahamas, AHS= Antillas Holandesas del Sur, T = Trinidad, VI = Islas Vírgenes.

La evidencia acumulada hasta el momento, indica un aporte importante de Centroamérica hacia las Antillas Mayores, aunque las áreas particulares involucradas, así como sus edades y la secuencia de separación de las áreas no han sido completamente estimadas (Pindell & Keenan, 2009). Adicionalmente, son necesarios datos que estimen de manera más precisa la edad aproximada de los grupos monofiléticos distribuidos en estas islas, pues eso permitiría ubicar los procesos geológicos que expliquen la historia de la distribución de dichos grupos. Hasta ahora, solo el trabajo de Hedges (1996) ha establecido la edad en las islas de varios grupos de

vertebrados con afinidad sudamericana, encontrando que los clados distribuidos en el Caribe se originaron a lo largo del Cuaternario.

Por su parte, Ibarra-Manríquez y colaboradores (2002) encontraron una relación relativamente distante en la composición de la flora de árboles de la Península de Yucatán y la de las islas del Caribe. Utilizando dendrogramas a partir de los datos de distribución de 434 especies de árboles, concluyeron que en términos de su composición florística existe una relación cercana entre la Península de Yucatán y otras partes de Mesoamérica, y que las islas del Caribe forman un clado junto con la Península de Florida. Sin embargo, éstas conclusiones, sólo permiten hacer inferencias limitadas respecto a la biota de las Antillas ya que el interés primario del trabajo era la historia biogeográfica de la Península de Yucatán.

2.3.2 Implicaciones biogeográficas de las relaciones filogenéticas de algunos grupos de plantas

La información de las relaciones filogenéticas de diferentes grupos ha sido utilizada ampliamente para establecer hipótesis biogeográficas de la región caribeña. Según Graham (2003), la principal limitante es la escasez de estudios paleontológicos en la región. Los estudios realizados hasta ahora en la Cuenca del Caribe han abordado las relaciones biogeográficas de plantas con diversos hábitos de crecimiento y diferentes procedencias hipotéticas (Mc Dowell & Bremer, 1998; Fritsch, 2003; Graham S., 2003; Little & Barrington, 2003; Negrón-Ortiz & Watson, 2003; Davis *et al.*, 2004) Algunos estudios han encontrado patrones filogenéticos en los que las especies centroamericanas aparecen como grupo hermano respecto a las especies de las Antillas Menores. Esto, aunado a la ausencia de algunos de estos grupos en Jamaica (la isla más joven de las Antillas Mayores), o bien a la posición relativamente basal de las especies de esta isla con respecto a las demás, parece fortalecer la hipótesis de que varios grupos de plantas llegaron desde Centroamérica colonizando las islas, o bien se originaron por la fragmentación posterior a una presunta conexión de tierra emergida entre las islas y el continente.

A continuación se exponen algunos grupos selectos de plantas que se han utilizado para discernir la historia biogeográfica del área.

Rubiaceae

Para esta familia de plantas vasculares se ha propuesto que la dispersión podría constituir el principal proceso causal de la distribución actual, resultando en que la familia se halle ampliamente distribuida en el archipiélago (McDowell & Bremer, 1998; Negrón-Ortiz & Watson, 2002, 2003). Por ejemplo, se ha encontrado que en las secciones *Exostema* y *Brachyantha* del género *Exostema*, los grupos basales dentro de cada una de ellas son especies que se distribuyen en Centroamérica y México. Por lo anterior, se sostiene que el grupo llegó a las islas del Caribe por dispersión (principalmente ornitocoria) desde Centroamérica y posteriormente ocurrió la radiación de la mayor parte de las especies ya en las islas (McDowell & Bremer, 1998). En el caso de especies de amplia distribución, como *Exostema caribaeum*, su posición filogenética es concordante con procesos de dispersión sobre el mar, tanto desde Mesoamérica hacia Cuba como de Cuba hacia Mesoamérica (Figura 2.3; McDowell *et al.*, 2003). Varias especies de *Exostema* de Cuba tienen especies hermanas en la isla de La Española, lo cual apoya un fenómeno de vicarianza provocado por la separación de estas dos islas, aunque la falta de registro palinológico impide tener estimaciones de los tiempos de divergencia de las Antillas Mayores (McDowell & Bremer, 1998; McDowell *et al.*, 2003).

En el caso de los *Ernodea* y *Erithalis*, análisis de parsimonia de Brooks sugieren también un origen centroamericano (Negrón-Ortiz & Watson, 2002, 2003; Figura 2.4). Algunas especies como *Erithalis fruticosa*, *E. odorifera* y *E. salmeoides* tienen una amplia distribución en las islas, lo cual sugiere que en esos casos en específico la dispersión podría explicar la distribución de estas especies (Negrón-Ortiz & Watson, 2002, 2003). Al mismo tiempo, para el género *Erithalis* el análisis de parsimonia de Brooks indica que hubo una dispersión desde las Antillas hacia Florida, al igual que para el género *Lyonia*, lo que acumula como evidencia de la contribución de las islas a la biota de Florida.

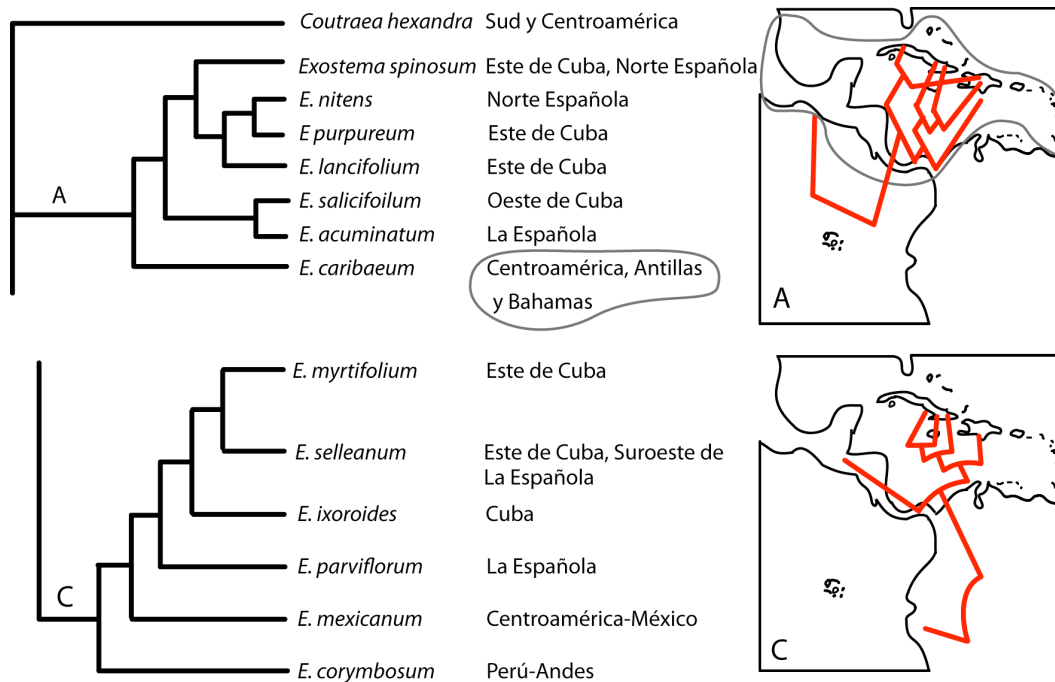
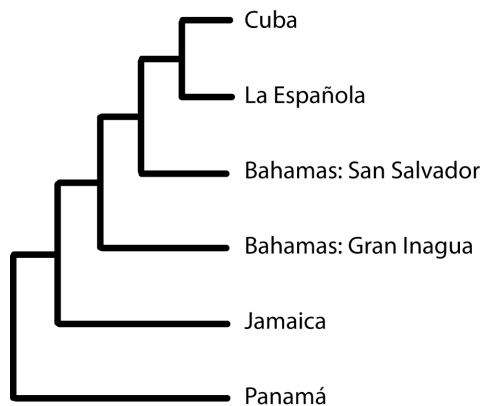


Figura 2.3 Relaciones filogenéticas recuperadas para algunos miembros del género *Exostema* y su ubicación geográfica. Adaptado de McDowell *et al.* (2003).

A. Género *Erithalis*



B. Género *Ernodea*

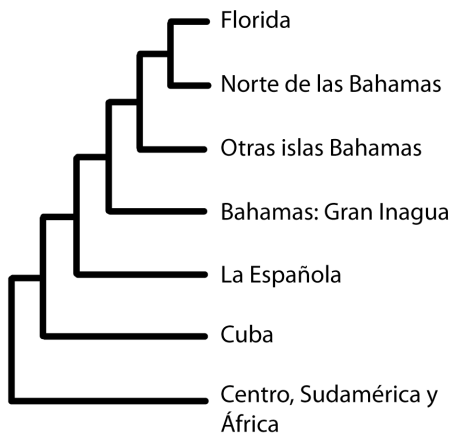


Figura 2.4. Cladogramas de área para los géneros *Ernodea* y *Erithalis*. Adaptada de Negrón-Ortiz & Watson (2003).

Otro género que ha sido estudiado dentro de Rubiaceae es *Neolaugeria*, endémico al arco de las Antillas (Moynihan & Watson, 2001). A partir de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las tres especies del género y de los

datos de distribución, Moynihan y Watson (2001) obtuvieron evidencia de que este género *Neolaugeria* se originó en las Antillas Menores hace unos 20 millones de años, probablemente por vicarianza. Posteriormente habría ocurrido una colonización de las Antillas Mayores y posteriormente a las Bahamas, probablemente gracias al fruto drupáceo de larga viabilidad (Moynihan & Watson, 2001), y a la dirección dominante de las corrientes marinas en los últimos millones de años (Hedges, 2002), aunque aún hay debate acerca de las alteraciones locales de estas corrientes durante las glaciaciones (ver Hedges, 2002 e Iturralde-Vinent & McPhee, 1999 para visiones contrastantes).

Styraceae

Al analizar la distribución del género *Styrax* Fritsch (2003) discutió la existencia de una conexión antigua entre Sudamérica y las Antillas (Iturralde-Vinent & MacPhee, 1999) en el marco de las inferencias biogeográficas mediante la optimización por parsimonia de Fitch. El análisis de dispersión-vicarianza (DIVA por sus siglas en inglés; Ronquist, 1997) arrojó especies en las que se detectó dispersión, por ejemplo tránsito de tres especies de Norteamérica a Sudamérica; dos especies presuntamente dispersadas de Sudamérica a las Antillas; y finalmente el paso de una especie del sudeste de Norteamérica a las Antillas. La distribución geográfica ancestral y el análisis biogeográfico de la distribución ancestral de dos especies de este género resultó compatible con la existencia del puente entre Sudamérica y las Antillas, llamado GAARlandia (Iturralde-Vinent & MacPhee; 1999; Ali, 2011). La desaparición hace 30-35 millones de años de esta conexión indica a la vicarianza como el proceso que originó la distribución actual de estas especies. Sin embargo para el resto del género (39 especies) no se encontró evidencia compatible con este escenario. Por su parte, Hedges (1996, 2001) ha criticado el carácter *ad-hoc* de adecuar la datación de las divergencias a la supuesta desaparición del puente terrestre llamado GAARlandia que los sustentantes de esta idea han hecho.

Solanaceae

En el estudio de la subfamilia Goetzoideae, nuevamente se hace evidente la necesidad de contar con estimados de las edades de divergencia entre los clados para poder juzgar la

plausibilidad de los escenarios de colonización tardía o de fragmentación temprana. A partir de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas dentro de Goetzoideae, se sabe que el grupo existió en la zona del Caribe antes del cierre del Istmo centroamericano (Santiago-Valentín & Olmstead, 2003). Sin embargo, lo extremadamente corto de las ramas de las reconstrucciones filogenéticas multigénicas introduce un factor de confusión, lo cual podría deberse al origen muy reciente de los grupos del Caribe, mediante un proceso de participación de la dispersión a grandes distancias a las islas. De manera alternativa, la escasa divergencia entre las secuencias se explicaría por tasas bajas de sustitución y entonces sería posible suponer un origen anterior de las especies, lo que requeriría la existencia de dos separaciones de masas terrestres y dos coalescencias posteriores entre Cuba y La Española (Santiago-Valentín & Olmstead, 2003). Ambas explicaciones requieren el mismo número de pasos, por lo que no es posible discernir la factibilidad de uno u otro con la información que se tiene.

Dentro del Género *Cestrum*, estudios recientes han mostrado que las especies que habitan en la isla de La Española serían el grupo hermano de un gran clado que abarcaría las especies de México y Centroamérica (Montero-Castro, *et al.*, 2006). En concordancia con los tiempos de divergencia recientes para los linajes dentro de este género, la dispersión a larga distancia ha sido el proceso invocado para explicar el patrón de distribución (Montero-Castro, *et al.*, 2006).

Fabaceae

A partir de análisis biogeográficos como la parsimonia de Brooks y de datación de divergencias filogenéticas por reloj molecular, se ha inferido que procesos de vicarianza antiguos y posteriormente de dispersión son los principales agentes explicativos de la distribución actual de las leguminosas robinoides, especialmente los géneros *Poitea*, *Pictetia* y *Gliciridia* (Lavin *et al.*, 2001, 2003). El patrón general que se infiere implica que las Antillas Mayores sirvieron como refugios durante el Terciario y el Cuaternario Temprano para estos dos géneros, los cuales están presentes en las islas más viejas desde el Terciario, cuando las islas apenas emergían (Lavin *et al.*, 2001 y 2003). Aunque inicialmente Lavin y su grupo sostuvieron que la separación del clado de las fabáceas robinoides había ocurrido entre Norteamérica y el Caribe, evidencia posterior mostró

que esta separación ocurrió entre Centroamérica y el Caribe (Lavin *et al.*, 2003), pues *Gliciridia*, género de distribución sud y centroamericana, y *Poitea*, género distribuido en las Antillas, resultaron grupos hermanos. Estos autores encontraron evidencia de eventos de vicarianza entre Cuba, La Española y Puerto Rico durante el Terciario, así como evidencia de eventos de dispersión a larga distancia en épocas recientes hacia Dominica y Jamaica. En este caso el uso combinado de evidencia molecular y paleontológica permitió distinguir claramente los eventos de vicarianza en la región.

Lythraceae

Debido a la distribución tropical y subtropical que presenta, los ancestros de los géneros y especies de esta familia que se distribuyen en las Antillas podrían provenir de cualquiera de las masas continentales circundantes (Centroamérica, Norteamérica y Sudamérica). Graham (2003) sugiere la dispersión desde el sudeste de los E.U. de dos especies de *Lythrum* y una de una de *Cuphea* a partir de las relaciones filogenéticas que colocan a estas especies antillanas dentro de clados norteamericanos. Asimismo infiere la dispersión desde México o el norte de Guatemala de una especie (*Cuphea decandra*). El resto del género se habría originado en el norte de Sudamérica, desde donde la dispersión explicaría la colonización del archipiélago, del mismo modo que para una especie del género *Adenaria*. En el caso del género *Ginoria* no se ha podido discernir si el género se originó en México o en las Antillas Menores, por lo que la dirección de la colonización permanece incierta (Graham, 2002). La evidencia para los géneros hermanos *Ginoria* y *Haitia* proveniente tanto de datos moleculares como morfológicos ha permitido establecer que la diversificación en Cuba y La Española fue posterior a la colonización de las islas (Graham, 2003).

Onagraceae

De esta familia se han estudiado las relaciones filogenéticas del género *Fuchsia*, analizando tanto secuencias nucleares y de cloroplasto como diversos caracteres morfológicos (Berry *et al.*, 2004). De este género solamente la Sección *Fuchsia* se distribuye en el Caribe, representada por dos especies. A partir de los datos de reloj molecular, que ubican el origen del género *Fuchsia* hace poco más de 30 millones de

años (Berry *et al.*, 2004) se infirió también la divergencia de las dos especies de la sección *Fuchsia* de La Española (únicas representantes en el Caribe) hace alrededor de 20 millones de años. El grupo del Caribe aparece anidado dentro de la rama de especies que se distribuyen en la región tropical de los Andes (Perú, Ecuador y Colombia).

Asteraceae

Dentro de esta familia los géneros *Rhodogeron* y *Sachsia* son endémicos de la Península de Florida y las Antillas (Liu *et al.*, 2004). A partir de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de estos dos géneros con el resto de las asteráceas pertenecientes a la tribu Pluceae y empleando un marcador ribosomal del núcleo y otro de cloroplasto, se infirió una posición basal para las especies distribuidas en Cuba (Liu *et al.*, 2004). Se propone una colonización del archipiélago de las Bahamas y de la Península de Florida desde Cuba al quedar las especies distribuidas en estas áreas en una posición más derivada dentro del árbol (Figura 2.5; Liu *et al.*, 2004). La polarización del árbol fue efectuada incorporando otra especie de la tribu Pluceae y otras asteráceas de distribución más distante (Islas Canarias y Marruecos).

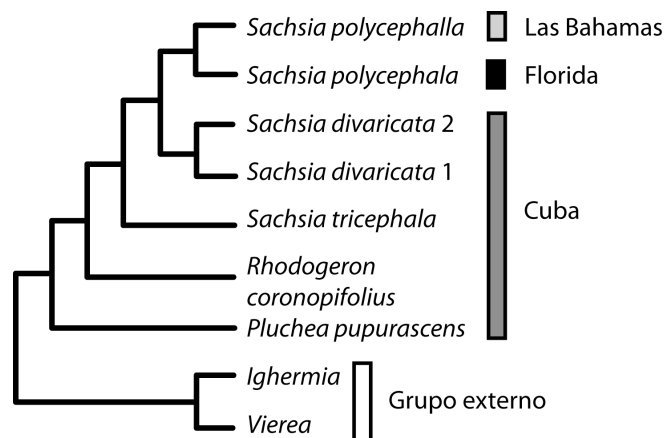


Figura 2.5 Relaciones filogenéticas recuperadas para el Género *Sachsia*. Adaptado de Liu *et al.* (2004).

Es interesante notar que las especies cubanas hermanas de aquellas distribuidas en Florida y las Bahamas son especies más generalistas en cuanto a los tipos de suelo donde habitan, mientras que los grupos más basales solamente habitan en suelos

derivados de roca serpentina (Liu et al., 2004). Lo anterior vuelve a aportar elementos que permiten suponer que la disponibilidad de hábitats ha sido un factor clave en la posibilitación o limitación de la dispersión de algunos grupos dentro del Archipiélago de las Antillas, mientras que pone de relieve la importancia de la diversidad de suelos en los patrones de endemismo que se observa en las Antillas como se ha observado en otros trabajos (Trejo-Torres & Ackerman, 2001; Judd, 2002). Lo anterior podría tener relevancia para este trabajo en la medida en que en el occidente de Cuba *Pinus caribaea* var. *caribaea* habita en suelos que van de silíceos a serpentinos (con alto contenido en hierro), siendo en los suelos más extremos donde forma masas puras más grandes (García, 2006).

Dryopteridaceae (Pteridophyta)

Este uno de los pocos grupos de helechos distribuidos en el Caribe para los que se posee información. Las relaciones filogenéticas reconstruidas por Little y Barrington (2003) a partir del gen de cloroplasto *rbcL* y de 41 caracteres morfológicos cualitativos del género *Polystichum*. Se sugiere que las especies neotropicales del género son monofiléticas y dentro de este clado, las especies continentales son el grupo hermano de las especies de las Antillas (Little & Barrington, 2003).

Malpighiaceae

La biogeografía de esta familia de amplia distribución fue abordada por Davis y colaboradores (2004), quienes incluyeron 103 representantes de esta familia en un esfuerzo de reconstrucción de las relaciones filogenéticas y de fechamiento de los eventos de cladogénesis para realizar inferencias acerca de la historia de la distribución. La edad de la familia y la evidencia fósil sugirieron que Malpighiaceae se originó en América. Posteriormente, la ampliación del intervalo de distribución de varias especies permitió la entrada del grupo a Asia y la actual África a través de Beringia en tres eventos: durante el Paleoceno (60 m.a.), durante el Eoceno-Oligoceno (34-31 m.a.) y finalmente en el Mioceno (21-17 m.a.).

El trabajo de Davis *et al.* (2004) tiene implicaciones importantes para la historia biogeográfica del Caribe, pues las fechas estimadas por los autores para el paso de las

malpigiaceas de Sudamérica a Norteamérica son unos 10 millones de años anteriores a las fechas que Graham (2003a), Iturralde-Vinent y McPhee (1999) y Lewis y Draper (1990) adjudican a las Antillas menores. Lo anterior documenta intercambio de biota a través del mar entre Sud y Norteamérica antes del cierre del istmo de Panamá.

2.3.3 Algunos patrones biogeográficos generales

La información biogeográfica con que se cuenta, permite indicar algunos patrones generales de relación entre las Antillas Mayores y los continentes, así como al interior de las islas que conforman el mencionado archipiélago. Sin embargo un vacío en la información generada hasta hoy tiene que ver con la ausencia de estimaciones de los tiempos de divergencia para los diferentes grupos, las cuales permitirían correlacionar los procesos de divergencia, colonización y diversificación de forma más precisa con los eventos geológicos.

La composición de la flora de las Antillas Mayores, en particular para algunos ecosistemas (bosques mesófilos, Luna-Vega et al., 2001), la distribución de orquídeas (Trejo-Torres & Ackerman, 2001), así como las relaciones filogenéticas al interior de varios grupos (Ericaceae, Judd, 2001; Rubiaceae, McDowell & Bremer 1998, Negrón-Ortiz & Watson 2003 & 2002; Fabaceae, Lavin *et al.*, 2001 & 2003; algunas especies de Lythraceae, Graham 2003; Dryopteridaceae, Davis *et al.*, 2003) permiten sostener una relación cercana entre la flora de Centroamérica y la de las Antillas Mayores sin que sea necesario apelar a la llegada de taxa desde Sudamérica (Tabla 2.1). Un aspecto interesante es que no parece haber una sola época en la que ocurrió la separación entre los clados centroamericanos y los clados antillanos.

En otros casos los grupos distribuidos en las Antillas Mayores parecen haber llegado desde las Antillas Menores y, en última instancia desde Sudamérica (algunas especies de Rubiaceae, McDowell & Bremer, 1998; Styracaceae, Fritsch 2003; algunas especies de Lythraceae, Graham, 2003). La diversificación *in situ* ocurrió no sólo en grupos que llegaron desde las masas continentales, sino también en grupos que se originaron en las propias Antillas, como es el caso de *Neolaugeria*, *Exostema*, *Erithalis* y *Sachsia*.

Tabla 2.1 Procesos y origen de las plantas de la Cuenca del Caribe (n.d.: no hay datos).

Procesos	Grupo	Origen/afinidad de las especies del Caribe	Época	Evidencia	Referencia
Dispersión a larga distancia	<i>Neolaugeria</i> (Rubiaceae)	Antillas menores a Antillas Mayores	> 20 Ma	Reconstrucción filogenética	Mohinyan & Watson (2001)
	<i>Exostema</i> (Rubiaceae)	Centroamerica	n.d.	Reconstrucción filogenética	McDowell & Bremer (1998) McDowell (2003)
	Goetzoidae (Solanaceae)	Sudamérica/Centroamérica	< 1.5 Ma	Reconstrucción filogenética	Santiago-Valentín & Olmstead (2003)
	Lythraceae	Sudeste de EU México Antillas Menores	n.d.	Reconstrucción filogenética	Graham (2003)
	<i>Rhodogeron</i> y <i>Sachsia</i>	Colonización de Florida desde Cuba	n.d.	Reconstrucción filogenética	Liu <i>et al.</i> (2004)
	Malpighiaceae	Paso de Sudamérica a Norteamérica a través de las Antillas menores	10 Ma	Reconstrucción filogenética	Davis <i>et al.</i> (2004)
Dispersión a larga distancia, posterior vicarianza Cuba/Española	<i>Poiteia</i> , <i>Puctetia</i> y <i>Gliciridia</i> (Fabaceae)	Centroamérica	Terciario y Cuaternario temprano	Análisis de parsimonia de Brooks	Lavin (2001, 2003)
	<i>Fuchsia</i> (Onagraceae)	Sudamérica	30 Ma Origen del género 20 Ma Vicarianza Cuba/Española	Reconstrucción filogenética	Berry <i>et al.</i> (2004)
Vicarianza Cuba/Española. Dispersión a Larga distancia entre hábitats similares	<i>Lyonia</i> (Ericaceae)	Cuba y La Española son grupos recíprocamente monofiléticos	Hace 10 Ma.	Cladograma de áreas a partir de la distribución de las spp.	Judd (2001)
Vicarianza y dispersión a larga distancia	<i>Ernodea</i> y <i>Erithalis</i> (Rubiaceae)	Centroamerica	n.d.	Análisis de Parsimonia de Brooks	(Negrón-Ortiz & Watson (2002, 2003)
Vicarianza	<i>Styrax</i> (Styraceae)	Sudamérica	30-35 Ma	Reconstrucción filogenética DIVA	Fritsch (2003)
Afinidad marcada por condiciones edáficas.	Orchidaceae	Afinidad entre Bahamas, Yucatán y Florida. Afinidad entre Antillas Mayores y Menores.	n.d.	Cladograma de áreas a partir de la distribución de las spp.	Trejo-Torres & Ackerman (2001a & 2001b)
n.d.	Flora de los bosques mesófilos	Afinidad entre Centroamérica y las islas del Caribe	n.d.	Análisis de simplicidad de endemismos	Luna-Vega <i>et al.</i> (2002)
n.d.	<i>Polystichum</i> (Dreopteridaceae)	Centro y Sudamérica	n.d.	Reconstrucción filogenética	Little & Barrington (2003)

Varios grupos parecen haber colonizado la Península de Florida y el archipiélago de las Bahamas desde las Antillas Mayores en algunos casos en épocas recientes, como algunas asteráceas (Liu et al., 2004), algunas fabáceas (Lavin *et al.*, 2003) y *Erithalis* (Negrón-Ortiz & Watson, 2002). Este patrón constituye evidencia novedosa acerca de la contribución de islas a la biota de una masa continental.

Entre las Antillas Mayores el evento de vicarianza más claro se presentó entre Cuba y La Española, al encontrarse evidencia de este evento en varios grupos, aún en casos en los que el resto de la distribución presentaba evidencias de dispersión. Así, varias especies de *Exostema* de Cuba y La Española están más cercanamente emparentadas con taxa distribuidos en la otra isla. El orden de ramificación de las fabáceas caribeñas mostró lo mismo, añadiendo un evento de vicarianza entre La Española y Puerto Rico. La ausencia de varios grupos, así como la posición relativamente derivada de otros taxa que se distribuyen en la isla de Jamaica, parece congruente con la relativamente reciente edad geológica de ésta. En el caso de la isla de Puerto Rico, la relación con la flora de las Antillas Menores tiene una importancia relativamente mayor como lo muestran los estudios de Luna-Vega et al. (2001).

En lo que respecta a la existencia de GAARlandia o algún otro tipo de conexión protoantillana, aunque la distribución o las relaciones filogenéticas de varios grupos resultan compatibles con la postulación de este puente, la evidencia biogeográfica no puede considerarse por sí misma concluyente, pues se corre el riesgo de aportar explicaciones circulares en las que un patrón filogenético sería la principal evidencia del proceso geológico que se invoca como explicación del mismo. La acumulación de evidencia geológica en el futuro tal vez permita dirimir claramente este punto.

Los elementos que se han vertido hasta aquí denotan un patrón biogeográfico complejo, en el que diferentes masas continentales han aportado distintos taxa a la flora de las Antillas Mayores, siendo este un rasgo distintivo de la región. La dispersión en la historia de la distribución de varios grupos ha sido un proceso importante, probablemente debido al prolongado periodo (30 millones de años) en que las Antillas han permanecido en una posición relativamente estable con respecto a los continentes y, en los casos de arribo más reciente, probablemente debido a la incidencia de huracanes, como ha sido señalado por Hedges (2002); este patrón es compatible con lo que se ha

observado para distintos grupos de animales (Davies & Bermingham, 2002; Hedges 2002 y 1996; Hower & Hedges, 2003; Liebherr & Godwin, 2004; Dávalos, 2004; Ricklefs & Bermingham, 2008). Por otra parte, existen varios patrones de distribución que son imputables de un modo más plausible a procesos de vicarianza, resultado de la separación paulatina de la Antillas Mayores más viejas (Cuba, La Española y Puerto Rico). El hecho de que clados de diferente antigüedad que se distribuyen en las Antillas Mayores tengan a sus parientes más cercanos distribuidos en las masas continentales adyacentes fortalece la idea de procesos recurrentes de dispersión a larga distancia.

Las Antillas Mayores son islas *fragmentos continentales*, por lo que podemos esperar que la historia de la composición de su biota incluya tanto eventos de especiación vicariante, como eventos de dispersión sobre el mar. Dada la antigüedad del archipiélago, para poder comprender la complejidad de la historia biogeográfica de las Antillas Mayores, es necesario reconocer que la frecuencia de la dispersión a grandes distancias desde diferentes puntos de esta cuenca puede haber sido mucho mayor que en otras regiones. La literatura acumulada hasta ahora aporta evidencia consistente de que la dispersión de semillas o propágulos de distintos tipos y por diferentes medios, marcó la distribución de varios grupos de plantas y en particular la llegada de éstos desde los continentes.

Otra manera de ponderar el papel de la dispersión a larga distancia sería utilizar la posibilidad que abre la distribución de linajes relativamente jóvenes en los que alguna especie presente una distribución continental e insular, como es el caso de los pinos de la subsección *Australes*. En caos con este tipo de distribución, se hace posible evaluar, utilizando herramientas de la genética de poblaciones, el nivel de intercambio o de flujo génico que ha ocurrido entre las islas y el continente.

2.4 Referencias

- Ali JR (2012) Colonizing the Caribbean: is the GAARlandia land-bridge hypothesis gaining a foothold. *Journal of Biogeography*, **39**: 431-433
- Azuma H, García-Franco J, Rico-Gray V & Thien L (2001) Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: the biogeography of tropical and temperate disjunctions. *America Journal of Botany*, **88**: 2275-2285.

- Berry PE, Hahn W, Sytsma K, Hall J & Mast A (2004). Phylogenetic relationships and biogeography of *Fuchsia* (Onagraceae) based on non coding nuclear and chloroplast DNA data. *American Journal of Botany*, **91**: 601-614
- Buskirk RE (1985) Zoogeographic patterns and tectonic history of Jamaica and northern Caribbean. *Journal of Biogeography*, **12**: 445-461
- Clark PU & Mix AC (2002) Ice sheets and sea level of the last glacial maximum. *Quaternary Science Reviews*, **21**: 1-7
- Coney PJ (1982) Plate tectonics constraints on the biogeography of middle America and the Caribbean region. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **69**: 432-443.
- Crother BI & Guyer C (1996) Caribbean historical biogeography: Was the dispersal-vicariance debate eliminated by an extraterrestrial bolide? *Herpetologica*, **52**: 440-465.
- Curtis JH, Brenner M & Hodell DA (2001) Climate change in the Circum-Caribbean (late Pleistocene to present) and implications for regional biogeography. En: Woods C.A. y Sergile F. E. (eds.) *Biogeography of the West Indies: patterns and perspectives*. CRC press. EUA.
- Davies N. & Bermingham E (2002) The historical biogeography of two Caribbean butterflies (Lepidoptera:Heliconidae) as inferred from genetic variation at multiple loci. *Evolution*, **56**: 573-589.
- Davis C., Fritsch PW, Bell CD & Mathews S (2004) High latitude tertiary migrations of an exclusively tropical clade: evidence from Malpighiaceae. *International Journal of Plant Sciences*, **165** (4s): s107-s121.
- Dodge RE, Fairbanks RG, Benninger LK. & Murrassa F (1983) Pleistocene sea levels from raised coral reefs of Haiti. *Science* 219 (4591): 1423-1435.
- Engbertson DC, Cox A & Gordon GR (1985) Relative plate motions between oceanic and continental plates in the Pacific basin. *Geological Society of America*, Special Paper **206**: 1-64.
- Escobar E, (2004) Structure and function in the ecosystems of the Intra-Americas Sea (IAS) (3,W). En: Robinson A. & Brink K. H. (eds.) *The Sea*, Volume 14. Nueva York, J. C. Wiley.
- Fritsch PW (2003) Multiple origins of Antillean *Styrax*. *Systematic Botany*, **28**: 421-430.
- Fritsch PW & McDowell T (2003) Biogeography and phylogeny of Caribbean plants-Introduction. *Systematic Botany*, **28**: 376-377.

- García Y (2006) Estrategia de conservación intraespecífica para *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* Barret y Golfari. Tesis Doctoral. Universidad de Pinar del Río/Universidad de Alicante.
- Getty JR, Asmerom Y, Quinn TM & Budd AF (2001) Accelerated Pleistocene coral extinctions in the Caribbean Basin shown by uranium-lead (U-Pb) dating. *Geology*, **29**: 639-642.
- Giunta G, Beccaluva L & Siena F (2006) Caribbean Plate margin evolution: constraints and current problems. *Geologica Acta*, **4(1-2)**: 265-277
- Graham A (2003a) Geohistory models and cenozoic paleoenvironments of the Caribbean region. *Systematic Botany*, **28**: 378-386.
- Graham A (2003b) Historical phytogeography of the Greater Antilles. *Brittonia*, **55**: 357-383
- Hedges SB, Haas CA & Maxson LR (1992) Caribbean biogeography: molecular evidence for dispersal in West Indian terrestrial vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**: 1909-1913.
- Hedges SB (1996) Historical biogeography of west indian vertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**: 163-196.
- Hedges S. B. (2001) Biogeography of the West Indies: an overview. En: Woods CA & Sergile F. E. (eds.) *Biogeography of the West Indies: patterns and perspectives*. EU, CRC press.
- Hedges, SB (2006) Paleogeography of the Antilles and the origin of West Indian terrestrial vertebrates. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **93**: 231-244
- Hower M & Hedges SB (2003) Molecular phylogeny and biogeography of West Indian teiid lizard of the genus *Ameiva*. *Caribbean Journal of Science*, **39**: 298-306.
- Ibarra-Manríquez G, Villaseñor JL, Durán R & Meave J. (2002) Biogeographical analysis of the tree flora of the Yucatán Peninsula. *Journal of Biogeography*, **29**: 17-29
- Iturralde-Vinent M & MacPhee RDE (1999) Paleogeography of the Caribbean region: implications for Cenozoic Biogeography. *American Museum of Natural History bulletin*, **238**: 1-95.
- Iturralde-Vinent M (2006) Meso-Cenozoic Caribbean paleogeography: implications for historical biogeography of the region. *Internatinal Geology Review*, **48**: 791-827.

- Judd WS (2001) Phylogeny and Biogeography of *Lyonia* sect. *Lyonia*. En: Woods C.A. y Sergile F. E. (eds.) Biogeography of the West Indies: patterns and perspectives. CRC press. EUA, 2001.
- Kerr A, Iturralde-Vinent M, Saunders A, Babbs T & Taney J (1999) A new plate tectonic model of the Caribbean: implications from a geochemical reconnaissance of Cuban Mesozoic volcanic rocks. *GSA Bulletin*, **111**: 1581-1599.
- Lavin M, Wojchiechowski MF, Gasson P, Hughes C. & Wheeler E (2003). Phylogeny of robinoid legumes (Fabaceae) revisited: *Coursetia* and *Gliricida* recircumscribed, and biogeographical appraisal of the Caribbean endemics. *Systematic Botany* **28**: 387-309.
- Lavin M, Wojchiechowski MF, Richman A, Rotella J, Sanderson MJ & Matos AB (2001) Identifying radiations of Fabaceae in the Greater Antilles: alternatives to cladistic vicariance analysis. *International Journal of Plant Sciences*, **162**: s53-s76.
- Lewis JF & Drapper G (1990) Geology and tectonic evolution of the northern Caribbean margin. En: Dengo G. y Case J. E. (eds.): The Geology of North America, vol. H: The Caribbean Region. Geological Society of America, Boulder. EUA.
- Liebherr JK & Godwin WB (2004) Giant *Platynus* beetle from Panamá (Coleoptera: Carabidae) overturns circum-Caribbean vicariance hypothesis. *Caribbean Journal of Science*, **40**: 41-51.
- Little DP y Barrington D (2003) Major evolutionary events in the origin and diversification of the fern genus *Polystrichum* (Dryopteridaceae). *American Journal of Botany*, **90**: 508-514.
- Liu H., Trusty J., Oviedo R., Anderberg A., y Francisco-Ortega J. (2004) Molecular phylogenetics of the Caribbean genera *Rhodogeron* and *Sachia* (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences*, **165**: 209-217.
- López-Ramos E (2001) Evolución tectónica de América Central, del Sur y del Caribe, desde el Jurásico hasta el reciente. En: Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: teorías, conceptos, métodos y aplicaciones. Llorente Bousquets J & Morrone JJ (eds). UNAM-CONABIO. México
- Luna-Vega I, Morrone JJ, Alcántara O & Espinosa D (2001) Biogeographical affinities among neotropical cloud forests. *Plant Systematics and Evolution*, **228**: 229-239.
- MacMillan I, Gans PB & Alvarado G, (2004) Middle Miocene to present plate tectonic history of the southern Central American Volcanic Arc. *Tectonophysics*, **392**: 325-348.

- Mann P & Burke K (1984) Neotectonics of the Caribbean. *Review of Geophysics and Space Physics*, **22**: 309-362.
- Mann P, Burke K & Matsumoto T, (1984) Neotectonics of Hispaniola: plate motion, sedimentation and seismicity at a restraining bend. *Earth and Planetary Science Letters*, **70**: 311-324.
- Maurrassee FJ (1991) Impacts, tsunamis and the Haitian Cretaceous-Tertiary boundary layer. *Science*, **252**: 1690-1693.
- McDowell T & Bremer B (1998) Phylogeny, diversity and distribution in *Exostema* (Rubiaceae): implications of morphological and molecular analyses. *Plant Systematics and Evolution*, **212**: 215-246.
- McDowell T, Volvosek M & Manos P (2003) Biogeography of *Exostema* (Rubiaceae) in the Caribbean region in light of molecular phylogenetic analysis. *Systematic Botany*, **28**: 431-441.
- Meschede M (1994) Tectonic evolution of the northwestern margin of the Caribbean plate in the light of the 'terrane concept': structural and geochemical studies in Southern Mexico and Costa Rica. *Tüb. Geow. Arn. A* **22**, 133pp.
- Meschede M, Frisch W, Herrmann UR & Ratschbacher L (1997) Stress transmission across an active plate boundary: an example from southern Mexico. *Tectonophysics*, **266**: 88-100
- Meschede M & Frisch W (1998) A plate-tectonic model for the Mesozoic and Early Cenozoic history of the Caribbean Plate. *Tectonophysics*, **206**: 269-291.
- Miller KG, Kominz MA, Browning JV, Wright JD, Mountain GS, Katz ME, *et al.* (2005) The phanerozoic record of global sea-level change. *Science*, **310**: 1293-1298
- Miranda-Esquivel D, Donato M & Ibarra-Manríquez (2002) La dispersión ha muerto, larga vida a la dispersión. En: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. Morrone JJ & Llorente Bousquets J (eds). UNAM-CONABIO. México.
- Montero-Castro JC, Delgado-Salinas A, De Luna E & Eguiarte LE (2006) Phylogenetic analysis of *Cestrum* section *Habrothamnus* (Solanaceae) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany*, **31**: 843-850.
- Mooers CNK. & Maul GA (1998) Intra-Americas sea Circulation, coastal segment (3,W). En: Robinson A. y Brink K. H. (eds.) *The Sea*, Volume 11. Nueva York, J.C. Wiley.

- Morrone JJ (2001) Biogeografía de América Latina y el Caribe. Manuales y Tesis SEA, vol. 3. Zaragoza, España.
- Moynihan J y Watson LE (2001) Phylogeography, generic allies and nomenclature of Caribbean endemic genus *Neolaugeria* (Rubiaceae) based on internal transcribed spacer sequences. *International Journal of Plant Sciences*, **162**: 393-401.
- Myers N., Mittermeier C., Mittermeier G., Da Fonseca G. y Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.
- Negrón-Ortiz V & Watson LE (2003) Hypotheses for the colonization of the Caribbean Basin by two genera of the Rubiaceae: *Erithalis* and *Ernodea*. *Systematic Botany*, **28**: 442-451.
- Negrón-Ortiz V & Watson LE (2002) Molecular phylogeny of *Erithalis* (Rubiaceae), an endemic of the Caribbean Basin. *Plant Systematics and Evolution*, **234**: 71-83.
- Pindell JL & Barrett SF (1990) Geological evolution of the Caribbean region: a plate tectonic perspective in Dengo, G., and Case, J. E., (eds.), The Caribbean, Volume H, Decade of North American Geology, Geological Society of America, Boulder, Colorado, p. 404-432.
- Pindell JL & Keenan LC (2009) Tectonic evolution of the Gulf of Mexico, Caribbean and northern South America in the mantle reference frame: an update. *Geological Society, London, Special Publications* 2009, **328**: 1-55.
- Pindell JL, Kennan L, Stanek KP, Maresch WV y Draper G (2006) Foundations of Gulf of Mexico and Caribbean evolution: eight controversies resolved. *Geologica Acta*, **4**: 303-341.
- Ricklefs R, Bermingham E (2008) The West Indies as a laboratory of biogeography and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)*, **363**: 2393–2413.
- Rivera-Ocasio E, Aide TM & McMillan WO (2002) Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.) in the Caribbean basin. *Molecular ecology* 11: 675-683.
- Ronquist, F. (1997) Dispersal–vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology*, **46**: 195–203.
- Roughgarden J (1995) Anolis Lizards of the Caribbean: ecology, evolution and plate tectonics. Nueva York, Oxford University Press.

- Santiago-Valentin E & Olmstead R (2003) Phylogenetics of the antillean Goetzoideae (Solanaceae) and their relationships within the Solanaceae based on chloroplast and ITS DNA sequence data. *Systematic Botany*, **28**: 452-460.
- Santiago-Valentin E & Olmstead R (2004) Historical biogeography of Caribbean plants: introduction to current knowledge and possibilities from a phylogenetic perspective. *Taxon*, **53**: 299-319.
- Schopf TJ (1980) *Paleoceanography*. EU, Harvard University Press. 341 p.
- Simms AR, Lambeck K, Purcell A, Anderson JB & Rodriguez AB, (2007) Sea-Level history of the Gulf of Mexico since the Last Glacial Maximum with implications for the melting history of the Laurentide Ice sheet. *Quaternary Science Reviews*, **26**: 920-940.
- Tinkler KJ (1983) Postglacial temperature anomalies and Glacial Isostasy. *Quaternary Research*, **19**: 293-301
- Trejo-Torres C y Ackerman JD (2001) Biogeography of the Antilles based on a parsimony analysis of orchid distributions. *Journal of Biogeography*, **28**: 775-794.
- Trejo-Torres C (2000) Biogeografía ecológica de las Antillas: ejemplos de las orquídeas y las selvas cársticas. En: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. Morrone J. J. y Llorente Bousquets J. (eds). UNAM-CONABIO. México.
- Warren, BR & Crother BI (2001) Métodos en biogeografía cladística: el ejemplo del Caribe. En: Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: teorías, conceptos, métodos y aplicaciones. Llorente Bousquets J. y Morrone J. J. (eds). UNAM-CONABIO. México.

Artículo:

**Phylogeography of *Pinus* subsection *Australes*
in the Caribbean Basin**

Phylogeography of *Pinus* subsection *Australes* in the Caribbean Basin

Lev Jardón-Barbolla^{1,*}, Patricia Delgado-Valerio², Gretel Geada-López³, Alejandra Vázquez-Lobo¹
and Daniel Piñero¹

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-275, Mexico D.F. 04510, Mexico, ²Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez', Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Revolución esquina con Berlín S/N, CP 60091, Uruapan, Michoacán, México and ³Departamento de Biología, Universidad de Pinar del Río, Martí 270 esquina con 27 de Noviembre, CP 20100, Ciudad de Pinar del Río, Pinar del Río, Cuba

* For correspondence. E-mail levjardon@yahoo.com.mx or lojb@hp.fciencias.unam.mx

Received: 19 April 2010 Returned for revision: 26 July 2010 Accepted: 27 October 2010 Published electronically: 29 November 2010

- **Background and Aims** Four species of *Pinus* subsection *Australes* occur in the Caribbean Basin: *P. caribaea*, *P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis*. This study analyses the phylogeography of these species to assess possible colonization events from Central America to the islands and subsequent population expansions during glacial periods driven by both drier climate and larger emerged land areas.
- **Methods** Allele size data were obtained for plastid microsatellites for 314 individuals from 24 populations, covering the distribution range of subsection *Australes* in the Caribbean Basin.
- **Key Results** In total, 113 plastid haplotypes were identified. The highest genetic diversity was found in populations of *P. caribaea*. Overall, Caribbean Basin populations fit the isolation by distance model. Significant phylogeographical structure was found ($R_{ST} = 0.671 > \text{permuted } R_{ST} = 0.101$; $P < 0.0001$). The haplotype network and a Bayesian analysis of population structure (BAPS) indicated different Central American origins for *P. caribaea* var. *bahamensis* and *P. caribaea* var. *caribaea* plastids, with Central America populations in northern and south-eastern groups. Sudden expansion times for BAPS clusters were close to three glacial maxima.
- **Conclusions** Central America contains ancestral plastid haplotypes. Population expansion has played a major role in the distribution of genetic diversity in *P. caribaea* var. *hondurensis*. Two colonization events gave rise to the *P. caribaea* var. *bahamensis* and *P. caribaea* var. *caribaea* lineages. Plastid variation in the eastern species (*P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis*) evolved independently from that in *P. caribaea* var. *caribaea*. Incomplete lineage sorting between *P. cubensis* and *P. maestrensis* is apparent. Inferred expansion times for *P. caribaea* var. *bahamensis* and for the eastern lineages correspond to glacial maxima, whereas those for *P. caribaea* var. *hondurensis* correspond to the beginning of the temperature decrease that led to Marine Isotope Stage 8.

Key words: Caribbean Basin, historical demography, phylogeography, *Pinus*, plastid microsatellites, population genetics, subsection *Australes*.

INTRODUCTION

Pinus subsection *Australes* (Pinaceae) is a monophyletic group of pines (Gernandt *et al.*, 2005, 2008) occurring in North America, Mexico, Central America and the western Caribbean islands. Four taxa of subsection *Australes* are found from low savannah to mountain regions in the Caribbean Basin (Farjon and Styles, 1997): *P. caribaea*, *P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis*.

The savannah lowlands in the west of the Caribbean Basin are dominated by the three varieties of *Pinus caribaea*: var. *hondurensis* (Central America), var. *caribaea* (western Cuba and Isla de la Juventud) and var. *bahamensis* (Bahamas and Turks & Caicos Islands). Among the three varieties, mature trees exhibit only slight morphological differences (Barrett and Golfari, 1962; Farjon and Styles, 1997). Although the population genetics and distribution of *P. caribaea* have been well studied (Dvorak *et al.*, 2000, 2005), there are no studies using molecular markers that include all three varieties throughout their natural range.

Two allopatric taxa, *P. cubensis* and *P. maestrensis*, are found in the eastern mountains of Cuba. Some authors (Farjon and Styles, 1997) have treated *P. maestrensis* as a synonym of *P. cubensis*, whereas others (López-Almirall, 1982) have considered them to be separate species. An analysis of ovulate cone morphology characters by Adams and Jackson (1997) retrieved *P. cubensis* and *P. caribaea* as sister groups but a posterior phylogenetic analysis of plastid DNA (Geada-López *et al.*, 2002) recovered *P. cubensis* and *P. maestrensis* as sister groups. According to Gernandt *et al.* (2005), *P. cubensis* is closely related to *P. occidentalis*, an endemic species from the mountains of Hispaniola. In Cuba, *P. cubensis* is distributed throughout the Sierra Nipe-Cristal and *P. maestrensis* inhabits the Sierra Maestra. *P. occidentalis* is found in the mountains of Hispaniola.

Slight morphological differences among the three varieties of *P. caribaea* suggest that they diverged recently (estimated divergence time for subsection *Australes* is 6 Myr BP; Gernandt *et al.*, 2008) and/or suggest gene flow between the continent and the islands. In contrast, morphological

differences have permitted the distinction of three species (*P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis*) in eastern Cuba and Hispaniola. These eastern species share ecological affinities, such as higher altitude distributions, more humid habitats and less invasive capability, differing in these characteristics from *P. caribaea* (López-Almirall, 1982). This suggests that eastern species have evolved separately from *P. caribaea* and that gene flow between the eastern and western areas of the basin has been restricted.

The present distribution of genetic variation in natural populations of a species or a set of recently diverged species is the result of current and past processes, including gene flow and introgression, population expansion, fragmentation, bottlenecks, changes in distribution ranges and common ancestry relationships (Cruzan and Templeton, 2000; Templeton, 2004; Avise, 2009). Plastids are paternally inherited in pines (Chen et al., 2002) and are more sensitive to genetic drift due to lower effective population size. The high degree of polymorphism of plastid simple sequence repeats (plastid SSRs; Vendramin et al., 1996) has proved useful in elucidating the genetic structure and recent phylogeographical history of populations (Cuenca et al., 2003; Afzal-Rafii and Dodd, 2007; Bucci et al., 2007; Delgado et al., 2007; Rodríguez-Banderas et al., 2009). These markers are also suitable for studies of past demographic expansions, such as those occurring after colonization events (Navascués et al., 2006). High mutation rates like those found in plastid SSRs (Provan et al., 1999) also permit the analysis of more recent population processes such as recent divergence and gene flow (Kuhner, 2009). Plastid markers have also been used to reveal cryptic hybridization in pines (Jasińska et al., 2010).

The interaction of four tectonic plates formed the Caribbean Basin during the Tertiary (Pindell et al., 2006). At approximately 35 Mya the Greater Antilles and the Bahamas became completely separated from Central and North America (Iturralde-Vinent, 2006; Pindell et al., 2006). This geological event probably preceded the arrival of the genus *Pinus* in southern Mexico (21 Mya; Graham, 1999). In the recent palaeogeography of the region, major changes in sea level have been important processes, particularly during glacial periods when a larger area of the main islands was above sea level, but there was no connection among them or with the continent (Iturralde-Vinent, 2006).

The position of Cuba and Hispaniola with respect to the nearby continental masses has remained almost unchanged for the past 10 Myr (Iturralde-Vinent, 2006). The Bahamas emerged more recently, during the Pleistocene (1.9 Mya) (Pindell et al., 2006) and the low level of endemism there has been explained as a result of the recent arrival of most of its flora and fauna (Trejo-Torres and Ackerman, 2001; Ricklefs and Bermingham, 2008).

Meanwhile there has been continuous land between Honduras and North America since the Miocene (23 Mya; Iturralde-Vinent, 2006; Pindell et al., 2006). The floristic composition of the Caribbean Basin, particularly the Great Antilles, suggests an important contribution from Central America (Lavin et al., 2003; Negrón-Ortiz and Watson, 2003; Santiago-Valentín and Olmstead, 2003; Ricklefs and Bermingham, 2008). This is also true for some animal species, for example the vertebrate genus *Icterus* (Omland et al., 1999).

Given that: (1) no land connection has existed between the islands and the continent for the last 30 Myr (Iturralde-Vinent, 2006), (2) the Greater Antilles and the Bahamas are geologically younger than Central America, (3) Central America has contributed to the Greater Antilles biota and (4) the origin of subsection *Australes* is relatively recent (6 Mya; Gernandt et al., 2008), we would expect to find a pattern of colonization of islands by pines from Central America via long-distance dispersal. Thus, we predict ancestral haplotypes and higher levels of genetic diversity within populations of *P. caribaea* var. *hondurensis* and that ancestors of the present Caribbean pines arrived to the islands from Central America.

Here we analyse the distribution of genetic variation to infer the main processes that have affected the distribution of plastid DNA lineages of pines of subsection *Australes* in the Caribbean Basin. We use information from seven polymorphic plastid SSRs to study the genetic structure of populations of pines in subsection *Australes* in the Caribbean Basin. The aims of our study were: (1) to infer patterns of colonization of the Caribbean islands by pines of subsection *Australes* and to investigate whether genetic evidence suggests Central America as the origin of present island lineages; (2) to determine the role of past fragmentation among populations; and (3) to characterize historical demographic patterns based on genetic evidence collected across the entire distributional range of the different pine species in the Caribbean. We use this information to test the hypothesis that Caribbean pines arrived in the islands from Central America.

MATERIALS AND METHODS

Population sampling

Leaf needles of the four different species of pines were sampled from Central America and the Caribbean islands. Needles were collected from six to 24 trees per population in each of 24 sampled locations (shown in Fig. 1 and Table 1). Total sample size was 314 individuals. Trees sampled within populations were separated by >50 m. National forest inventories were used to avoid sampling plantations. All locations corresponded to monospecific populations, with the exception of that of Viñales, Cuba, where *P. caribaea* var. *caribaea* and *P. tropicalis*, two distantly related species, are sympatric. Geoposition and altitudes at each collection site were measured using an eTrex Vista global positioning system (Garmin, Taiwan).

DNA isolation, microsatellite amplification and size estimation

DNA was isolated using a modified cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) protocol (Doyle and Doyle, 1987) from 0.2–0.4 g of tissue. A preliminary screen for polymorphic loci was carried out for 35 individuals using ten microsatellite primers (Vendramin et al., 1996), widely used in phylogeographical and population genetics studies (Cuenca et al., 2003; Afzal-Rafii and Dodd, 2007; Bucci et al., 2007; Delgado et al., 2007; Rodríguez-Banderas et al., 2009). Loci tested were Pt1254, Pt9383, Pt15169, Pt26081, Pt30204, Pt45002, Pt63718, Pt71936, Pt87268 and

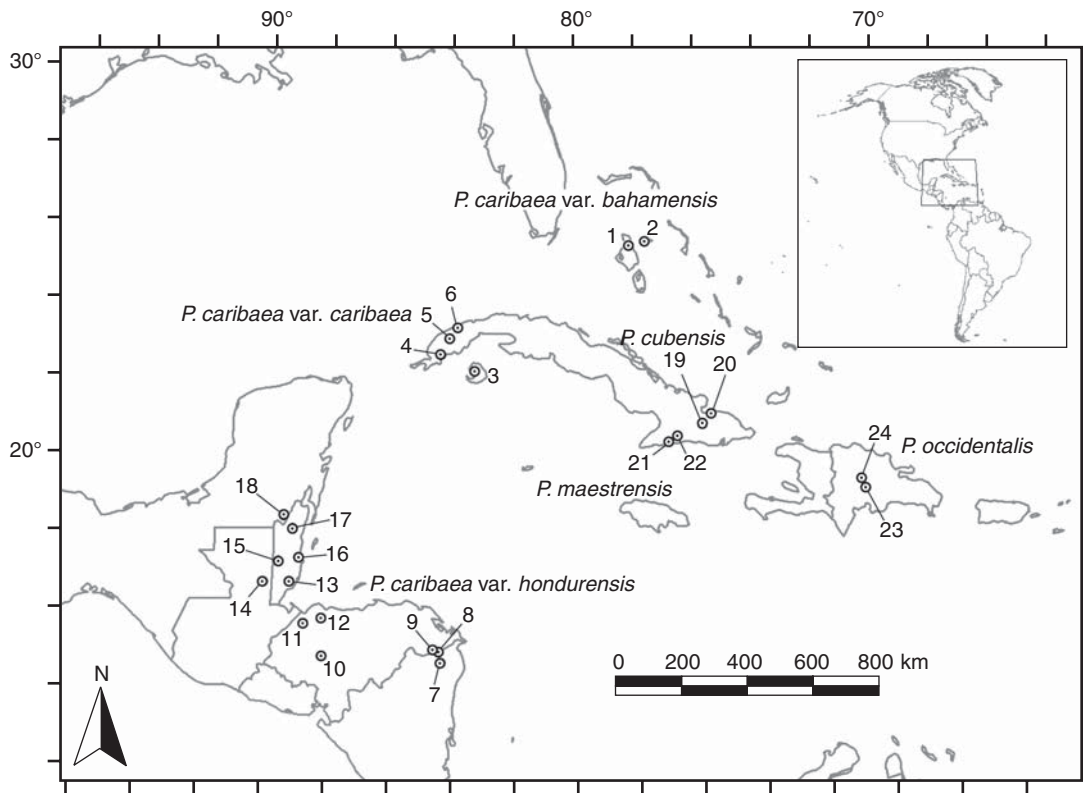


FIG. 1. Map showing the sampled populations and their species assignments: (1) Andros, (2) New Providence, (3) Isla de la Juventud, (4) Arenas Blancas, (5) Viñales, (6) Marbajita, (7) Moss, (8) Waspam, (9) Leimus, (10) San Jerónimo, (11) Cofradía, (12) Mezapa, (13) Deep River, (14) Dolores, (15) Mountain Pine Ridge, (16) Mullins River, (17) Crooked Tree, (18) Jaguactal, (19) Mayarí, (20) Cabonico, (21) Los Rodrigos, (22) Los Números, (23) Agua Blanca, (24) Manabao.

Pt110048. The polymorphic loci detected in the preliminary screen were amplified for the entire set of individuals.

PCRs were carried out in a 25-mL volume, containing 25 ng of template DNA, 0.8 mM dNTP mixture (each 0.2 μ M), 2.5 mM MgCl₂, 1 \times PCR reaction buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.4 μ M of each primer and 0.5 U of *Taq* polymerase (Invitrogen). PCR reactions were performed on a Mastercycler gradient (Eppendorf Scientific Inc., Hamburg, Germany) or on a 2770 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with the following profile: 7 min denaturing at 95 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C, with a final hold of 7 min at 72 °C.

Amplification products of Pt71936, Pt87268 and Pt110048 were analysed by denaturing electrophoresis in 6% polyacrylamide gels stained with silver nitrate. The size and homology of the alleles was corroborated by direct sequencing of PCR products previously purified using a QIAquick Purification Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and both strands were sequenced (High-Throughput Genomics Unit, Department of Genome Sciences, University of Washington; GenBank accession numbers: FJ705614–FJ705623, FJ750441–FJ750448 and FJ769208–FJ769217). Primers Pt1259, Pt15169 and Pt45002 were multiplexed in PCRs using forward primers labelled with fluorescent dyes (VIC, 6-FAM and VIC, respectively; Applied Biosystems) and fragment sizes were determined

using an ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and Gene Mapper v3.5 (Applied Biosystems).

Of the six loci retained, five were simple mononucleotides (Vendramin *et al.*, 1996) and one (Pt15169) was a compound microsatellite with three different repeat blocks [(C)₈(T)₈A(T)₈; Vendramin *et al.*, 1996]. To eliminate the molecularly accessible size homoplasy (MASH; Estoup *et al.*, 2002) for this locus, we purified and sequenced 42 PCR products as described above. This subsample of 42 PCR products represented the four size classes that were found for this locus and included individuals from all the populations studied.

Data analyses

Plastid haplotypes were identified by allele combinations of polymorphic SSRs. An estimation of haplotypic richness (H_T) was obtained with ADZE-v1.0 software (Szpiech *et al.*, 2008), using a rarefaction procedure to control for different sample sizes within each population. Additionally, a rarefaction curve from ADZE-1.0 was used to approximate a regression between $\ln(\text{sample size})$ and the expected number of new plastid haplotypes, following Gillespie (2004), to validate our sample size.

The programme Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) was used to obtain measures of genetic diversity for each population. For our dataset corrected for MASH through sequencing, unbiased haplotypic diversity H_E SEQ (equivalent to

with the best likelihood was performed as delineated by Godbout *et al.* (2008).

To examine evidence of demographic expansion, mismatch distribution tests were used (Rogers and Harpending, 1992; Schneider and Excoffier, 1999) for different clades (based on BAPS) using Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), and with microsatellite data binary coded (Navascués *et al.*, 2006). Estimation of τ (time to expansion in mutational units) was made by a maximum-pseudolikelihood method developed by Navascués *et al.* (2009), which uses a homoplasy correction model and has been demonstrated to provide a τ estimate closer to the true value than moment-based estimates. Time to expansion was calculated using a per-locus mutation rate estimate of 5.5×10^{-5} per generation (Provan *et al.*, 1999) and 42.5 years as the generation time; this generation time is the mean between the age at which maximum fecundity is reached in these species (15 years) and the approximate life span (70 years; A. López-Almirall, Museo Nacional de Historia Natural, Cuba, pers. comm.).

RESULTS

Genetic variation

Of the ten loci analysed, six were polymorphic in our data set (Pt1254, Pt15169, Pt 45002, Pt71936, Pt87268 and Pt110048). Sequencing of the locus Pt15169 (GenBank accession numbers: FJ687622–FJ687664) revealed that the first two repeat blocks were polymorphic. Each species had a distinct range of nucleotide composition in these repeat blocks within the subsample. We therefore treated them as separate loci, designated as Pt15169C (ranging from nine to ten C's) and Pt15169T (ranging from nine to 11 T's), respectively, assigning to the individuals of each species the nucleotide composition found in the subsample for its population. This eliminated the MASH in our data set. A total of 113 plastid haplotypes was identified with different combinations of alleles for the seven loci. Only haplotypes 60 and 73 had frequencies >0.05 (Supplementary Data Table S1, available online).

Rarefaction analysis showed that observed differences in haplotypic richness among populations and lineages were consistent with the standardized estimators obtained (Table 1). Moreover, regression analysis demonstrated that even if we double the total sample size (to 628 individuals), we should expect to find only nine new plastid haplotypes (Supplementary Data Table S2). This indicates that our sample size was adequate to provide a reasonable estimate of genetic diversity.

The genetic diversity for *P. caribaea* populations was H_E SEQ = 0.977 [confidence interval (CI) \pm 0.006] (θ_{IAM} = 40.270, θ_{SMM} = 944.679). For the eastern species this estimate was significantly smaller [H_E = 0.926 (CI \pm 0.033); see Table 1]. As shown, the highest values for the indirect estimator of the effective population size revealed larger values for the species with a wider distribution. This finding is supported by rarefaction analysis, which shows that when controlling for sample size, the haplotypic richness of *P. caribaea* is still larger than that of the eastern lineages (Table 1).

Within *P. caribaea* var. *hondurensis* the most variable populations were in Honduras in the middle portion of the

distribution range in Central America (San Jerónimo, Cofradía and Mezapa, populations 10, 11 and 12, Fig. 1, Table 1). The presence in the Arenas Blancas and Viñales populations of *P. caribaea* var. *caribaea* plastid haplotypes 28, 94 and 109, probably of Central American origin (see below), increased estimates of theta considerably.

Isolation by distance

We found a general pattern of IBD for the Caribbean Basin ($r = 0.375$, $P < 0.0001$; Fig. 2A). On the other hand, comparisons among populations of *P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis* showed smaller $\delta\mu^2$ values on average than those obtained for pairs of populations of *P. caribaea* ($t = 4.227$, $P = 0.0001$). Also, pairwise comparisons among populations of *P. caribaea* and eastern species (*P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis*) showed the highest genetic distance values (Fig. 2A).

At the species level, IBD was significant for *P. caribaea* ($P < 0.05$; Fig. 2B) and the eastern species ($r = 0.815$, $P < 0.0001$; Fig. 2E). In contrast, IBD can be rejected within varieties *hondurensis* and *caribaea* ($P = 0.683$ and 0.283 , respectively; Fig. 2C, D).

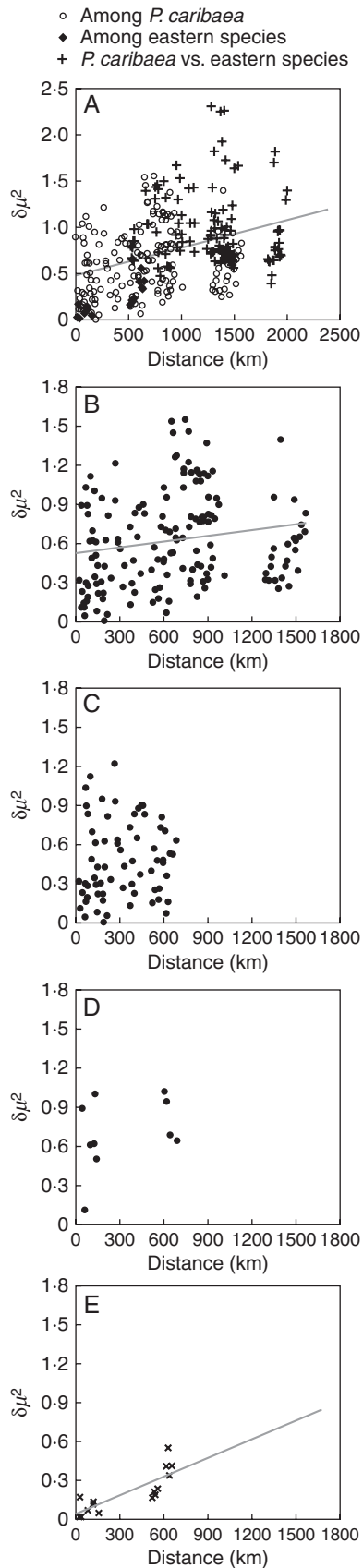
Within *P. caribaea* var. *hondurensis*, the geographically extreme populations, Moss and Waspam (south), and Dolores, Mountain Pine Ridge, Crooked Tree and Jaguactal (north), show small θ estimates (Table 1) and strong differentiation even at small distances (mean $\delta\mu^2 = 0.491$).

Tests of the IBD model for the three *P. caribaea* groups resulting from BAPS were non-significant (data not shown). Only the eastern group (Group IV), which corresponds to data shown in Fig. 2E, had a significant IBD structure.

Genetic relationships among taxa

The plastid haplotype network revealed a structure tightly associated with geography (Fig. 3). There were no shared plastid haplotypes among the three varieties of *P. caribaea* or between *P. caribaea* and the other three species. Rarefaction analysis showed that within each *P. caribaea* variety, sampling twice as many individuals would only result in finding one more plastid haplotype (see Supplementary Data Table S2 and Supplementary Data Figures S1 and S2). Thus, it is unlikely that increasing sample size would result in shared plastid haplotypes between varieties. In contrast, *P. cubensis* and *P. occidentalis* shared one plastid haplotype (6) and *P. cubensis* and *P. maestrensis* share three plastid haplotypes (42, 43 and 44). Shared plastid haplotypes between *P. cubensis* and *P. maestrensis* represented 44 and 61 % of sampled individuals, respectively.

Plastid haplotypes in *P. caribaea* var. *bahamensis* were more closely related to those of *P. caribaea* var. *hondurensis* (Fig. 3). Plastid haplotypes of *P. caribaea* var. *bahamensis* are only indirectly connected to plastid haplotypes of var. *caribaea* through var. *hondurensis*. Two of the most connected plastid haplotypes (60 and 66, Fig. 3) are distributed in Central America. Also, some abundant plastid DNA variants are close to the tips of the network, corresponding to the south-eastern (55, 76 and 84) and northern (65 and 73) extremes of the distribution of *P. caribaea* var. *hondurensis*.



Phylogeographical structure

Total genetic diversity ($H_T = 0.982$) was higher than average within populations ($H_S = 0.770$). A permutation test revealed that R_{ST} (0.671) is significantly higher than mean permuted R_{ST} (0.101; $P < 0.0001$), indicating geographical association of closely related plastid haplotypes. This pattern was consistent for *P. caribaea* populations for which $R_{ST} = 0.769$ (mean permuted $R_{ST} = 0.230$; $P < 0.005$) and eastern species populations for which $R_{ST} = 0.607$ (mean permuted $R_{ST} = 0.112$; $P < 0.005$).

Bayesian analysis of population structure gave an optimal partition of the populations into four groups ($P = 0.999$; Fig. 4A). This structure had the largest log maximum-likelihood value among partitions (-1794.660). This analysis maximizes the posterior probability of a structure (given a maximum number of groups, K), assigning individuals (not populations) to each cluster. So, it was possible to identify some plastid haplotypes that can be assigned to geographically distant clusters.

P. caribaea populations formed three clusters: group I, comprising the northern range of Central America (*P. caribaea* var. *hondurensis*) and the populations from Bahamas (*P. caribaea* var. *bahamensis*); group II, the south-eastern part of the *P. caribaea* var. *hondurensis* distribution in Central America, except for nine individuals of the Mezapa population (*P. caribaea* var. *hondurensis*), which were clustered with group III; and group III, a single cluster comprising all *P. caribaea* var. *caribaea* populations except for six individuals of the Marbajita population (*P. caribaea* var. *caribaea*) which were clustered with group II. The populations of the eastern species were clustered in a fourth group (group IV).

Historical demography

The mismatch distribution analysis did not reject the null hypothesis of sudden growth in three of the clusters identified with BAPS. The only case in which this hypothesis was rejected was for *P. caribaea* var. *caribaea* group III (Fig. 4B). The time for population expansion could be estimated for the remaining groups. For example, group I of BAPS clustering corresponding to *P. caribaea* from northern Central America and Bahamas showed a distribution congruent with the sudden expansion model: $\tau = 6.054$; estimated time since expansion, 331 100 yr BP (CI: 181 500–457 600; Navascués *et al.*, 2009). Even so, it is reasonable to suppose that *P. caribaea* populations in New Providence and Andros have a common origin because they belong to the same coral formation, and thus we computed the mismatch distribution for this and obtained a $\tau = 1.790$ (CI: 0.833–2.637), which, considering a generation time of 42.5 years, provided

FIG. 2. Mantel test between geographical and Goldstein's genetic distance ($\delta\mu^2$). A regression line is drawn when significant correlation was found after 10 000 permutations. (A) Total data set ($r = 0.375$, $P < 0.0001$), showing comparisons among *P. caribaea* populations, among eastern species, and between *P. caribaea* and the eastern species, as indicated. (B) All *P. caribaea* populations ($r = 0.178$, $P < 0.05$). (C) Central America populations of *P. caribaea*. (D) Cuban populations of *P. caribaea*. (E) Eastern species populations ($r = 0.815$, $P < 0.0001$).

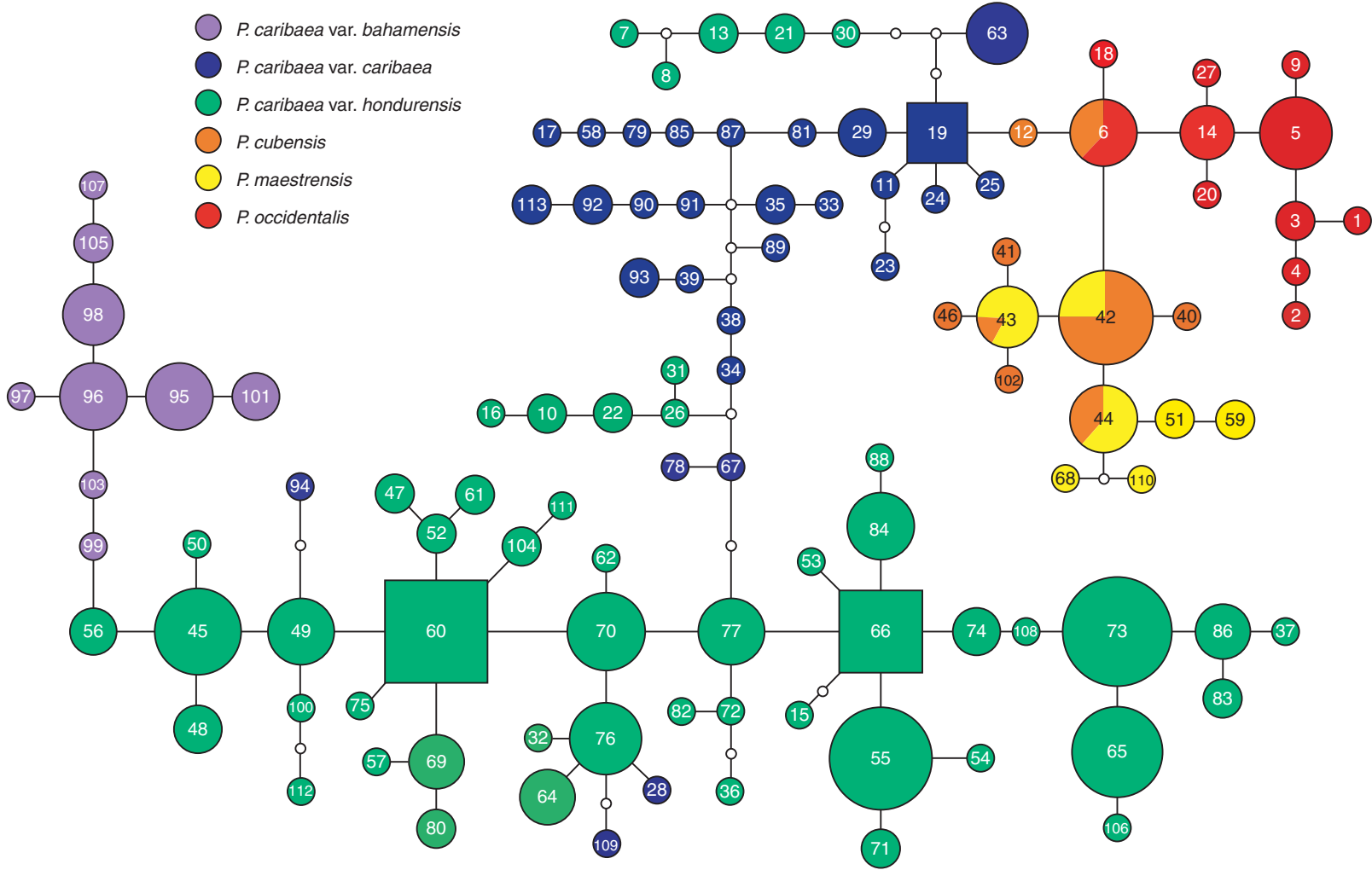


FIG. 3. Minimum spanning network for the plastid haplotypes in the *Australes* species of Caribbean pines. The area of each plastid haplotype is proportional to its abundance. Colour describes the species in which a particular plastid haplotype is found; when it is found in more than one species, colour division of the symbol is proportional to the contribution of each species to the total abundance. Each line represents a mutational step; missing plastid haplotypes are represented with circles. The squares correspond to the three most connected plastid haplotypes (19, 60 and 66).

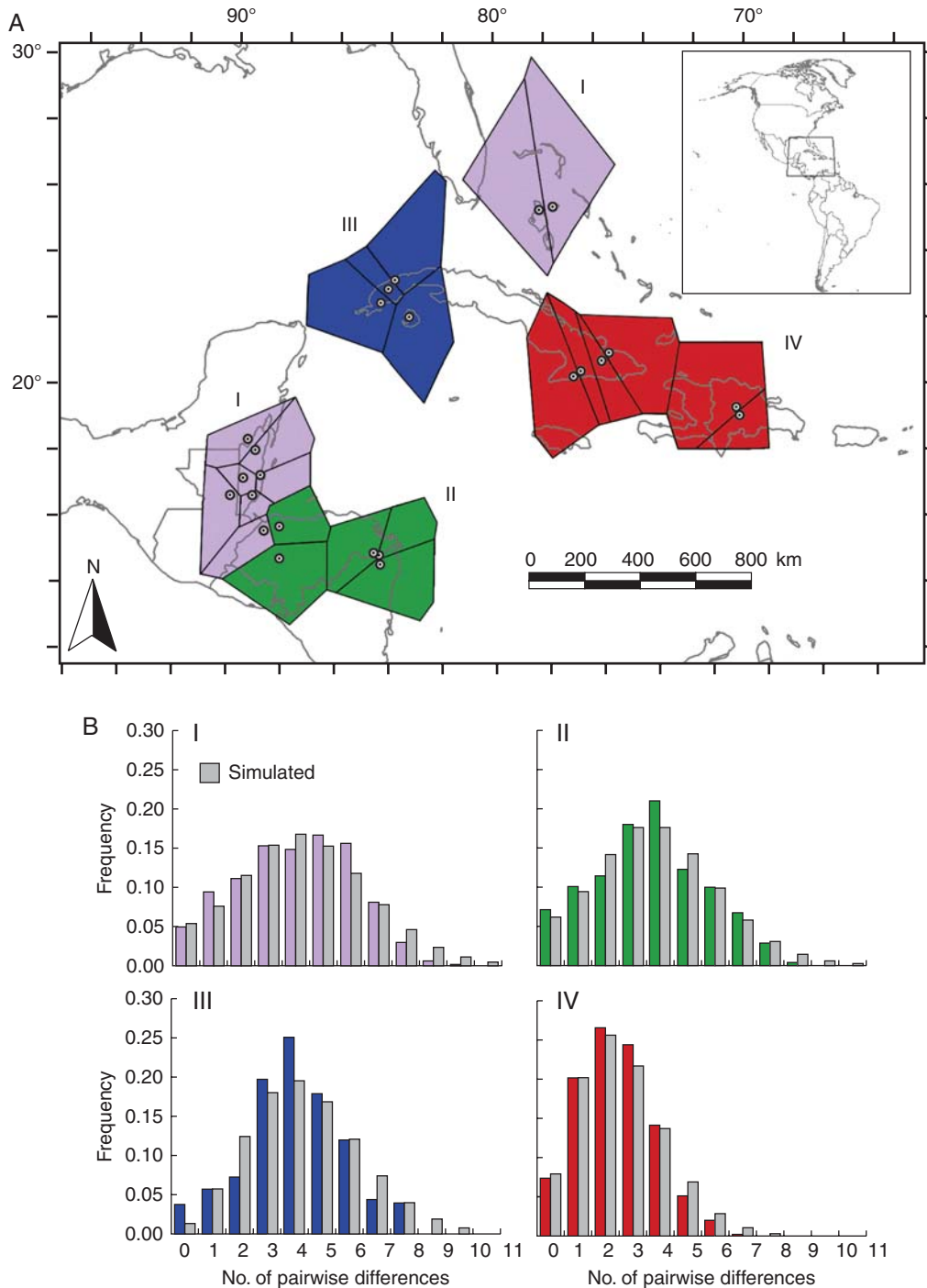


FIG. 4. (A) Bayesian analysis of population structure (BAPS) results. Clusters correspond to the best partition of the data (log maximum likelihood = -1794.6602 ; $P = 0.999$) and are indicated by different colour Voronoi polygons. Collection sites are indicated by circles. (B) Mismatch distribution for each group, Roman numerals refer to the BAPS clusters; observed differences are shown in colour bars, and simulated distributions in grey bars. Parameters estimated the under sudden expansion model were: (I) $\tau = 6.054$ (CI 3.618–8.366), (II) $\tau = 5.965$ (CI 1.020–7.176), (IV) $\tau = 2.921$ (CI 1.850–3.509); cluster (III) deviated significantly from the null hypothesis of sudden expansion ($P = 0.0477$).

an estimate of time to expansion of 97 900 yr BP (CI: 45 600–144 200). The estimate of the time to expansion for group II of *P. caribaea* var. *hondurensis* was similar to that for group I ($\tau = 5.965$ and 6.054, respectively). This is congruent with the high abundance in relatively derived plastid haplotypes

(Fig. 3). Time to expansion calculated for Group II is 326 300 yr BP (CI: 150 300–511 200). Finally, group IV from BAPS (*P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis*) showed a lower τ estimate (2.921), which gave an estimated time to expansion of 159 800 yr BP (CI: 101 200–192 000).

DISCUSSION

Genetic variation

Genetic diversity in terms of plastid haplotype diversities (H_E , Table 1) for the taxa included was comparable with other pine species that have been studied with plastid SSRs, including *P. pinaster* (0.870, Ribeiro *et al.*, 2001; 0.927, Gómez *et al.*, 2005), *P. canariensis* (0.73, Gómez *et al.*, 2003), *P. nigra* (0.954, Afzal-Rafii and Dodd, 2007) and *P. strobiformis* (0.856, Moreno-Letelier and Piñero, 2009).

The indirect estimators of effective population size (θ) for *P. caribaea* were high in comparison with species from the east of the Caribbean Basin, namely *P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis*. This pattern is congruent with the size of the species range, with the most widely distributed taxon (*P. caribaea*) having the highest theta value ($\theta_{IAM} = 40.270$).

High values of θ found in San Jerónimo, Cofradía and Mezapa in Central America and in Arenas Blancas and Viñales in Cuba appear to be related to gene flow among these populations, as deduced from the origin of plastid haplotypes 7, 8, 13, 21, 28, 30, 94 and 109. As can be seen in Fig. 3, plastid haplotypes 7, 8, 13, 21 and 30 present in Central America populations are in a network branch derived from an ancestral plastid haplotype, 19, present only in Cuba. Similarly, plastid haplotypes 28, 94 and 109 were found in Cuban populations, but are derived from ancestral plastid haplotypes found only in Central America. Given the otherwise consistent geographical association of the network branches and the absence of shared plastid haplotypes among *P. caribaea* varieties, it is plausible that gene flow among certain populations in Central America and Cuba explains both the distribution of these plastid haplotypes and their contribution to local genetic diversity, particularly in the case of Cuban populations.

Contrasting patterns of IBD and metapopulation dynamics

Within *P. caribaea* and the eastern species, the genetic distances are correlated with geographical distance among populations, indicating that populations within each region are less isolated from each other than populations from different regions.

When analysed separately, Central American populations of *P. caribaea* did not fit the IBD model, and this result was corroborated when Mantel tests were conducted for the BAPS clusters of this region (data not shown). The IBD model assumes that populations are in equilibrium, such that genetic structure is due to geographical restriction of gene flow (Epperson, 1995; Hardy and Vekemans, 1999). Absence of IBD could be explained by the presence of highly differentiated populations with low θ_{IAM} and θ_{SMM} estimates (in the south: Moss and Waspam; in the north: Deep River, Mullins River, Mountain Pine Ridge and Jaguactal). This suggests a metapopulation dynamic (Slatkin, 1977) in which some populations have been recently founded and others have gone extinct. In this scenario, and due to the action of genetic drift, plastid haplotypes common in some populations are rare in the rest of the distribution area (Whitlock, 2004). This contributes to higher $\delta\mu^2$ values because flow has not

diluted the differences among populations (Slatkin, 1977; Pannel and Charlesworth, 2000; Whitlock, 2004). This metapopulation dynamic could explain the distribution of genetic variation in *P. caribaea* from Central America and is congruent with the susceptibility of this species to the balance of humidity and periodic fire (Borhidi, 1988; Dvorak *et al.*, 2005). The precise testing of this type of dynamic would require further detailed studies about the demographic and ecological processes in these populations.

Central American origin for P. caribaea and eastern species as a separate lineage

Ancestral plastid haplotypes are likely to have given rise to more derived haplotypes than younger haplotypes, because in ancestral haplotypes mutation has occurred over a longer period of time (Posada and Crandall, 2001). As a consequence, older plastid haplotypes tend to have more connections in a network. Although homoplasy and high mutation rates (reflected in θ) can bias this pattern, highly connected plastid haplotypes tend to be closely related to ancestral plastid haplotypes (Alavez, 2008). Thus, the presence of highly connected plastid haplotypes (Fig. 3) together with the distribution of genetic diversity could indicate that Central America is the ancestral area in the plastid haplotype distribution.

The plastid haplotype network also suggests that the distribution of genetic diversity in *P. caribaea* is the result of two independent colonization events to the islands, one to Cuba and another to Bahamas. The plastid haplotypes of *P. caribaea* var. *bahamensis* (Bahamas) were more closely related to Central American plastid haplotypes than to their Caribbean counterparts. Meanwhile, plastid haplotypes of *P. caribaea* var. *caribaea* (Cuba) had different Central American relatives. The BAPS clustering further confirmed such a close relationship between populations from the Bahamas and Central America (Fig. 4B).

Some authors have suggested a North American ancestor for *P. caribaea* (Farjon, 1996; Adams and Jackson, 1997). To date, phylogenetic analyses of *Pinus* based on plastid DNA have been unresolved with respect to the relationships between North American and Caribbean species of subsection *Australes* (Geada-López *et al.*, 2002; Gernandt *et al.*, 2005). Furthermore, it is important to remember that the lineage history of a single locus (such as the plastid genome) does not necessarily coincide with the species history (Rosenberg and Nordborg, 2002; Hey and Machado, 2003; Avise, 2009) and discordance is known to exist between nuclear and plastid phylogenetic analyses in other pines (Willyard *et al.*, 2009). Thus, even if the hypothesis of a North American origin of *P. caribaea* were true, the results of this study still reflect the historical distribution of the plastid lineages within the species. Moreover, both this study and that of Adams and Jackson (1997) agree that there have been long-distance colonization events in the evolution of subsection *Australes* pines in the Caribbean Basin, although the current study detected a different direction for such events.

The close relationship between plastid haplotypes from *P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis* and those of *P. caribaea* var. *caribaea* suggests that eastern species

diverged from ancestors in western Cuba rather than from Central America. This can be explained by long-distance colonization or by an ancient fragmentation event (Cruzan and Templeton, 2000). The colonization pathway to Hispaniola from Central America through Cuba has also been inferred for other plant lineages: *Ernodea* (Negrón-Ortiz and Watson, 2003), *Exostema* (McDowell et al., 2003), *Ginoria* (Graham, 2003) and Solanaceae (Santiago-Valentín and Olmstead, 2003).

Unlike the *P. caribaea* varieties, the eastern species show many morphological differences and have been recognized as different species (López-Almirall, 1982; Farjon and Styles, 1997). Nevertheless, there is a high proportion of shared plastid haplotypes among species in the east of the basin. This could be due to recurrent gene flow or shared ancestral polymorphism (Avice, 2009). Shared variation could be better explained by incomplete lineage sorting, or we should expect a smaller degree of morphological differentiation or abundant intermediate phenotypes, as a result of sustained gene flow.

The descendants of a mutation event are likely to remain in the population where they originated unless migration occurs (Posada and Crandall, 2001). What is observed in the plastid haplotype network is precisely that some descendants of such a mutation event are distributed away from where their ancestors occur. The presence in Central America of two clades of plastid haplotypes closely related to Cuban ones and, similarly, the presence of three Cuban plastid haplotypes associated with continental ones (Fig. 2) suggest gene flow between these two regions in both directions. Shared ancestral polymorphism can be discarded because there are no shared plastid haplotypes.

Stochasticity of gene genealogies may mislead the inferred processes from haplotype networks (Hey and Machado, 2003). Nevertheless, the existence of gene flow between Central America and Cuba is congruent with present biogeographical evidence for the region, showing dispersion in both directions, from Central America to the Antilles (Negrón-Ortiz and Watson, 2003; Santiago-Valentín and Olmstead, 2004; Perdices et al., 2005; Ricklefs and Bermingham, 2008) and from the Antilles to Central America (Dávalos, 2007). The absence of shared plastid haplotypes among *P. caribaea* varieties could be explained if island populations have gone through bottlenecks after colonizations from Central American populations.

Two colonization events to the Caribbean islands

The R_{ST} analysis reveals a phylogeographical structure for the pines of the Caribbean Basin. The higher structure detected using ordered alleles indicates that pairs of plastid haplotypes from the same population are more similar than those of separate populations (Pons and Petit, 1996). Under a stepwise mutation model, the number of differences between plastid haplotypes reflects their genealogical relationship. Thus, high R_{ST} values reflect a spatial clustering of the majority of the closely related plastid haplotypes, a result that is congruent with the structure of the plastid haplotype network.

Results from BAPS confirm that populations of the Caribbean Basin are subdivided. The assignment of

P. caribaea var. *bahamensis* populations to group I (mostly *P. caribaea* var. *hondurensis* populations) is striking because Bahamian populations are closer to Cuba than to Central America. Nevertheless, this finding is in agreement with the close relationship between Bahamian and Central American plastid haplotypes in the network. The plastid haplotype network relies on the number of steps that connect the haplotypes using statistical parsimony, but BAPS relies on a different statistical approach and considers only haplotype identity. Taken together, these results suggest an origin of the *P. caribaea* var. *bahamensis* plastid haplotype from Central America. Considering the recent origin of the Bahamas and that they have been separated from the continent, over-sea dispersion apparently explains these results.

Group II (the south-eastern range of *P. caribaea* var. *hondurensis*) contained some highly diverse populations, e.g. San Jerónimo and Mezapa, and also some of the most connected plastid haplotypes, (60, 66, 76 and 77). Such evidence enables higher accuracy in identifying this as a possible ancestral area.

The majority of individuals of *P. caribaea* var. *caribaea* were grouped in a separate cluster (group III), but some plastid haplotypes of this variety were assigned to the Central American group (II), which is suggestive of gene flow between different regions. Such flow must have taken place across the sea, given that Cuba has not been connected to the continent in the last 30 Myr (Iturralde-Vinent, 2006). *P. caribaea* is one of the few pines of subgenus *Pinus* with adnate seed wings, which has been assumed as an adaptation to long-distance dispersal (Farjon and Styles, 1997). Although there is variation in seed wings among *P. caribaea* varieties, ranging from almost completely articulate (var. *bahamensis*) to adnate (var. *caribaea*), in var. *hondurensis* a wide variation with both types of seeds has been described (Farjon and Styles, 1997; Eckenwalder, 2009). Seed-mediated gene flow could explain both the long distance over which it took place and the relative scarcity of plastid interchange between varieties, not reinforced by pollen gene flow, and this is reflected in the absence of plastid haplotype sharing among varieties.

Due to shorter coalescence times in linked haploid genes compared with unlinked diploid nuclear genes (Rosenberg and Nordborg, 2002; Avice, 2009), the genetic variation in plastid haplotypes reflects recent history. The absence of shared haplotypes among *P. caribaea* varieties may not occur when nuclear markers are analysed, and caution should be exercised when comparing the species and plastid histories as plastid data reflect a more recent history than nuclear data.

Our data suggest that the plastids of *P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis* evolved separately from those in the rest of the basin, based on the pattern of plastid haplotype sharing and in their assignment to a single BAPS cluster. Within this group it is possible to distinguish *P. occidentalis* as closely related to *P. cubensis* and *P. maestrensis*, but sharing a small (9%) proportion of variation with them. This is also congruent with the geological history of the ancient separation between eastern Cuba and northern Hispaniola (Iturralde-Vinent, 2006).

P. cubensis and *P. maestrensis* share a significant proportion of plastid haplotypes (33 and 43%, respectively). It is difficult

to distinguish between recent divergence and recurrent gene flow from our data, but, as explained previously, incomplete lineage sorting is compatible with the morphological differentiation of these species.

Demographic expansions during glacial periods

The expansion time in group I (North Central America and Bahamas) of 331 100 yr BP is on the border between an interglacial period corresponding to Marine Isotope Stage (MIS) 9 and the beginning of the temperature decrease that led to MIS 8 (EPICA Community Members, 2004). The lower elevations of Andros and New Providence relative to Cuba or Hispaniola meant that a considerable proportion of the Bahamas was submerged due to higher temperatures and higher sea level of the past interglacial (Duplessy et al., 2008). In this scenario some plastid lineages could have been fixed by chance after land re-emerged. According to our data, such lineages were those closely related to the Central American ones. In support of this, the expansion time estimation of 97 900 yr BP for Bahamian populations roughly corresponds to the beginning of the last glacial period (110 000 yr BP; Petit et al., 1999; EPICA Community Members, 2004).

Group II, corresponding to the south-eastern range of *P. caribaea* var. *hondurensis*, also shows evidence of a sudden expansion. The time estimate of 326 300 yr BP is at the beginning of the temperature decrease that led to the MIS 8 cold period (Petit et al., 1999; EPICA Community Members, 2004). Population expansion inference in groups I and II is also reinforced by the presence of abundant plastid haplotypes close to the tips of the network. Sudden expansion of group IV (eastern Cuba and Hispaniola) would have taken place around 159 800 yr BP, close to the cold period of MIS 6.

Estimates of expansion times corresponding to glacial periods are coherent with the biology of these pine species: survival of *P. caribaea* populations depends on periodic fire, otherwise they are replaced by tropical rain forest (Borhidi, 1988; Dvorak et al., 2005). Present knowledge of glacial climate indicates drier environments at latitudes resembling Central America and the Caribbean (Ray and Adams, 2001). In addition, both continent and islands had more emerged area (i.e. more available habitat) during glacial periods. There is evidence that the range of *P. caribaea* var. *hondurensis* has been contracting during the Holocene interglacial due to progressive increases in humidity (Dvorak et al., 2005), which supports the inference of larger populations during colder periods. Recent findings in Lake Petén-Itzá cores in Guatemala show a correlation between colder periods and an increase in pollen of *Pinus* and Poaceae concomitant with increasing fire incidence in Central America (Hodell et al., 2008). This pattern reinforces the idea of expansion of *P. caribaea* savannah during glacial periods.

The wider altitudinal ranges of *P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis* probably allowed them to occupy the greater available lowlands as the mountain crests became cooler and drier. In addition, the smaller reduction of monsoons in the eastern part of the basin than in Central America should have provided humid land for this group of species, adding support to population expansion during glaciations.

Our study reveals close correspondence between time to expansion and glacial periods in *P. caribaea* var. *bahamensis* (small CI in τ estimates). Previous palaeoclimate studies have shown that during the cooler periods, populations of *P. caribaea* var. *hondurensis* were larger (Dvorak et al., 2005; Hodell et al., 2008). In the context of current global warming, historical demography data for *P. caribaea* alert us to the possible consequences for its populations. Bahamian populations are particularly sensitive to a global warming scenario given the low elevation predominant in these islands and could be drastically reduced because the detected demographic expansion occurred when the climate was colder. Our data suggest that the cool periods were also important in the expansions of Central American *P. caribaea* var. *hondurensis*-dominated savannahs. If so, global warming may lead to *P. caribaea* population contraction or, in the case of Bahamas, an increase in its probability of extinction.

The estimated times to expansion come from only one genome (plastid) and thus may not reflect the complete history of pines in the region. Also, there is stochastic variance both in gene trees and in mutations even in genes that have undergone a similar demographic history (Hey and Machado, 2003). Nevertheless, although the variance in τ estimate is also large (Fig. 4.), it has been demonstrated through simulations that the estimate of τ obtained by the maximum-pseudolikelihood method is close to the true τ value, providing an accurate estimator of time to expansion (Navascués et al., 2009). Moreover, correspondence between estimated expansion times and glacial periods is biologically meaningful and therefore its discussion in this paper was relevant.

In summary: (1) possible ancestral plastid haplotypes and highest gene diversity and θ estimates are found today in Central America; (2) population expansion has played a major role in the distribution of genetic diversity in *P. caribaea* var. *hondurensis*; (3) independent colonization events gave rise to the lineages of *P. caribaea* var. *bahamensis* and of *P. caribaea* var. *caribaea*; (4) plastid lineages of *P. cubensis*, *P. maestrensis* and *P. occidentalis* evolved independently and are separate from *P. caribaea*; (5) there is incomplete lineage sorting between *P. cubensis* and *P. maestrensis* plastids, suggesting recent divergence; and (6) all estimated expansion times correspond to glacial periods.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at www.aob.oxfordjournals.org and consist of the following files. Table S1: Plastid haplotype allelic composition and frequency of each plastid haplotype, and overall relative frequency. Table S2: Expected change in plastid haplotype diversity when doubling the sample size for each lineage. Figure S1: Expected accumulation of plastid haplotypes for the *Pinus* species studied depending on sample size. Figure S2: Expected accumulation of plastid haplotypes for *P. caribaea* varieties depending on sample size.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Rodríguez, E. García, R. Sotolongo, Y. García, A. Palmarola, M. Mejía, C. Espadas, M. Ferrer, V. Rebolledo,

F. Chi and D. Escudero, Leon University Herbarium, Pinar del Río University, Integrated Forest Enterprise of Mayarí, Guisa Forestry Station, Belize Wildlife Service, Santo Domingo Botanical Garden for work in the field. Thanks to L. Espinoza-Azuar who helped using the ABI 3100 and to O. Rodríguez who helped with lab work. R. Salas, A. Moreno-Lettelier, V. Alavez and D. Ortega provided insightful discussions about plastid haplotype networks and phylogeography. C. Espadas and E. Scheinvar are thanked for help with Fig. 4. Thanks to D.S. Gernandt and J. Jaramillo for their comments to improve this manuscript. We thank M. Navascués and C. Burgarella for providing their source code to implement pseudo-likelihood analyses. This work was supported by CONACYT, (grant number 185586 to LJB), by SEP-CONACYT, (grant number 44373 to PD), SEP-CONACYT (grant number 46925 to DP) and SEMARNAT-CONACYT (grant number 2002-C01-201 to DP). This work is part of the PhD in Biomedical Sciences of Lev Jardón-Barbolla at the Universidad Nacional Autónoma de México.

LITERATURE CITED

- Adams DC, Jackson JF. 1997. A phylogenetic analysis of the southern pines (*Pinus* subsect. *Australes* Loudon): biogeographical and ecological implications. *Proceedings of the Biological Society of Washington* **110**: 681–692.
- Afzal-Rafii Z, Dodd R. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Molecular Ecology* **16**: 723–736.
- Alavez V. 2008. *Evolución de microsatélites de cloroplasto en Pinus pseudostrobus y Pinus montezumae: efecto del ligamiento en la estimación de parámetros poblacionales y aplicaciones en genética de poblaciones*. BS Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Avise JC. 2009. Phylogeography, retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3–15.
- Barrett WHG, Golfari L. 1962. Descripción de dos nuevas variedades del pino de Caribe. *Caribbean Forestry* (in Spanish) **23**: 59–71.
- Borhidi A. 1988. Vegetation dynamics of the savannization process on Cuba. *Plant Ecology* **77**: 177–183.
- Bucci G, Gonzalez-Martinez SC, Le Provost G, et al. 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology* **16**: 2137–2153.
- Chen J, Tauer CG, Huang Y. 2002. Paternal inheritance patterns in pine hybrids detected with *trnL-trnF* intergenic region polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 1307–1311.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657–1660.
- Corander J, Sirén J, Arjas E. 2008. Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computational Statistics* **23**: 111–129.
- Crandall KA, Templeton AR. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* **134**: 959–969.
- Cruzan MB, Templeton AR. 2000. Palaeoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 491–496.
- Cuenca A, Escalante AE, Piñero D. 2003. Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSR). *Molecular Ecology* **12**: 2087–2097.
- Dávalos LM. 2007. Short-faced bats (Phyllostomidae: Stenodermatina): a Caribbean radiation of strict frugivores. *Journal of Biogeography* **34**: 364–375.
- Delgado P, Salas-Lizana R, Vázquez-Lobo A, et al. 2007. Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb. and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae): morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences* **168**: 861–875.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin, Botanical Society of America* **19**: 11–15.
- Duplessy JC, Charbit S, Kageyama M, Masson-Delmotte V. 2008. Insolation and sea level variations during Quaternary interglacial periods: a review. *Geoscience* **340**: 701–710.
- Dvorak WS, Jordon AP, Hodge GP, Romero JL. 2000. Assessing the evolutionary relationships of the pines in the *Oocarpae* and *Australes* subsections using RAPD markers. *New Forests* **20**: 163–192.
- Dvorak WS, Hamrick JL, Gutierrez EA. 2005. The origin of the Caribbean pine in the seasonal swamps of the Yucatán. *International Journal of Plant Sciences* **166**: 985–994.
- Eckenwalder JF. 2009. *Conifers of the world: the complete reference*. Portland, OR: Timber Press.
- EPICA Community Members. 2004. Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature* **429**: 623–628.
- Epperson BK. 1995. Spatial distribution of genotypes under isolation by distance. *Genetics* **140**: 1431–1440.
- Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, Cornuet JM, Adriaamanga M, Guyomard R. 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology* **7**: 339–353.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM. 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology* **11**: 1591–1604.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.
- Farjon AF. 1996. Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and paleo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* **121**: 365–384.
- Farjon AF, Styles BT. 1997. *Flora Neotropica, Pinus (Pinaceae)*. New York: The New York Botanical Garden.
- Geadá-López G, Kamiya K, Harada K. 2002. Phylogenetic relationships of *Diploxylon* pines (subgenus *Pinus*) based on plastid sequence data. *International Journal of Plant Sciences* **163**: 737–747.
- Gernandt D, Geadá-López G, Ortiz-García S, Liston A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* **54**: 29–42.
- Gernandt D, Magallón S, Geadá-López G, Zenón-Flores O, Willyard AS, Liston A. 2008. Use of simultaneous analyses to guide fossil-based calibrations of Pinaceae phylogeny. *International Journal of Plant Sciences* **169**: 1086–1099.
- Gillespie JH. 2004. *Population genetics: a concise guide*, 2nd edn. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press.
- Godbout J, Fazekas A, Newton CH, Yehm FC, Bousquet J. 2008. Glacial vicariance in the Pacific Northwest; evidence from a lodgepole pine mitochondrial DNA minisatellite for multiple genetically distinct and widely separated refugia. *Molecular Ecology* **17**: 2463–2475.
- Goldstein DB, Ruiz-Linares A, Feldman M, Cavalli-Sforza LL. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* **139**: 463–471.
- Gómez A, González-Martínez SC, Collada C, Climent J, Gill L. 2003. Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 1123–1131.
- Gómez A, Vendramin GG, González-Martínez SC, Alía R. 2005. Genetic diversity and differentiation of two Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Ait.) along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers. *Diversity and Distributions* **11**: 257–263.
- Graham A. 1999. Studies in neotropical palaeobotany. XIII. An Oligo-Miocene palynoflora from Simojovel (Chiapas, Mexico). *American Journal of Botany* **86**: 17–31.
- Graham SA. 2003. Biogeographical patterns of Antillean Lythraceae. *Systematic Botany* **28**: 410–420.
- Hardy OJ, Vekemans X. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* **83**: 145–154.
- Hardy OJ, Vekemans X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**: 618–620.
- Hardy OJ, Charbonnel N, Fréville H, Heuertz M. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* **163**: 1463–1482.

- Hey J, Machado CA. 2003. The study of structured populations – new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4: 535–543.
- Hodell DA, Anselmetti FS, Aiztegui D, et al. 2008. An 85-ka record of climate change in lowland Central America. *Quaternary Science Reviews* 27: 1152–1165.
- Iturralde-Vinent M. 2006. Meso-Cenozoic Caribbean paleogeography: implications for historical biogeography of the region. *International Geology Review* 48: 791–827.
- Jasińska AK, Wachowiak W, Muchewicz E, Boratyńska K, Montserrat JM, Boratyński A. 2010. Cryptic hybrids between *Pinus uncinata* and *P. sylvestris*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 163: 473–485.
- Kuhner MK. 2009. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 86–93.
- Lapègue D, Petit RJ. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475–1487.
- Lavin M, Wojchickowski MF, Gasson P, Hughes C, Wheeler E. 2003. Phylogeny of robinoid legumes (Fabaceae) revisited: *Coursetia* and *Glicricida* recircumscribed, and biogeographical appraisal of the Caribbean endemics. *Systematic Botany* 28: 387–409.
- López-Almirall A. 1982. Variabilidad del género *Pinus* (Coniferales: Pinaceae) en Cuba. *Acta Botánica Cubana* 12: 1–32.
- McDowell T, Volovosek M, Manos P. 2003. Biogeography of *Exostema* (Rubiaceae) in the Caribbean region in the light of molecular phylogenetic analyses. *Systematic Botany* 28: 431–441.
- Moreno-Letelier A, Piñero D. 2009. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography* 36: 121–131.
- Navascués M, Vaxevanidou Z, González-Martínez SC, Climent J, Gil L, Emerson BC. 2006. Chloroplast microsatellites reveal colonization and metapopulation dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology* 15: 2691–2698.
- Navascués M, Hardy OJ, Burgarella C. 2009. Characterization of demographic expansions from the pairwise comparisons of linked microsatellite haplotypes. *Genetics* 181: 1013–1019.
- Negrón-Ortiz V, Watson LE. 2003. Hypotheses for the colonization of the Caribbean Basin by two genera of the Rubiaceae: *Erithalis* and *Ernodea*. *Systematic Botany* 28: 442–451.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Ohta T, Kimura M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research* 22: 201–204.
- Omland KE, Lanyon SM, Fritz SJ. 1999. A molecular phylogeny of the New World orioles (*Icterus*): the importance of dense taxon sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 224–239.
- Pannel JR, Charlesworth B. 2000. Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 355: 1851–1864.
- Perdices A, Doadrio I, Bermingham E. 2005. Evolutionary history of the synbranchid eels (Teleostei: Synbranchidae) in Central America and the Caribbean islands inferred from their molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 460–473.
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, et al. 1999. Climate atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399: 429–439.
- Pindell J, Kennan L, Stanek KP, Maresch WV, Draper G. 2006. Foundations of Gulf of Mexico and Caribbean evolution: eight controversies resolved. *Geologica Acta* 4: 303–341.
- Pons O, Petit RJ. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.
- Posada A, Crandall KA. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37–45.
- Provan J, Soranzo N, Wilson NJ, Goldstein D, Powell W. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153: 943–947.
- Ray N, Adams JM. 2001. A GIS-based vegetation map of the World at the Last Glacial Maximum (25,000–15,000 BP). *Internet Archaeology* 11. http://intarch.ac.uk/journal/issue11/rayadams_toc.html
- Ribeiro MM, Plomion C, Petit R, Vendramin GG, Szmidt AE. 2001. Variation in chloroplast single-sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics* 102: 97–103.
- Ricklefs R, Bermingham E. 2008. The West Indies as a laboratory of biogeography and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)* 363: 2393–2413.
- Rodríguez-Banderas A, Vargas-Mendoza CF, Buonamici A, Vendramin GG. 2009. Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of Biogeography* 36: 1807–1820.
- Rogers AR, Harpending HC. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552–569.
- Rosenberg NA, Nordborg M. 2002. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 3: 380–390.
- Santiago-Valentín E, Olmstead RG. 2003. Phylogenetics of the Antillean Goetzeoideae (Solanaceae) and their relationships within the Solanaceae based on chloroplast and ITS DNA sequence data. *Systematic Botany* 28: 452–460.
- Santiago-Valentín E, Olmstead RG. 2004. Historical biogeography of Caribbean plants: introduction to current knowledge and possibilities from a phylogenetic perspective. *Taxon* 53: 299–319.
- Schneider S, Excoffier L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites. Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079–1089.
- Slatkin M. 1977. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical Population Biology* 12: 253–262.
- Szpiech ZA, Jackobson NA, Rosenberg NA. 2008. ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics* 24: 2498–2504.
- Templeton AR. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13: 789–809.
- Trejo-Torres C, Ackerman JD. 2001. Biogeography of the Antilles based on a parsimony analysis of orchid distributions. *Journal of Biogeography* 28: 775–794.
- Vendramin GG, Lelli G, Rossi P, Morgante M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595–598.
- Whitlock MC. 2004. Selection and drift in metapopulations. In: Hanski I, Gaggiotti O, eds. *Ecology, genetics, and evolution of metapopulations*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 153–173.
- Willyard A, Cronn R, Liston A. 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting in the ponderosa pines. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 498–511.
- Xu H, Fu YX. 2004. Estimating effective populations size or mutation rate with microsatellites. *Genetics* 166: 555–563.

Flujo génico a larga distancia y demografía histórica en la Cuenca del Caribe

4.1 Introducción

Para profundizar en el análisis del tipo de procesos que han afectado la distribución de la variación genética en los pinos de la Subsección *Australes* en la Cuenca del Caribe, utilizamos como marco de referencia el modelo de una población en equilibrio Wright-Fisher (Wakeley, 2009) y a partir de las formas en que diferentes procesos los modifican éstas condiciones, analicé analizar la evidencia genética para inferir los procesos históricos que han moldeado ésta distribución.

Como hemos señalado, los procesos demográficos en las poblaciones, el flujo génico y las relaciones históricas entre ellas subyacen a la distribución actual de la variación genética. Siguiendo a Slatkin (2000) podemos emplear el término *estructura genética de las poblaciones* para denominar a los rasgos genéticos de un conjunto de poblaciones que hacen que éstas no cumplan las suposiciones más simples de un modelo Wright-Fisher. En este modelo, se supone que: 1) las poblaciones tienen un tamaño constante N ; 2) las generaciones no se sobrelapan; 3) el apareamiento entre los individuos es al azar; y 4) la cantidad de prole por individuo se distribuye aleatoriamente siguiendo una distribución de Poisson (Hey & Machado, 2003).

En una población Wright-Fisher, la distribución de la variación genética (\hat{H}) está determinada por el tamaño poblacional (N constante) y la tasa de mutación (μ igualmente constante). Para una población en la que se cumple un modelo de alelos infinitos esto se traduce en que la heterocigosis esperada (\hat{H}) se aproxima a las condiciones de equilibrio mutación-deriva en las que:

$$\hat{H} = \frac{4N\mu}{1 + 4N\mu}$$

Y en el caso de microsatélites, que evolucionan con un modelo de mutación de “piedras de paso”, es posible tener una homocigosis esperada (Ohta & Kimura, 1973) dada por la expresión:

$$E(Hom) = \frac{1}{\sqrt{1 + 2\theta}}$$

Donde θ es el estimador escalado de la tasa mutacional y la heterocigosis esperada bajo este equilibrio es el complemento $1-E(Hom)$.

4.1.1 Condiciones de no equilibrio

Existen procesos diversos que generan una estructura genética dentro y/o entre las poblaciones, por lo que se ha planteado que es necesario concentrarse en casos particulares (Slatkin, 2000). En el contexto del presente estudio es de interés la comprensión de los efectos de factores que se alejan de los supuestos 1) y 3): el efecto de los cambios demográficos y el efecto de la subdivisión y flujo entre las poblaciones en diferentes escalas.

Crecimiento demográfico

El crecimiento demográfico altera la escala temporal en la que ocurren los eventos de coalescencia en una genealogía, así como la forma en la que se distribuyen dichos eventos a lo largo de la genealogía. En una población con tamaño poblacional efectivo (N_e) constante las ramas más cortas son las más externas o recientes (es decir, los eventos de coalescencia son más frecuentes en las primeras generaciones hacia atrás en el tiempo), y las ramas que llevan a los últimos eventos de coalescencia, las internas, son más largas. En cambio, en una población que ha experimentado crecimiento demográfico, la relación se invierte: las ramas externas son más largas y las ramas internas, que están más cerca del ancestro común más reciente (MRCA) para una genealogía, son más cortas (Rogers & Harpending, 1992; Wakeley, 2009). Este patrón tiende a acentuarse mientras más abrupto o intenso ha sido el crecimiento de una población.

Lo anterior afecta la variación que se presenta en una población en términos de frecuencias alélicas. Las ramas más largas de una genealogía (las ramas externas en una genealogía con crecimiento poblacional) acumulan, por el mero hecho de ser más largas, una proporción mayor de los eventos mutacionales, ocasionando que un número menor de linajes comparta esas mutaciones (ver Figura 4.1.) Por lo tanto las poblaciones (o regiones) que han presentado crecimientos demográficos, tienden a tener una mayor cantidad de alelos representados por solamente una (*singletons* en inglés) o muy pocas copias en relación a lo que se esperaría en una población de tamaño constante (Nei *et al.*, 1975). Slatkin y Hudson (1991) demostraron que la distribución de las diferencias pareadas (*mismatch distribution*) en una población que ha tenido una expansión demográfica se aproximaría a una distribución Poisson. Este es el fundamento del análisis de distribución de diferencias pareadas (Rogers & Harpending, 1992; Harpending, 1994) y que utilicé para analizar los procesos demográficos de las poblaciones de pinos en la Cuenca del Caribe (Jardón-Barbolla, *et al.*, 2011). En el presente capítulo, este marco conceptual servirá para analizar con ésta y otras herramientas, la historia de las poblaciones de pinos en la Cuenca del Caribe.

Analizada desde el presente, la expansión poblacional en el pasado, se conceptualiza como una contracción que ocurrió hace τ unidades, donde τ es un estimador escalado por la tasa mutacional (u) y el tiempo medido en generaciones (t) (Rogers & Harpending, 1992):

$$\tau = 2ut$$

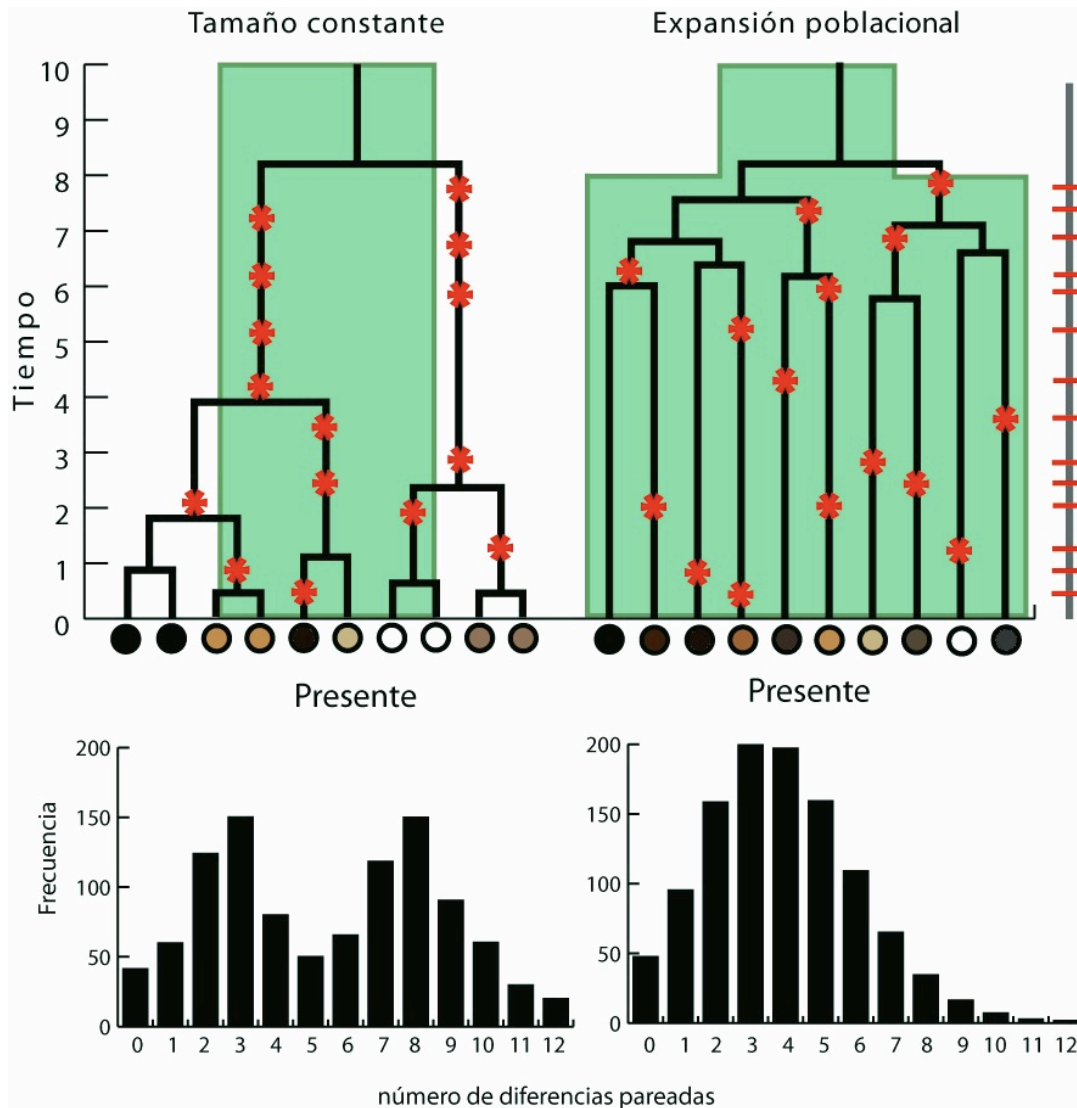


Figura 4.1 Efecto de la expansión poblacional en la estructura de una genealogía. En poblaciones con tamaño constante (lado izquierdo), se observan pocos alelos de copia única y varios alelos representados por más de una copia (arriba) mientras que la distribución de diferencias pareadas es bimodal. En poblaciones que han atravesado expansión poblacional (lado derecho) en el pasado se observa un mayor número de alelos de copia única y la distribución de diferencias pareadas (abajo) se asemeja a una distribución Poisson.

Estructura geográfica

El otro tipo de procesos en los que nos concentraremos son los que tienen que ver con la no aleatoriedad del proceso de apareamiento, en particular cuando la probabilidad de apareamiento al interior de una población no es igual a la probabilidad de apareamiento entre poblaciones. Cuando esto ocurre las poblaciones presentan una *estructura geográfica*, es decir, están subdivididas.

Una consecuencia relativamente evidente es que una genealogía de genes provenientes de una población subdividida será en promedio más larga que una proveniente de una muestra que se comporta como una sola población panmíctica (Slatkin, 2000; Wakeley, 2008). Lo anterior ocurre debido a que gracias a la deriva génica que ocurre al interior de cada subpoblación, los diferentes linajes colaescen primero al interior de su propia subpoblación y sólo más atrás en el tiempo, se puede dar la coalescencia entre la totalidad de los diferentes linajes.

En contrapartida, el flujo génico entre subpoblaciones puede ser visto como una fuerza cohesiva, que incrementa el grado de similitud genética (Wright, 1951) o de correlación (en el sentido de Malecót, 1975) entre diferentes poblaciones. Así, la variación genética compartida en el presente entre dos o más subpoblaciones puede deberse no solamente a su asociación histórica reflejando la secuencia de eventos de divergencia entre ellas, sino también al nivel del flujo genético histórico entre subpoblaciones, el cual homogeniza genéticamente a las subpoblaciones. Eventualmente se puede alcanzar un equilibrio entre los procesos de divergencia-asociación histórica y el mantenimiento de la similitud debida al flujo, equilibrio que da origen al estadístico de resumen clásico:

$$F_{ST} = \frac{1}{1 + 4Nm}$$

Donde N es el tamaño efectivo de la población y m la fracción de migrantes por generación; siendo Nm el número efectivo de migrantes por generación. De esta manera F_{ST} aparece tanto como una medida de la diferenciación o estructura genética de las poblaciones, como un estimador indirecto del flujo génico histórico entre poblaciones (Slatkin, 1977).

El estadístico F_{ST} también puede expresarse en términos del tiempo de coalescencia de una muestra de genes tomada de una población subdividida, de forma análoga a la comparación clásica de las heterocigosis para estimar su valor (Slatkin, 1977):

$$F_{ST} = \frac{T_T - T_S}{T_T}$$

Donde T_T es el tiempo de coalescencia promedio para un par de copias muestreadas en la población total, y T_S es el tiempo medio de coalescencia para dos copias que provienen de subpoblaciones (o demes) diferentes (Hudson *et al.*, 1992; Charlesworth *et al.*, 2003).

La comparación de diferentes loci no ligados, también puede ser de utilidad. Desde el punto de vista de la teoría de coalescencia, el flujo génico entre subpoblaciones ocasiona que se incremente la varianza del tiempo al ancestro común más reciente (time to most common recent ancestor, TMRCA por sus siglas en inglés) para diferentes loci no ligados a lo largo del genoma (Wakeley, 2009). De esta manera, las genealogías de genes para subpoblaciones que presentan flujo génico también se ven afectadas en la forma que éstas toman (Figura 4.2). Entonces, alcanzadas las condiciones de equilibrio, en un conjunto de poblaciones con migración habría muchos polimorfismos de frecuencia intermedia, ocasionando que los valores de otros estadísticos de resumen como la D de Tajima (1989) o la F^* de Fu y Li (1993) tomen valores positivos (Wakeley, 2009).

Diferentes tipos de flujo génico entre subpoblaciones ocasionan diferentes patrones de distribución de la variación y diferenciación genética entre poblaciones. El estadístico de resumen F_{ST} fue derivado para un modelo de islas, que supone que las poblaciones intercambian alelos a una tasa m , independientemente de la distancia que las separe (Hamilton, 2009). El estadístico F_{ST} puede proporcionar una aproximación general al número efectivo de migrantes por generación (Nm) para el conjunto de subpoblaciones, aún cuando la estructura se desvíe del modelo de islas (Slatkin & Barton, 1989), pero estos diferentes patrones de estructura genética son relevantes al hacer inferencias acerca del tipo de procesos que han afectado la historia de un conjunto de poblaciones.

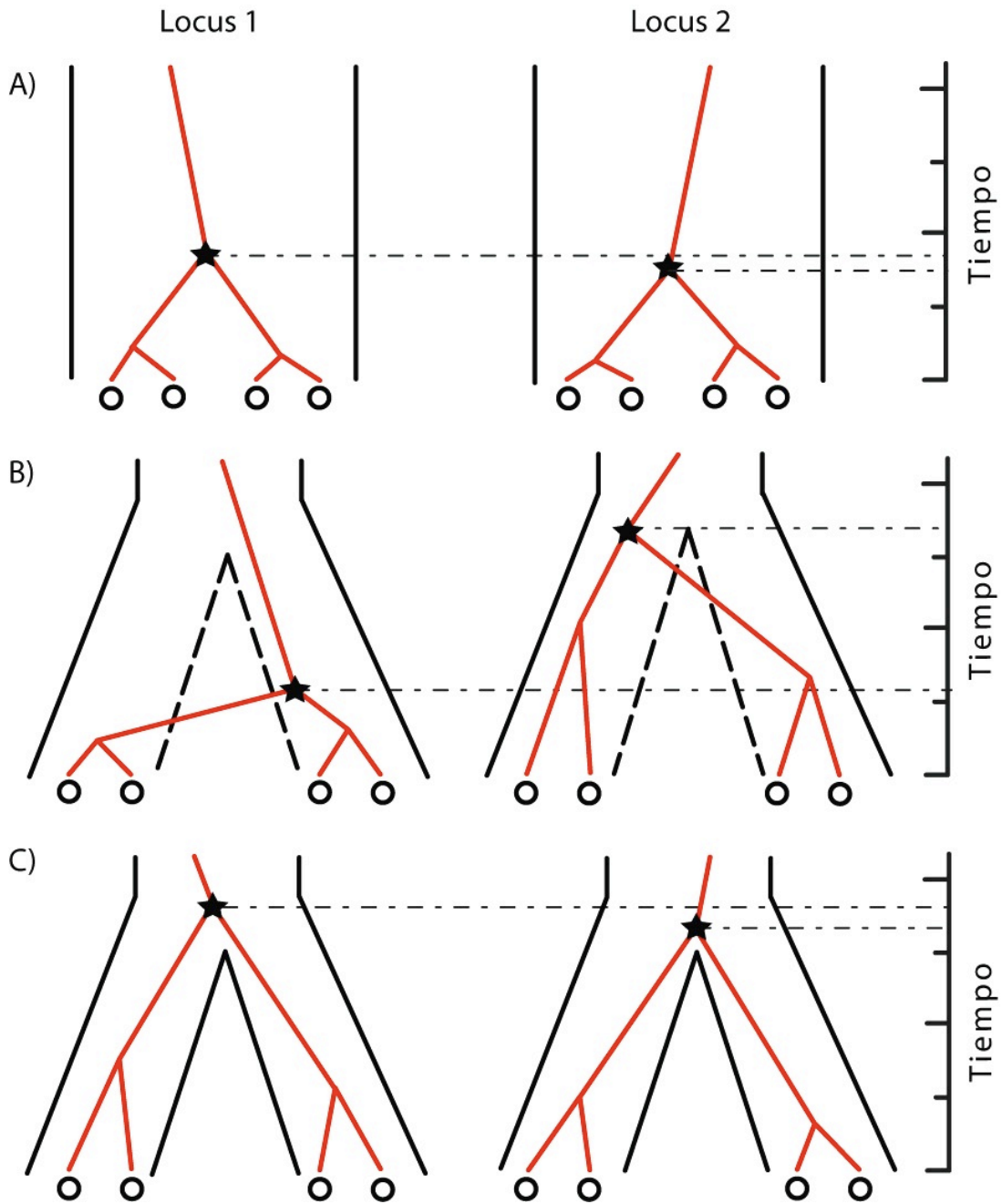


Figura 4.2 Efecto de la estructura geográfica en las genealogías de genes. Se indica con una ★ el Ancestro Común Más Reciente (MRCA) para dos loci hipotéticos. A) Población panmítica sin estructura geográfica. B) Dos poblaciones con separación geográfica y flujo génico esporádico; se observa un incremento en la varianza en el tiempo al MRCA (TMRCA) para diferentes loci. C) Dos poblaciones separadas y sin flujo génico; se observa menos varianza en el TMRCA que en presencia de flujo, pero el TMRCA promedio es mayor al de una sola población panmítica (Modificado de Wakeley, 2009).

En un modelo de “piedras de paso” (*stepping stone*; Kimura & Weiss, 1964), la mayor parte o la totalidad del flujo génico ocurre entre poblaciones adyacentes, dando

como resultado un patrón de aislamiento por distancia (IBD por sus siglas en inglés). En este patrón, el grado de similitud genética entre las poblaciones tendría una relación inversamente proporcional con la distancia que separa a los diferentes pares de subpoblaciones. El flujo génico a grandes distancias puede alterar este patrón, ocasionando que el grado de correlación entre la diferenciación genética y la distancia geográfica disminuya (i.e. la varianza en la similitud genética es mayor; Slatkin, 2000). En un caso extremo, si el flujo génico a larga distancia fuese común entre varias poblaciones, el patrón de correlación entre F_{ST} y la distancia geográfica se haría indistinguible de un modelo de islas (Hamilton, 2009). Sin embargo, en casos intermedios, en los que existe flujo génico a larga distancia de manera ocasional, el resultado observable será una mayor varianza en los valores pareados de F_{ST} para una misma categoría de distancia, como resultado de que los eventos de dispersión esporádicos incrementan la varianza en la ubicación geográfica de los padres respecto a sus hijos (Rousset, 1997; 2001a, b). Por lo tanto, los valores pareados de F_{ST} que se desvían hacia abajo de la tendencia general, podrían ser indicativos de flujo a génico a larga distancia.

El modelo de “piedras de paso” se puede extender al tipo de estructura que se esperaría bajo una dinámica metapoblacional, en la que procesos de colonización/extinción local moldean la estructura genética entre poblaciones (Hanski, 1998; Whitlock, 2004; Hamilton, 2009). En una dinámica metapoblacional, el flujo entre los demes presentes en un momento determinado se comporta exactamente como se esperaría en un modelo de piedras de paso (Hamilton, 2009). Sin embargo durante el proceso de colonización que da origen a las poblaciones más nuevas, el patrón que toma el flujo es diferente (Slatkin, 1977; 2000). En esta escala, la deriva génica puede fijar alelos localmente de manera transitoria en algunas de estas poblaciones nuevas, contribuyendo a valores de diferenciación (F_{ST} , $\delta\mu^2$, ϕ_{ST} , etc.) relativamente altos, los cuales se presentan momentáneamente, hasta que el flujo génico diluye las diferencias entre poblaciones (Slatkin, 1977; Pannel & Charlesworth, 2000, Whitlock, 2004; Hamilton, 2009). Este patrón se suele ver acompañado de una distribución heterogénea de la diversidad genética, por ejemplo a nivel de los valores de θ estimados, en la que las poblaciones más antiguas como *fuentes* de variación y otras como *sumideros* de

variación, teniendo las primeras una diversidad genética más alta (Pannel & Charlesworth, 2000; Whitlock, 2004).

El estadístico de resumen F_{ST} y sus derivados (G_{ST} , R_{ST}) son resultado de fenómenos que escapan a las condiciones de equilibrio de una población Wright-Fisher, como la presencia de diferentes niveles de flujo génico entre ellas y describen adecuadamente las condiciones de equilibrio migración-deriva (Hey & Machado, 2003). Sin embargo, en el estudio de poblaciones que han atravesado cambios recientes en su distribución o en los patrones de flujo génico, las condiciones de equilibrio no siempre se han alcanzado. Este es uno de los temas importantes en el análisis de la historia reciente de la distribución de linajes genéticos (Hey & Machado, 2003). Cuando han ocurrido eventos de colonización reciente a lo largo de áreas geográficas grandes, algunas subpoblaciones pueden no ajustarse a un modelo de aislamiento por distancia Slatkin (1993, 2000). Este se establecería en primera instancia entre las poblaciones más cercanas (que tendrían una mayor probabilidad de mantener flujo génico entre ellas) y solamente después de mucho tiempo, mediando eventos esporádicos de flujo génico entre las poblaciones establecidas, se establecería un patrón claro de aislamiento por distancia.

4.1.2 Análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA)

El análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA por sus siglas en inglés) propuesto por Templeton (1995, 1998, 2004) busca distinguir procesos históricos y contemporáneos que han afectado la distribución de la variación genética en el espacio. Este análisis integra diferentes niveles de información provenientes de las frecuencias de los diferentes haplotipos, sus relaciones genealógicas y su distribución geográfica para cuantificar las asociaciones entre la geografía, el tiempo y el árbol de genes. Este método se basa en la reconstrucción de una red de haplotipos de menor número de pasos. Una red de haplotipos es una representación gráfica de las relaciones genealógicas entre los haplotipos en la que, a diferencia de un árbol de genes, un nodo puede conectar a más de dos ramas al mismo tiempo (trifurcaciones, multifurcaciones). Los elementos de los haplotipos ancestrales (nodos) pueden estar presentes en la muestra actual de genes e incluso podría haber segmentos reticulados si se presenta

recombinación (Posada & Crandall, 2001). Estas propiedades de las redes de haplotipos reflejan características de la evolución de linajes genéticos de reciente divergencia (Avice, 2001).

Cuando se produce un nuevo alelo a partir de una de las copias de un alelo ancestral, este último no desaparece de inmediato de una población, lo cual lleva a que una muestra contenga haplotipos derivados y haplotipos ancestrales. Por ello, en una muestra de genes de reciente divergencia, las relaciones genealógicas aparecen de manera multifurcada, donde en promedio, los haplotipos más antiguos tienen un mayor número de conexiones en la actualidad (Posada & Crandall, 2001; Templeton 2001, 2006). De esta manera, las redes de haplotipos se convierten en una herramienta útil para el análisis filogeográfico. Generalmente, se puede esperar que los haplotipos más antiguos, también tengan una distribución espacial más amplia; los haplotipos más abundantes tienden a tener un mayor número de conexiones; haplotipos de copia única (singletons) tienden a conectarse con haplotipos más abundantes y en promedio suelen estar conectados con haplotipos de la misma población (Posada & Crandall, 2001)

Las redes de haplotipos se pueden reconstruir empleando el criterio de parsimonia estadística (Templeton *et al.*, 1992) partiendo de la idea general de que cuando se trabaja con linajes de reciente divergencia hay menor riesgo de que se arribe a un mismo estado de carácter por dos vías independientes (homoplasia). El criterio de parsimonia estadística evalúa la probabilidad de que las diferencias observadas entre los diferentes pares de haplotipos sea el resultado del mismo número de eventos mutacionales. Estudios de simulación de evolución de secuencias han demostrado que en ausencia de recombinación, este criterio permite recuperar la topología y longitudes de rama correctas, aún en presencia de tasas mutacionales altas (Woolley *et al.*, 2008).

Las redes de haplotipos pueden presentar ambigüedades en la forma de segmentos reticulados o asas cerradas en las que aún aplicando el criterio de parsimonia estadística hay más de una vía para arribar a un estado de carácter (haplotipo). Descontando la posibilidad de homoplasia real o bien de recombinación, en tanto se trabaje con un número suficientemente grande de loci en una escala temporal reciente y se utilicen marcadores moleculares de herencia uniparental (por ejemplo, los genomas mitocondrial y cloroplástico han sido ampliamente usados) es posible controlar la

incertidumbre en la reconstrucción de las redes. Las ambigüedades pueden resolverse empleando los criterios planteados por Crandall & Templeton (1993) y Pfenninger y Posada (2002). Dichos criterios incluyen: 1) los haplotipos ancestrales que han permanecido en altas frecuencias por más tiempo en una población tienen mayor probabilidad de haber dado origen a nuevos haplotipos, por lo que es más probable que los singletons estén conectados a haplotipos más frecuentes que a otros singletons (criterio de frecuencia); 2) los haplotipos con mayor número de conexiones tienen más probabilidad de ser ancestrales por lo que tienden a ocupar nodos en la red, mientras que un haplotipo raro (y por tanto probablemente de reciente aparición) tendrá mayor probabilidad de estar unido a un nodo que a una punta (criterio de topología); 3) es más probable que los haplotipos raros o de copia única estén conectados con haplotipos de su misma población (Donnelly & Tavaré, 1986; Posada & Crandall, 2001; Pfenninger & Posada, 2002).

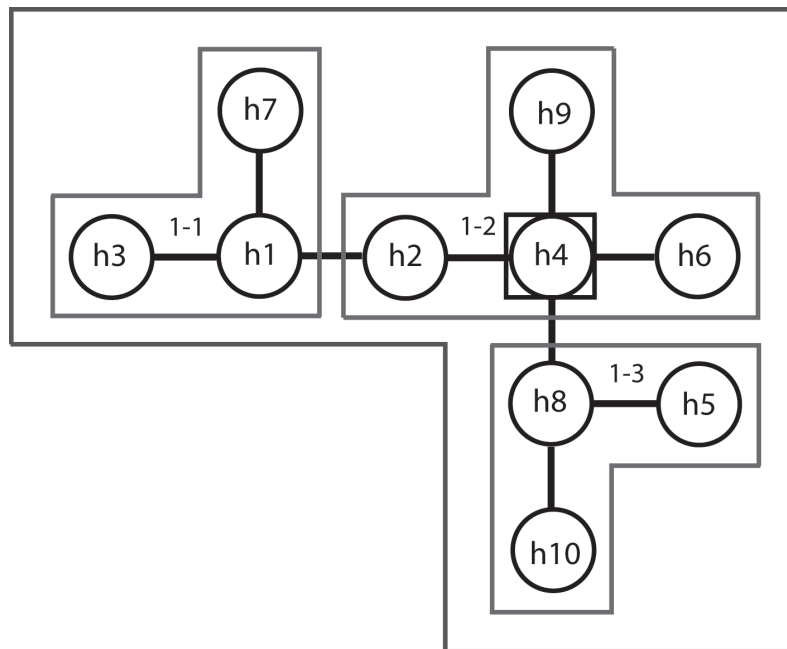


Figura 4.3. Ejemplo de una red de haplotipos. La notación h1, h2, h3... h10 corresponde a diferentes haplotipos. Las líneas indican que entre un haplotipo y otro hay un paso mutacional. El haplotipo h4 tiene más conexiones que el resto. Los clados se anidan de las puntas hacia el centro y se denotan con 1-1, 1-2 y 1-3. 1-1 y 1-3 son clados punta, mientras que 1-2 es un clado interior. La línea negra exterior denota el cladograma total que engloba los clados 1-1, 1-2 y 1-3.

A partir de la red de haplotipos, se genera un ordenamiento jerárquico en clados anidados. Este anidamiento se genera comenzando desde las puntas de la red, uniendo en primer instancia los haplotipos que estén separados por un paso mutacional, generando un primer nivel de anidamiento (Templeton, 1998; 2006). A su vez estos clados son anidados en clados más incluyentes bajo el criterio de agrupar aquéllos que están separados por un solo paso mutacional, comenzando siempre por las puntas. Se procede de esta manera hasta generar un clado que incluya a toda la red de haplotipos, un cladograma total.

Una vez anidada una red, se prueba la asociación geográfica de los clados formados a partir de la comparación de dos medidas de la dispersión geográfica de un clado, D_c y D_n . La medida D_c es la distancia media de los haplotipos de un mismo clado respecto al centro geográfico del mismo y D_n es la media ponderada de la distancia que separa a los haplotipos de ese clado del centro geográfico del siguiente nivel de anidamiento (Templeton, 1987, 2006). De esta manera se expresa qué tanto se ha desplazado históricamente un clado más reciente (nivel de anidamiento inferior) con respecto al clado de nivel superior del que forma parte (nivel de anidamiento superior). El programa GEODIS 2.6 (Posada *et al.*, 2000) realiza una permutación de las localidades geográficas de los diferentes clados y calcula las distancias D_c y D_n para cada caso. Con ello se genera una distribución aleatoria y se puede realizar una prueba de dos colas que permite detectar los casos en los que un clado presenta valores de D_c o D_n significativamente altos o bajos, indicando algún tipo de asociación geográfica.

El método del análisis filogeográfico de clados anidados requiere de información adicional acerca de la distribución así como de algunas características ecológicas de la especie para poder realizar un procedimiento de inferencia siguiendo una clave (Templeton, 2004). Esta inferencia se realiza siguiendo los procesos del presente hacia el pasado, comenzando por la asociación geográfica de los clados punta, o de primer nivel, y posteriormente los clados más interiores, que contienen los nodos y representan eventos del pasado.

Los procesos que se pueden inferir son; fragmentación alopátrica, flujo génico restringido, dispersión a larga distancia, aislamiento por distancia y expansión de rango contigua, siendo ésta última la que mayor tasa de falsos positivos puede presentar

(Templeton, 2008). En tanto que la expansión contigua del rango implicaría un incremento en el tamaño de la población, esta inferencia puede corroborarse usando otras aproximaciones, basadas en la proporción de singletons esperada para una genealogía con expansión, como la de Rogers & Harpending (1992).

Si bien el NCPA ha sido criticado por arrojar falsos positivos (Petit, 2008), y la interpretación de sus conclusiones debe ser particularmente cautelosa cuando se trabaje con datos que provienen de un solo locus (Templeton, 2002; Knowles, 2004, Garrick *et al.*, 2008), las inferencias de éste análisis pueden servir para generar una matriz de hipótesis que se pueden probar mediante otros métodos de análisis (Garrick *et al.*, 2008).

El propio Templeton (2004) ha alertado acerca de la interpretación que se hace a partir de las redes de haplotipos, pues las relaciones genealógicas entre éstos no necesariamente son equivalentes a las relaciones entre linajes de poblaciones o especies (Hudson, 1990). Sin embargo, es posible utilizar este método como parte de una serie más amplia de análisis que en conjunto brinden una reconstrucción amplia de la historia de un grupo de linajes genéticos. La extrapolación de estos resultados hacia el nivel de especies, debe ser cautelosa e incorporar otras fuentes de información (Avise, 2000; Carstens & Knowles, 2007; Knowles & Carstens, 2007).

EL objetivo de este capítulo fue analizar la estructura filogeográfica de *P. caribaea*, *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*, en la Cuenca del Caribe con el fin de obtener evidencia adicional acerca de patrones de colonización a larga distancia, expansión poblacional y posible fragmentación en el pasado para los linajes de cloroplasto encontrados en la Cuenca del Caribe.

4.2 Material y Métodos

Análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA)

En este trabajo se utilizó el conjunto de datos de haplotipos de cloroplasto publicados en Jardón *et al.* (2011) para construir una red de haplotipos de menor número de pasos (minimum spanning network) utilizando el programa TCS v.1.21 (Clement *et al.*, 2000). Las ambigüedades de la red fueron resueltas siguiendo los criterios planteados por Posada y Crandall (2001) y por Pfenninger y Posada (2002); la red fue anidada conforme a la metodología descrita por Templeton (2004, 2006). El análisis de asociación geográfica se realizó utilizando el programa GeoDis V. 2.6 (Posada *et al.*,

2000) actualizado para realizar una corrección Dunn-Sidak para determinar el grado de significancia de la asociación geográfica. La corrección Dunn-Sidak se emplea para no sobreestimar la asociación geográfica cuando se realiza el NCPA a partir de un solo locus, como es el caso del genoma del cloroplasto utilizado en el presente estudio.

Análisis demografía histórica

La expansión contigua de rango es la inferencia más débil derivada del NCPA (Beaumont & Panchal, 2008; Garrick & Dyer, 2008), por lo que realicé análisis adicionales. Una expansión contigua del rango traería asociado un incremento en el tamaño de las poblaciones. Por ello, para corroborar estas inferencias se realizaron pruebas de neutralidad para los conjuntos de datos correspondientes a los clados para los que se infirió expansión contigua del intervalo de distribución.

Las pruebas de neutralidad D de Tajima (1993) y F_S (Fu, 1997) permiten estimar la desviación de la neutralidad para estos conjuntos de datos. Estas pruebas permiten detectar el exceso de mutaciones en baja frecuencia, lo cual puede ser resultado de procesos selectivos, pero como hemos señalado antes, también resulta de procesos demográficos. Ambas pruebas se basan en la comparación de estimados alternativos del parámetro escalado de tasa mutacional, θ . El estadístico D de Tajima (1989) compara la proporción de sitios segregantes (θ_S de Watterson, 1975) y el número medio de diferencias pareadas entre los diferentes haplotipos (θ_π , Tajima 1983).

El estadístico F_S de Fu (1997) evalúa la probabilidad \hat{S} de observar, bajo un modelo neutral Wright-Fisher, un cierto número de mutaciones de copia única en una muestra de tamaño dado, dada una cierta diversidad nucleotídica.

$$F_S = \ln \left(\frac{\hat{S}}{1-\hat{S}} \right)$$

Cuando la composición de una muestra presenta exceso de mutaciones de copia única respecto a lo esperado para una población con tamaño constante, el estadístico F_S toma valores negativos y significativos ($p < 0.02$; Fu, 1997; Ramírez-Soriano *et al.*, 2008). Esta prueba tiene más poder estadístico para detectar expansiones poblacionales recientes a partir de datos que no presentan recombinación, aunque se ve afectado por

pequeños tamaños de muestra. Debido a esto, se escogió la prueba de Fu (1997) como la prueba de neutralidad más adecuada para aplicarse al conjunto de datos de cloroplasto que tenemos.

Se realizó un análisis de distribución de diferencias pareadas (Rogers & Harpending, 1992) para aquellos clados que mostraron asociación geográfica significativa y en los que la inferencia del NCPA llevó a la conclusión de expansión contigua de rango. Se usó el programa Arlequin V3.5 para probar la hipótesis de una distribución Poisson en las diferencias pareadas. La estimación del parámetro τ para calcular el tiempo a la expansión poblacional se realizó mediante cálculo bayesiano aproximado (ABC, por sus siglas en inglés) utilizando el método desarrollado por Ortega (2009) utilizando 10,000 simulaciones de coalescencia para cada clado. Se escogió este método debido a que permite obtener estimado de τ tan cercanos al valor real como el método de máxima pseudoverosimilitud de Navascués *et al.* (2009), pero controlando mejor el sesgo por homoplasia, lo que permite obtener intervalos de confianza de menor tamaño (Ortega, 2009). El tiempo a la expansión fue calculado utilizando una tasa mutacional por locus de 5.5×10^{-5} por generación (Provan, 1999) y un tiempo generacional de 42.5 años (A. López-Almirall, Museo Nacional de Historia Natural, Cuba, Com. Pers.). Tanto el análisis de distribución de frecuencias pareadas como el cálculo del estadístico F_S se realizaron codificando los haplotipos de microsatélites como RFLP's siguiendo la descripción de Navascués *et al.* (2006).

Análisis de aislamiento por distancia

Para tener evidencia adicional de aislamiento por distancia, se puso a prueba la asociación entre el grado de aislamiento genético y la distancia geográfica. Para ello se utilizaron los valores de distancia genética de Goldstein calculados mediante el programa SpaGeDi (Hardy & Vekemans, 2002), probándose su asociación con el logaritmo base 10 de la distancia geográfica. El análisis se realizó utilizando el programa XLSTAT v2011.3.01.

Para identificar comparaciones entre poblaciones con valores de distancia genética relativamente bajos, se compararon los valores de $\delta\mu^2$ a lo largo de diez intervalos de Log[distancia geográfica]. Ello permitió constatar, mediante una prueba de

T de Student, un ANOVA y una prueba de Mann-Whitney, si para un mismo intervalo de distancia geográfica existen diferencias significativas en el grado de diferenciación entre grupos de poblaciones. De esta manera fue posible detectar regiones geográficas que, en promedio, se hallan menos diferenciadas entre sí para un mismo intervalo de distancia.

Análisis de gráfica de poblaciones

Para tener evidencia adicional sobre posibles eventos de flujo génico a larga distancia así como sobre la estructura poblacional, se revisó la relación genética entre las poblaciones mediante el análisis de gráfica de poblaciones (Genetic Studio; Dyer, 2009). Ésta aproximación analiza la distribución en el paisaje estudiado (distribución geográfica) de la covarianza genética entre poblaciones. Para ello, no se supone *a priori* una estructura jerárquica o de partición de las poblaciones en grupos, sino que se utiliza una aproximación multivariada para generar una topología de relaciones entre las poblaciones (Dyer & Nason, 2004). En dicha topología, las poblaciones ocupan los nodos de una gráfica y se encuentran conectadas entre sí reflejando las relaciones globales de covarianza genética entre poblaciones en lugar de hacerlo de manera pareada (Dyer & Nason 2004); la longitud de las conexiones entre nodos refleja el grado de covarianza entre cada par de poblaciones.

Cuando esta topología es proyectada sobre un mapa es posible detectar poblaciones que muestran un grado de correlación genética mayor o menor al patrón observado globalmente para un paisaje determinado. Al realizar esta proyección, las conexiones que unen poblaciones que se encuentran significativamente más distantes de lo que se esperaría por la distribución de distancias en la gráfica de covarianzas (conexiones extendidas) reflejan eventos de dispersión a distancias mayores a las esperadas por el patrón global. En sentido opuesto, las conexiones que unen a poblaciones que se encuentran significativamente más cerca de los esperado dado su grado de correlación genética (conexiones comprimidas) reflejan aislamiento entre poblaciones, probablemente debido a vicarianza (Dyer, 2009). La significancia de estos patrones se probó mediante un análisis de χ^2 por el programa GeneticStudio (Dyer, 2008).

4.3 Resultados

Análisis Filogeográfico de Clados Anidados

La red de haplotipos y su anidamiento se muestran en la Figura 4.4. Los haplotipos presentan relaciones genealógicas fuertemente asociadas con la distribución geográfica de las variedades estudiadas. No hay haplotipos compartidos entre las variedades de *P. caribaea*, mientras que los haplotipos correspondientes a los linajes del Oriente de la Cuenca, *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*, se agrupan en un clado separado de *P. caribaea*.

Los haplotipos presentes en las islas Bahamas están más estrechamente relacionados con los haplotipos que se distribuyen en Centroamérica. Esta porción centroamericana de la red contiene la mayor parte de los haplotipos encontrados en *P. caribaea* var. *hondurensis* y se conecta de manera independiente con los haplotipos distribuidos en Cuba.

Tres haplotipos presentan el mayor número de conexiones (seis), el 60 y el 66 se distribuyen en Centramérica (*P. caribaea* var. *hondurensis*) y el 19 en Cuba (*P. caribaea* var. *caribaea*). La red anidada incluye 4 niveles de anidamiento, siendo el cuarto el que incluye al cladograma total (Figura 4.4). De los clados de primer orden, solamente el clado 1-22 presentó asociación geográfica significativa (Tabla 4.1). Éste se ubica en Belice y para él se infiere la presencia de flujo génico restringido con aislamiento por distancia.

Entre los clados de segundo orden los clados 2-1, 2-4, 2-5, 2-9, 2-16 y 2-21 mostraron asociación geográfica significativa. Todos los clados del tercer y cuarto nivel de anidamiento mostraron asociación geográfica significativa, al igual que el cladograma total. En los clados de dos pasos (2-X) se infieren dos tipos de procesos a través de la clave. Para los clados 2-1 y 2-4, distribuidos en las Islas Bahamas y en la parte media de Centroamérica se infiere flujo génico restringido. La expansión de rango contigua se infirió para el clado 2-9, que contiene haplotipos de *P. caribaea* var. *hondurensis* distribuidos predominantemente en Belice. Este proceso se infiere también para los clados 2-16 y 2-21, distribuidos respectivamente en el Occidente (*P. caribaea* var. *caribaea*) y en el Oriente (*P. cubensis* y *P. maestrensis*) de Cuba.

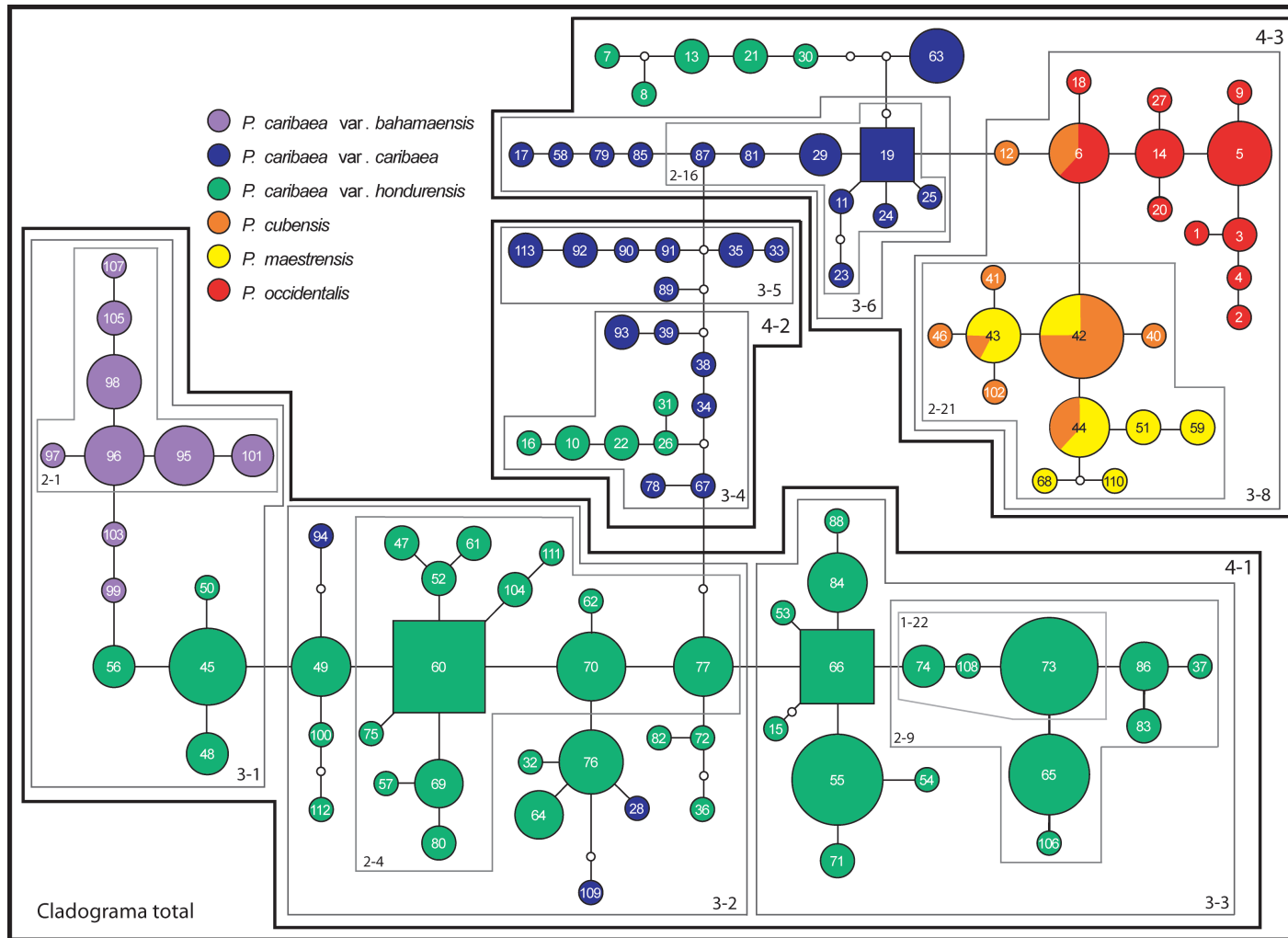


Figura 4.4. Red de haplotipos con clados anidados. Los tamaños de los círculos son proporcionales a la abundancia de cada haplotipo. Se indican con cuadrados los haplotipos con mayor número de conexiones. Se muestran delimitados por líneas solamente aquellos clados que mostraron asociación geográfica significativa considerando la corrección Dunn-Sidak ($p < 0.0170$).

Tabla 4.1. Resultados del Análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA). Los valores del estadístico χ_i^2 y su nivel significancia incluyen la corrección Dunn-Sidak. Solamente se presentan los clados para los que se encontró asociación geográfica significativa (ver Figura 4.4). La cadena de inferencias incluye las respuestas dadas a partir de la última versión disponible de la clave de inferencias para el NCPA (enero de 2011, Posada & Templeton).

Clados	Estadístico χ_i^2	p	Clave de inferencia para el clado	Inferencias
Clado 1-22	20.0000	0.0002	1-19-20-2-11-17-4-NO	Flujo genético restringido con aislamiento por distancia (dispersión restringida)
Clado 2-1	17.2867	0.0001	1-2-11-17-4-NO	Flujo genético restringido con aislamiento por distancia (dispersión restringida)
Clado 2-4	63.3290	0.0001	1-2-3-4-NO	Flujo genético restringido con aislamiento por distancia (dispersión restringida)
Clado 2-9	28.4452	0.0001	1-2-11-12-NO	Expansión contigua del intervalo de distribución
Clado 2-16	14.0000	0.0108	1-2-11-12-NO	Expansión contigua del intervalo de distribución
Clado 2-21	26.3515	0.0004	1-2-11-12-NO	Expansión contigua del intervalo de distribución
Clado 3-1	34.4653	0.0001	1-2-3-5-6-7-SI	Flujo genético o dispersión restringidos, pero con dispersión ocasional a larga distancia.
Clado 3-2	125.8726	0.0001	1-2-11-17-NO	Resultado no concluyente
Clado 3-3	107.8506	0.0001	1-2-11-12-NO	Expansión contigua del intervalo de distribución
Clado 3-4	14.0000	0.0007	1-2-3-5-15-NO	Fragmentación en el pasado y/o colonización a larga distancia.
Clado 3-5	10.0000	0.0048	1-2-3-4-NO	Flujo genético restringido con aislamiento por distancia (dispersión restringida)
Clado 3-6	10.2857	0.0032	1-2-11-12-NO	Expansión contigua del intervalo de distribución
Clado 3-8	65.5580	0.0001	1-2-11-12-NO	Expansión contigua del intervalo de distribución
Clado 4-1	370.5903	0.0001	1-2-11-12-13-SI	Colonización a larga distancia posiblemente asociada con posterior fragmentación (hacia el clado 3-1)
Clado 4-2	24.0000	0.0001	1-2-No hay puntas	Resultado no concluyente
Clado 4-3	138.9020	0.0001	1-2-11-12-13-14-NO	Colonización a larga distancia y/o fragmentación en el pasado (no mutuamente excluyentes)
Cladograma Total	481.8127	0.0001	1-2-11-12-13-SI	Colonización a larga distancia posiblemente asociada con posterior fragmentación.

Todos los clados del tercer y cuarto nivel de anidamiento mostraron asociación geográfica significativa, al igual que el cladograma total. El clado 3-1 distribuido en Centroamérica y las Islas Bahamas, incluye los haplotipos de *P. caribaea* var. *bahamensis* y algunos de los haplotipos de *P. caribaea* var. *hondurensis*; para este clado se infiere flujo genético o dispersión restringidos, pero con dispersión ocasional a larga distancia. La colonización a larga distancia aparece como posibilidad en el clado 3-4, que incluye linajes de Centroamérica y del Occidente de Cuba. El flujo genético restringido con aislamiento por distancia es el proceso que se infirió para los clados 3-5, distribuido en el occidente de Cuba.

En los clados de tercer nivel también tres eventos de expansión de rango contigua, para los clados 3-3 (Centroamérica), 3-6 (occidente de Cuba) y 3-8 (oriente de Cuba); los haplotipos más abundantes del clado 3-3 (haplotipos 55, 65, 66, 73) se ubican cerca o en los extremos suroeste y norte de la distribución de *P. caribaea* var. *hondurensis*.

En los clados de cuarto nivel de anidamiento, que representan eventos más antiguos, los eventos que se pudieron inferir fueron colonizaciones a larga distancia, hacia las islas Bahamas (Clado 4-1) y hacia el Oriente de la Cuenca (Clado 4-3). El cladograma total refleja los eventos más antiguos que se pueden inferir para la historia de los linajes de cloroplasto con este set de datos; para este nivel de anidamiento el proceso inferido fue la colonización a larga distancia con posterior fragmentación. Esto querría decir, que una vez establecidas las poblaciones que los fundan, el flujo genético entre los grandes clados (nivel 4) sería muy escaso o nulo.

Análisis de demografía histórica

La prueba de Fu aplicada a los clados para los que el NCPA permitió inferir expansión de rango contigua, detectó desviaciones significativas de la neutralidad para la variación genética del cloroplasto en los clados: 2-16, 2-21, 3-6 y 3-8. No se detectaron diferencias significativas de la neutralidad en los clados 2-9 y 3-3 (Tabla 4.2). Por otro lado, los análisis de diferencias pareadas mostraron que no se puede rechazar la hipótesis de expansión poblacional en el pasado para los clados 2-9, 2-16, 2-21, 3-3, 3-6 y 3-8 (Tabla 4.2). Los individuos y los haplotipos contenidos en el clado 3-8 son los mismos que

resultaron agrupados previamente mediante un Análisis Bayesiano de Estructura Poblacional (BAPS; Jardón *et al.*, 2011).

La Figura 4.5 muestra la distribución de la probabilidad posterior para los estimados de τ para cada uno de los clados. Los tiempos a la expansión calculados para cada clado (Tabla 4.2) son mayores para los clados más incluyentes (clados de tercer nivel), mientras que los clados más recientes (clados de segundo nivel) presentan tiempos a la expansión más recientes. En todos los clados, el valor estimado de τ con mayor probabilidad posterior corresponde a algún periodo glacial: la Etapa de Isótopo Marino (*Marine Isotope Stage*, MIS en los sucesivo) 4 para los clados 2-16 y 2-21; la MIS-6 para los clados 2-9, 3-3 y 3-8; y la tapa de descenso en la temperatura inmediatamente posterior a MIS-7 par el clado 3-6.

Tabla 4.2 Resultados de la prueba de neutralidad de F_s y parámetros del modelo de expansión súbita probado mediante el análisis de distribución de diferencias pareadas. Se presentan el estadístico F_s de Fu (1997) y su probabilidad; el número de individuos incluidos en cada comparación por clado en (N); la suma de diferencias pareadas (SSD) y su probabilidad asociada; el estimador del tiempo a la expansión poblacional (τ) y su correspondencia en años considerando una tasa m de 5.5×10^{-5} y un tiempo generacional de 42.5 años. Los valores que difieren significativamente de la neutralidad ($p(F_s) < 0.02$) así como los parámetros de tiempo a la expansión para aquellos clados que no se desviaron significativamente del modelo de expansión poblacional súbita ($p(SSD) > 0.05$) se muestran en negritas y con fondo gris.

Clados	F_s	$p(F_s)$	N	SSD	$p(SSD)$	τ (i.c. 95%)	Tiempo a la expansión (i.c. 95%)
Clado 2-9	-2.7086	0.0518	39	0.0047	0.3685	2.6578 (1.1798 - 7.9886)	146694 (65117 - 440927)
Clado 2-16	-3.5539	0.0061	14	0.0116	0.4495	1.2411 (0.6481 - 6.5077)	68500 (35770 - 359190)
Clado 2-21	-5.4067	0.0021	33	0.0027	0.5627	1.7823 (0.8631 - 7.0949)	98376 (47641 - 391600)
Clado 3-3	-4.8953	0.0347	77	0.01281	0.1989	3.4159 (2.0210 - 12.1703)	188542 (111550 - 671740)
Clado 3-6	-6.5864	<0.0001	18	0.0112	0.6410	3.9758 (2.4378 - 16.0634)	219442 (134552 - 886618)
Clado 3-8	-15.5711	<0.0001	62	0.0014	0.4602	2.8741 (1.7003 - 6.3998)	158636 (93847 - 353235)

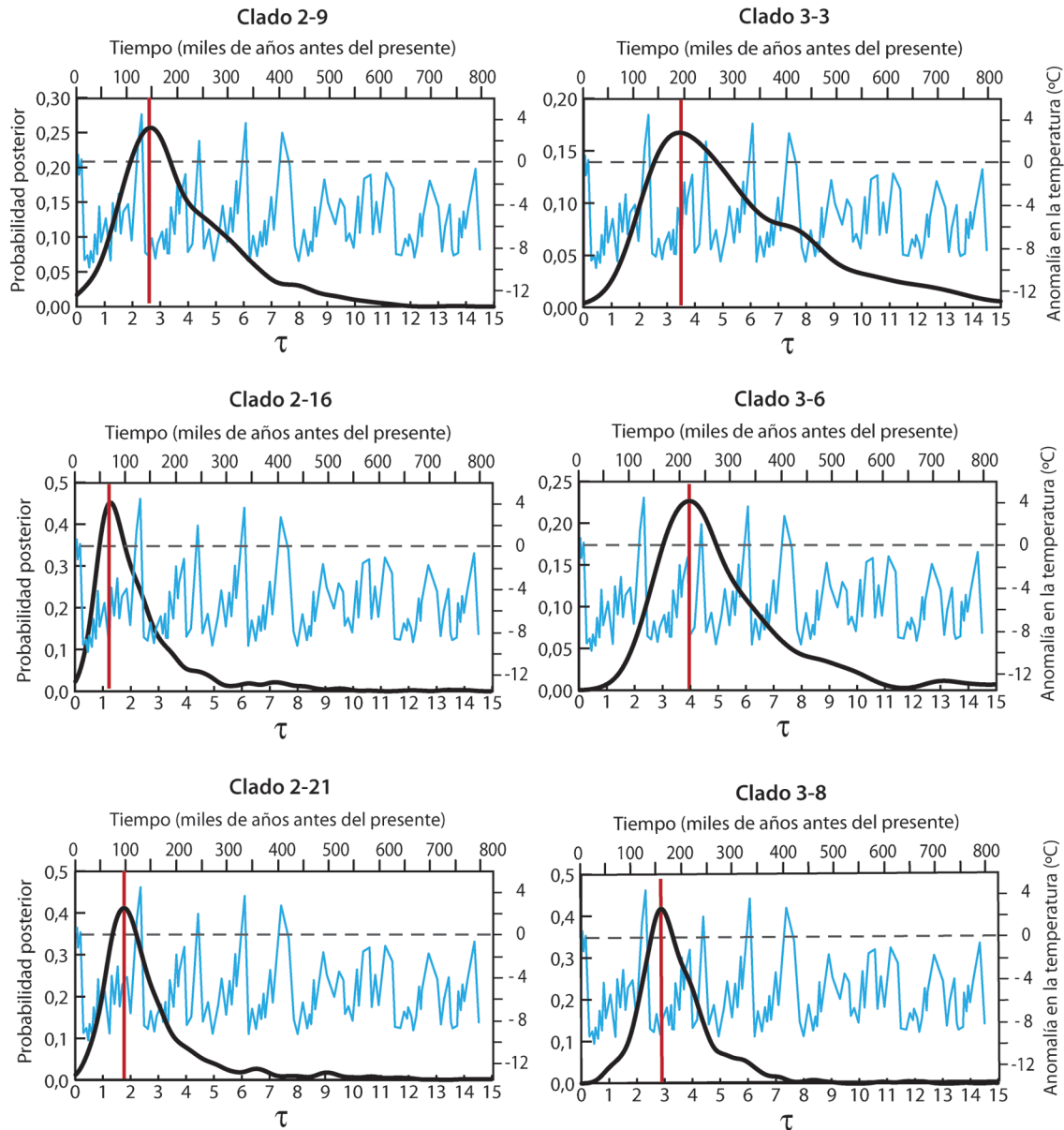


Figura 4.5 Probabilidad posterior del valor de τ para los diferentes clados en los que se detectó expansión contigua del intervalo de distribución. Se incluye también el tiempo en miles de años (escala superior) al que corresponde cada valor de τ , junto con las fluctuaciones en la temperatura registradas para los últimos 800 mil años (escala derecha; Luthi *et al.*, 2008). Los picos azules descendentes indican máximos glaciales. Las líneas rojas señalan en cada caso el valor de τ con mayor probabilidad posterior detectado después de 10,000 simulaciones de coalescencia.

Aislamiento por distancia

La prueba de Mantel comparando los pares de logaritmo de distancia geográfica con la distancia genética de Goldstein ($\delta\mu^2$) para todas las poblaciones de la Cuenca del Caribe, resultó en una correlación significativa ($r = 0.413$; $p < 0.0001$) indicativa de aislamiento

por distancia (IBD; Figura 4.6). Este patrón se encontró también al analizar las poblaciones de *Pinus caribaea* por separado ($r=0.178$; $p<0.0287$).

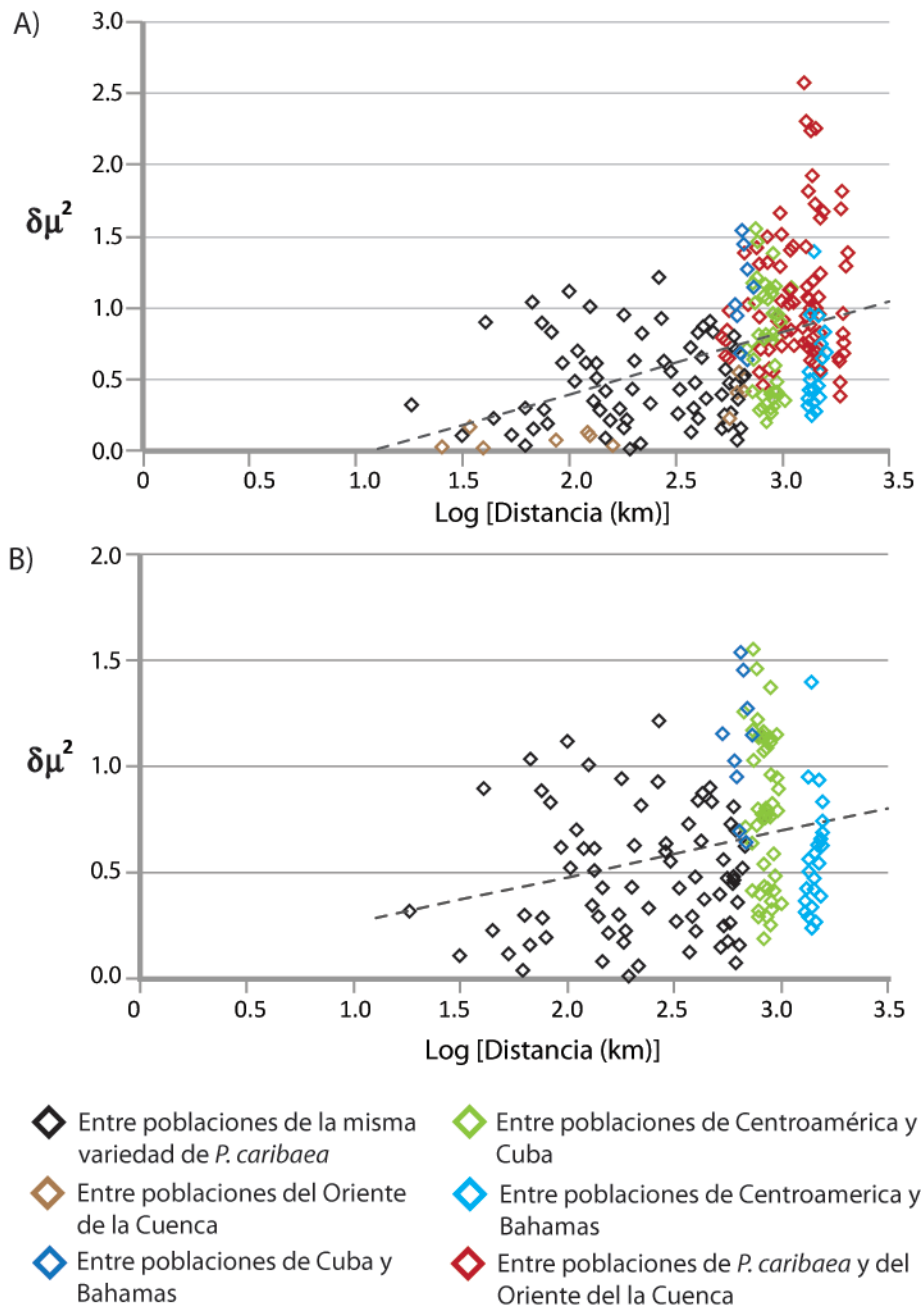


Figura 4.6 Análisis de aislamiento por distancia. A) Considerando todas las poblaciones de la Cuenca del Caribe. B) Considerando solamente las poblaciones de *P. caribaea*. Las comparaciones se distinguen por color de acuerdo a la acotación. Se indica con una línea punteada la recta ajustada.

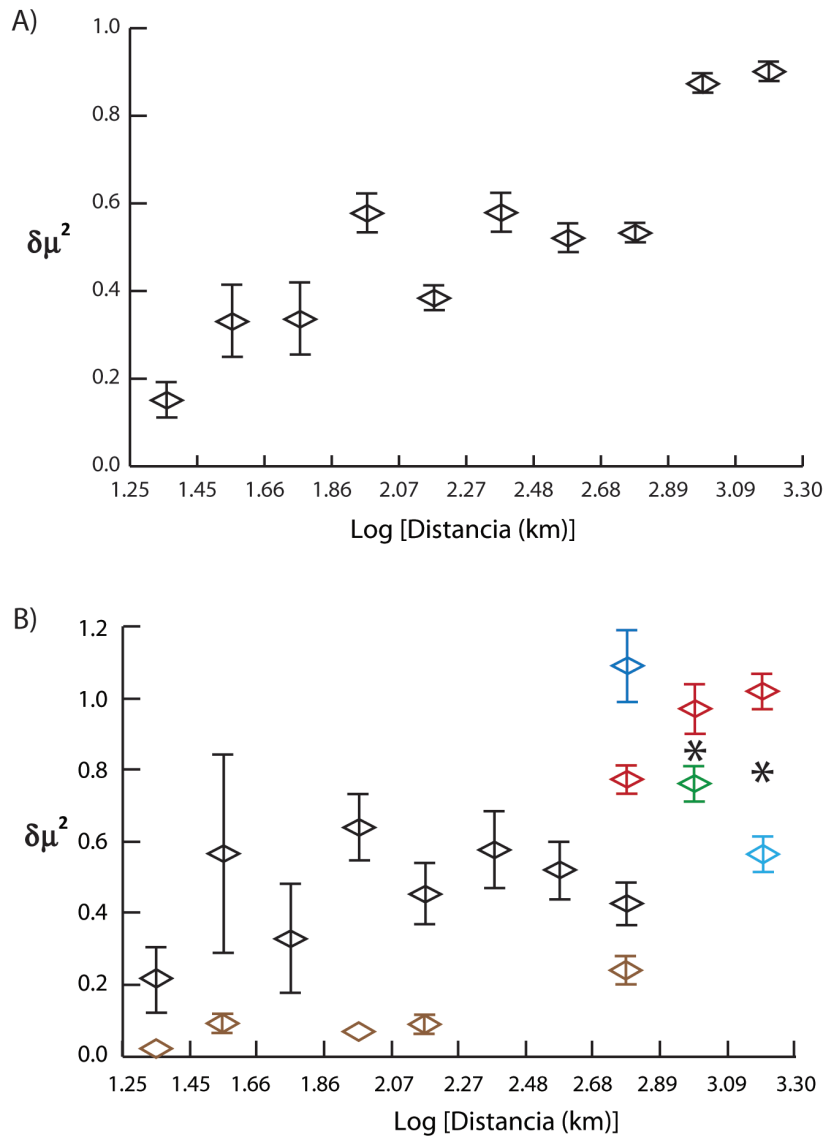


Figura 4.7. Cambio en los valores promedio de distancia genética de Goldstein ($\delta\mu^2$) por categoría de distancia geográfica. A) Valores sin distinguir el tipo de comparaciones entre taxa o regiones. B) Valores agrupados según las regiones comparadas; se distinguen las comparaciones entre grupos siguiendo el mismo código de colores que en la Figura 4.7. Se indica el valor promedio de distancia geográfica para cada tipo de comparación con un \diamond y se muestra con barras el error estándar. Los casos en los que se encontraron diferencias significativas en $\delta\mu^2$ se indican con un asterisco (*).

Al agruparse los valores de $\delta\mu^2$ por categoría de distancia geográfica, se aprecia la misma tendencia general de aislamiento por distancia (Figura 4.7). Las comparaciones separadas por mayores distancias geográficas ($\text{Log}[\text{Distancia}] > 3.09$) son aquéllas entre Centroamérica y Las Bahamas y las comparaciones entre las poblaciones de *P. caribaea* y las del Oriente de la Cuenca. La media de $\delta\mu^2$ entre poblaciones de Centroamérica y Bahamas es de 0.564, mientras que entre la media entre las poblaciones de *P. caribaea* y

el Oriente para ese intervalo es de 1.028; las varianzas de ambas muestras son significativamente heterogéneas entre sí (Prueba de Levene: $F = 726$; $p = 0.188$; g.l. = 1, 89), por lo que se aplicó una prueba de Mann-Whitney, encontrándose que la distancia genética media entre Centroamérica y Bahamas es significativamente menor a aquella entre *P. caribaea* y el Oriente de la Cuenca ($U = 247.5$; $Z = -5.012$; $p < 0.001$).

En el intervalo de distancias geográficas comprendido entre Log [Distancia] 2.89 y 3.09 (Figura 4.7B), el valor medio de la diferenciación entre Centroamérica y Cuba ($\overline{\delta\mu^2} = 0.761$) fue estadísticamente menor que el valor medio de diferenciación entre *P. caribaea* y las poblaciones del Oriente de la Cuenca ($\overline{\delta\mu^2} = 0.970$; $T = 2.471$; $p = 0.0163$; g.l. = 60). En estos dos casos los grupos de poblaciones geográficamente distantes mostraron valores significativamente bajos de distancia genética en comparación con los niveles observados para ese mismo nivel de distancia geográfica.

Análisis de gráfica de poblaciones

En la gráfica de poblaciones (Figura 4.8A) se forman dos grupos principales, uno uniendo a las poblaciones de *P. caribaea* y otro, unido al anterior por un solo borde, que agrupa a las poblaciones de los linajes del Oriente de la Cuenca (*P. maestrensis*, *P. cubensis* y *P. occidentalis*). La gráfica presenta seis bordes que unen la porción centroamericana de la distribución de *Pinus caribaea* con las islas del Caribe. De éstos, tres se extienden significativamente al ser proyectados sobre la distribución geográfica de las poblaciones (Figura 4.8 B). La extensión significativa de las conexiones significa que la distancia geográfica que separa a las poblaciones en cuestión es mayor a la esperada dada su distancia en la gráfica, dada por el patrón de covarianza genética entre las poblaciones. Las conexiones entre las poblaciones centroamericanas (*P. caribaea* var. *hondurensis*) y las poblaciones de las Islas Bahamas (*P. caribaea* var. *bahamensis*) son independientes de aquellas que unen a las poblaciones de Cuba (*P. caribaea* var. *caribaea*) con las poblaciones centroamericanas (*P. caribaea* var. *hondurensis*). Los bordes que unen a las Bahamas con Centroamérica se conectan con poblaciones de los extremos norte y sureste de la distribución de *P. caribaea* var. *hondurensis*. El borde con extensión significativa que conecta Centroamérica con Cuba parte del centro de la distribución de *P. caribaea* var. *hondurensis* (San Jerónimo, Honduras).

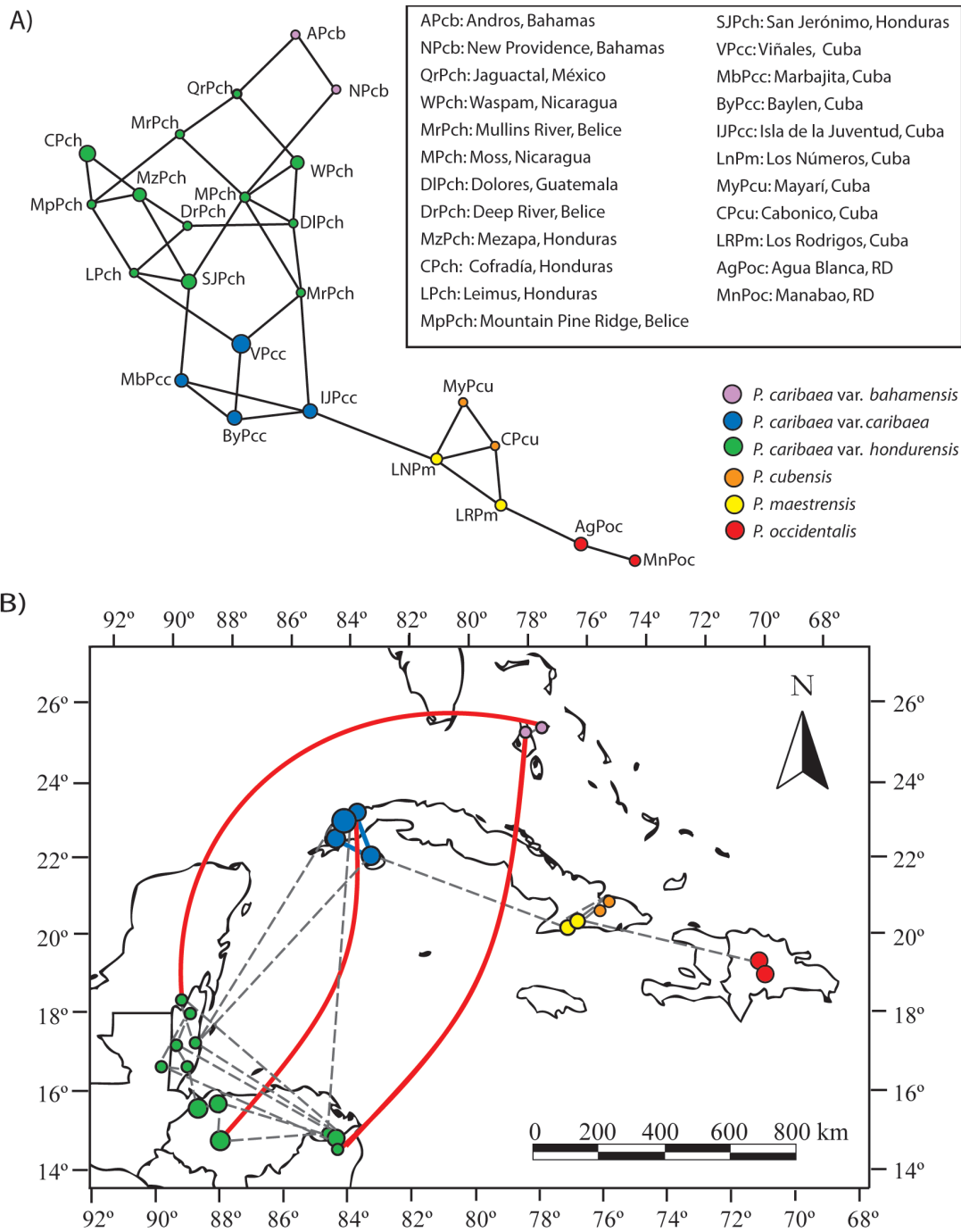


Figura 4.8. Análisis de Gráfica de Poblaciones. A) Red de poblaciones construida a partir de la covarianza genética entre ellas. B) La misma red, proyectada sobre un mapa de la distribución de las poblaciones. Se indican con líneas rojas las conexiones entre poblaciones que resultaron significativamente extendidas y con líneas azules las conexiones significativamente comprimidas; con líneas grises punteadas se muestran las conexiones que cambian al proyectarse las poblaciones a partir de sus coordenadas espaciales.

Dos conexiones, entre poblaciones de Cuba y la Isla de la Juventud resultan comprimidas significativamente cuando la gráfica es proyectada sobre la distribución geográfica (Figura 4.8B)

4.4 Discusión

Siguiendo el criterio de Posada & Crandall (2001), los haplotipos 60 y 66, presentes en Centroamérica y el 19, presente en Cuba, serían probablemente haplotipos ancestrales. Si bien es difícil establecer a partir de la sola presencia de haplotipos altamente conectados que región es ancestral, el hecho de que los haplotipos 60 y 66 tengan una distribución más amplia, pues se encuentran en varias poblaciones de la porción central de la distribución de *P. caribaea* var. *hondurensis* (el 60 en Mountain Pine Ridge, Belice y en Mezapa y Cofradía, Honduras; el 66 en San Jerónimo, Honduras y en Moss, Nicaragua), soporta la posibilidad de que sean haplotipos antiguos siguiendo a Posada y Crandall (2001). De ello se deriva nuevamente un posible origen centroamericano para la variación genética del cloroplasto en los pinos de Caribe (Jardón-Barbola *et al.*, 2011).

Cada variedad de *Pinus caribaea* presenta un intervalo distintivo de variación genética, al no compartirse haplotipos entre variedades. Este tipo de patrón de diferenciación cloroplástica se ha encontrado en *P. torreyana*, otra especie de pino con distribución continental e insular (Whitall *et al.*, 2010). El elevado grado de correspondencia entre la distribución geográfica y la estructura de la red (Figura 4.4), ocasiona que los clados que presentan asociación geográfica significativa, especialmente a partir del segundo nivel de anidamiento, se distribuyan por toda la red y abarquen los diferentes linajes presentes en ella. No podemos afirmar que haya un mayor nivel de asociación geográfica en una de las regiones de la Cuenca del Caribe, pero sí podemos distinguir los diferentes procesos que se presentan en ella y cómo ha afectado a los linajes de cada región (ver abajo).

Aislamiento por distancia y flujo génico a larga distancia

Todos los clados de la red anidada para los que se detecta flujo génico restringido con aislamiento por distancia corresponden a *P. caribaea*, tanto en la porción continental

como en la insular de su distribución. Esta inferencia es concordante con el patrón general de aislamiento por distancia que se pudo inferir mediante prueba de Mantel para estos datos (Figura 4.6B). Al mismo tiempo, el hecho de que varios de los clados para los que el NCPA infiere flujo genético restringido sean clados con haplotipos correspondientes a *P. caribaea* var. *hondurensis* es concordante con una mayor disponibilidad de hábitat en esta región durante los periodos interglaciales (Iturralde-Vinent, 2006; Hodell *et al.*, 2008), en comparación con Cuba y las Bahamas, donde la reducción debida al incremento en el nivel medio del mar habría sido más pronunciada. Esto permite inferir un escenario en el que poblaciones relativamente más estables alcanzarían condiciones de equilibrio migración-deriva, ajustándose claramente a un modelo de aislamiento por distancia, mientras que en la región donde la dinámica de colonización/extinción es más acusada no se ha establecido aún este patrón (Slatkin, 1977, 2000).

El modelo general de aislamiento por distancia sirve como marco de referencia para detectar a las poblaciones o conjuntos de éstas que se alejan de este modelo, sea a partir de la correlación entre pares de distancia geográfica/distancia genética (prueba de Mantel) o a través de desviaciones respecto a un patrón global de covarianza (gráfica de poblaciones). Como hemos señalado, una de las consecuencias de los eventos esporádicos de flujo génico a larga distancia y/o de la colonización reciente de hábitats, es que de manera transitoria (Slatkin, 1977; Pannel & Charlesworth, 2000; Whitlock, 2004; Hamilton, 2009) la varianza en la similitud genética puede ser mayor a la esperada bajo condiciones de equilibrio. Al analizar la distribución geográfica de los clados para los que se infirió dispersión a larga distancia se revelan eventos de colonización desde la porción continental hacia las islas. Eventos de colonización a larga distancia con una dinámica metapoblacional en pinos han sido reportadas en estudios anteriores para *Pinus halepensis* (Bohrer *et al.*, 2004), *P. canariensis* (Navascués *et al.*, 2006) y *P. pinaster* (Bucci *et al.*, 2007).

Flujo génico a larga distancia entre Centroamérica y las Bahamas

En el clado 3-1, detecté flujo restringido, pero con eventos ocasionales de dispersión a larga distancia. Este anidamiento incluye al clado punta 2-1, distribuido en las Bahamas

y al clado interior 2-2, que se distribuye en Bahamas y Centroamérica. La inferencia de eventos esporádicos de dispersión a larga distancia, correspondería a flujo desde Centroamérica hacia las Bahamas, ya que los haplotipos más interiores están distribuidos en Centroamérica.

La evidencia aportada por la distribución de las distancias genéticas en función de las distancia geográficas (Figuras 4.6 y 4.7) soporta esta inferencia. Los valores de $\delta\mu^2$ pareados para las comparaciones entre Centroamérica y Bahamas (*P. caribaea* var. *hondurensis* y *P. caribaea* var. *bahamensis*) significativamente más bajos que las demás comparaciones para el mismo intervalo de distancia, sugiere que entre Centroamérica y las Bahamas hubo flujo, mismo ocasionando una disminución en los valores de diferenciación genética entre estos dos grupos de poblaciones. Esta desviación respecto a una tendencia general de aislamiento por distancia (IBD) es congruente con lo que se espera para poblaciones en las que esporádicamente hay eventos de flujo (Rousset, 2001a, 2001b).

Si bien Centroamérica y Bahamas no comparten haplotipos (Figura 4.4), los haplotipos que presentan se encuentran separados entre sí por pocos pasos mutacionales, lo que ocasiona que el estimado de distancia genética ($\delta\mu^2$) entre Centroamérica y Bahamas sea bajo, pues esta medida de distancia considera qué tan diferentes son los haplotipos presentes en las diferentes poblaciones. Lo anterior permite distinguir un proceso en el que el flujo génico esporádico podría estar asociado a eventos de colonización a larga distancia, toda vez que ello permitiría explicar por qué habiendo flujo, no se comparten haplotipos. Si el flujo ha sido relativamente reciente o bien esporádico (como indica la inferencia del NCPA) se podría esperar abundancia de alelos raros en la población recientemente fundada (Pannel & Charlesworth, 2000; Whitlock, 2004).

El flujo génico a larga distancia entre Centroamérica y las Bahamas es evidenciado también por la presencia de dos bordes significativamente alargados respecto al patrón global de covarianza en la gráfica de poblaciones (Figura 4.8). Los bordes significativamente alargados son indicativos de flujo a larga distancia (Dyer, 2009). De las poblaciones centroamericanas que se conectan con las Bahamas, la población de Jaguactal, Quintana Roo (QrPch, Figura 4.8) es la población que contiene

la mayoría de los haplotipos centroamericanos presentes en el clado 3-1. Es decir, al menos en este nivel el NCPA y el Análisis de Gráfica de poblaciones, arrojan resultados congruentes. En términos de la edad del clado, el 3-1 contiene anidados a todos los haplotipos que se encuentran en las Bahamas, por lo que la inferencia de flujo a larga distancia explicaría el origen mismo de los linajes de cloroplasto de estas islas.

Flujo génico a larga distancia entre Centroamérica y Cuba

A partir de la distribución geográfica de los haplotipos del Clado 3-4 (Figura 4.4) se infirió que los procesos subyacentes podrían ser fragmentación en el pasado o colonización a larga distancia (Tabla 4.2). Sabemos por la historia geológica de la Cuenca del Caribe (Iturralde-Vinent, 2006; ver también capítulo 2 de esta tesis) que la separación de Cuba respecto a las masas continentales antecede a la divergencia misma de la subsección *Australes* y que no ha habido conexión posterior por tierras emergidas entre ésta y el continente. Cuba es, en este sentido, un fragmento continental (Whittaker & Fernandez-Palacios, 2007). De modo que, de los procesos inferidos, el más plausible es el de colonización a larga distancia. En el Clado 3-4, los haplotipos que aparecen como derivados son los haplotipos centroamericanos, lo cual indicaría que el evento de flujo que se detecta en este caso va de Cuba hacia Centroamérica. Este evento de flujo génico ocurre en un clado relativamente reciente (clado nivel 3), que no abarca toda la variación presente en *P. caribaea* var. *caribaea*. De esto se desprende que solo una parte de las poblaciones de *P. caribaea* var. *caribaea* habrían participado en este evento de flujo reciente. Por lo que, este evento de flujo es más reciente que el origen de las poblaciones cubanas y no explicaría su origen. El origen de la distribución de los pinos en las islas queda no explicado sino hasta el cladograma total.

Los valores de distancia genética observados en las figuras 4.6 y 4.7, aportan evidencia adicional de contacto entre Cuba y Centroamérica, pues los valores de $\delta\mu^2$ entre estas regiones resultaron significativamente menores respecto al valor medio de diferenciación genética para el resto de las comparaciones en ese intervalo de distancia geográfica. Esta relación estrecha entre poblaciones de *P. caribaea* var. *hondurensis* y aquellas de la variedad *caribaea* también se recuperó en el análisis de gráfica de poblaciones. La conexión o borde significativamente alargado corresponde a la unión de

la población de San Jerónimo (SJPch, Figura 4.8) con la población de Marbajita (MbPcc, Figura 4.8), indicando flujo génico a larga distancia. Este hecho reitera la evidencia de que la porción central de la distribución de *P. caribaea* var. *hondurensis*, en el oeste de Honduras y el sur de Belice, ha sido relevante en la historia de la distribución de la variación genética en la Cuenca del Caribe, siendo no sólo una zona de alta diversidad, como mencionamos en el capítulo anterior, sino además una zona que ha intercambiado material genético con el occidente de Cuba así como con las poblaciones de Bahamas. Como se mencionó en el capítulo anterior, este flujo génico posiblemente habría ocurrido a través de semillas y se habría tratado de flujo génico muy esporádico, lo cual explicaría porque las variedades de *P. caribaea* no comparten haplotipos. Resultados similares se han encontrado al emplear el método de Dyer y Nason en el pasto marino *Posidonia oceánica* en el Mediterráneo, donde, si bien a otra escala, esta especie presenta una dinámica metapoblacional (Rozenfeld *et al.*, 2008). En dicho estudio, se encontró que algunas poblaciones son nodos particularmente críticos en la red y que han tenido un papel comparativamente importante como mediadoras del flujo génico y claves en el sistema de metapoblaciones (Rozenfeld *et al.*, 2008) al actuar como poblaciones “fuente” (en el sentido de Pannel & Charlesworth, 2000)

Expansiones poblacionales durante máximos glaciales

La expansión contigua del intervalo de distribución se detectó para clados de nivel 2 y 3 en la red anidada, y corresponden a todo el intervalo de distribución de las poblaciones estudiadas. El hecho de que otros análisis hayan detectado el patrón que se infirió por el NCPA, permite sostener, que la inferencia de expansión contigua del rango, si bien puede estar sesgada por realizarse a partir de un solo locus, no es el resultado de un mero artefacto del análisis propuesto por Templeton (2004). La expansión poblacional no es el único proceso que ocasiona un exceso de mutaciones de copia única (y por consiguiente resultados significativos en la prueba de Fu), pues la selección direccional puede ocasionar un patrón similar (Hamilton, 2009). En presencia de recombinación se puede distinguir entre ambos procesos porque la selección natural afectaría al locus o región del genoma bajo selección, mientras que la expansión demográfica afectaría del mismo modo a varios loci (Ramírez-Soriano *et al.*, 2008;

Wakeley, 2009). Esto no es posible para el conjunto de datos de este trabajo, pues los diferentes loci de microsátélites de cloroplasto se heredan completamente ligados, por lo que todos se verían afectados, sea por selección o por expansión poblacional. Si bien los resultados de demografía histórica pueden resultar limitados en este sentido, en otros estudios la información de cloroplasto ha permitido detectar correctamente eventos de expansión demográfica en especies de pinos (Navascués *et al.*, 2006, 2009). En todo caso, la señal que arroja el genoma del cloroplasto para estas poblaciones de pinos es consistente a través de diferentes métodos de análisis. En todos los clados para los que se detectó expansión contigua mediante NCPA se aceptó la hipótesis de expansión poblacional súbita mediante el método de Rogers & Harpending (1992), ajustándose la distribución de diferencias pareadas al modelo. Sin embargo, solamente para 4 de ellos (2-16, 2-21, 3-6 y 3-8) la prueba de Fu (1997) detectó desviación significativa de la neutralidad.

Los clados 2-9 y 3-3, para los que no se detecta divergencia respecto a la neutralidad en la prueba de Fu, corresponden al sureste de la distribución de *P. caribaea* var. *hondurensis* y son claramente clados con un menor número de singletons (en relación con los demás clados para los que se infiere expansión). En este caso particular, la discrepancia entre la prueba de Fu y el análisis de distribución de diferencias pareadas resulta difícil de explicar, pues se ha reportado una menor sensibilidad para la prueba de distribución de diferencias pareadas respecto a la prueba de Fu (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). De acuerdo con esto, normalmente el análisis de diferencias pareadas debería dejar de detectar expansiones poblacionales que la prueba de Fu sí detecta, pero no al revés. El único aspecto en el que la prueba de diferencias pareadas iguala la sensibilidad de la prueba de Fu es en el índice de *raggedness*, que evalúa la forma de la distribución de estas diferencias (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Así, clados como el 2-9 y 3-3, con relativamente pocos singletons pueden sin embargo tener patrones de distribución de las diferencias entre pares que asemejen en lo general a la distribución Poisson esperada bajo el modelo de expansión súbita (Rogers & Harpending, 1992). En cualquier caso, la evidencia de expansión poblacional para Centroamérica sería un poco menos robusta que aquella que se encuentra para las poblaciones de las islas (Clados 2-16, 2-21, 3-3 y 3-8).

Todos los estimados de tiempo a la expansión obtenidos a partir de τ , corresponden a periodos glaciales o muy cercanos al inicio de éstos. Los intervalos de confianza para los tiempos a la expansión son muy grandes (Tabla 4.2), sin embargo, las simulaciones de coalescencia (Ortega, 2009) han demostrado que el valor de τ con mayor probabilidad posterior suele ser un estimado bastante cercano al valor real. En general, las condiciones prevalecientes durante los máximos glaciales al disminuir la humedad y favorecer la dinámica de incendios periódicos (Dvorak *et al.*, 2005; Hodell *et al.*, 2008; Delgado *et al.* 2011), así como al incrementar el área de las tierras emergidas (Iturralde-Vinent, 2006) habrían favorecido el desarrollo de poblaciones de pinos de mayor tamaño. Resulta significativo entonces, que la evidencia más fuerte que detecta expansiones poblacionales ocurra en clados distribuidos en las islas del Caribe, tanto en Cuba como en la Española.

Por otra parte, la evidencia fósil con que se cuenta apunta a una mayor abundancia del género *Pinus* en Centroamérica durante los periodos más fríos del último máximo glacial (Hodell *et al.*, 2008), lo cual indica que si bien no todas las pruebas aplicadas detectaron evidencia de expansión, la inferencia es acorde con evidencia independiente, fortaleciendo nuestras inferencias (Knowles & Carstens, 2007).

Encontrar expansión poblacional asociada a los máximos glaciales resulta relevante, pues aporta datos sobre el efecto de los máximos glaciales en especies del género *Pinus* en condiciones tropicales. Para especies de distribución templada, la presencia de refugios y/o cuellos de botella durante los periodos glaciales ha sido documentada para algunas especies como *P. sylvestris* (Pyhäjärvi *et al.*, 2007). También se han encontrado en ocasiones con expansiones poblacionales asociadas a la recolonización post-glacial como en *P. contorta* (Marshall *et al.*, 2002), *P. banksiana* (Godbout *et al.*, 2005) o en *P. balfourniana* (Eckert *et al.*, 2010). En especies con distribución más austral, pero también asociadas a ambientes montanos, la huella genética que han dejado los periodos glaciales es compatible con la expansión poblacional durante los máximos glaciales, incluyendo especies con distribución en ambientes secos como *P. nelsonii* (Cuenca *et al.*, 2003) y con distribución en zonas más húmedas como *P. strobiformis* (Moreno, 2009) o *P. kwangtungensis* (Tian *et al.*, 2010). Por otro lado, la dinámica de expansión que encontramos para las poblaciones de *P.*

caribaea se asemeja a la dinámica que se observa para otras especies con distribución insular, como *P. canariensis*, especie para la cual los tiempos a la expansión corresponden a la colonización posterior a los eventos volcánicos que incrementaron la superficie emergida de las Canarias (Navascués *et al.*, 2006, 2009)

Eventos independientes de colonización a larga distancia para las Bahamas y el Oriente de la Cuenca

En los niveles de anidamiento más incluyentes, para los clados 4-1 y 4-3, se infiere colonización a larga distancia y posterior fragmentación. El clado 4-1 está compuesto por haplotipos encontrados en Centroamérica y Bahamas. Como ya se ha señalado, la colonización a larga distancia sería desde Centroamérica hacia las Bahamas, pues al ser los haplotipos centroamericanos haplotipos interiores, se infiere que es probable que éstos sean haplotipos ancestrales (Posada & Crandall, 2002; Templeton, 2006).

El otro evento de colonización a larga distancia con posterior fragmentación habría ocurrido en el clado 4-3 desde el occidente de Cuba hacia la parte Oriental de la misma isla y La Española. El clado 3-8, que contiene la variación genética del Oriente de la Cuenca es derivado respecto al clado 3-6 (*P. caribaea* var. *caribaea*, Occidente de Cuba). La explicación de la fragmentación entre el Occidente Cuba (Clado 3-6 en la red) y el Oriente (Clado 3-8 en la red) probablemente está relacionada con la propia divergencia entre las especies del Oriente de la Cuenca (*P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*) y con los periodos en los que la porción central de la isla ha estado sumergida durante los interglaciales anteriores al Holoceno (Iturralde-Vinent, 2006).

En la gráfica de poblaciones (Figura 4.8) aparece una conexión congruente con la relación entre el Occidente de Cuba y el Oriente de la Cuenca. Al no haber anomalías en el grado de covarianza genética en ésta última conexión, no podemos extraer de la gráfica de poblaciones inferencias acerca del tipo de procesos que habrían mediado la relación entre el Occidente de Cuba y el Oriente de la Cuenca. Por ello, la evidencia de colonización a larga distancia para los linajes de Oriente proviene solamente del NCPA y debe ser tomada con precaución. A pesar de esto, es relevante que las topologías de las dos redes, la de haplotipos (NCPA) y la de poblaciones (gráfica de poblaciones), son congruentes e indican el mismo tipo de relación entre Cuba y La Española. El origen

cubano de taxa distribuidos en La Española, es un patrón biogeográfico que ha sido reportado para varias plantas (Ricklefs & Bermingham., 2008).

A diferencia del resto de la red de haplotipos, al interior del clado 3-8 se observa variación compartida entre las diferentes especies, lo cual es un rasgo distintivo de la porción oriental de esta red. Los haplotipos compartidos entre *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis* son todos haplotipos interiores, es decir, probablemente ancestrales (Donnelly & Tavaré, 1986; Posada & Crandall, 2001). Si el patrón observado se debiese a flujo génico reciente, el cual tendría que ser abundante para explicar el fenómeno, esperaríamos que los haplotipos compartidos ocurriesen indistintamente en haplotipos punta o en haplotipos interiores. Por el contrario, la retención de polimorfismo ancestral tiende a ocurrir más frecuentemente en haplotipos interiores (Donnelly & Tavaré, 1986; Chiang *et al.*, 2006), lo cual es lo que observamos en este caso. Así, sin ser un resultado concluyente, el patrón observado para las especies del Oriente de la Cuenca, probablemente se deba a polimorfismo ancestral compartido.

Los niveles de variación que encontramos en las especies del Oriente de la Cuenca, reportados en el capítulo 2, son menores a los del occidente de la Cuenca. Así, en este caso, se cumple con la predicción de un menor nivel de variación en las islas, por lo menos en las más alejadas, respecto a las poblaciones desde las que se habría colonizado (Franks, 2010). En un estudio previo (Chiang *et al.* 2006), se reportó un gradiente similar para *P. luchuensis*, en el que la subespecie de las islas Ryukyu, que son la porción más alejada de la distribución de esta especie, tienen menores niveles de variación en el cloroplasto que la subespecie de Taiwan.

Por último, los eventos de colonización a larga distancia y posterior fragmentación detectados para el cladograma total (Figura 4.4) son congruentes en términos generales con la evidencia obtenida en el análisis bayesiano de estructura poblacional (BAPS), presentado en el capítulo 2 de este trabajo. Los eventos de colonización desde Centroamérica hacia las islas del Caribe corresponden a ramas independientes en la red de haplotipos que conectan a los haplotipos centroamericanos con haplotipos distribuidos en las islas. La gráfica de poblaciones también parece reflejar la presencia de dos tipos de conexiones entre Centroamérica y las islas del Caribe: Centroamérica-Bahamas y Centroamérica-Cuba. Estos eventos son más antiguos

en la genealogía del cloroplasto que los que se detectaron en los niveles de anidamiento inferior (3-X y 2-X) para las poblaciones que estudiamos y estarían relacionados con los procesos de colonización de las islas. La historia geológica de la Cuenca del Caribe, hace plausible la existencia de eventos de colonización a larga distancia en el pasado, pues las islas llevan millones de años separadas del continente (Iturralde-Vinent. 2006; Pindell & Kennan, 2009). La historia más reciente de la isla de Cuba, con conexión intermitente entre el Oriente y Occidente de la Cuenca es coherente con la fragmentación que se detectó.

4.5 Conclusiones

Se utilizó el análisis filogeográfico de clados anidados sobre un conjunto de datos de microsatélites de cloroplasto para inferir los procesos históricos que han afectado la distribución de los linajes genéticos de especies de pinos en la Cuenca del Caribe. Las inferencias fueron utilizadas como guía para la aplicación de otros métodos de análisis en aras de descartar falsos positivos. En este sentido, la aplicación de otros métodos usando el anidamiento de la red de haplotipos para probar hipótesis localmente, permite que a pesar de que pueda haber errores asociados a la estocasticidad del árbol (Hey & Machado, 2003) las inferencias del NCPA sean más robustas (Garrick *et al.*, 2008; Templeton, 2009) y validadas por métodos independientes. Utilizados en conjunto, los análisis de demografía histórica, aislamiento por distancia y la gráfica de poblaciones permitieron robustecer la inferencia de una serie de procesos históricos que son coherentes con la información que tenemos respecto a *P. caribaea*, *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis* y con la historia geológica de la región donde se distribuyen.

A partir de la evidencia que tenemos, es posible reconstruir la siguiente sucesión de eventos que han moldeado la distribución de los linajes de cloroplasto en los pinos de la Cuenca del Caribe:

- 1) Dos eventos de dispersión con posterior fragmentación diferentes explican la llegada de linajes de cloroplasto de los pinos desde Centroamérica hacia las islas del Caribe, sustentado por el NCPA y la gráfica de poblaciones.

- 2) Los linajes de cloroplasto presentes en las especies del Oriente de la Cuenca se habrían derivado de los que habitan el Occidente de Cuba, sustentados por el NCPA y la gráfica de poblaciones.
- 3) Ocurrieron expansiones poblacionales en las islas. En este sentido apuntan los resultados del NCPA, de la prueba de Fu y el análisis de diferencias pareadas. Los valores de τ estimados indican que estas expansiones ocurrieron durante diferentes periodos glaciales.
- 4) Como lo indican el NCPA, el análisis de gráfica de poblaciones y la distribución de los valores distancia genética de Goldstein ha habido eventos esporádicos de flujo génico a larga distancia y/o colonización de islas a larga distancia por parte de linajes de cloroplasto de *P. caribaea*. Estos eventos han ocurrido desde Centroamérica hacia las Bahamas y entre Centroamérica y el Occidente Cuba.

Al provenir del análisis de un solo locus (cloroplasto) la interpretación de las inferencias de este estudio debe ser tomada con precaución, pues la genealogía de un solo gen (o locus) no necesariamente es concordante con la genealogía de las especies o poblaciones (Hey & Machado, 2003). Por ello los datos en los que se basa el presente análisis son quizá la principal limitante del estudio. Sin embargo, desde el punto de vista metodológico, las inferencias hechas no parecen deberse a un artefacto del NCPA.

4.6 Referencias

- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. EUA, Harvard University Press.
- Beaumont MA & Panchal M (2008) On the validity of the nested clade phylogeographic analysis. *Molecular Ecology*, **17**: 2563-2565.
- Bohrer G, Nathan R & Volis S (2007) Effects of long distance dispersal for metapopulation survival and genetic structure ecological time and spatial scales. *Journal of Ecology*, **93**: 1029.1040.
- Bucci G, Gonzalez-Martinez SC, Le Provost G, Plomion C, Ribeiro MM, Sebastiani F, *et al.* (2007) Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **16**: 2137–2153.

- Carstens B & Knowles L (2007) Shifting distributions and speciation: species divergence during rapid climate change. *Molecular Ecology*, **17**: 619–627.
- Charlesworth B, Charlesworth D & Barton NH (2003) The effects of genetic and geographic structure on neutral variation. *Annual Reviews in Ecology and Systematics*, **34**: 99-1256.
- Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, Ge&T XJ, Hsu W & Chiang TY (2006) Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Molecular Ecology*, **15**, 765-779
- Crandall KA, Templeton AR. (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, **134**: 959–969.
- Cuenca A, Escalante AE & Piñero D (2003) Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSR). *Molecular Ecology*, **12**: 2087-2097.
- Donnelly P & Tavaré S (1986) The ages of alleles and a coalescent. *Advanced Applied Probabilities*, **18**, 1–19.
- Dvorak WS, Hamrick JL & Gutierrez EA (2005) The origin of caribbean pine in the seasonal swamps of the Yucatán. *International Journal of Plant Sciences*, **166**: 984-995.
- Dyer R & Nason JD (2004) Population graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Molecular Ecology*, **13**: 1713-1727.
- Dyer RJ (2009) GeneticStudio: A suite of programs for the spatial analysis of genetic marker data. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 110-113.
- Eckert AJ, Eckert ML & Hall BD (2010) Effects of historical demography and ecological context of spatial patterns of genetic diversity within foxtail pine (*Pinus balfourniana*; Pinaceae) stands. *American Journal of Botany*, **97**: 650-659.
- Franks SJ. (2010) Genetics, evolution and conservation in islands. *International Journal of Plant Sciences*, **53**: 1-9.
- Fu YX & Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**: 693-709.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics*, **147**:915-925.

- Garrick RC, Dyer RJ, Beheregaray LB & Sunnucks B (2008) Babies and bathwater, a comment on the premature obituary for nested clade analysis. *Molecular Ecology*, **17**:1401-1403.
- Godbout J, Jaramillo-Correa JP, Beaulieu J & Bousquet J (2005) A mitochondrial DNA minisatellite reveals the postglacial history of Jack pine (*Pinus banksiana*), a broad range North American conifer. *Molecular Ecology* **14**: 3497-3512.
- Hamilton MB (2009) Population genetics. Oxford, RU, Blackwell publishing. 424 pp.
- Hanski I (1998) Metapopulation dynamics. *Nature*, **396**: 41-49
- Hardy OJ & Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, **2**: 618-620.
- Harpending H (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**: 591.
- Hey J & Machado C (2003) The study of structured populations- new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*, **4**: 535–543.
- Hodell DA, Anselmetti FS, Aiztegui D, *et al.* 2008. An 85-ka record of climate change in lowland Central America. *Quaternary Science Reviews*, **27**: 1152–1165.
- Hudson RR (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, **7**: 1–44.
- Hudson RR, Boos DD & Kaplan NL (1992) A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution*, **9**:138–151
- Iturralde-Vinent M. 2006. Meso-Cenozoic Caribbean paleogeography: implications for historical biogeography of the region. *International Geology Review* **48**: 791–827.
- Kimura M & Weiss GH (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic Ccorrelation with distance. *Genetics*, **49**: 561-576
- Knowles L & Carstens B (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, **56**: 887–895.
- Luthi D, Le Floch M, Berthier B, Blunier T, Barnola JM *et al.* (2008) High resolution carbon-dioxide concentration record 650,000-850,000 years before present. *Nature*, **453**: 379-383.

- Malécot G (1975) Heterozygosity and relationship in regularly subdivided populations. *Theoretical Population Biology*, **8**: 212-241.
- Marshall HD, Newton C & Ritland K (2002) Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 367-378.
- Moreno A (2009) Estructura filogeográfica de *Pinus strobiformis* y su relación con los cambios climáticos durante el Pleistoceno. Tesis doctoral, UNAM, Instituto de Ecología. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.
- Navascués M, Vaxevanidou Z, González-Martínez SC, Climent J, Gil L, Emerson BC. (2006) Chloroplast microsatellites reveal colonization and metapopulation dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology*, **15**: 2691-2698.
- Navascués M, Hardy OJ, Burgarella C (2009) Characterization of demographic expansions from the pairwise comparisons of linked microsatellite haplotypes. *Genetics*, **181**: 1013-1019.
- Ohta T & Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Research*, **22**: 201-204.
- Ortega Del Vecchio VD (2009) Efecto y estimación de la homoplasia en el crecimiento poblacional. Tesis, Licenciatura en Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pannell JR & Charlesworth B. 2000. Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Ser. B*, **355**: 1851-64.
- Petit RJ (2008) The coup de grâce for the nested clade phylogeographic analysis? *Molecular Ecology*, **17**: 516-518.
- Pfenninger M & Posada D. (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): Fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution*, **56**: 1776-1788.
- Pindell JL & Kennan L (2009) Tectonic evolution of the Gulf of Mexico, Caribbean and northern South America in the mantle reference frame: an update. *Geological Society, London*, 328:1-55.
- Posada A & Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**: 37-45.

- Posada D, Crandall KA & Templeton AR (2000) GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, **9**: 487-488.
- Provan J, Soranzo N, Wilson NJ, Goldstein D, Powell W (1999) A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* **153**: 943-947.
- Pyjärvi T, García-Gil MR, Knürr T, Mikkonen M, Wachowiak W & Savolainen O (2007) Demographic history has influenced nucleotide diversity in European *Pinus sylvestris* populations. *Genetics*, **177**: 1713-1724.
- Ramírez-Soriano A, Ramos-Onsins SE, Rozas J, Calafell F & Navarro A (2008) Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, **179**: 555-567.
- Ricklefs R & Bermingham E. (2008). The West Indies as a laboratory of biogeography and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)*, **363**: 2393-2413.
- Rogers AR, Harpending HC (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 552-569.
- Rousset, F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**: 1219-1228.
- Rousset F (2001 a) Inferences from spatial population genetics. En: Balding DJ, Bishop M & Cannings C, 2001 *Handbook of statistical genetics*. New York, EU, John Wiley & Sons LTD.
- Rousset (2001 b) Genetic approach to the estimation of dispersal rates. En: Clobert J, Danchin E, Dhondt AA & Nichols JD, 2001 *Dispersal*. Oxford, RU, Oxford University Press.
- Rozenberg A, Arnaud-Haond S, Hernandez-García E, Equíluz V, Serra EA & Duarte CM (2008) Network analysis identifies weak and strong links in a metapopulation system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **125**: 18824-18829.
- Slatkin M. 1977. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical Population Biology*, **12**: 253-262.
- Slatkin M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical Research*, **58**:167-75
- Slatkin M (2000) A coalescent view of population structure. En: Singh RS & Krimbas CB (eds). *Evolutionary Genetics*. Cambridge University Press, 418-429

- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, **105**: 437-460.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**: 5985-5995.
- Templeton AR (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**: 381-397.
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, **13**: 789–809.
- Templeton AR (2008) Nested Clade Analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology*, **17**:1877-1880
- Templeton AR (2009) Statistical hypothesis testing in intraespecific phylogeography: nested clade phylogeographical analysis vs. approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology*, **18**: 319-331.
- Templeton AR & Sing CF (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* **134**: 659–669.
- Templeton AR, Crandall KA, & Sing CF (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**: 619-633.
- Tian S, López-Pujol J, Wang HW, Ge S & Zhang ZY (2010) Molecular evidence for glacial expansion and interglacial retreat during Quaternary climatic changes in a montane temperate pine (*Pinus kwangtungensis* Chun ex Tsiang) in southern China. *Plant Systematics and Evolution*, **284**: 219-229.
- Wakeley J (2009) *Coalescent theory*. Greenwood Village, Colorado, Robertson & Company Publishers.
- Woolley SM, Posada D & Crandall SM (2008) A comparison of phylogenetic network methods using computer simulation. *PLoS One*, **3**: e1913.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**: 323-354.
- Whitall JB, Syring J, Parks M, Buenrostro J, Dick C, Liston A & Cronn R (2010). Finding a (pine) needle in a haystack: chloroplast genome sequence divergence in rare and widespread pines. *Molecular Ecology*, **19** (S): 100-114.
- Whitlock MC (2004) Selection and drift in metapopulations. En: Hanski I, Gaggiotti O.

eds. *Ecology, genetics, and evolution of metapopulations*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 153–173.

Conclusiones Generales

5.1 Colonización, flujo génico y expansión poblacional en la Cuenca del Caribe

La estructura filogeográfica encontrada con los marcadores de cloroplasto para las especies de pinos estudiadas indica que las islas de la Cuenca del Caribe fueron colonizadas en dos ocasiones desde Centroamérica. Esta conclusión basada en la estructura de la variación contenida en cloroplasto no necesariamente refleja la historia completa de las especies, tanto porque en este trabajo no se incluyeron datos del genoma nuclear, como porque las relaciones filogenéticas de las especies del Caribe con las especies del Sudeste de Estados Unidos están en proceso de desentrañarse, lo cual podría implicar la necesidad de analizar también los patrones de variación de estas especies en el futuro. Sin embargo, la evidencia de colonización de las islas es congruente con la historia biogeográfica de la región, que indica que los eventos de dispersión a larga distancia son relativamente frecuentes en la Cuenca del Caribe, tanto por su cercanía con los continentes, como por la naturaleza de *fragmentos continentales* de Cuba y La Española (Ricklefs & Bermingham, 2008). En este aspecto, lo relevante de nuestro estudio fue el poder detectar la presencia de más de un evento de colonización así como evidencia de eventos de flujo génico a larga distancia entre estas dos regiones.

La aplicación de diferentes análisis filogeográficos, permitió ponderar el papel de la fragmentación y la dispersión como procesos que explican, en conjunto, parte de la dinámica que se presenta en las poblaciones de la Cuenca del Caribe. Una de las hipótesis planteadas por Franks (2010) es la de la reducción en los niveles de variación genética en las islas debido al proceso de colonización a larga distancia. En nuestro estudio, de manera similar al caso de *Pinus luchuensis* (Chiang *et al.*, 2006) y al de *Callitropsis guadalupensis* (Rosas-Escobar *et al.* 2011), no se aprecia una reducción importante en los valores de θ para las poblaciones de *P. caribaea* en las islas (Capítulo 3; Tabla 1) y de hecho en Cuba y en menor medida en las Bahamas, hay niveles de

variación altos. Al respecto deben señalarse dos cosas: la presencia de alelos raros debidos al flujo génico entre Centroamérica y Cuba incrementan las estimaciones de θ , como se discutió en el Capítulo 3; por otro lado, el grado de reducción en la variación genética que se puede esperar en las poblaciones insulares, depende también de la edad de éstas, así como de qué tan recurrente sea el flujo génico entre éstas y el continente.

Por otra parte, el patrón de estructuración dentro y entre las poblaciones de las islas corresponde al de un menor nivel de flujo génico entre islas o regiones. Esto se ve reflejado en una alta estructuración geográfica de la variación genética, la cual corresponde a grandes rasgos, con la de las diferentes islas y en el caso de *P. caribaea* con la de las diferentes variedades de la especie. Como mencioné en el Capítulo 1, en especies que se distribuyen en conjuntos de islas a diferentes distancias de un continente la distancia respecto a las poblaciones grandes afectaría los niveles de variación, presentándose una disminución gradual conforme se alejan de las masas continentales. En el caso de las poblaciones que estudiamos, no hay un claro patrón en el que la variación tienda a disminuir en las poblaciones más alejadas del continente, salvo para aquellas de *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*. En este último caso, el tener una distribución más restringida, así como rodales puros más pequeños (comparados con aquéllos de *P. caribaea*), pueden ser factores más relevantes que la distancia respecto a una masa continental.

Lo anterior se debe a que no solamente los niveles de flujo génico histórico (Slatkin, 1977; Rousset, 1997) han moldeado la estructuración geográfica de las poblaciones de pinos en la Cuenca del Caribe. En el caso de *P. caribaea*, algunos aspectos ecológicos podrían jugar un papel importante. Esta especie presenta potencial para ser invasora (Richardson & Rejmanek, 2004; Rejmanek, 2006), dada su relativa precocidad reproductiva, así como con sus capacidades para resistir incendios y producir madera relativamente densa. Esto permite suponer que el efecto de los cuellos de botella en las poblaciones insulares no sería tan marcado como lo esperaríamos si se tratase de una especie con menor potencial demográfico, lo que posiblemente contribuye a los niveles de variación genética relativamente altos que observamos en algunas poblaciones de Cuba.

Por otra parte, se encontró que las poblaciones de la Cuenca del Caribe, y particularmente las de *P. caribaea*, presentan evidencia de una dinámica metapoblacional, con colonización y extinción local de poblaciones. Este patrón es congruente con otros resultados en los que, al analizarse con marcadores nucleares la variación genética de dos poblaciones de *P. caribaea* var. *hondurensis* en Quintana Roo, se encontró que las poblaciones de la zona son remanentes de una distribución más amplia en el pasado y han atravesado cuellos de botella (Dvorak *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2011). Como resultado de esta dinámica metapoblacional y de eventos de flujo génico a larga distancia, el origen de la variación cloroplástica presente en *P. caribaea* var. *bahamensis* no se explica partir de la colonización desde Cuba, sino a través de colonización desde Centroamérica. También la heterogeneidad en los estimados indirectos de tamaño efectivo de población (θ) que se encontró entre las poblaciones es congruente con una combinación de eventos de flujo génico esporádico y la dinámica metapoblacional (Slatkin, 1977; Pannel & Charlesworth, 2000; Whitlock, 2004). Esto es particularmente significativo en el caso de *P. caribaea* var. *hondurensis*, variedad para la que no se encontró un patrón de aislamiento por distancia.

La disponibilidad de hábitat ha afectado la historia demográfica de los pinos e la Cuenca del Caribe. Si bien ésta región está alejada de zonas que estuvieron cubiertas por grandes glaciares, se vió afectada mayormente en la superficie de tierras emergidas, debido a la intensidad de los cambios eustáticos durante los periodos glaciales e interglaciales, así como por la relativa poca altura de muchas de las islas. Ello pudo haber alterado la cantidad de superficie susceptible de ser habitada por el género *Pinus* en la región. Por esto, a pesar de los grandes intervalos de confianza inherentes a los métodos empleados para estimarlos, el hallazgo de tiempos a la expansión consistentes en todos los casos con periodos glaciales refleja muy probablemente un patrón real.

De acuerdo a nuestros datos, el efecto de expansión poblacional durante los máximos glaciales sería consistente, *P. caribaea*, especie que forma grandes masas puras, y para *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*, especies con poblaciones comparativamente más pequeñas. Esto hablaría de que independientemente de las diferencias ecológicas que encontramos en los taxa del Occidente y el Oriente de la Cuenca, la disponibilidad de tierras emergidas habría sido un factor clave.

En general se puede hablar de 4 grandes oleadas de expansión poblacional en la Cuenca. En el Capítulo 3 se mostró que para las poblaciones centroamericanas (*P. caribaea* var. *hondurensis*), el tiempo medio estimado a la expansión corresponde con el isótopo marino (MIS) 8. Mientras tanto los tiempos a la expansión estimados para las poblaciones insulares son, en términos generales, más recientes (Capítulo 4): en una ventana de menor temperatura entre el MIS-7 y el MIS-6 en Cuba; correspondientes al MIS-6 en el Oriente de la Cuenca; y por último, una señal sincrónica de expansión poblacional asociada al último máximo glacial, detectada para las poblaciones de *P. caribaea* de Bahamas y Cuba y para aquéllas del Oriente de la Cuenca (*P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*).

Mi trabajo no pretende resolver las relaciones taxonómicas entre las especies del Oriente de la Cuenca, pues como hemos señalado, las relaciones genealógicas para un locus (cloroplasto en este caso), además de estar sujetas a un factor de estocasticidad (Hey & Machado, 2003) pueden no coincidir con las relaciones filogenéticas entre las especies (Willyard *et al.*, 2009). Sin embargo, la estructura filogeográfica que inferimos puede aproximarnos el tipo de procesos evolutivos que han afectado la historia reciente de los linajes de cloroplasto en la región. De acuerdo a estos datos, las especies de Oriente debieron evolucionar independientemente de *P. caribaea*, o ya que la variación genética del cloroplasto no muestra signos de intercambio genético significativo entre el Oriente y el Occidente de la Cuenca. Por otra parte, la variación genética contenida en el Oriente aparece como derivada de aquélla del Occidente de Cuba, lo cual habla de que ésta última región (donde habita *P. caribaea* var. *caribaea*) es posiblemente la que dio origen a la porción más oriental de la distribución del género *Pinus* en la Cuenca del Caribe. Esto último es concordante con patrones biogeográficos comunes en esta región (Ricklefs & Bermingham, 2008).

Por otra parte, los niveles de variación compartida entre *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*, contrastan hasta cierto punto con la presencia de caracteres morfológicos claros que distinguen a estas especies (López-Almirall, 1982; Adams & Jackson 1997). Así, *P. occidentalis* se distingue por tener fascículos con 5 agujas predominantemente (3-4-5), mientras que *P. cubensis* y *P. maestrensis*, que habitan en Cuba, tienen fascículos con 2-3 agujas (Bissé, 1981, López-Almirall, 1982).

Por otra parte, *P. cubensis* carece de espina terminal en la apófisis de las escamas ovulíferas, mientras que *P. maestrensis* y *P. occidentalis* presentan este rasgo en común (López-Almirall, 1982).

La similitud genética entre grupos de poblaciones en la forma de alelos compartidos se puede deber a sorteo incompleto de linajes posterior a la divergencia o bien flujo génico entre ellas (Pinho & Hey, 2010). Para estas especies, como hemos señalado en los capítulos 3 y 4, la explicación más plausible para el polimorfismo compartido sería el sorteo incompleto de linajes a nivel del cloroplasto entre estas especies. Sin embargo, sería necesario contrastar con la distribución de la variación en un conjunto de marcadores no ligados, como microsatélites o secuencias de núcleo, en las que podrían detectarse diferentes patrones de compartición de la variación genética para diferentes loci, ayudando a distinguir flujo de sorteo incompleto de linajes (ver por ejemplo, Zhou *et al.*, 2010). Otra posibilidad interesante es que los niveles de diferenciación morfológica en estas taxa tengan un correlato en la distribución de la variación presente en genes candidatos involucrados en la respuesta a variables ambientales tales como la sequía y que han sido localizados en otras especies de pinos (ver, por ejemplo, Gonzalez-Martínez *et al.*, 2006; Eveno *et al.*, 2008). Las condiciones medioambientales en términos de la distribución de la precipitación a uno y otro lado de la Sierra Maestra, o bien de los suelos en los que viven *P. cubensis*, *P. maestrensis* y *P. occidentalis*, podrían ser variables que hipotéticamente podrían estar relacionadas con un mayor grado de diferenciación en loci sujetos a procesos selectivos.

5.2 Perspectivas

El presente trabajo está basado exclusivamente en el análisis de información genética del cloroplasto, heredado por vía paterna a través del polen (si bien se dispersa a través del polen y de las semillas). Una historia más completa de la distribución de la variación genética y de la demografía histórica de las especies que hemos estudiado se verá beneficiado en el futuro de la incorporación de marcadores variables provenientes del núcleo y del genoma mitocondrial.

Asimismo, si bien es posible decir que hemos explorado los principales grupos de métodos disponibles para el análisis de microsatélites ligados (completamente ligados

en este caso), posteriores trabajos basados en otro tipo de marcadores moleculares (por ejemplo de loci no ligados) podrán aprovechar de mejor manera otros análisis. Métodos de asignación como Structure (Pritchard *et al.*, 2000) o de coalescencia completa como IMA (Nielsen & Wakeley, 2001), permiten poner a prueba modelos de mutación explícitos para datos provenientes de secuencias y, en el caso de IMA, estimar de manera directa el tiempo de coalescencia al ancestro común más cercano (TMRCA) y los niveles de flujo entre pares de poblaciones.

Es importante señalar que la elucidación y delimitación más clara del status taxonómico de *P. maestrensis* respecto a *P. cubensis* y *P. occidentalis*, dependerá no solamente de contar con más datos genéticos para estas poblaciones, sino de un esfuerzo adicional desde el campo de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las especies. Al mismo tiempo, un tratamiento taxonómico de los caracteres morfológicos a partir de la revisión de ejemplares colectados más recientemente, podría aportar mejores elementos para este fin.

Las datos paleoclimáticos con que se cuenta en el presente para la región son limitados, por lo que en el futuro, conocer de manera más precisa la forma en la que cambió durante las glaciaciones la distribución de las lluvias monzónicas de verano, así como los patrones de incidencia de huracanes (por mencionar sólo dos de los factores ecológicos que pueden afectar de manera importante la demografía y la dispersión de las especies) ayudará a aproximar reconstrucciones más completas de la historia de la distribución de los linajes en la región. Este tipo de aproximaciones, permitiría incorporar análisis como la modelación de la distribución potencial hacia el pasado para robustecer las inferencias de expansión poblacional que se han hecho en este trabajo.

Esta línea de investigación podría ser reforzada con la exploración de posibles diferencias entre las poblaciones del Oriente y el Occidente de la Cuenca del Caribe en la distribución en la variación para genes candidatos posiblemente asociados a adaptaciones. Para ello, es posible aprovechar los avances en la identificación de este tipo de secuencias en genomas de coníferas en general y de pinos en particular (*Picea*: Namroud *et al.* 2008; *Pinus*: Wachowiack *et al.*, 2009). En este campo, el contexto de una distribución tropical, con ambientes contrastantes en el que se distribuyen, hace que

los pinos de la subsección *Australes* sean un modelo ideal para la realización de este tipo de estudios.

5.3 Referencias

- Adams DC & Jackson JF. 1997. A phylogenetic analysis of the southern pines (*Pinus* Subsect. *Australes* Loudon): biogeographical and ecological implications. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **110**: 681–692.
- Bissé J (1975) Nuevos árboles de la flora cubana. *Ciencias: Serie Botánica (Cuba)*, **10**:1-23.
- Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, GeřT XJ, Hsu W & Chiang TY (2006) Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Molecular Ecology*, **15**, 765-779
- Delgado P, Piñero D, Rebolledo V, Jardón-Barbolla L & Chi F (2011) Genetic variation and demographic contraction of the remnant populations of Mexican Caribbean pine (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*: Pinaceae). *Annals of Forest Science*, **68**: 121-128.
- Eveno E, Collada C, Guevara MA, Léger V, Soto A, Díaz L, Léger P *et al.* (2008) contrasting patterns at *Pinus pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses. *Molecular Biology and Evolution*, **25**: 417-437.
- Franks SJ. (2010) Genetics, evolution and conservation in islands. *International Journal of Plant Sciences*, **53**: 1-9.
- Gonzalez-Martínez S, Esroz E, Brown GR, Wheeler N & Neale D (2006) DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics*, **172**: 1915-1926.
- Hey J & Machado C (2003) The study of structured populations- new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*, **4**: 535–543
- López-Almirall A (1982) Variabilidad del Género *Pinus* (Coniferales: Pinaceae) en Cuba. *Acta Botánica Cubana*, **12**: 1–32.
- Namroud MC, Beaulieu J, Juge N, Laroche J & Bousquet J (2008). Scanning the genome for gene single nucleotide polymorphisms involved in adaptive population differentiation in white spruce. *Molecular Ecology*, **17**: 3599-3613.
- Nielsen R & Wakeley J (2001). Distinguishing migration from isolation. A Markov

chain Monte Carlo approach. *Genetics* 158:885–96

Pannel JR, Charlesworth B (2000) Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **355**: 1851–1864.

Pinho C & Hey J (2010) Divergence and gene flow: models and data. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **41**: 215-230.

Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945–959.

Richardson DM & Rejmanek M (2004) Conifers as invasive aliens: a global survey and predictive framework. *Diversity and Distributions*, **10**: 321-331.

Richardson DM & Petit R (2006) Pines as invasive aliens: Outlook on transgenic pine plantations in the southern hemisphere. *Managing Forest Ecosystems*, **9**: 169-188

Ricklefs R, Bermingham E (2008) The West Indies as a laboratory of biogeography and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)*, **363**: 2393–2413.

Rosas-Escobar P, Gernandt DS, Piñero D & Garcillán GP (2011) Plastid DNA diversity is higher in the island endemic Guadalupe cypress than in the continental Tecate cypress. *PLoS One*, **6**: e16133

Rousset, F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-Statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**: 1219-1228

Slatkin M (1977) Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical Population Biology*, **12**: 253–262.

Wachowiack W, Balk PA & Savolainen O (2009) Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genetics & Genomes*, **5**: 117-132.

Whitlock MC (2004) Selection and drift in metapopulations. En: Hanski I, Gaggiotti O. eds. *Ecology, genetics, and evolution of metapopulations*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 153–173.

Zhou YF, Abbot, RJ, Yang ZY, Du FK, Milne RI & Liu JQ (2010) Gene flow and species delimitation; a case study of two pine species with overlapping distributions in southeast China. *Evolution*, **64**: 2342–2352.

**Composición y frecuencia alélica de cada
haplotipo de cloroplasto**

Tamaño de los alelos							Número del haplotipo	Poblaciones																								Frecuencia Total				
Pt 110048	Pt 87268	Pt 71936	Pt 1254	Pt 15169T	Pt 15169C	Pt 450002		1. Andros, Bahamas	2. New Providence, Bahamas	3. Isla de la Juventud, Cuba	4. Arenas Blancas, Cuba	5. Viñales, Cuba	6. Marbajita, Cuba	7. Moss, Nicaragua	8. Waspam, Nicaragua	9. Leimus, Honduras	10. San Jerónimo, Honduras	11. Cofradía, Honduras	12. Mezapa, Honduras	13. Deep River, Belice	14. Dolores, Guatemala	15. Mountain Pine Ridge, Belice	16. Mullins River, Belice	17. Crooked Tree, Belice	18. Jaguactal, México	19. Mayarí, Cuba	20. Cabonico, Cuba	21. Los Rodrigos, Cuba	22. Los Números, Cuba	23. Agua Blanca, República Dominicana	24. Manabao, República Dominicana					
91	163	146	61	9	9	159	21																													0.0064
91	162	147	61	9	9	159	22										2																			0.0064
90	164	145	63	8	10	158	23					1																								0.0032
90	165	146	62	8	10	159	24					1																								0.0032
90	164	147	62	8	10	159	25					1																								0.0032
91	162	148	61	9	9	159	26										1																			0.0032
90	162	147	63	8	10	159	27																											3		0.0096
91	164	147	62	8	10	158	28				1																									0.0032
90	164	146	63	8	10	159	29					3																								0.0096
91	163	146	62	9	9	159	30											1																		0.0032
92	162	148	61	9	9	159	31										1																			0.0032
91	164	147	62	9	9	158	32												1																	0.0032
91	164	146	63	8	10	159	33				1																									0.0032
91	163	148	62	9	9	159	34							1																						0.0032
91	164	147	63	8	10	159	35				2																									0.0064
91	162	148	63	9	9	158	36									1																				0.0032
90	164	148	63	9	9	158	37							1																						0.0032
91	163	148	63	9	9	159	38								1																					0.0032
92	164	148	63	9	9	159	39									1																				0.0032
90	162	146	62	8	11	158	40																													0.0032

Tamaño de los alelos							Poblaciones														Frecuencia total														
Pt 110048	Pt 87268	Pt 71936	Pt 1254	Pt 15169T	Pt 15169C	Pt 450002	Número del haplotipo																												
90	162	147	63	9	11	157	101	1. Andros, Bahamas	2. New Providence, Bahamas	3. Isla de la Juventud, Cuba	4. Arenas Blancas, Cuba	5. Viñales, Cuba	6. Marbajita, Cuba	7. Moss, Nicaragua	8. Waspam, Nicaragua	9. Leimus, Honduras	10. San Jerónimo, Honduras	11. Cofradía, Honduras	12. Mezapa, Honduras	13. Deep River, Belice	14. Dolores, Guatemala	15. Mountain Pine Ridge, Belice	16. Mullins River, Belice	17. Crooked Tree, Belice	18. Jaguactal, México	19. Mayari, Cuba	20. Cabonico, Cuba	21. Los Rodrigues, Cuba	22. Los Números, Cuba	23. Agua Blanca, República Dominicana	24. Manabao, República Dominicana				
90	162	147	63	9	11	157	101		3																									0.0096	
91	162	146	62	9	11	159	102																											0.0032	
90	163	147	63	9	11	157	103	1																										0.0032	
91	163	146	62	10	10	158	104											1																0.0064	
90	163	147	63	9	11	158	105	2																										0.0064	
90	164	148	62	10	10	157	106														1													0.0032	
90	163	147	63	9	11	159	107	1																										0.0032	
90	164	148	62	10	10	158	108																1											0.0032	
91	164	147	62	9	11	159	109				1	1																						0.0064	
90	162	146	64	9	11	159	110																								1			0.0064	
92	163	146	62	10	10	158	111															1												0.0032	
90	163	147	63	10	10	158	112																1												0.0032
91	164	148	64	9	11	159	113			2																								0.0064	
Total individuals																	314																		