



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Patrones de diversidad y detección de
grupos genéticos en dos especies de *Abies*
con distribuciones contrastantes en el Eje
Volcánico Transmexicano**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

JULIA MÚGICA GALLART

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA



México D.F.

2013



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.



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.

JURADO EXAMINADOR

DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

DRA. ERIKA AGUIRRE PLANTER

DR. JUAN FRANCISCO ORNELAS RODRÍGUEZ

DRA. SILVIA CASTILLO ARGÜERO

Se agradece el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM a través de los proyectos IC200411 e IA201013 otorgados a Juan Pablo Jaramillo Correa, director de este estudio.

Así mismo, se agradece el soporte técnico para el desarrollo del presente proyecto dado por:

Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental

Dra. Erika Aguirre Planter

M. en C. Laura Espinosa Asuar

Manuel Gabriel Rosas

Laboratorio de Genética y Ecología

Dra. Alejandra Vázquez Lobo Yurén

M. en C. Ariadna Esthela Morales García

Instituto de Ecología, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis lleva dentro un sinfín de personas que desde distintos vértices hicieron posible su realización, y a todas ellas quiero agradecerles. Empezando por el Dr. Juan Pablo Jaramillo, o J.P., por ser un excelente guía, por siempre hacerme esforzar un poco más, por ser fanático de la redacción y por alegrarse de saberme viva cada vez que llegué a tocar a su cubículo. A mis sinodales, la Dra. Erika Aguirre, el Dr. Daniel Piñero, el Dr. Juan Francisco Ornelas y la Dra. Silvia Castillo por leerme y aportar calidad al trabajo. Al Dr. Luis Eguiarte por ser mi sinodal en esencia y revisar el trabajo con mucha meticulosidad, por ser el primero en introducirme la genética de poblaciones con sus excelentes clases y por acogerme en su laboratorio en un principio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarnos a mi y a tantos infinitas oportunidades, y por ser el espacio que construimos entre muchos.

Agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental (el de abajo) por ser tan chidos y ayudarme a resolver tantas, tantísimas dudas, entre ellos a Jonás, Natalia, María y Caro por ser mis compañeros y compartir dudas e inquietudes, a Erika por presentarme el arte del PCR, a Lau por tanta disposición a ayudar, siempre, a Jaime por aconsejarme y ayudarme a comprender a los microsátélites, a Enrique por preocuparse por mi y estar siempre atento, a Santiago por dedicarme tiempo laboratoresco y enseñarme a no hacer burbujas con la pipeta, a Richard y a Gaby por las pláticas sube ánimos con cigarro en mano en el jardín, a Manuel por siempre ayudar a todos los necesitados y a la Sra. Chivis porque es el pilar de ese laboratorio y siempre que la veo, sonrío.

También quiero agradecer a los integrantes del Laboratorio de Genética y Ecología (el de arriba), sobre todo a Ale Lobo por poner orden, sacarme de muchos problemas y alivianar mis múltiples ansiedades, a Laura y a Lorena por ser tan entregadas a su trabajo y compartirme esa pasión, a Ariadna porque estoy segura que sin ella esto no sería lo que es y porque me enseñó a satirizar situaciones difíciles, y finalmente a Lev por ser un buenazo y compartirme un poco de su conocimiento. También agradezco a Paty de Biomédicas por su gran disponibilidad y su excelente manejo del secuenciador.

A Juan Joselito, porque compartió conmigo un mismo camino por años con mucho humor, y el cariño que le tengo siempre estará ahí. A todos mis amigos de la carrera. A Cristina y Leopoldo

por esos primeros años. A Santiago, Ornela, Jonás, Nahum y Victor por compartir tiempos increíbles y contagiar su ñoñés. A María por ser una gran amiga, y a Andrés por ser tan excéntrico y compartir mi humor. A Rafín por rifado en la vida, por perder el miedo. A Noris y a Dani, amigas que se quedarán para siempre, y a David por todas esas pláticas analíticas que tanto me encantan. A Coral y a Sarita por el amor desmedido que les tengo y por enfrentar juntas. A mi Piña, porque vamos y seguiremos juntas, porque ocupa un lugar único en mi corazón y he pasado los mejores momentos con ella. A Sofía, Fer, Ximena, Alexa y Julia porque son mis hermanas para siempre, y sin ellas nada de esto tendría sentido. A Ximena además por compartir conmigo la pasión por la biología, y por todas esas traspachadas que recuerdo con nostalgia. A Marisela por regresar a mi vida y hacerme feliz. A Luisa, por su amistad y su cariño incondicional, por ser mi familia.

A Raquel, por ayudarme a descubrir la profundidad de las emociones, y alentarme a seguir. A las chicas del grupo, por compartir tanto, tan íntimo.

A mi familia, toda ella. A mi mamá, porque es una mujer admirable, por amarnos tanto y por ser la mejor mamá del mundo mundial. A mi papá, por contagiarme el amor a la biología, por tanto cariño y por enseñarme constantemente desde rock hasta política. A mi hermano, por ser mi cómplice y mi maestro, por cuidarme tanto siempre y por mostrarme el mundo desde sus ojos, y a Moni, por el placer de tenerla en mi vida. A mi Tatá, por ser tan tan cercana, por quererme tanto y por su apoyo incondicional. A mis abuelos, por su herencia invaluable.

A Manolla, Zuko, Silvana y Tito por hacerme sentir tanto amor día a día y por hacerme querer regresar a casa.

Por último, a Iván, por ser la mejor persona que conozco, por explotar mi mundo, por caminar conmigo y llevarme a lugares mágicos, por TODO.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. <i>Biogeografía Evolutiva</i>	3
Ejemplos en México	6
Faja Volcánica Transmexicana	8
1.2. <i>Bosques de Abies en México</i>	12
1.3. <i>Taxa estudiados</i>	12
Género Abies	12
<i>Abies religiosa</i> y <i>Abies flinckii</i>	15
1.4. <i>Antecedentes</i>	17
1.5. <i>Genética de Poblaciones</i>	20
Variación genética	20
Marcadores moleculares: microsatélites	22
Estructura poblacional	24
2. OBJETIVO GENERAL	27
2.1. <i>Objetivos particulares</i>	27
3. JUSTIFICACIÓN	28

4. HIPÓTESIS	29
5. MÉTODOS	30
5.1. Muestreo	30
5.2. Extracción de ADN	31
5.3. Amplificación	32
5.4. Diversidad genética	33
5.5. Estructura genética	35
6. RESULTADOS	39
6.1. Diversidad genética	39
6.2. Estructura genética	43
7. DISCUSIÓN	52
7.1. Diversidad genética	52
7.2. Estructura poblacional	57
7.3. Detección de grupos genéticos y delimitación de especies	60
7.4. Implicaciones en la conservación	63
8. CONCLUSIONES	67
9. LITERATURA CITADA	69
10. ANEXOS	84

RESUMEN

Los oyameles o abetos (Pinaceae: *Abies*) en México tienen una historia de expansión y fragmentación poblacional durante los ciclos glaciales e interglaciales del Pleistoceno. Actualmente dos especies exhiben distribuciones contrastantes en la Faja Volcánica Transmexicana: *Abies religiosa*, con una distribución relativamente continua, y *Abies flinckii*, con una distribución restringida en poblaciones en los estados de Jalisco y Michoacán. Explorar la distribución de la variación genética en estas especies permite dilucidar qué fuerzas evolutivas han actuado en sus poblaciones, y cómo estas junto con su historia biogeográfica han moldeado la diversidad y estructura poblacional, además de evaluar si existe una diferenciación genética distinta que permita delimitar cada especie. Con estos objetivos, se genotiparon cuatro microsátelites nucleares en 120 individuos de cuatro poblaciones de *A. religiosa* y dos poblaciones de *A. flinckii*. Contrario a lo esperado, la diversidad genética obtenida fue alta en ambas especies ($H_{Nei}=0.883$ y 0.895 para *A. flinckii* y *A. religiosa*, respectivamente) Se encontró también una endogamia significativa ($F_{IS}= 0.2$ Y 0.192 para *A. flinckii* y *A. religiosa*, respectivamente) e indicios de cuellos de botella en todas las poblaciones, y una alta diferenciación genética entre estas ($G_{ST}'= 0.481$ y 0.324 , para *A. flinckii* y *A. religiosa*, respectivamente) Estos resultados indican que las especies han tenido históricamente tamaños efectivos poblacionales grandes, pero que han sufrido una reducción y aislamiento recientes. La estructura obtenida y los análisis de detección de grupos genéticos no exhibieron una clara separación genética entre especies. Esto puede deberse al mantenimiento de polimorfismos ancestrales y/o a flujo génico interespecífico reciente. En términos de conservación, se recomienda preservar el mayor número de poblaciones posible dada su alta estructuración genética y darles prioridad a las poblaciones que contienen fuentes de variación única por hibridación o por mayor divergencia genética.

Palabras clave: Genética de poblaciones, *Abies*, Faja Volcánica Transmexicana, grupos genéticos.

ABSTRACT

Firs (Pinaceae: *Abies*) in Mexico have a history of population expansion and fragmentation during the Pleistocene glacial and interglacial cycles. Currently, two species exhibit contrasting distributions at the Trans-Mexican Volcanic Belt: *Abies religiosa*, with an approximately continuous distribution, and *Abies flinckii*, with a narrower distribution in the states of Jalisco and Michoacán. To explore the genetic variation in these species allows elucidating which evolutionary forces have intervened in their populations and how these, together with their biogeographic history have shaped the population's structure and genetic diversity, besides evaluating if there is a different genetic identity that defines each species. With this in mind, four nuclear microsatellites were genotyped in 120 individuals of four populations of *A. religiosa* and 2 populations of *A. flinckii*. Unlike expected, the observed genetic diversity was high in both species ($H_{Nei}=0.883$ y 0.895 for *A. flinckii* y *A. religiosa*, respectively). Also, significant inbreeding ($F_{IS}= 0.2$ Y 0.192 for *A. flinckii* y *A. religiosa*, respectively) and bottleneck evidence were found in all populations, and a high genetic differentiation among them ($G_{ST}'= 0.481$ y 0.324 , for *A. flinckii* y *A. religiosa*, respectively). These results indicate that species have had big historical effective population sizes, but have suffered a recent reduction and isolation. The obtained structure and the genetic clustering detection analyses didn't exhibit a clear genetic separation between species. This could be the result of ancestral polymorphisms maintenance and/or recent interspecific gene flow. In terms of conservation, the preservation of the highest number of populations is recommended given their high genetic structure and to prioritize in the populations that contain unique variation sources by hybridization or by higher genetic differentiation.

Key words: Population genetics, *Abies*, Trans-Mexican Volcanic Belt, genetic clustering.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Biogeografía evolutiva*

Las inferencias sobre la historia biogeográfica de las especies y la importancia que tienen diferentes procesos históricos como la fragmentación, la migración, y las expansiones o contracciones de rango de distribución en los patrones de variación genética de sus poblaciones son el foco de estudio de la biogeografía evolutiva, y permiten explicar procesos actuales y predecir las respuestas de las especies a cambios ambientales futuros (Soltis et al. 2006; Morrone, 2009). Esta detección de patrones en las dinámicas poblacionales de especies de animales y plantas se lleva a cabo a partir de la integración de datos paleontológicos o geológicos, para determinar distribuciones e interacciones pasadas, y también moleculares y filogenéticos, para analizar su variación genética a partir de fragmentos de ADN comparados entre individuos, poblaciones y/o especies, encontrando sus similitudes y diferencias, y así poder conocer sus relaciones evolutivas. Esto en conjunto permite reconstruir paleofloras durante diferentes periodos de tiempo, e inferir los eventos que han moldeado su historia evolutiva (Hu et al. 2009; Morrone, 2009). En este sentido, la genética y la paleontología son complementarias, porque eventos demográficos pasados usualmente dejan huellas genéticas de larga duración en las poblaciones actuales (Hu et al. 2009).

Este tipo de estudios han mostrado que la estructura poblacional y los patrones de diversidad genética en una especie son moldeados en gran parte por los cambios geológicos (i.e. la formación de montañas y sistemas de ríos) y las fluctuaciones climáticas que generan cambios en la distribución de las especies por la búsqueda de condiciones aptas para su desarrollo, ocasionando muchas veces aislamiento poblacional y favoreciendo la divergencia de sus genomas por selección o deriva génica y endogamia, lo

cual podría conllevar eventualmente a la especiación (Hewitt, 2004; Jaramillo-Correa et al. 2009).

El registro fósil, sobre todo a partir de núcleos de polen, y la información disponible sobre los niveles de isótopos de oxígeno y carbono, que permiten datar la antigüedad de las muestras, han mostrado que los cambios a gran escala en las distribuciones de las especies se han llevado a cabo principalmente en respuesta a las fluctuaciones climáticas del periodo Cuaternario (desde hace 2.5 millones de años; Davis & Shaw, 2001). Durante este periodo, el clima de la Tierra se ha caracterizado por fluctuaciones muy marcadas con etapas más frías que el clima actual, conocidas como glaciaciones, y etapas en las que el clima es similar o más cálido que el presente, conocidas como interglaciales, con una periodicidad de 100,000 y 41,000 años determinadas por las variaciones de la órbita de la Tierra alrededor del Sol, que modifican la insolación y por ende la cantidad de energía que recibe la Tierra (Hays et al. 1976). Por ejemplo, en el último máximo glacial, hace aproximadamente 20,000 años, se produjeron descargas de hielo en el Atlántico que provocaron cambios en la circulación de agua fría en el Atlántico norte y de agua caliente en el Pacífico, los cuales produjeron cambios en la precipitación, la temperatura y el nivel del mar, con efectos diferentes en el mundo dependiendo de la distancia al ecuador, las corrientes oceánicas, la masa continental y los rangos montañosos (Metcalfe, 2006).

En los episodios glaciales, el Hemisferio Norte quedó prácticamente cubierto de hielo. Las especies templadas y boreales persistieron durante estos periodos en refugios sureños aislados donde las condiciones climáticas eran menos extremas, lo que en general ocasionó cuellos de botella en las poblaciones y una subsecuente pérdida de variación genética (Hu et al. 2008). En los periodos interglaciales, las poblaciones expandieron sus distribuciones a mayores latitudes (Soltis, 2006; Hu et al. 2008), probablemente a partir de dos procesos de colonización complementarios. El primero incluye una expansión gradual liderado por un frente de migración; en este se preserva la mayor parte de la diversidad genética en las nuevas poblaciones (Jaramillo-Correa et al. 2009). En el segundo proceso

se forman nuevas poblaciones a partir de la dispersión a larga distancia de unos pocos individuos, por lo que es una colonización rápida e involucra una serie de cuellos de botella, que conllevan a una alta diferenciación genética de las poblaciones nuevas con respecto a las originales (Hewitt, 2004; Jaramillo-Correa et al. 2009).

En cambio, en las regiones templadas sureñas y en los trópicos los efectos de las glaciaciones fueron menos drásticos y más heterogéneos, debido a que el clima es afectado no solo por la latitud, sino también por la altitud y por su topografía compleja (Moreno-Letellier & Piñero, 2009; Ornelas et al. 2013). Estas regiones no presentaron glaciación extensiva, pero sus condiciones climáticas fueron modificadas considerablemente debido a una disminución de la temperatura y a cambios variables en la precipitación (Caballero et al. 2010). Los estudios filogeográficos realizados en especies de árboles templados en Mesoamérica muestran que sus poblaciones han sufrido ciclos migratorios latitudinales y altitudinales en los diferentes periodos glaciales e interglaciales que han ocasionado expansiones, fragmentaciones, hibridación e introgresión genética entre poblaciones de especies cercanamente relacionadas (Jaramillo-Correa et al. 2009). En los máximos glaciales, la disminución de la temperatura permitió la expansión de los bosques templados a menores altitudes formando poblaciones continuas y aumentando el intercambio genético entre estas. En los periodos interglaciales, las poblaciones se fragmentaron y retrajeron a alta montaña, probablemente perdiendo diversidad genética, disminuyendo los niveles de flujo génico entre ellas y fomentando su divergencia (Davis & Shaw, 2001; Bennet & Provan, 2008). En el actual interglacial, estas poblaciones remanentes aisladas en alta montaña pueden fungir como refugios interglaciales y expandirse de nuevo cuando las condiciones climáticas lo permitan (Jaramillo-Correa et al. 2009).

Ejemplos en México

Existen varios estudios filogeográficos que permiten una primera aproximación a las dinámicas poblacionales de las especies a partir de los cambios geológicos y climáticos de los últimos 5 millones de años en México. Por ejemplo, la especie de sapo *Bufo valliceps*, que actualmente se encuentra ampliamente distribuida desde el norte de Costa Rica a través de la vertiente del Atlántico hasta el sur de Estados Unidos por toda la costa del Golfo, está compuesta por dos grupos filogenéticamente distintos, uno conteniendo a las poblaciones del Norte y el otro a las del Sur, separados en la costa del Golfo de México en Veracruz (Mulcahy & Mendelson, 2000). La estimación del tiempo de divergencia de estos dos grupos data su separación hace aproximadamente 5 millones de años en el Mioceno-Plioceno. Esta fecha coincide con la formación de la Faja Volcánica Transmexicana que dividió la costa del Golfo y probablemente separó a la especie ancestral en dos poblaciones geográficamente aisladas, lo cual fomentó su divergencia en dos clados con trayectorias evolutivas distintas. El grupo del norte parece haber expandido su distribución colonizando Texas y Louisiana cuando las condiciones climáticas lo permitieron en el actual interglacial (Mulcahy & Mendelson, 2000). De forma similar, las especies de serpiente de cascabel (Viperidae) que habitan en alta montaña en los bosques de pino-encino en prácticamente todas las regiones montañosas principales de México han experimentado una diversificación progresiva desde hace 6 millones de años. La divergencia temprana de este grupo está relacionada con la formación de la Faja Volcánica Transmexicana y la divergencia posterior con los cambios climáticos del Cuaternario que fragmentaron los bosques de pino-encino (Bryson et al. 2011).

Contrario a lo sucedido en latitudes más al norte, durante la última glaciación muchas especies templadas tuvieron su máximo desarrollo en México, y en el actual interglacial sus poblaciones quedaron confinadas en refugios en alta montaña, disminuyendo la cantidad de flujo génico entre ellas (Hewitt, 2000, 2001). Por ejemplo, *Pinus strobiformis* tiene una distribución amplia pero fragmentada, restringida a grandes altitudes en áreas

húmedas y templadas en el norte de México y en el suroeste de Estados Unidos (Perry, 1991). Su migración a México probablemente también se llevó a cabo durante los máximos glaciales del Cuaternario. Cuando el hielo se retrajo, esta especie pudo haber migrado hacia el Norte, formando las poblaciones del límite norte de la distribución dada la disminución en la diversidad genética de las poblaciones de sur a norte (Moreno-Letellier & Piñero, 2009). Los análisis de estructura filogeográfica exhibieron dos grupos distintos en el este y oeste de México, en la Sierra Madre Oriental y el Eje Volcánico Transmexicano, y la Sierra Madre Occidental, respectivamente. Durante los máximos glaciales del Pleistoceno, las poblaciones dentro de cada grupo se expandieron, aumentando el flujo génico entre ellas. Actualmente, los dos grupos están aparentemente aislados por el desierto de Chihuahua, que impide el intercambio de genes en sentido este-oeste (Moreno-Letellier & Piñero, 2009). Otro ejemplo es la conífera *Pseudotsuga menziesii*, que se distribuye desde México Central hasta la Columbia Británica, en el oeste de Canadá (Hermann, 1985). Las poblaciones en México se encuentran fragmentadas, están geográficamente aisladas de las poblaciones de Estados Unidos por grandes desiertos, y difieren morfológica, ecológica y genéticamente de las poblaciones de Estados Unidos y Canadá (Li & Adams, 1989; Reyes-Hernández et al. 2005). La llegada de esta especie a México probablemente ocurrió a partir de una colonización durante el Pleistoceno. A partir de su llegada, hace entre 1.6 millones de años y 464 mil años (Gugger et al. 2011), las poblaciones de *P. menziesii* han sufrido varias expansiones y contracciones, correspondientes a los glaciales e interglaciales respectivamente. En el último glacial, las poblaciones tuvieron una distribución más continua y formaron corredores entre regiones a través de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y la Faja Volcánica Transmexicana, lo que permitió intercambio genético entre estas poblaciones (Gugger, 2010). Estas tres cadenas montañosas, pero más especialmente la Faja Volcánica Transmexicana, representan las principales barreras en México que fomentan la divergencia de no sólo de esta, sino de otras especies (ej. Mulcahy & Mendelson, 2000; Corona et al. 2007; McCormack et al. 2010; Bryson et al. 2011; Ruiz-Sánchez & Specht, 2013).

Faja Volcánica Transmexicana

La Faja Volcánica Transmexicana representa el sistema montañoso más largo que se extiende transversalmente a través del centro de México, desde la Costa del Pacífico en Nayarit y Jalisco hasta el Golfo de México en Veracruz. Posee aproximadamente 1,000 km de longitud y 80-230 km de ancho y abarca los estados de Guanajuato, Distrito Federal, Estado de México, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz (**Figura 1**; Morrone, 2005).

Esta cadena montañosa es geológicamente reciente, y volcánica y tectónicamente activa. Se encuentra constituida sobre dos placas independientes, la placa Norteamericana y la de Cocos, que varían en edad, composición, velocidad y ángulo de subducción (**Figura 1**; Ferrari, 2012). Estas características junto con otras peculiaridades geoquímicas la convierten en uno de los sistemas tectónicos convergentes más complejos del mundo, y como consecuencia se han propuesto distintos mecanismos además de la subducción de las placas tectónicas para su origen, entre ellos por una falla intraplaca, por la rotación del arco que formó la Sierra Madre Occidental y por una pluma del manto (Gómez-Tuena et al. 2005; Ferrari, 2012).

La gran cantidad de fechamientos isotópicos que se han obtenido recientemente han mostrado que la Faja Volcánica Transmexicana se originó durante el Mioceno Temprano (hace aproximadamente 19 millones de años) en la parte central de México en donde se localizan actualmente las ciudades de Morelia y Querétaro, eventualmente expandiéndose hacia el este a Veracruz y hacia el oeste a Jalisco y Nayarit (Gómez-Tuena et al. 2005). Dadas las diferencias en edad, orogénesis y características tectónicas, la FVT está dividida en tres regiones diferentes correspondientes al oeste, este y centro (**Figura 1**; Ferrari, 2011).

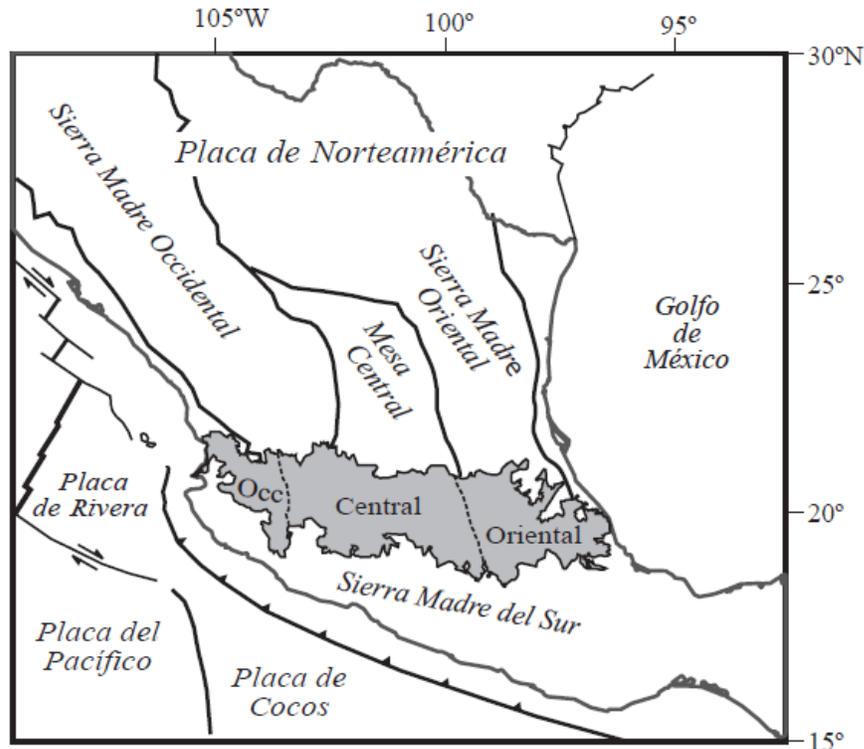


Figura 1. Ubicación de la Faja Volcánica Transmexicana (en gris) y de las tres regiones correspondientes al oeste, centro y este. También se muestran las placas tectónicas actuales y las provincias geológicas principales en México. Imagen tomada de Gómez-Tuena et al. 2005.

La historia geológica y la actividad volcánica de la FVT pueden dividirse en cuatro episodios principales. El primero ocurrió entre el Mioceno temprano y el Mioceno tardío a partir de Michoacán y Querétaro hacia las costas del Golfo de México al este (Ferrari, 2011). En este tiempo también se formaron varios estratovolcanes y se ensanchó considerablemente el arco volcánico (Gómez-Tuena, 2005). El segundo episodio ocurrió en el Mioceno tardío y consistió en un vulcanismo máfico de oeste a este, con edades desde 11.5-10 Ma en la costa de Nayarit hasta 7.6-6.5 Ma en la costa de Veracruz. En el Mioceno tardío y el Plioceno se llevó a cabo el tercer episodio representado por un vulcanismo silíceo y máfico hacia el sur de las rocas del episodio anterior con edades comprendidas entre 7.6 y 3 Ma (Gómez-Tuena et al. 2005; Ferrari, 2011). El último episodio se desarrolló durante el Plioceno tardío hasta el Holoceno por el desarrollo de un

arco volcánico que formó los principales estratovolcanes del Eje, principalmente el complejo volcánico de Colima. En la parte central, el volcanismo empieza hace 2.8 millones de años y continúa activo actualmente, con ejemplos como el Jorullo y el Parícutin. La parte oriente restablece su vulcanismo hace 3.7 millones de años, sin embargo, la mayor parte del vulcanismo en esta zona se desarrolla en el Cuaternario, con volcanes menores a 1 millón de años (Gómez-Tuena, 2005).

Biogeográficamente, este rango montañoso forma parte de la Zona de transición Mexicana, un área compleja donde se mezclan elementos bióticos neotropicales y neárticos (Morrone, 2005). El clima principal en la Faja Volcánica Transmexicana es templado donde predominan los bosques de pino-encino, pero también se desarrollan ecosistemas subtropicales diversos separados por el hábitat de alta montaña. Incluye los picos más altos del territorio mexicano, algunos de estos cubiertos de hielo, que superan los 5000 metros de altura, separados por valles y cuencas por debajo de los 2000 metros (Morrone, 2005). La Faja Volcánica Transmexicana conecta entre sí las Sierras Madre Occidental, Oriental y del Sur, y representa una barrera vicariante importante para muchos taxa como se ha visto en los ejemplos anteriores, lo que ha fomentado, junto con los cambios climáticos, la divergencia genética de los linajes y la evolución *in situ* de muchas especies endémicas (Morrone, 2005).

Entre estos ejemplos se encuentra la especie *Nolina parviflora* distribuida en los bosques de pino-encino-juniperus, en matorrales xerófilos y en bosques tropicales secos en la Faja Volcánica Transmexicana, en la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y Sierra Madre del Sur (Ruiz-Sánchez & Specht, 2013). Esta especie exhibe niveles de diferenciación genética altos entre las poblaciones dentro del Eje, lo cual indica que la fragmentación del hábitat inherente a esta cadena montañosa puede actuar como barrera al flujo génico e incrementar el potencial de las poblaciones de diversificarse y especiarse (Ruiz-Sánchez & Specht, 2013). Estas poblaciones presentan haplotipos diferenciados geográficamente en tres regiones correspondientes a la división realizada a partir de diferencias en edad, orografía y características tectónicas (este, oeste y centro), y los

estimados de tiempo de divergencia para las poblaciones de esta especie coinciden con dos episodios principales de actividad volcánica a lo largo del Eje entre los 21-10 y los 7.5-3 millones de años. Estas concordancias fomentan la hipótesis de que la Faja Volcánica Transmexicana no representa una provincia biogeográfica y que sus diferentes regiones muestran relaciones con otras áreas en la zona de transición mexicana (Corona et al. 2007; Ruiz-Sánchez & Specht, 2013).

Otro ejemplo es la especie *Pinus rzedowskii*, endémica de México, que se localiza en el Faja Volcánica Transmexicana en Michoacán entre los 2000 y 2500 metros de altitud, y está representada por doce poblaciones con altos niveles de diferenciación genética entre ellas (Delgado et al. 1999). Una de las hipótesis en la historia biogeográfica de esta especie es que en el último glacial del Pleistoceno, existía una población panmítica que sufrió fragmentación en el inicio del Holoceno por el cambio de condiciones climáticas que restringieron los hábitats adecuados para su desarrollo, provocando poblaciones pequeñas, aisladas en grandes altitudes, que han sido afectadas por la deriva génica y la endogamia, fomentando la divergencia genética entre estas (Delgado et al. 1999).

El bosque de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana comparte una historia similar de fragmentación poblacional y divergencia genética (Aguirre-Planter et al. 2000; Jaramillo-Correa et al. 2008). Algunas especies de abeto presentan una distribución aproximadamente continua, mientras otras se encuentran restringidas en unas pocas poblaciones aisladas (Farjon, 1990). Esto hace a los *Abies* un buen modelo de estudio para analizar los efectos de la historia biogeográfica de la Faja Volcánica Transmexicana en los patrones de diversidad y estructura genética.

1.2. Bosques de *Abies* en México

Los bosques de *Abies* en México se distribuyen principalmente en manchones aislados en alta montaña. Las áreas de distribución con mayor extensión se encuentran en el Valle de México y en la Faja Volcánica Transmexicana, como el Pico de Orizaba, el Cofre de Perote, el Nevado de Toluca, Tancítaro y el Nevado de Colima. Este tipo de vegetación en México se encuentra entre los 2000 y los 3600 m de altitud, por debajo de las poblaciones de *Pinus hartwegii*, donde encuentran las condiciones de humedad necesarias para su desarrollo (Rzedowski, 1978). Estos bosques crecen en sitios con una precipitación media anual mayor a 1000 mm y una temperatura media anual que varía entre 7 y 15 °C. Normalmente se desarrollan en rocas de origen volcánico, como andesitas y basaltos, que son profundos, con alto drenaje y húmedos todo el año. Los *Abies* pueden ser el único componente en el estrato arbóreo superior o pueden estar mezclados con otras coníferas como *Pinus*, *Quercus*, *Pseudotsuga* y *Cupressus* (Rzedowski, 1978; Hernandez, 1985).

1.3. Taxa estudiados

Género *Abies*

El género *Abies*, conocido comúnmente en México como Oyamel o Abeto, pertenece a la familia Pinaceae. Son árboles monoicos, perennes de larga vida, con madurez reproductiva a los 20 años, y un promedio de vida de 60 años. Presentan una corona cónica compuesta de capas de ramas cortas horizontales con hojas arregladas generalmente en espiral, con forma de aguja (Farjon, 1990). Su madera es suave, blanquizca a color marrón claro, y en general no presenta canales resinosos. Los conos

surgen en ramas de un año de edad, maduran en una estación y son deciduos. Los conos de polen aparecen en primavera agrupados en la parte axilar de las hojas de ramas en la parte baja de la corona. Su forma es globular o cónica, y pueden ser amarillos, rojos, verdes, azules o morados. Los conos de semilla son cilíndricos o en forma de barril, surgen en los tallos en la parte axilar de las hojas en la parte superior de la corona (Eckenwalder, 2009). Al romperse en la madurez, los conos de semilla liberan numerosas escamas ovulíferas con dos semillas aladas cada una. Su polinización y dispersión es por viento. Son plantas diploides con un número cromosómico de $(2n) 24$. (Eckenwalder, 2009). Los *Abies* se utilizan comercialmente como árboles de navidad en Europa y América. Además, también son utilizados para producir pulpa de madera y aserrín, mientras que el follaje es utilizado como material de relleno de almohadas y como aromatizante debido a su agradable olor (Hunt, 1993; Eckenwalder, 2009).

El origen y tiempo de divergencia de los *Abies* es aún tema de discusión. Los depósitos de polen encontrados en China y Siberia indican la presencia de este género en el Cretácico tardío hace aproximadamente 80 millones de años, sugiriendo su origen en Asia Oriental (Xiang et al. 2007). En este escenario, su evolución probablemente implicó la migración hacia Norte América por el puente de Beringia. Sin embargo, la confiabilidad de los restos de polen para identificar especies es dudosa, dada la posibilidad de homoplasias en los caracteres morfológicos con especies extintas. La filogenia de los *Abies* obtenida a partir de marcadores de cloroplasto (Aguirre-Planter et al. 2012) sugiere la posibilidad del origen de este género en el oeste de Norte América, dados tanto la posición basal de *A. bracteata* (una especie actualmente distribuida en el suroeste de Norte América) en la filogenia. Esta posibilidad se ve reforzada por los fragmentos de órganos encontrados en el estado de Washington, EUA, que indican la presencia del género en el Eoceno Medio (Eckenwalder, 2009). Bajo este escenario, el origen del género probablemente sucedió en el Eoceno hace aproximadamente 40 millones de años (Aguirre-Planter et al. 2012). En México, el registro fósil más antiguo encontrado data del Plioceno Medio, hace 5 millones de años, en la formación del Paraje Solo en Veracruz (Graham, 1999).

Debido a la cantidad de semejanzas morfológicas que presentan los árboles de este género, la identificación y clasificación de especies de *Abies* es complicada. Para distinguirlos se utilizan principalmente la forma, tamaño y color de los conos de semilla maduros y de las brácteas, la forma de las hojas, la posición de los estomas y de los canales de resina en las hojas, así como la longitud de las yemas. (Eckenwalder, 2009). Actualmente están clasificadas aproximadamente 50 especies distribuidas en regiones subtropicales y templadas del Hemisferio Norte, principalmente en regiones montañosas (Naravae et al. 1997). En México se han reconocido de 6 a 10 especies de *Abies* (Martínez, 1948; Liu, 1971; Rushforth, 1987; Farjón, 1990) distribuidas desde Baja California y Sonora, hasta el sureste en Chiapas (Farjón, 1990). En el centro de México se encuentran representadas principalmente dos especies con distribuciones contrastantes, *A. religiosa* y *A. flinckii*

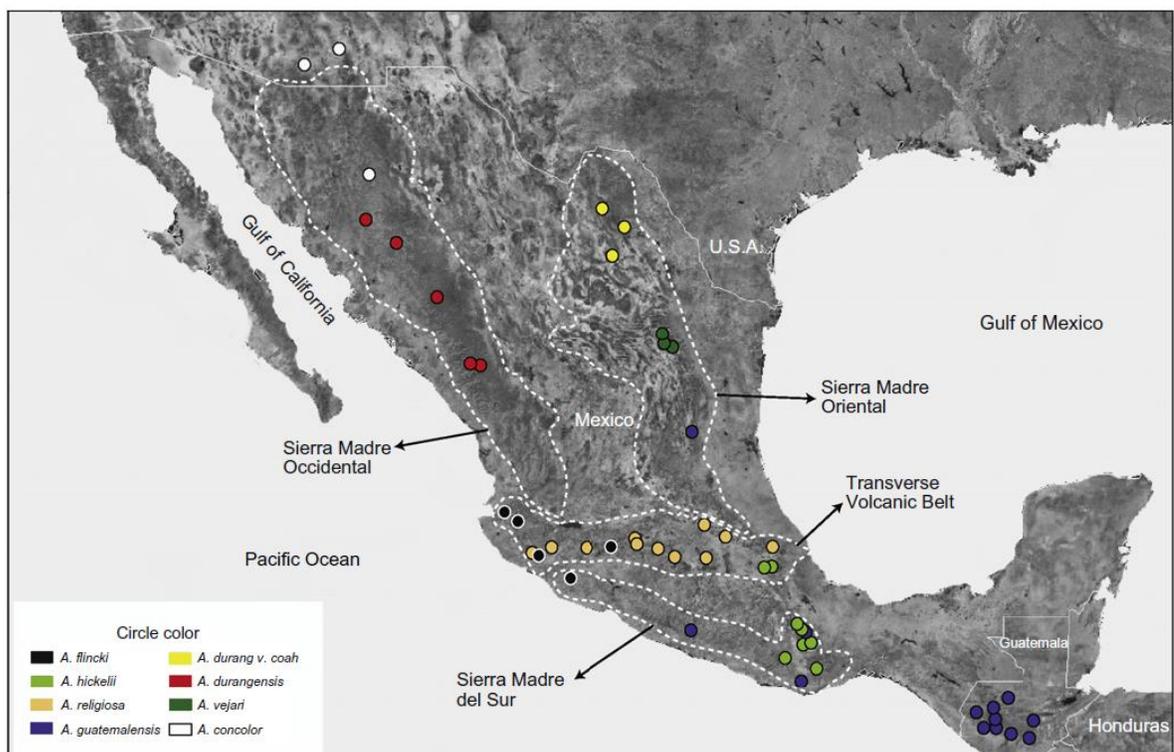


Figura 2. Localización geográfica de las poblaciones de las diferentes especies de *Abies* en México y Guatemala. Las líneas punteadas representan las principales cadenas montañosas en México. Mapa tomado de Aguirre-Planter et al. 2012.

Abies religiosa* y *Abies flinckii

Abies religiosa es una especie de 45 a 60 metros de altura, con un tronco de 1.5 a 2 metros de diámetro. Sus hojas son puntiagudas o redondeadas en el ápice con un canal resinoso en cada lado y pueden o no presentar estomas en cinco líneas interrumpidas (Farjón, 1990). Los conos de polen son rojos y miden entre 1-1.5 cm de longitud. Los conos de semilla miden de más de 11 cm de longitud, son cilíndricos u oblongos, con las brácteas dobladas hacia abajo, morados al inicio de su desarrollo y cafés claro en la madurez (Figura 3; Farjón, 1990; Eckenwalder, 2009).



Figura 3. Rama de *A. religiosa* con hojas puntiagudas en el ápice color verde pálido acomodadas en espiral y semillas aladas. Imagen tomada del herbario de plantas vasculares de la Universidad del estado de Arizona.

(<http://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=1112193>)

La especie presenta una distribución aproximadamente continua a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana por encima de los 2000 m. Abarca los estados de Guerrero,

Jalisco, Michoacán, México, Morelos, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Veracruz y Distrito Federal, y está representada por al menos once poblaciones. Los árboles de esta especie funcionan como refugio de las mariposas monarca que migran en invierno hacia el sur desde el este de Norte América en otoño. Estas poblaciones de oyamel están siendo taladas a pesar de que se encuentran en un área natural protegida (Eckenwalder, 2009).

Las poblaciones de *Abies flinckii* fueron inicialmente catalogadas como dos variedades diferentes de *A. religiosa* (*A. religiosa* var. *emarginata*) y *A. guatemalensis* (*A. guatemalensis* var. *jaliscana*) correspondientes a dos grupos de localidades en el este y centro de México en los estados de Jalisco y Michoacán, respectivamente (Aguirre-Planter et al. 2000). Sin embargo, Rushforth (1989) combinó a las dos variedades en una especie nueva, con base en las diferencias morfológicas y fenológicas que muestran en comparación con las otras especies. Además, análisis genéticos con isoenzimas (Aguirre et al. 2000) y marcadores citoplasmáticos (Jaramillo-Correa et al. 2008; Aguirre-Planter et al. 2012) han aportado evidencias para considerar a *A. flinckii* como una especie distinta al ser la más divergente formando un grupo de haplotipos separado.

Esta especie de abeto (*A. flinckii*) es más similar morfológicamente a *Abies guatemalensis*. Se caracteriza por árboles de 35 a 45 metros de altura con un tronco de 1 a 1.5 metros de diámetro. Sus hojas son alargadas y dentadas o puntiagudas en el ápice, y cuando presentan estomas se acomodan en tres o cuatro filas discontinuas de cada lado en el envés. Los conos de polen son amarillos y miden entre 2-2.5 cm de longitud (Farjón, 1999). Los conos de semilla son morados cuando jóvenes y cafés oscuros en la madurez, con las brácteas escondidas y salientes, y miden menos de 11 cm de largo. En *Abies flinckii* son más estrechos que en *A. guatemalensis* (Farjón, 1999; Eckenwalder, 2009), característica morfológica básica para su identificación como especies distintas. En cuanto a su fenología, las poblaciones de *A. flinckii* inician su crecimiento vegetativo hasta tres meses antes que *A. guatemalensis* y que *A. religiosa* (Aguirre-Planter et al. 2000).



Figura 4. Ramas de *A. flinckii* con hojas alargadas y puntiagudas en el ápice y con conos de polen axilares amarillos. Imagen tomada del herbario de plantas vasculares de la Universidad del estado de Arizona.
(<http://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=1112193>)

A. religiosa y *A. flinckii* han sido listadas como especies amenazadas por diferentes organizaciones (FAO 1986; CITES Convention of International Trade and Endangered Species y SEMARNAT, 2010 con categoría de riesgo “sujetas a protección especial (Pr)”), por lo que es importante conocer la variación genética que existe en sus poblaciones así como su grado de aislamiento genético (i.e. presencia de hibridación) para generar estrategias de conservación adecuadas.

1.4. Antecedentes

Existen varios trabajos que han comenzado a esclarecer la dinámica genética y evolutiva de los *Abies* en México. Por ejemplo, previamente se encontró, utilizando isoenzimas, que

la variación genética dentro de las poblaciones de *Abies* en el sur de México es baja, pero su diferenciación genética es alta, contrario a lo encontrado en la mayoría de las coníferas boreales (Aguirre-Planter et al. 2000). Esto puede ser el resultado de la fragmentación y retracción de las poblaciones de *Abies* a zonas de alta montaña durante el calentamiento de la tierra de los últimos 9000 años, lo cual fomentó la endogamia y la deriva génica. Por otro lado, el análisis realizado a partir de marcadores citoplasmáticos mostró que la diferenciación poblacional, tanto dentro como entre las especies, fue mayor para el mtDNA que para el cpDNA (Jaramillo-Correa et al. 2008). Con los datos de cpDNA se encontró que la diferenciación genética se relaciona con la separación taxonómica de *Abies flinckii* con respecto a las demás (Jaramillo-Correa et al. 2008).

Como continuación de este último estudio, se amplió el análisis filogeográfico y se realizó un estudio filogenético para inferir los procesos de diversificación en los *Abies* mesoamericanos a partir de la variación en regiones repetitivas y no repetitivas del genoma del cloroplasto (Aguirre-Planter et al. 2012). La filogenia confirmó la monofilia del género y mostró cinco grupos principales correspondientes a la distribución geográfica de las especies. Los *Abies* mesoamericanos se agruparon en un mismo grupo junto con *A. grandis* y otras especies del sudoeste de Norte América. Sin embargo, ninguno de estos taxa formó grupos monofiléticos. Dependiendo de la calibración utilizada, la divergencia de los *Abies* en Mesoamérica se llevó a cabo en el Paleoceno tardío o en el Mioceno temprano, lo que se traduce en bajas tasas de diversificación (Aguirre-Planter et al. 2012). La red de haplotipos de cpDNA en el análisis extendido de estructura filogeográfica exhibió a las especies *A. flinckii* y *A. concolor* como las más divergentes, al separarse cada una en un grupo distinto de haplotipos. Estos resultados apoyan la hipótesis sobre la llegada de los *Abies* a México a partir de varias olas migratorias y la separación de *A. flinckii* como una especie distinta (Aguirre-Planter et al. 2012).

Los resultados obtenidos en estos estudios previos han permitido inferir en gran parte cuáles han sido los procesos históricos que han moldeado los patrones filogeográficos de las poblaciones de *Abies* en México. Sin embargo, la historia que cuenta

cada locus en el genoma de un individuo puede diferir y exhibir los efectos de procesos demográficos históricos en diferentes escalas de tiempo, debido a que es un proceso coalescente, además de sus distintas tasas de mutación y recombinación, y pueden ser afectados de manera diferencial por fuerzas evolutivas, especialmente la selección natural (Sunnucks, 2000).

El cpDNA es informativo para reconstruir eventos ancestrales gracias a su baja tasa de recombinación, sin embargo, al ser el genoma de un organelo representa una sola genealogía de genes, y por lo tanto es improbable que logre capturar todos los eventos históricos que las poblaciones han experimentado (Heuertz et al. 2004). Además, los polimorfismos encontrados posiblemente sean antiguos, por lo que difícilmente se pueden conocer los factores actuales que se encuentran moldeando la diversidad y estructura genética en las poblaciones (Selkoe, 2006). En cambio, los microsatélites nucleares y las isoenzimas tienen recombinación y permiten obtener información de los eventos contemporáneos y del pasado reciente que han moldeado la variación genética. De ellos, los microsatélites son los más informativos porque tienen una mayor tasa de mutación, lo que resulta en un mayor número de polimorfismos y por lo tanto en una mayor resolución en los estudios de genética de poblaciones (Selkoe, 2006). Las herramientas de análisis para los microsatélites en esta área permiten detectar con mayor poder estadístico la estructura poblacional de las especies e inferir la cantidad de admixia genética que existe en las poblaciones (Heuertz, 2004). Estimados fidedignos de diversidad y diferenciación genética son cruciales en la biología de la conservación, ya que es necesario comprender el potencial evolutivo de las poblaciones, y determinar su probabilidad de sobrevivencia (Newton, 1999; Balloux & Lugon, 2002).

Dada la necesidad de comprender más a fondo la dinámica evolutiva y la estructura genética de los *Abies*, en el presente trabajo se utilizaron microsatélites nucleares para estudiar la diversidad y estructura genética de poblaciones de *A. flinckii* y *A. religiosa* en la Faja Volcánica Transmexicana, comparar los patrones de variación encontrados con sus distribuciones contrastantes, y detectar grupos genéticos distintos

que puedan ser comparados con la separación actual de las especies y así enriquecer los programas de conservación existentes.

1.5. *Genética de poblaciones*

Variación genética

La variación genética se refiere a la variación heredable del material genético en las poblaciones naturales. Se genera a partir de deleciones, inserciones o cambios nucleotídicos en el genoma. La genética de poblaciones es un área de la biología que estudia los niveles y patrones de variación genética dentro y entre poblaciones, y las fuerzas que determinan los cambios en esta variación, tanto en el espacio como en el tiempo (Griffiths et al. 1996).

Entre las fuerzas que determinan la cantidad de variación genética dentro y entre poblaciones se encuentran la deriva génica y la endogamia, que tienden a disminuir la cantidad de diversidad genética, la mutación, que tiende a aumentarla, y la selección y el flujo génico, que pueden aumentarla o reducirla (Hedrick, 2005a). Para poder conocer estas fuerzas, se hace uso de un modelo nulo que elimina las complejidades reales de las poblaciones y permite esperar frecuencias genotípicas constantes en una población cuando ninguna fuerza está actuando sobre esta, es decir, cuando la población se encuentra en equilibrio (Gillespie, 2004). Este modelo es denominado Ley de Hardy-Weinberg y establece que una población está en equilibrio cuando presenta un tamaño efectivo poblacional muy grande (infinito), no recibe migrantes, presenta tasas de mutación despreciables, sus individuos se aparean aleatoriamente y no tiene presiones de selección natural. De esta forma, cuando se analizan sus patrones de variación, las

desviaciones del equilibrio esperado indican que alguna fuerza evolutiva se encuentra actuando dentro de la población (Hamilton, 2011).

La medida más utilizada para estimar la cantidad de variación genética en una población es la heterocigosis. En un organismo diploide, esta se define como la presencia de dos alelos en un locus que son diferentes por estado (Gillespie, 2004). Sin embargo, esta medida no considera el número de polimorfismos, es decir, el número de alelos distintos que hay en la población en un locus particular (Hedrick, 2005). Por esto, otras medidas se utilizan para complementar la cuantificación de la diversidad genética, como la riqueza alélica, el número efectivo de alelos y el número de alelos privados. La primera hace referencia al número total de alelos de todos los loci promediado por el número total de loci estudiados. El número efectivo de alelos se refiere al número de alelos necesarios para generar la misma heterocigosis observada si todos los alelos tuvieran la misma frecuencia y se calcula como el inverso de la homocigosis (Frankham, 2003). Finalmente, los alelos privados, aquellos que solo se encuentran en una población particular (Hedrick, 2005).

Para alcanzar un mayor entendimiento del comportamiento de la diversidad genética y de las fuerzas que actúan sobre esta en una población, es importante estimar el tamaño efectivo poblacional (Wang, 2005). Este es determinado a partir de la comparación de la tasa de deriva génica en la población real con la tasa de deriva génica en una población ideal siguiendo el modelo de Wright-Fisher (Fisher, 1930; Wright, 1931). Este modelo principalmente supone que los tamaños poblacionales son finitos y constantes en el tiempo, y que cada individuo aporta la misma cantidad de gametos y que todos estos son viables (que no hay selección natural). El tamaño de la población ideal en el modelo que produce la misma tasa de deriva génica observada en la población real, representa el tamaño efectivo de la población analizada (Hamilton, 2011). Por lo tanto, el tamaño efectivo poblacional puede ser definido como el tamaño de una población ideal que experimenta tanta deriva génica como la población analizada sin importar el tamaño censal. Existen distintas maneras de estimar el tamaño efectivo de una población. Una de

ellas se realiza a partir de la tasa de mutación por locus por generación (μ) y del estimado θ (theta), que se refiere a la probabilidad de que dos alelos muestreados al azar en una población que está en equilibrio mutación-deriva no sean idénticos por descendencia (Hamilton, 2011).

Marcadores moleculares: microsatélites.

La diversidad genética en poblaciones naturales se estudia por medio de marcadores genéticos, como por ejemplo los marcadores moleculares que se derivan de la amplificación del ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Los microsatélites son unos de los marcadores más eficaces para la obtención y análisis de datos. Son secuencias de ADN compuestas de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem, que se encuentran distribuidos en frecuencias altas en los genomas de la mayor parte de los taxa (Selkoe et al. 2006). La longitud de las repeticiones en un microsatélite puede variar desde 5 a 40 repeticiones (Li et al. 2008).

La mayoría de los microsatélites se encuentran en regiones no codificantes y se supone que son neutros, ya que sus diferentes estados alélicos no afectan significativamente la adecuación de los individuos (Tachida et al. 1999). Además, estos marcadores son generalmente codominantes, lo que permite la distinción de individuos heterocigotos en las poblaciones (Oliveira et al. 2006). Por otro lado, también presentan una alta tasa de mutación, normalmente entre 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por locus por generación (Selkoe et al. 2006), característica que los hace altamente polimórficos y los convierte en una herramienta muy valiosa para estudiar con profundidad la diversidad y estructura genética de las poblaciones y de las especies filogenéticamente cercanas.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la alta tasa de mutación y la forma en la que mutan los microsatélites. Los dos más sustentados son la recombinación

(crossing-over) desigual y la presencia de errores en la replicación o en la reparación de ADN por parte de la polimerasa. En la primera se generan dos cromosomas con distintos números de repeticiones (Tachida et al. 1992), y la presencia de errores en la replicación o en la reparación de ADN por parte de la polimerasa que puede ocasionar adiciones o pérdidas en el número de repeticiones (Harding et al. 1992). Dada la poca certidumbre en los mecanismos mutacionales de estos marcadores, actualmente no pueden ser explicados por un solo modelo de mutación que describa adecuadamente su dinámica mutacional (Gaggiotti et al. 1999). Sin embargo, generalmente se utilizan tres modelos. El primero es el modelo de alelos infinitos (IAM), que asume que cada evento de mutación genera un nuevo alelo (Oliveira et al. 2006). Esto implica que dos alelos con número de repeticiones similares no se encuentran más cercanos filogenéticamente que un alelo que difiere en un mayor número de repeticiones. El segundo modelo, específico para microsatélites, es el de mutación paso a paso (*Stepwise* o SMM) y supone que cuando un locus muta, gana o pierde una sola repetición a la vez (Oliveira et al. 2006). En este caso, alelos con números de repeticiones similares tienen una mayor relación filogenética que los alelos con número repeticiones muy disímiles. (Oliveira et al. 2006; Selkoe et al. 2006). Un tercer modelo mutacional es el modelo de dos fases (TPM) que supone que hay un número finito de alelos que pueden ganar o perder una repetición, pero también permite saltos mutacionales mayores a una repetición. Este modelo aparentemente se ajusta mejor a los loci de microsatélites (Di Rienzo et al. 1994).

Una de las ventajas del uso de microsatélites como marcadores moleculares es que permiten el uso de muestras de ADN antiguas y métodos económicos de extracción, ya que son marcadores con secuencias cortas y que se pueden amplificar por PCR aún con ADN de baja calidad o cantidad (Selkoe et al. 2006). Además, los microsatélites hacen posible la amplificación de varios loci para obtener información del comportamiento genético de las poblaciones. La información obtenida de un solo locus no es representativa del comportamiento de la población ya que la recombinación, la selección y la deriva génica afectan de manera distinta a diferentes regiones del genoma (Selkoe et al. 2006).

Por otro lado, los microsatélites tienen ciertas desventajas, como lo son la necesidad de que las regiones flanqueantes no muestren diferencias en sus secuencias entre individuos, la presencia de alelos nulos (i.e. un alelo que falla en amplificarse a niveles detectables en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR; Dakin & Avise, 2004), la incertidumbre en sus mecanismos de mutación y la presencia de homoplasia de longitud, es decir, dos alelos con una misma longitud pero provenientes de diferentes linajes. Por ejemplo, la homoplasia ocurre cuando se revierte una mutación en las repeticiones del alelo o cuando dos alelos no relacionados convergen en su secuencia cambiando su número de repeticiones (Selkoe et al. 2006). La homoplasia genera una serie de errores en diversos estimados ya que hay una pérdida de información en la diversidad alélica (Selkoe et al. 2006).

Estructura poblacional

La mayoría de las especies presentan algún nivel de estructura poblacional, es decir, en la forma como la variación genética está repartida entre sus poblaciones, la cual se refleja en el número de alelos intercambiados (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). La historia biogeográfica y la distribución actual de una especie determinan en gran parte la diferenciación genética entre sus poblaciones. En general, las especies con distribuciones amplias y continuas presentan menor diferenciación genética entre sus poblaciones y mayor diversidad genética intrapoblacional que aquellas con distribuciones restringidas y poblaciones fragmentadas (Hedrick, 2005a). Esto se debe a que cuando el flujo génico entre poblaciones es alto, estas tienden a homogeneizar sus frecuencias alélicas, manteniendo un mayor número de polimorfismos, aumentando el tamaño poblacional efectivo; lo que a su vez disminuye la deriva génica. En cambio, cuando una población no recibe intercambio genético con otras poblaciones, la acción de la deriva disminuye la diversidad genética y su potencial evolutivo debido a que la probabilidad de fijar

mutaciones deletéreas aumenta (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). De igual forma, poblaciones que han experimentado reducciones en su tamaño poblacional efectivo a causa de cuellos de botella o por efectos fundadores ven disminuida su diversidad genética por la pérdida de alelos, reduciendo su probabilidad de adaptarse a nuevas presiones de selección (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Las diferencias en los niveles y patrones de diversidad genética y estructura poblacional también están determinadas por las características de historia de vida de las especies. Por ejemplo, especies con sistemas de apareamiento por entrecruzamiento y dispersión por viento presentan en general niveles superiores de diversidad genética y menor estructuración poblacional que especies con autofertilización y dispersión por gravedad (Hamrick & Godt, 1996).

Los índices de fijación de Wright (1951; F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}) son las medidas más utilizadas para cuantificar la diferenciación genética que existe dentro y entre poblaciones. F_{IS} mide el grado de endogamia de los individuos con respecto a la subpoblación a la que pertenecen, F_{ST} es una medida de la diferenciación genética existente entre subpoblaciones y mide el grado de endogamia en las subpoblaciones en relación con la población total, mientras que F_{IT} mide la endogamia de los individuos en relación a la población total (Freeland, 2005).

F_{ST} es el estadístico más utilizado en la estimación de estructura poblacional. Se basa en el modelo de mutación de alelos infinitos (IAM), que supone que cada mutación crea un nuevo alelo. Sin embargo, F_{ST} puede subestimar los niveles de diferenciación genética entre poblaciones en el caso de loci con altas tasas de mutación (como los microsatélites), especialmente cuando el flujo génico entre poblaciones es bajo (Hedrick, 2005b). Esto se debe a que la probabilidad de identidad por descendencia de dos alelos decrece considerablemente cuando se tienen altas tasas de mutación, lo cual aumenta la probabilidad de sobreestimar la cantidad de flujo génico que existe entre poblaciones obteniendo un valor subestimado de F_{ST} (Balloux & Lugon-Molin, 2002).

La R_{ST} de Slatkin (1995) también es utilizada como un estimador de la divergencia genética entre poblaciones y asume un modelo de mutación paso a paso (SMM), que *a priori* es más adecuado para datos de microsatélites. Según este modelo, la diferenciación (R_{ST}) es independiente de la tasa de mutación. Sin embargo, este estadístico presenta una varianza muy alta, y no existe certidumbre sobre qué tanto los microsatélites se adecúan a un modelo SMM estricto (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Por otro lado, Hedrick (2005b) propuso una medida estandarizada de diferenciación genética relacionada a la medida G_{ST} . La G_{ST} (Nei, 1973) estima la estructura con base en la heterocigosis observada promedio de las subpoblaciones y la heterocigosis total de la población, pero que tiene la desventaja de ser dependiente de la cantidad de variación genética para loci altamente variables como los microsatélites. Por lo tanto, G_{ST} puede resultar en un valor muy bajo a pesar de que la estructuración poblacional sea muy alta. Para corregir esto, se propuso entonces el estadístico G'_{ST} que es la medida estandarizada del valor observado de G_{ST} por el valor máximo que puede tomar dados los niveles observados de variación genética (Hedrick, 2005b). De forma paralela, Jost (2008) buscó resolver el problema de indistinción entre mutación y migración en loci altamente variables utilizando el número efectivo de alelos y los alelos privados de cada subpoblación para calcular un índice de diferenciación denominado D_{EST} . También se han desarrollado otras formas de inferir la estructura poblacional por detección de grupos genéticamente distintos. Por ejemplo, Pritchard et al. (2000) propusieron, a partir de la estadística bayesiana, un modelo que asigna probabilísticamente a los individuos a un número k de poblaciones, cada una con frecuencias alélicas determinadas en cada locus. El modelo además supone que las poblaciones están en equilibrio de H-W, que los marcadores están en equilibrio de ligamiento y no considera ningún proceso específico de mutación.

2. OBJETIVO GENERAL

Analizar la diversidad genética encontrada en cuatro poblaciones de *Abies religiosa* y dos poblaciones de *A. flinckii* en la Faja Volcánica Transmexicana para intentar inferir las fuerzas evolutivas que han moldeado esta diversidad, y determinar si su estructura poblacional muestra una separación genética entre las dos especies.

2.1. *Objetivos particulares*

Conocer la diversidad y estructura genética que existe dentro y entre las poblaciones de *A. religiosa* y *A. flinckii*.

Determinar si las dos especies muestran la misma cantidad de diversidad genética y diferenciación poblacional con microsatélites nucleares.

Comparar los patrones de variación genética obtenidos con la historia biogeográfica de las dos especies, e inferir qué fuerzas podrían estar moldeando dicha variación.

Comparar la estructura genética obtenida en los dos taxa para detectar si existen entidades genéticas diferentes, y si estas corresponden a la separación de las poblaciones en especies distintas.

3. JUSTIFICACIÓN

Esta tesis contribuye al acervo de estudios sobre genética de poblaciones de *Abies* en México (Aguirre-Planter et al. 2000, 2012; Jaramillo-Correa et al. 2008). Al sumar los datos aquí obtenidos a partir de marcadores nucleares a los ya disponibles para otros marcadores moleculares, se espera obtener un escenario más completo sobre cuáles han sido los procesos evolutivos y biogeográficos que han actuado en los taxa analizados, y comprender a mayor profundidad las repercusiones genéticas que tienen sus distribuciones contrastantes en la Faja Volcánica Transmexicana. La comparación de la variación genética obtenida con la diversidad y estructura genética observada en otras coníferas en el Hemisferio Norte ampliará nuestro conocimiento sobre cómo las características inherentes a las especies y/o las relacionadas con la topografía compleja característica de México, particularmente de la Faja Volcánica Transmexicana, afectan directamente los niveles y la repartición de la diversidad genética en las poblaciones.

De la misma forma, permite un mayor acercamiento a la distinción de grupos genéticos en las poblaciones analizadas y a los posibles procesos de especiación e hibridación que han ocurrido en nuestro país dados los cambios de distribución geográfica en especies de montaña durante los diferentes ciclos glaciales del Cuaternario. Esta distinción, junto con los datos de diversidad genética obtenidos para las poblaciones, permitirá a su vez generar estrategias de conservación adecuadas para cada taxa, dependiendo de su distribución, variación genética y diferenciación poblacional, así como de las presiones sociales y económicas que existen en cada región donde se distribuyen.

4. HIPÓTESIS

Dado que las poblaciones de *A. religiosa* tienen una distribución más continua en la Faja Volcánica Transmexicana, estas presentarán valores más altos de diversidad y menor estructuración que las poblaciones de *A. flinckii*, que se encuentran restringidas a pocas poblaciones aisladas.

Las poblaciones de *A. religiosa* presentarán aislamiento por distancia, la cual se perderá cuando se incluyan las poblaciones de *A. flinckii* en el análisis.

Se espera encontrar dos grupos genéticamente diferenciados correspondientes a *A. flinckii* y *A. religiosa*.

5. MÉTODOS

5.1. Muestreo

El muestreo de poblaciones de *A. religiosa* y *A. flinckii* fue llevado a cabo por Aguirre-Planter et al. (2000) según las descripciones basadas en características vegetativas y reproductivas de Martínez (1948), Donahue et al. (1985) y/o muestras en el Herbario Nacional (MEXU). Se recolectaron ramas de cuarenta individuos por población separados por 10 metros o más dependiendo de su abundancia en cada localidad. Las muestras se almacenaron a -80°C . Para este estudio, se eligieron aleatoriamente entre 18 y 22 individuos por población (121 individuos en total), de seis poblaciones a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana: dos pertenecientes a *A. flinckii* y cuatro a *A. religiosa* (**Tabla 1** y **Figura 5**). Este número de poblaciones es suficiente para la detección de grupos genéticos distintos ya que el estudio consta de un análisis multilocus con marcadores microsatélites amplificables en todas las poblaciones con el propósito de encontrar señales genotípicas distintas que permitan comprobar la identidad genética de los dos taxa (Valentini et al. 2009; DeSalle et al. 2004) Esto puede complementarse por ejemplo con análisis tipo *DNA barcoding* con secuencias cortas estandarizadas para un mayor número de taxa que se aseguren como identificadores únicos a nivel de especie (eg. Dupont et al. 2011).

Tabla 1. Localización geográfica y número de individuos caracterizados genéticamente de 6 poblaciones de dos especies de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana. N, número de individuos caracterizados genéticamente.

Especie	Localidad	Clave	Estado	Long. °W	Lat. °N	Elevación (msnm)	N
<i>A. flinckii</i>	El Caracol	AF14	Michoacán	100°45'	19°35'	2300	20
<i>A. flinckii</i>	Cumbre de Guadalupe	AF18	Jalisco	104°43'	20°12'	2100	22
<i>A. religiosa</i>	Nevado de Colima	AR22	Jalisco	103°53'	19°35'	3330	18
<i>A. religiosa</i>	Cofre de Perote	AR48	Veracruz	97°09'	19°31'	3510	22
<i>A. religiosa</i>	El Chico	AR53	Hidalgo	98°42'	20°09'	2940	19
<i>A. religiosa</i>	Tancítaro	AR55	Michoacán	102°19'	19°23'	3030	20



Figura 5. Mapa de distribución en la Faja Volcánica Transmexicana de seis poblaciones de dos especies de *Abies*: *A. religiosa* y *A. flinckii*.

5.2. Extracción de ADN

El ADN se extrajo siguiendo el protocolo CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) *mini-prep* de Vázquez-Lobo (1996; **Anexo 1**).

Para comprobar su calidad y estimar su concentración se corrieron 5 µl de cada producto de extracción en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio, a 100 V durante veinte minutos. El gel fue visualizado con luz ultravioleta y se comparó la intensidad de las bandas obtenidas para determinar su concentración. Dependiendo de la antigüedad, calidad y concentración de ADN en la extracción, se utilizaron entre 20 y 200 ng de ADN en las reacciones de PCR.

5.3. Amplificación

La amplificación de los microsatélites nucleares se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos descritos en Rasmussen et al. (2008) y modificando las condiciones que describen los autores en *A. guatemalensis* para adecuarlas a las especies analizadas en este trabajo. Principalmente, se realizaron cambios en las temperaturas de alineación y en las concentraciones de MgCl₂ y dNTP's. Las amplificaciones fueron hechas en un volumen de 20 µl y utilizando primers fluorescentes (**Tabla 2**)

Tabla 2. Características de oligonucleótidos diseñados en *A. guatemalensis* por Rasmussen et al. (2008) y condiciones generales de amplificación. Se muestra el número de repeticiones, la concentración de MgCl₂, concentración de dNTPs, la temperatura de alineación, el rango esperado y encontrado de tamaño alélico, y la secuencia de oligonucleótidos con el tinte fluorescente utilizado para *A. religiosa* y *A. flinckii*.

Locus	Repeticiones	MgCl ₂ (mM)	dNTPs (mM)	T(°C)	Rango del tamaño de alelos (pb)		Secuencia de los oligonucleótidos (5' - 3')
					Esperado	Encontrado	Tinte fluorescente
Ab07	(GT) ₁₃	2.0	0.4	57	219 - 257	214 - 262	F ACTGGCATTGTGCGCATT ^{-FAM}
							R CCTCGGAGGACAAGATTTGC
Ab12	(GT) ₉ GC(GT) ₁₁	2.0	0.4	57	223 - 244	190 -254	F AGGTTGTGTGAAACCAAGTTCC ^{-VIC}
							R CCCTTTGTTGATAGAGGGAAAC
Ab20	(GA) ₁₈	2.5	0.8	60	134 - 169	118 - 178	F GATCCAGGTTTAGCGTATCTGAG ^{-FAM}
							R CAATGAATCTCTGCAACTGACC
Ab27	(GA) ₃₃	2.0	0.5	54	114 - 182	116 - 234	F GCCTTGAGAGCTGAAAATGG ^{-PET}
							R TGACAAAATGGAGGGAAAATAAGAG

Las condiciones de PCR para los loci consistieron en 1X de Buffer para PCR, 2-2.5 mM de MgCl₂, 0.4-0.8 mM de dNTPs, 0.4 Mm de cada oligonucleótido (0.2 mM en el caso de Ab20), 1U de Taq polimerasa, y ≈10 ng de ADN. En el caso del marcador Ab20 también se utilizaron 0.15% de Tritón X-100 y 5% de Albúmina Sérica Bovina (BSA) para incrementar

el rendimiento de la reacción y evitar la formación de estructuras secundarias. Las condiciones de termociclación para Ab07, Ab12 y Ab27 constaron en un ciclo de desnaturalización de 8 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C (95°C para Ab27), 1 min de alineación (a diferente temperatura según el loci) y 1 minuto (o 30 segundos para Ab27) de extensión a 72°C. Por último, se efectuó un ciclo de extensión de 7 min a 72°C. Para Ab20, la amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización de 15 min a 95°C, seguido de 33 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineación a 60°C y 1 min de extensión a 72°C. Finalmente, un ciclo de extensión de 10 minutos a 72°C.

Para conocer si la amplificación fue exitosa, se corrieron 3 µl de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 2% en TBE, teñido con bromuro de etidio, a 100V durante 30 minutos, para después observarse bajo luz ultravioleta. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Nucleic Acid Markers, 100 bp ADN ladder, Invitrogen) para compararlo con los fragmentos obtenidos. Los fragmentos que mostraron en el tamaño esperado una banda en el caso de individuos homocigos, o dos en individuos heterocigos, se almacenaron a -20°C para su próxima electroforesis.

Las muestras se separaron en un secuenciador automático ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems) del servicio de análisis de fragmentos en el Roy. J. Carver Biotechnology Center de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. El tamaño de fragmentos en cada individuo y en cada locus se estimó con el programa Peak Scanner v. 1.0 (Applied Biosystems).

5.4. *Diversidad genética*

Las frecuencias alélicas fueron calculadas con el programa GeneA1Ex v. 6.41 (Peakall & Smouse, 2006), las medidas de diversidad genética, como el número observado y efectivo

de alelos, las heterocigosis observada y esperada según Levene (1949) y según Nei (1973; que aplica una corrección para tamaños de muestra pequeños), y el número de alelos privados, se obtuvieron con el programa Popgene v.132 (Yeh et al. 1999), mientras que la riqueza alélica se determinó con el programa FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 2001) para cada locus y población.

La frecuencia de alelos nulos se estimó a partir del algoritmo EM (Dempster et al. 1977) para cada locus y cada población con el programa FreeNA v. 1.0 (Chapuis & Estoup, 2007). Se calcularon los valores de F_{ST} según Weir & Cockerham (1984) con la corrección de ENA (*Excluding Null Alleles*; Chapuis & Estoup, 2007) para evitar el posible sesgo producido por la existencia de alelos nulos. Se realizó una prueba de rango de Wilcoxon para conocer si existían diferencias significativas entre los valores de F_{ST} con y sin la corrección de ENA.

Para analizar si los loci se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada población se realizó una prueba exacta según Guo & Thompson (1992) en el programa GenePop v. 4.1.1 (Rousset, 2008). Esta utiliza el algoritmo de cadenas de Markov (MC) para estimar, sin sesgo, el valor de P , y es adecuado para múltiples alelos (Rousset, 2008). Cuando algún locus no se encontró en equilibrio de H-W, se realizó una prueba para inferir si la hipótesis nula fue rechazada por exceso o déficit de heterocigos (Raymond & Rousset, 1995). Los parámetros para los dos análisis fueron: 10000 dememorizaciones, 200 batches y 1000 iteraciones. Para conocer si algún par de loci se encontraba en desequilibrio de ligamiento, se realizó una prueba Exacta de Fisher con el programa GenePop v. 4.1.1 (Rousset, 2008) que aplica el algoritmo de MC. Se realizó el análisis considerando 10000 dememorizaciones, 200 batches y 1000 iteraciones.

En el programa Arlequín v. 3.5 (Excoffier et al. 2010) se estimó el valor de θ promedio de los loci bajo el modelo SMM para cada población. Con este valor se calculó el tamaño efectivo poblacional despejando a partir de la fórmula:

$$\theta=4Ne\mu$$

Se asumió una tasa de mutación (μ) de 1×10^{-3} por generación, ya que valores similares han sido reportados anteriormente en microsatélites de plantas (Udupa & Baum, 2001; Thuillet et al. 2002; Vigouroux et al. 2002; Boys et al. 2005).

Se realizaron también dos análisis para determinar si las poblaciones han sufrido cuellos de botella. El primero, el índice M (Garza & Williamson, 2001), se basa en la razón entre el número de alelos y el rango de tamaño alélico. El valor de M es más pequeño en poblaciones que han sufrido cuellos de botella (<0.67 , según Garza & Williamson, 2001), debido a que se espera que durante un cuello de botella, el número de alelos decrezca más rápido que el rango en el tamaño alélico. Esta prueba se realizó en Arlequín v. 3.5 (Excoffier et al. 2010).

El segundo análisis para inferir posibles cuellos de botella, la prueba de exceso de heterocigotos, se basa en la comparación entre la heterocigosis esperada bajo equilibrio de H-W y la heterocigosis esperada bajo equilibrio mutación-deriva calculada a partir del número de alelos observados. Un cuello de botella es inferido cuando la heterocigosis esperada bajo equilibrio de H-W excede a la heterocigosis esperada bajo equilibrio mutación-deriva. Esta prueba se realizó en el programa Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996) bajo el modelo de TPM con 90% de SMM y 10% de IAM, una varianza de 10, 1,000 réplicas y una probabilidad de significancia (P) de 0.05 calculada con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (*Wilcoxon signed-rank test*).

5.5. Estructura genética

Para analizar la diferenciación genética que existe dentro y entre poblaciones, se calcularon los índices de fijación de Wright (1951; F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) según Weir & Cockerham (1984) para cada locus utilizando GenePop v. 4.1.1 (Rousset, 2008). Los valores de

diferenciación genética varían dependiendo del modelo de mutación utilizado, por lo que además del F_{ST} , que toma en cuenta un modelo de mutación de alelos infinitos (IAM), también se calculó el estadístico R_{ST} (Slatkin, 1995), que se basa en un modelo de mutación paso por paso (SMM). Además se calcularon los índices D_{EST} (Jost, 2008) y G_{ST}' (Hedrick, 2005), que no dependen de la cantidad de diversidad genética intrapoblacional y se ha propuesto que son más adecuados para calcular la diferenciación genética con microsatélites. Se obtuvieron adicionalmente estimados pareados de diferenciación entre poblaciones. Los F_{ST} y R_{ST} pareados fueron calculados en el programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier et al. 2010) con 10000 permutaciones, mientras que D_{EST} y G_{ST}' pareados fueron calculado en SMOGD v 1.2.5 (Crawford, 2010) con 1000 iteraciones.

Para determinar la cantidad de variación genética que se encuentra dentro o entre las poblaciones o las especies, se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) para las seis poblaciones de las dos especies y otro para dos grupos, uno agrupando a las poblaciones de *A. religiosa*, y el otro a las de *A. flinckii*. Para este análisis, se utilizaron los índices de fijación F_{ST} y R_{ST} . La prueba se realizó en Arlequin v. 3.5 (Excoffier et al. 2010) con 50000 permutaciones.

Para conocer si las poblaciones presentan un patrón de aislamiento por distancia, se obtuvo primero distancias genéticas de Nei (1978) entre pares de poblaciones en el programa PopGene v. 1.32 (Yeh et al. 1999). Luego se construyeron matrices de distancias genética y geográfica entre poblaciones para realizar dos pruebas de Mantel en Arlequin v. 3.5 (Excoffier et al. 2010) con 100000 permutaciones, una incluyó solamente las poblaciones de *A. religiosa*, y la otra las poblaciones de las dos especies. También, a partir de las distancias genéticas de Nei (1978) se realizó un dendrograma tipo *Neighbor Joining* (NJ; Saitou & Nei, 1987) para inferir las relaciones filogenéticas entre las poblaciones. Se utilizaron 100 muestras de *bootstrap* para cada locus para estimar la confianza en cada bifurcación de las ramas. El árbol se construyó en el programa PHYLIP v. 3.69 (Felsenstein, 1995).

Se aplicaron tres métodos distintos para detectar grupos genéticos a partir de los genotipos obtenidos. El programa Structure v. 2.3.3 (Falush et al. 2007) implementa un método bayesiano (Pritchard et al. 2000) para identificar poblaciones genéticamente distintas para inferir las poblaciones de origen de cada individuo y las frecuencias alélicas que caracterizan a las poblaciones establecidas. Para ello se calcula la probabilidad posterior de encontrar cierto número de poblaciones con frecuencias alélicas específicas dados los genotipos observados. El modelo establece un número predeterminado de poblaciones (k), cada una con frecuencias alélicas características en los loci analizados. A cada individuo se le asigna una probabilidad de pertenencia a una población particular, y se identifican migrantes y genotipos mezclados (admixia). El modelo supone que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg, que los loci están en equilibrio de ligamiento y no existe ningún proceso de mutación. El análisis se realizó en 10 corridas independientes con valores de k entre 1 y 6, suponiendo un modelo de admixia con frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones. Esta opción permite una asignación más precisa de los individuos en poblaciones cercanamente relacionadas, a pesar de que se pueda sobreestimar k . La longitud del periodo de calentamiento fue de 50,000 y el número de iteraciones de MCMC después del calentamiento se estableció en 500,000.

Para obtener un estimado del número real de grupos genéticos (Δk), se realizó el análisis propuesto por Evanno et al. (2005) que calcula la media de las corridas independientes para cada k . Este valor es más preciso que la media de la probabilidad logarítmica posterior $\{L p(x|k)\}$ obtenida por Structure porque toma en cuenta el aumento de la varianza de la probabilidad logarítmica posterior en cada corrida independiente conforme aumenta el valor de k .

Adicionalmente, se utilizó el programa BAPS v. 5.3 (Corander et al. 2009), que emplea la inferencia bayesiana para determinar la estructura genética en las poblaciones utilizando un modelo espacial que toma en cuenta la ubicación geográfica de los

individuos o de las poblaciones analizadas. Este también supone equilibrio de ligamiento entre loci y equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones, y trata a las frecuencias alélicas y al número de subpoblaciones como variables aleatorias. El análisis se llevó a cabo a nivel individual con un modelo de agrupamiento espacial (Corander et al. 2008), y se exploraron un número de k desde 2 hasta 10, con seis réplicas para cada valor. Dados los resultados de este análisis, se realizaron dos pruebas de admixia con poblaciones predefinidas. En el primero se definieron las seis poblaciones separadas y en el segundo se definieron a los individuos de la población AF14 como de origen desconocido (ver Resultados). Los dos análisis se llevaron a cabo con mínimo 5 individuos por población, 100 iteraciones, 100 individuos de referencia y 100 iteraciones.

De manera complementaria también se utilizó el algoritmo implementado en el programa SAMOVA v. 1.0 (Dupanloup et al. 2002) para determinar grupos de poblaciones diferenciados al máximo a partir del valor de F_{CT} , que se refiere a la proporción de la varianza genética total que se debe a las diferencias entre grupos de poblaciones. El valor máximo de F_{CT} en k grupos genéticos indica la mayor diferenciación entre grupos y la similitud máxima dentro de las poblaciones en cada grupo. La agrupación depende de la localización geográfica de las poblaciones y permite identificar barreras genéticas (Dupanloup et al. 2002). La simulación se llevó a cabo con 100 condiciones iniciales y con valores de k entre 2 y 6. El valor óptimo de k se tomó como aquel que tuvo el F_{CT} más alto.

6. RESULTADOS

6.1. Diversidad genética

Entre los cuatro loci estudiados se encontraron 115 alelos en el total de las poblaciones (Tabla 3). Ab12 y Ab27 fueron los loci más variables (ambos 31 alelos) y Ab07 el que menos variación presentó (23 alelos). Las poblaciones AR48 y AR53 fueron las que exhibieron el mayor y menor número de alelos (74 y 53 alelos, respectivamente).

Tabla 3. Número de alelos encontrados en cuatro loci microsatélites utilizados para genotipar seis poblaciones de *Abies* distribuidas a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana.

	Número de alelos en las poblaciones						Número total de alelos
	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55	
Ab07	17	17	14	18	13	15	23
Ab12	17	14	12	15	13	18	31
Ab20	17	11	15	18	13	20	30
Ab27	17	13	14	23	14	13	31
Total	68	55	55	74	53	66	115

Se detectaron alelos nulos en todos los loci y en la mayoría de las poblaciones, aunque estos fueron relativamente poco frecuentes (Ab07=0.09%, Ab12=0.07%, Ab20=0.04%, Ab27=0.14%). De hecho, los valores de F_{ST} según Weir & Cockerham (1984) y los calculados con la corrección de ENA no difirieron significativamente (valores de t de Student o de prueba del signo de Wilcoxon. $T=0.84$, d.f. 3, $p=0.231288$ una cola. $W=4$, $p>0.05$), por lo que la presencia de estos alelos nulos parece no haber afectado los estimados de estructura genética (Tabla 4 y Anexo 4).

Tabla 4. Equilibrio de Hardy-Weinberg, Valores de F_{ST} según Weir y Cockerham (1984) y presencia de alelos nulos en cuatro loci microsatelitales para seis poblaciones de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana.

	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55
Ab07	0.088 H-W 0	0.204 H-W 0	0.155 H-W 0	0.336 dH** 0	0.327 dH** 0	0.194 H-W 0
Ab12	0.149 dH** 0	0.042 H-W 0	0.261 dH** 0	0.149 dH* 0	0.365 dH** 0	- 0.011 H-W
Ab20	0.030 H-W 0	0.396 dH** 0	0.020 H-W	- 0.027 H-W	- 0.150 H-W	0.156 H-W 0
Ab27	0.344 H-W 0	0.333 dH** 0	0.216 dH** 0	0.343 dH** 0	0.43 dH** 0	0.271 dH** 0

H-W está en equilibrio ($p > 0.01$); dH deficiencia de heterócigos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$), 0 presenta alelos nulos.

Todos los loci mostraron una desviación significativa del equilibrio de H-W en al menos una población (**Tabla 4**). Dichas desviaciones siempre se debieron a un déficit significativo de heterócigos ($p < 0.001$). Igualmente, el análisis global mostró que el total de poblaciones se encuentra en desequilibrio de H-W ($p < 0.001$) también con un déficit significativo de heterócigos. Por otro lado, todos los pares de loci se encontraron en equilibrio de ligamiento (no están genéticamente ligadas, $p > 0.5$ en todos los casos; **Tabla 5**).

Tabla 5. Desequilibrio de ligamiento de pares de loci microsatelitales para dos especies de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana.

Prueba Exacta de Fisher.

	Ab07	Ab12	Ab20	Ab27
Ab07	-	0.560466	1	1
Ab12	10.635	-	0.989817	0.653854
Ab20	0	3.585	-	0.568556
Ab27	0	9.568	10.542	-

Debajo de la diagonal, valores de X^2 . Arriba de la diagonal valores de probabilidad asociada. Todas las pruebas tienen 12 g.l.

Los cuatro loci mostraron un nivel de diversidad genética alto y relativamente homogéneo, tanto a nivel del número de alelos observado, como del número efectivo de alelos, de las heterocigosis observada y esperada (*sensu* Levene 1949), y de la diversidad genética de Nei (1973; **Anexo 5**).

De igual manera, la mayoría de las poblaciones exhibieron niveles altos de diversidad genética, aunque en promedio *A. flinckii* mostró valores ligeramente más bajos que *A. religiosa* (diferencias no significativas, $p>0.05$). Dentro de *A. flinckii*, la población AF18 presentó niveles de diversidad genética bastante más bajos a los encontrados en AF14. Entre las poblaciones de *A. religiosa*, AR48 obtuvo en general niveles de diversidad genética muy elevados, mientras que AR53 exhibió los valores más bajos de diversidad de las poblaciones analizadas en esta especie. Los valores de F_{IS} fueron relativamente altos en todas las poblaciones, sobre todo en AF18 y AR53 (**Tabla 6 y Figura 6**).

Tabla 6. Diversidad genética de seis poblaciones de *Abies* distribuidas a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana estimada con seis marcadores microsatélites.

	N	Na	pa	A	na		Ae		Ho		He*		H _{Nei} **		F _{IS}
					Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	
<i>A. flinckii</i>															
AF14	20	62	3	14.83	15.50	1.915	10.27	1.197	0.788	0.132	0.925	0.013	0.902	0.012	0.152
AF18	22	55	2	12.75	13.75	2.500	7.51	1.250	0.671	0.125	0.884	0.023	0.864	0.023	0.246
Media	21	58.5	2.5	13.79	14.62	1.237	8.89	1.955	0.729	0.082	0.904	0.029	0.883	0.027	0.200
<i>A. religiosa</i>															
AR22	18	55	3	13.75	13.75	1.258	8.60	0.677	0.764	0.095	0.908	0.010	0.883	0.009	0.163
AR48	22	74	8	16.94	18.50	3.317	12.57	3.434	0.750	0.151	0.937	0.025	0.916	0.024	0.203
AR53	19	53	2	13.02	13.25	0.500	8.65	1.633	0.684	0.215	0.905	0.024	0.881	0.023	0.249
AR55	20	66	5	15.81	16.50	3.109	10.51	2.318	0.788	0.125	0.924	0.026	0.901	0.026	0.151
Media	19.75	62	4.5	14.88	15.50	2.460	10.08	1.883	0.747	0.04	0.918	0.015	0.895	0.016	0.192

N, número de individuos; Na, número total de alelos; pa, alelos privados; A, riqueza alélica promedio; na, número de alelos observados; Ae, número efectivo de alelos; Ho, heterocigosis observada; He, heterocigosis esperada (*Según Levene (1949), **Según Nei (1973)); F_{IS}, índice de endogamia; D.E., desviación estándar.

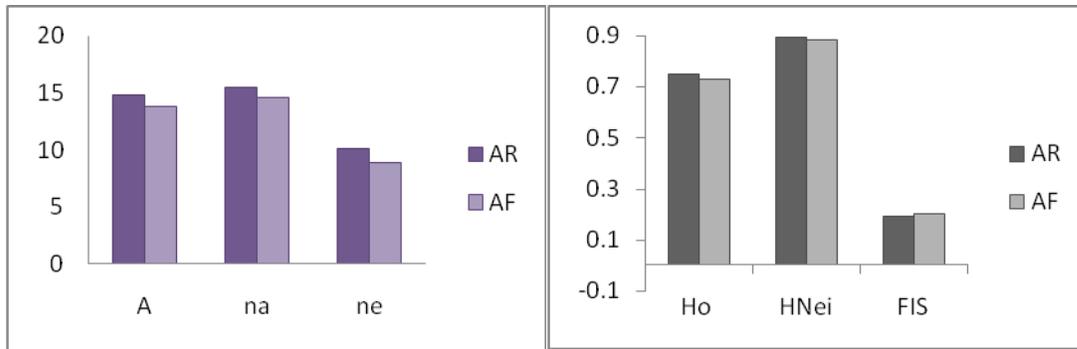


Figura 6. Diferencias en medidas de diversidad genética entre poblaciones de *A. religiosa* (AR) y *A. flinckii* (AF) en la Faja Volcánica Transmexicana calculadas a partir de marcadores de microsatélites. A, riqueza alélica; na, número promedio de alelos observados; ne, número efectivo de alelos; Ho, heterocigosis observada; H_{Nei}, heterocigosis esperada según Nei (1973); F_{IS}, índice de endogamia.

Los estimados de Θ promedio de los loci en cada población y el tamaño efectivo poblacional resultante fueron altos si suponemos una tasa de mutación de 1×10^{-3} por generación (ej. Boys et al. 2005). De esta forma, la población AF18 presentó el menor valor de Θ y el tamaño efectivo más pequeño, mientras que AR48 tuvo el mayor valor de Θ y el tamaño efectivo más grande. La diferencia en tamaño efectivo entre estas poblaciones fue ligeramente menor a los 1,000 individuos (Tabla 7).

Tabla 7. Estimado Θ bajo modelo de SMM y tamaño efectivo poblacional (N_e) para seis poblaciones de Abies en la Faja Volcánica Transmexicana suponiendo una tasa de mutación de 1×10^{-3} por generación para todos los loci microsatelitales.

	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55	Media
Θ	6.679	4.375	5.505	7.950	5.318	6.596	6.071
N_e	1670	1094	1376	1988	1330	1649	1518

El análisis de Cuello de Botella a partir del índice M (Garza & Williamson, 2001) exhibió valores bajos para todos los loci y todas las poblaciones. El locus Ab27 obtuvo el menor valor promedio (0.126), mientras que el locus Ab07 mostró el mayor valor (0.320). La población AR53 mostró el valor promedio más bajo (0.199), y la población AR48 el valor más alto (0.272). Todas las poblaciones mostraron señales de cuellos de botella, dado que

los valores obtenidos fueron menores a 0.67, valor máximo para reportar un cuello de botella (Garza & Williamson, 2001).

Tabla 8. Índice M (Garza & Williamson, 2001) estimado para seis poblaciones de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana con cuatro marcadores de microsatélites.

Locus	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55	Media	D.E.
Ab07	0.347	0.347	0.286	0.367	0.265	0.306	0.320	0.040
Ab12	0.262	0.215	0.185	0.231	0.200	0.277	0.228	0.036
Ab20	0.246	0.180	0.246	0.295	0.213	0.328	0.251	0.054
Ab27	0.109	0.109	0.118	0.193	0.118	0.109	0.126	0.033
Media	0.241	0.213	0.208	0.272	0.199	0.255	0.231	0.029
D.E.	0.098	0.100	0.073	0.076	0.061	0.099	0.085	0.017

D.E., desviación estándar.

El análisis de cuello de botella realizado con Bottleneck (Cournet & Luikart, 1996) bajo el modelo de mutación TPM (de dos fases) no detectó un exceso significativo de heterocigotos ($p < 0.05$) en ninguna de las poblaciones, lo que contradice el análisis anterior al no encontrarse indicios de cuello de botella.

6.2. Estructura genética

Los valores de diferenciación genética promedio dentro y entre poblaciones fueron ligeramente mayores para las poblaciones de *A. flinckii* que para las de *A. religiosa*, aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). Los estimados de diferenciación dentro de las poblaciones (F_{IS}) y de diferenciación total (F_{IT}) fueron altos para la mayoría de los loci en las dos especies.

Los valores de F_{ST} promedio obtenidos en todos los loci fueron bajos para las dos especies. Sin embargo, los valores promedio de G'_{ST} y D_{EST} fueron relativamente altos para las dos especies. Estos últimos tienen la ventaja de no depender de la cantidad de diversidad genética en los loci analizados, por lo que se les considera más adecuados que F_{ST} ya que exhiben los niveles reales de diferenciación genética entre poblaciones (Heller & Siegismund, 2009).

Tabla 9. Índices de fijación de Wright según Weir y Cockerham (1984) y estimados de G'_{ST} (Hedrick, 2005) y D_{EST} (Jost, 2008) para cuatro microsatélites en dos especies de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana por locus.

	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G'_{ST}	D_{EST}
<i>A. flinckii</i>					
Ab07	0.148	0.153	0.006	0.118	0.113
Ab12	0.095	0.171	0.084	0.805	0.795
Ab20	0.219	0.267	0.062	0.736	0.727
Ab27	0.338	0.353	0.021	0.263	0.252
Todos los loci	0.200	0.235	0.044	0.481	Ñ= 0.310
<i>A. religiosa</i>					
Ab07	0.258	0.267	0.012	0.278	0.267
Ab12	0.184	0.187	0.003	0.083	0.078
Ab20	0.004	0.042	0.039	0.453	0.436
Ab27	0.318	0.339	0.031	0.482	0.466
Todos los loci	0.192	0.209	0.021	0.324	Ñ= 0.235

La **Tabla 10** muestra los valores de diferenciación pareados entre poblaciones para F_{ST} , R_{ST} y D_{EST} . La mayoría de las poblaciones exhibieron valores de diferenciación pareados altos y significativos para D_{EST} , y más bajos para R_{ST} . Las poblaciones de *A. flinckii* presentaron valores de diferenciación genética pareados más altos que las poblaciones de *A. religiosa* entre sí para todos los estimados. Las poblaciones más diferenciadas entre sí en *A. religiosa* fueron AR53 y AR55. La población AF18 mostró el mayor grado de

diferenciación con todas las poblaciones, y presentó el valor más bajo con la población AF14. En cambio, la población AF14 se diferenció menos de las poblaciones de *A. religiosa*, que de AF18.

Tabla 10. Diferenciación genética entre seis poblaciones de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana a partir de marcadores microsatelitales.

	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55
AF14		0.310	0.195	0.204	0.157	0.248
AF18	0.049 (0.386)		0.540	0.473	0.660	0.370
AR22	0.032 (0.009)	0.068 (0.263)		0.108	0.249	0.229
AR48	0.017 (0.045)	0.058 (0.337)	0.017 * (0.019)		0.177	0.248
AR53	0.031 (0.181)	0.079 (0.545)	0.037 (0.060)*	0.023 * (0.105)		0.285
AR55	0.032 (0.062)*	0.047 (0.274)	0.030 (-0.008)	0.023 (0.013)	0.030. (0.123)	

Debajo de la diagonal valores de F_{ST} y (R_{ST}) y arriba de la diagonal valores de D_{EST} . Valores significativos ($p < 0.01$, * $p < 0.05$) excepto valores en negritas.

El AMOVA realizado para todas las poblaciones a partir de F_{ST} mostró que la mayor fuente de variación se encuentra entre individuos (77.8%), mientras que solo un 3.4% de la variación total es explicada por la diferenciación entre poblaciones. Los valores a partir de R_{ST} mostraron un valor elevado en la diferenciación entre individuos dentro de las poblaciones (37.5%), aunque la mayor fuente de variación se encuentra entre todos los individuos (46.6%). El AMOVA realizado considerando dos grupos distintos (*A. flinckii* y *A. religiosa*) presentó resultados similares. Sin embargo, la variación entre individuos dentro de las especies muestra un porcentaje relativamente elevado (20.5%). Los valores de R_{ST} obtenidos con esta partición exhibieron porcentajes elevados en la variación entre los

individuos dentro de las especies (44.1%) y entre todos los individuos (44.9%). El porcentaje de variación entre poblaciones fue mayor al porcentaje de variación entre especies (**Tabla 11**).

Tabla 11. Porcentaje de variación e índices de fijación a partir del Análisis Molecular de Varianza AMOVA tomando en cuenta 6 poblaciones geográficamente diferenciadas de dos especies de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana: *A. religiosa* y *A. flinckii*, y dos grupos distintos: uno incluyendo las poblaciones de *A. flinckii* y el otro a las poblaciones de *A. religiosa*.

Fuente de variación	g.l.	% de variación		Índices de fijación	
		F_{ST}	R_{ST}	Estadístico F	Estadístico R
Entre poblaciones	5	3.40	15.88	$F_{IS} = 0.195$	$F_{IS} = 0.446$
Entre individuos dentro de las pob.	115	18.80	37.55	$F_{ST} = 0.034$	$F_{ST} = 0.159$
Todos los individuos entre sí	121	77.81	46.57	$F_{IT} = 0.222$	$F_{IT} = 0.534$
Entre especies	1	2.21	10.90	$F_{IS} = 0.210$	$F_{IS} = 0.495$
Entre individuos dentro de las especies	119	20.50	44.14	$F_{ST} = 0.022$	$F_{ST} = 0.109$
Todos los individuos entre sí	121	77.29	44.96	$F_{IT} = 0.227$	$F_{IT} = 0.550$

g.l., grados de libertad. Todos los valores son significativos ($p < 0.01$).

Al realizar la prueba de Mantel no se encontró aislamiento por distancia en poblaciones de *A. religiosa* ($r^2 = -0.213$, $p = 0.839$), ni entre el total de las poblaciones ($r^2 = 0.264$, $p = 0.172$) (**Figura 7 y Anexo 6**).

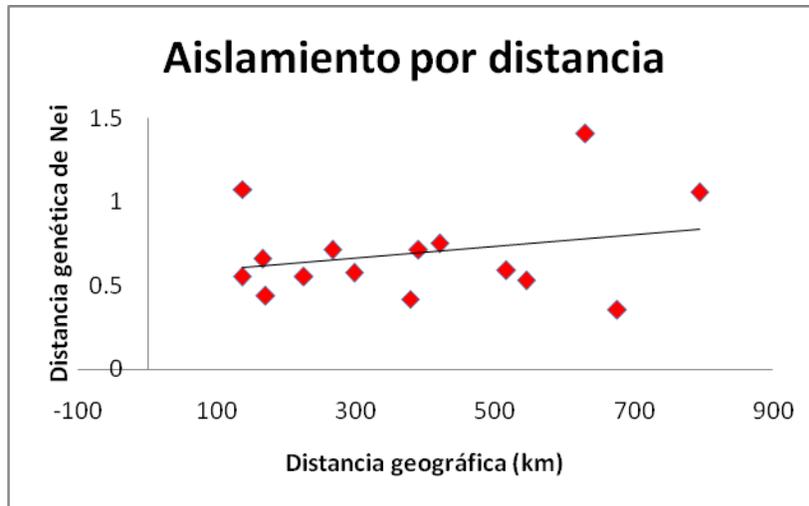


Figura 7. Prueba de Mantel de aislamiento por distancia entre seis poblaciones de dos especies de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana.

En el dendrograma tipo NJ obtenido no se observó la formación de grupos monofiléticos en las dos especies. La población AR55 exhibió mayor cercanía con las poblaciones de *A. flinckii* que con las de *A. religiosa*. Los niveles de confianza en las bifurcaciones de las ramas son bastante bajos, probablemente debido al número reducido de loci utilizados en este estudio. Sería necesario ampliar el número de microsatélites para obtener resultados filogenéticos más confiables (Figura 8)

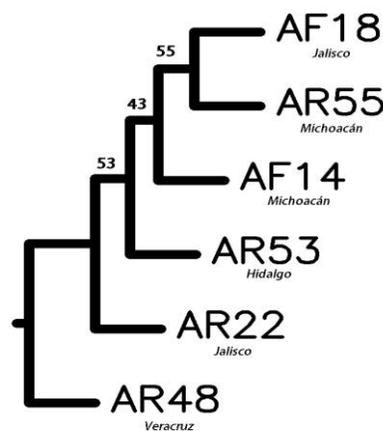


Figura 8. Dendrograma tipo *Neighbor Joining* basado en las distancias genéticas de Nei entre dos poblaciones de *A. flinckii* (AF) y cuatro poblaciones de *A. religiosa* (AR) en la Faja Volcánica Transmexicana. Los números representan los valores de *bootstrap*.

La detección de grupos genéticamente distintos fue realizada por dos métodos bayesianos implementados en los programas Structure y BAPS. El primero mostró que el valor más alto de probabilidad posterior logarítmica estaba en K=2 (**Tabla 12**), valor que fue corroborado por la prueba de Evanno et al. (2005) (**Figura 9B**).

Tabla 12. Promedio de simulaciones de probabilidad de distribución en k grupos de individuos de *A. religiosa* y *A. flinckii* en la Faja Volcánica Transmexicana. LnP(k) probabilidad logarítmica de la existencia de k grupos, α , valor de admixia.

K	LnP(K)	Var[LnP(K)]	α	F _{ST_1}	F _{ST_2}	F _{ST_3}	F _{ST_4}	F _{ST_5}	F _{ST_6}
1	-3010.05	49.03	-	0.00034	-	-	-	-	-
2	-2879.71	191.13	0.0488	0.03359	0.04832	-	-	-	-
3	-2950.89	504.8	0.0491	0.05045	0.05079	0.057	-	-	-
4	-3013.78	750.46	0.0486	0.05641	0.0653	0.03992	0.05093	-	-
5	-3093.28	1002.7	0.04817	0.06811	0.0609	0.0605	0.05536	0.06117	-
6	-3175.64	1240.26	0.04765	0.05872	0.07258	0.08105	0.06662	0.05473	0.07212

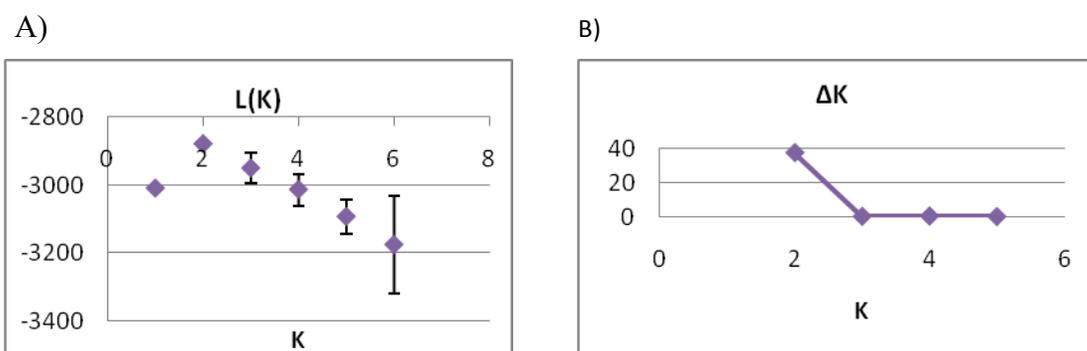


Figura 9. Prueba de Evanno et al. (2005) para conocer el número real de grupos genéticos en seis poblaciones de dos especies de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana.

A) Verosimilitud media L(K) (+/- D.E.) de 10 corridas para cada K. **B)** Media de los valores absolutos de L''(K) promedio de 10 corridas dividido por la desviación estándar de L(K). Δk es un estimado basado en la tasa de cambio de segundo orden de la función de verosimilitud con respecto a K.

La asignación probabilística de individuos para dos grupos colocó a la mayor parte de los individuos de las poblaciones AF14, AR22, AR48, AR53 y AR55 en un primer grupo, y a la mayor parte de los individuos de AF18 en el segundo grupo (**Figura 10**). AR14 y AR55 presentan un mayor número de individuos con alta probabilidad de ser el resultado de flujo génico con la población del otro grupo, esto también se ve reflejado en el dendrograma tipo NJ (**Figura 8**). De igual manera, en AF18, algunos individuos también serían el resultado de flujo génico con el otro grupo.

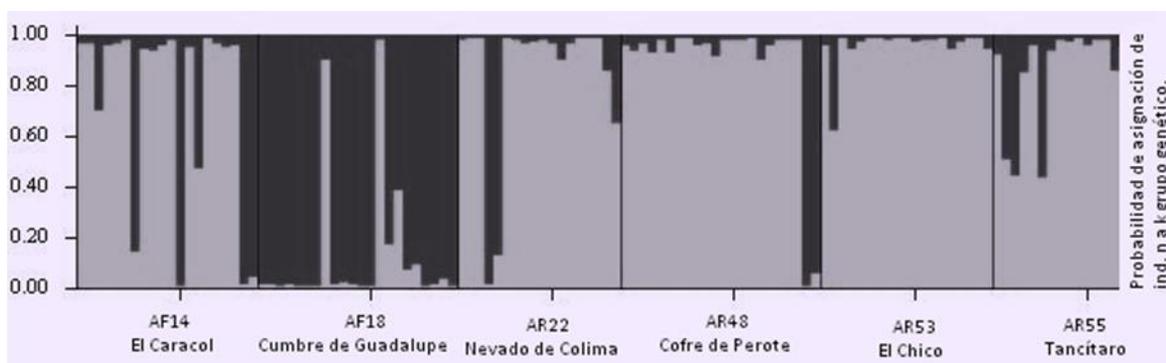


Figura 10. Probabilidad de asignación a $k=2$ grupos genéticos de cada individuo de dos poblaciones de *A. flinckii* (AF14 Y AF18) y cuatro poblaciones de *Abies religiosa* (AR22, AR48, AR53, AR55) analizadas en la Faja Volcánica Transmexicana a partir de loci microsatélites. Las líneas verticales representan un individuo y su probabilidad de asignación según Structure.

En el análisis de mixture en BAPS el valor más alto de probabilidad posterior logarítmica obtenido fue para $k=9$. Con este tipo de partición, todas las poblaciones de *A. religiosa* y la población AF18 conformaron un grupo genético, mientras que individuos de la población AF14 formaron los ocho grupos restantes, la mayoría sólo con dos individuos por grupo (**Figura 11**).

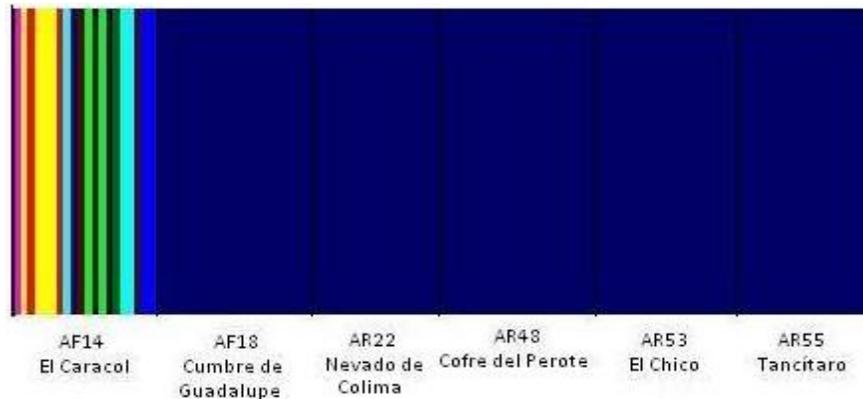


Figura 11. Gráfica de análisis espacial de mixture en BAPS a nivel individual para dos poblaciones de *A. flinckii* (AF14 Y AF18) y cuatro poblaciones de *Abies religiosa* (AR22, AR48, AR53, AR55) en la Faja Volcánica Transmexicana. Cada línea vertical representa a un individuo, y cada color representa un grupo genético distinto.

Dada la variabilidad en pertenencia de los individuos de AF14 en el análisis de mixture, se realizó un segundo análisis de admixia con cinco poblaciones predefinidas y tomando a los individuos de la población AF14 como de origen desconocido. En este análisis se obtuvo que la mayoría de los individuos de AF14 tienen genotipos mezclados, muchos con alta probabilidad de pertenecer a AF18 y a AR48 (**Figura 12**).



Figura 12. Gráfica de análisis de admixia para dos especies de *Abies* en la Faja Volcánica Transmexicana con 5 poblaciones pre definidas y los individuos de AF14 como de origen desconocido. Cada línea vertical representa un individuo y su probabilidad de asignación a una población.

Además de los dos métodos bayesianos anteriores, se realizó un análisis de detección de grupos genéticos en el programa SAMOVA. Este análisis es similar al AMOVA realizado anteriormente, sin embargo toma en cuenta la localización geográfica de las poblaciones e identifica barreras genéticas. El valor más alto de F_{CT} obtenido en el análisis de SAMOVA es el que corresponde a $k=2$ ($F_{CT}=0.26104$). La agrupación consistió en un grupo integrado por las poblaciones de *A. religiosa* y AF14, y otro grupo conformado únicamente por AF18.

7. DISCUSIÓN

7.1. Diversidad genética

Los valores de diversidad genética fueron altos tanto para *A. religiosa* como para *A. flinckii* ($A=14.9$, $na=15.5$, $Ho=0.747$, $He_{Nei}=0.895$ y $A=13.8$, $na=14.6$, $Ho=0.729$, $He_{Nei}=0.883$, respectivamente), tal como se esperaría en árboles perennes de larga vida con entrecruzamiento y dispersión por viento (Nybom, 2004), y considerando que son microsatélites. *Abies religiosa* mostró valores de diversidad incluso más altos a los reportados para microsatélites en coníferas con distribuciones continuas, por ejemplo en *Larix occidentalis* ($na=5.5$, $Ho=0.521$, $He=0.580$; Khasa et al. 2006) en Canadá, o *Pinus taeda* ($na=10.8$, $Ho=0.55$, $He=0.679$; Al-Rabab'ah et al. 2002) en el sur de Estados Unidos. Así, no es sorprendente que los valores de diversidad encontrados para *A. flinckii* fueron notablemente mayores a los reportados para microsatélites en coníferas con distribuciones restringidas, como es el caso de *Abies fraseri* ($A=4.4$, $na=5.52$, $Ho=0.341$, $He=0.442$; Potter et al. 2008) en los Montes Apalaches, *Larix lyalli* ($na=3.6$, $Ho=0.389$, $He=0.418$; Khasa et al. 2006) en el oeste de Norte América o *Abies ziyuanensis* ($Ho=0.319$, $He=0.337$; Tang et al. 2008) en el sur de China.

Los valores obtenidos en *A. religiosa* y *A. flinckii* son similares a los encontrados con microsatélites en *Pinus oocarpa* ($A=11.9$, $He=0.711$; Dvorak et al. 2009) que presenta una distribución continua en el centro de México, y en *A. guatemalensis*, que a pesar de tener una distribución restringida a manchones en México y Centro América, presenta valores de heterocigosis observada y esperada bastante elevados, de 0.822 y 0.862, respectivamente (Rasmussen et al. 2010). Estudios previos de diversidad genética con isoenzimas realizados en México y Centro América han mostrado que en su mayoría, las coníferas tienen niveles elevados de diversidad comparados con coníferas de otras partes

del mundo, aun cuando sus poblaciones se encuentren fragmentadas (ej. Delgado et al. 1999, Ledig et al. 2002).

Dentro de *A. religiosa*, la población más oriental (AR48), mostró niveles de diversidad genética más altos que cualquier otra población, sobre todo en cuanto a alelos privados y riqueza alélica ($p=8$, $A=16.9$), en consecuencia, los estimados de θ sugieren que esta población tiene un tamaño efectivo mayor. Si suponemos que *A. religiosa* representa una ola migratoria que entró a México por el este, vía la Sierra Madre Oriental, y a partir de allí colonizó las partes centrales del país (Jaramillo-Correa et al. 2008), se esperaría que áreas cercanas a las primeras colonizaciones presentaran mayores niveles de diversidad genética, como por ejemplo la zona donde se encuentra AR48. De esta forma, las demás poblaciones analizadas podrían representar colonizaciones posteriores, tal como se ha sugerido para otras coníferas con historias de colonización similares (ej. Potter et al. 2008). En las poblaciones de *A. flinckii*, AF18 mostró valores de diversidad más bajos que AF14. Es probable que la primera población esté más afectada por deriva génica y aislamiento (menor flujo génico) que la segunda. Esta hipótesis está fomentada por los estimados de tamaño efectivo poblacional, donde AF18 presentó un valor más bajo que AF14.

Contrario a lo esperado, los valores de diversidad en *A. flinckii* no fueron significativamente distintos a los encontrados en *A. religiosa* ($p>0.05$). Normalmente especies con distribuciones restringidas muestran valores de diversidad genética más bajos a los encontrados en especies con distribuciones continuas (Nybom, 2004). Una posible explicación a esta falta de diferencia puede ser el tamaño de muestra en este estudio que pudo no haber permitido asignar significancia a la diferencia en los niveles de diversidad entre las dos especies. Sin embargo, altos niveles de diversidad genética han sido encontrados en plantas con distribuciones restringidas (Richter et al. 1994; Zawko et al. 2001; González-Astorga & Castillo-Campos, 2004), y existen diversos factores que pueden contribuir a los altos niveles de diversidad en estas especies que van desde

especiación reciente de una especie ancestral con amplia distribución, hasta el sistema de apareamiento y tipo de dispersión (Maguirre & Sedgley, 1997; Xue et al. 2004). En este caso, los altos niveles de variación genética en *A. flinckii* pueden deberse a que las poblaciones actuales sean remanentes de poblaciones ancestrales grandes que recientemente experimentaron una reducción de tamaño. Los largos tiempos generacionales y la capacidad de dispersión del polen y las semillas por viento de esta especie pueden haber retrasado la pérdida de variabilidad genética que se esperaría bajo deriva génica en una población reducida. Por lo tanto, es posible que no haya pasado suficiente tiempo desde su fragmentación para que la especie exhiba los síntomas genéticos esperados después de una reducción en su tamaño poblacional (Ranker, 1994; Zawko et al. 2001).

Esta hipótesis es apoyada por los niveles de endogamia encontrados en las poblaciones. Todos los loci se encontraron en desequilibrio de H-W por déficit de heterocigos en la mayoría de las poblaciones de las dos especies (excepto Ab07 en *A. flinckii* y Ab20 en *A. Religiosa*). Los valores de F_{IS} por especie son similares, positivos, y mucho más altos que los de *A. guatemalensis*, una especie cercana analizada con los mismos microsatélites que en este estudio ($F_{IS}=0.047$). Dado que la proporción de alelos nulos obtenidos no afecta los valores de estructura genética en ningún locus ($p>0.05$) y que los individuos muestreados fueron árboles adultos [los valores de endogamia tienden a disminuir con la edad (Potter et al. 2008)], el déficit significativo de heterocigos sugiere la presencia de endogamia en todas las poblaciones analizadas. Varias especies de *Abies* ya han mostrado un déficit de heterocigos similar al reportado aquí, como es el caso de *A. fraseri* ($F_{IS}=0.285$; Potter et al. 2008) y *A. ziguaguensis* ($F_{IS}=0.259$; Tang et al. 2008).

Estos niveles de endogamia, combinados con los altos niveles de diversidad genética encontrados en las poblaciones indican que las especies han tenido grandes tamaños efectivos poblacionales históricos, pero sufrieron una reducción reciente probablemente combinada con una disminución en el flujo génico que ha fomentado la endogamia. De hecho, los efectos a corto plazo de la endogamia afectan al patrón de diversidad pero no a la cantidad de diversidad genética (Charlesworth, 2003), lo que

concuera con nuestras observaciones. Sin embargo, es probable que con el tiempo la diversidad genética también comience a disminuir.

Por otro lado, es posible que aún exista o haya existido recientemente flujo génico entre *A. flinckii* y *A. religiosa*, dada su divergencia probablemente reciente (Aguirre-Planter et al. 2012), y la historia de expansión y fragmentación de sus poblaciones en los ciclos glaciales e interglaciales en las que pudieron entrar en contacto y tener intercambio genético (Aguirre-Planter et al. 2000). Esto pudo haber permitido la introducción de nueva variación a las poblaciones de *A. flinckii*, aumentando así los niveles de diversidad genética en esta especie.

Para poder comprender con mayor profundidad los patrones de diversidad genética encontrada en las poblaciones analizadas e inferir si la fragmentación y reducción en los tamaños efectivos poblacionales y/o el flujo génico interespecífico reciente han estado involucrados en moldear su variación, es necesario investigar la historia biogeográfica de las dos especies en conjunto. Esto puede realizarse a partir del análisis multilocus de modelos de aislamiento con migración (Hey & Nielsen, 2004), que permiten obtener estimados de los tamaños efectivos poblacionales a largo plazo, patrones de crecimiento poblacional, y tasas de flujo génico histórico entre las especies (Strasburg & Rieseberg, 2008; Li et al. 2012; Wachowiak et al. 2011). La poca certidumbre en los mecanismos y tasas de mutación de los microsatélites vuelve complicado el análisis con estos marcadores al obtener un gran margen de error en los estimados, por lo que normalmente se utilizan secuencias de genes nucleares en conjunto con marcadores de mtADN y cpADN (Marko & Hart, 2011).

Una disminución en el tamaño efectivo de las poblaciones por cuellos de botella fue sugerida con la prueba M (Garza & Williamson 2001), pero no se detectaron señales de cuello de botella con la prueba de exceso de heterócigos (Cournet & Luikart, 1996). La prueba de M permite inferir cuellos de botella más antiguos que la prueba de exceso de heterócigos, debido a que se espera que el exceso de heterocigosis dado el número de alelos observados alcance el equilibrio mutación-deriva más rápido que la razón entre el

número de alelos y el rango de tamaño alélico en los loci analizados (Garza & Williamson, 2001). Dado que la historia de los *Abies* en México implica varias fragmentaciones y expansiones en el Pleistoceno y en el Holoceno, puede ser que la prueba de *M* haya detectado un cuello de botella ocurrido durante el anterior interglacial en el Pleistoceno medio (hace 130,000-114,000 años), que se estima fue más intenso que el presente interglacial (Hewit, 2000). Por otro lado, la probabilidad de no detectar cuellos de botella en estas pruebas aumenta significativamente con tamaños de muestra pequeños (Peery et al. 2012). De hecho, el poder estadístico de detectar un cuello de botella aumenta considerablemente cuando la muestra incluye más de 100 individuos y 16 loci, mientras que el poder estadístico de ambas pruebas siempre será muy bajo cuando el cuello de botella fue moderado (Peery et al. 2012). En este caso se utilizaron únicamente 4 loci y 19-22 individuos para el análisis, y los niveles de diversidad genética encontrados en las poblaciones fueron bastante altos, lo que podría significar que los cuellos de botella experimentados por las poblaciones no han sido severos y que sería necesario tener un muestreo mucho más intenso, en términos del número de loci, para detectarlos. Además, se podrían realizar pruebas de inferencias de coalescencia como el *Skyline Plot* Bayesiano que reconstruye la historia demográfica de las poblaciones por medio de la estimación de los tamaños efectivos de las poblaciones en el tiempo (Drummond et al. 2005) o la Computación Bayesiana Aproximada (ABC) que simula diferentes escenarios demográficos históricos y se elige aquel que corresponda mejor con los datos genéticos observados (Bertorelle et al. 2010). Sin embargo, estos análisis requieren de un mayor número de loci para obtener resultados confiables sobre la historia demográfica de las especies. Realizarlos con únicamente cuatro loci microsatelitales arrojaría un alto grado de incertidumbre en las distribuciones de las probabilidades posteriores en los estimados de tamaño efectivo poblacional en el tiempo, y por lo tanto no serían informativos.

Las pruebas aquí utilizadas también son sensibles a la cantidad de diversidad genética que existía antes del cuello de botella. Por ejemplo, la prueba de *M* tiene mayor poder estadístico cuando esta diversidad era alta, mientras que la prueba de exceso de heterocigos pierde poder estadístico en estas circunstancias (Peery et al. 2012). Dada la

historia de poblaciones continuas en los máximos glaciales del Pleistoceno y la cantidad de diversidad observada actualmente en las especies de *Abies* analizadas, es probable que las poblaciones tuvieran altos niveles de diversidad genética antes de la reducción en sus tamaños poblacionales en el Holoceno. Factores que pudieron afectar el poder estadístico de la prueba de exceso de heterocigotos.

7.2. Estructura poblacional

Los valores promedio de F_{ST} obtenidos para las dos especies parecen indicar niveles bajos de diferenciación poblacional (0.021 para *A. religiosa*, 0.044 para *A. flinckii*). Sin embargo, es bien conocido que los valores de F_{ST} subestiman la diferenciación genética, sobre todo cuando los loci analizados son muy polimórficos (como es el caso de los microsatélites) y cuando estos muestran valores altos de diversidad dentro de las poblaciones (como sucede en las poblaciones analizadas; Heller & Siegismund, 2009). En este caso, los estimados como G'_{ST} y D_{EST} son medidas apropiadas de diferenciación poblacional, ya que no están correlacionados con la diversidad genética que existe dentro de las poblaciones. Las dos especies mostraron valores altos de G'_{ST} y D_{EST} promedio (0.481 y 0.310 para *A. flinckii*, y 0.324 y 0.235 para *A. religiosa*), comparados con los valores obtenidos para coníferas con distribuciones continuas (*Larix occidentalis*, $G'_{ST}=0.133$, $D_{EST}=0.085$) y con distribuciones restringidas (*Larix lyalli*, $G'_{ST}=0.264$, $D_{EST}=0.134$) en Norte América (Khasa et al. 2008). Estos altos niveles de diferenciación poblacional son consistentes con los encontrados con isoenzimas para las dos especies (Aguirre-Planter et al. 2000).

En México, las poblaciones de coníferas suelen mostrar niveles de diferenciación más altos a los encontrados en coníferas de Norte América, tal vez debido a la topografía y

al clima asociado que mantiene a las poblaciones separadas por muchos kilómetros y restringe la migración, y a la historia demográfica compleja que han experimentado en el pasado reciente (Ledig et al. 2000). En el AMOVA realizado con base en R_{ST} para todas las poblaciones se obtuvo que un 15% de la variación total se encuentra entre poblaciones. Esto es más o menos consistente con lo encontrado con isoenzimas para siete coníferas de México y Centro América, donde la diferenciación genética promedio entre poblaciones fue del 17% de la diversidad total. En cambio, en Norte América fue de 7.6% en *Pinus* y 4.7% en *Abies* (Ledig et al., 2000). Dichos niveles de diferenciación poblacional elevados también han sido encontrados en especies de coníferas co-distribuidas con los *Abies* en México, como *Quercus affinis* y *Q. laurina* en el centro y sur de México ($G_{ST}=0.499$; González-Rodríguez, 2004), y *Pseudotsuga mensiezii* en el norte y centro del país ($R_{ST}=0.32$; Gugger et al. 2011). Estos valores tan altos sugieren que las poblaciones están sujetas a deriva génica y a niveles limitados de flujo génico. De hecho, los estudios realizados en *A. religiosa* y *A. flinckii* con isoenzimas y marcadores citoplásmicos encontraron bajos valores de migrantes por generación (1.6 a 2.67 y 0.41 a 2.13, respectivamente), concordando con los resultados obtenidos en este estudio (Aguirre-Planter et al. 2000; Jaramillo-Correa, et al. 2008).

Cuando se compararon las poblaciones de ambas especies, se observó que la población AF18 de *A. flinckii* presentó valores de diferenciación genética pareados más altos con las poblaciones de *A. religiosa* que la población AF14, y que las poblaciones de *A. religiosa* entre sí. Sin embargo, inicialmente se esperaba encontrar niveles de diferenciación mayores entre especies que entre poblaciones dentro de la misma especie, como sucede con AF18. El efecto de AF14 es notorio en los AMOVAS realizados para todas las poblaciones y para las dos especies, donde un mayor porcentaje de la variación es explicado por diferencias entre poblaciones (3.4 y 15.8%), que por diferencias entre especies (2.21 y 10.90%), tanto para F_{ST} como para R_{ST} . Esto puede deberse a que AF14 es una población relativamente central y podría presentar niveles de flujo génico más altos con poblaciones cercanas, lo que le ayudaría a mantener un mayor tamaño efectivo y un gran número de polimorfismos ancestrales compartidos con las poblaciones de *A.*

religiosa. Tamaños poblacionales grandes podrían retardar la fijación de alelos y favorecerían su persistencia en las poblaciones (Kimura & Ohta, 1969). Igualmente, la población AF14 se encuentra muy cerca de varias poblaciones de *A. religiosa* en Michoacán. Los resultados de admixia en BAPS tomando a los individuos de AF14 como de origen desconocido indican un alto flujo génico entre especies en esta zona, dado que la mayoría de los individuos de esta población exhibieron genotipos intermedios entre las poblaciones de *A. religiosa* y AF18. La hibridación entre especies cercanamente relacionadas ha sido documentada en especies de coníferas (Perron et al. 2003; Edwards-Burke, et al 1997) y en *Abies* en Norte América (Critchfield, 1988) y Asia (Isoda & Shiraishi, 2001). En la distribución actual de las especies analizadas, dos poblaciones de *A. religiosa* y *A. flinckii* se desarrollan en la misma zona en la Sierra de Manantlán. Los árboles representantes de cada especie difieren significativamente en su morfología y fenología (Aguirre-Planter et al. 2000), y presentan diferentes clorotipos (Jaramillo-Correa et al. 2008), lo que podría sugerir que se encuentran parcialmente aislados reproductivamente. En este estudio no se analizaron estas poblaciones, pero nuestros resultados indican que ha habido introgresión genética incluso fuera de esta zona. Para poder cuantificar estos niveles de introgresión se requeriría analizar un mayor número de loci de microsatélites (u otros marcadores altamente polimórficos, como los AFLP's) y más poblaciones de cada especie, incluyendo las que se encuentran en la zona de contacto, junto a análisis bayesianos para catalogar probabilísticamente a los individuos en diferentes clases genotípicas (ver por ej. Peñaloza-Ramírez et al. 2010). También sería necesario realizar cruza controladas entre individuos de las dos especies para comprobar si existe aislamiento reproductivo (Kormuták et al. 2012; Koblíha et al. 2013).

Otra razón para la cantidad de polimorfismos compartidos entre AF14 y las poblaciones de *A. religiosa* puede ser por homoplasia de tamaño de fragmento, lo que impide distinguir entre alelos idénticos por estado pero no por descendencia. Si se asume el modelo de mutación de paso a paso (SMM) en donde la homoplasia es esperada, se podría calcular el índice de homoplasia de tamaño entre poblaciones. Sin embargo, para conocer este índice se debe tener claridad sobre los valores de tamaños efectivos

poblacionales, las tasas de mutación de los microsatélites y el tiempo de divergencia de las poblaciones, además de que se debe de estar seguro que los microsatélites se adaptan al modelo de mutación SMM (Estoup et al. 2002). Desafortunadamente, estos factores son desconocidos para los marcadores utilizados en este estudio.

Los valores de diferenciación genética en las poblaciones de *A. religiosa* no mostraron un patrón de aislamiento por distancia. La falta de estructuración geográfica puede deberse a flujo génico a larga distancia entre todas las poblaciones, o a que algunas poblaciones han sufrido expansiones o reducciones en sus tamaños poblacionales, por lo que no están en equilibrio migración-deriva génica y la diferenciación genética que existe entre las poblaciones no depende únicamente de la distancia geográfica entre ellas. Las señales de cuellos de botella ancestrales obtenidos por la prueba de M (Garza & Williamson, 2001) respaldan esta suposición.

7.3. Detección de grupos genéticos y delimitación de especies.

La definición de grupos genéticos se llevó a cabo a partir de los resultados obtenidos en Structure y en SAMOVA, dado que presentan mayor congruencia biológica que los resultados de BAPS, que dividió a los individuos de la población AF14 en varios grupos independientes, algunos con no más de 2 individuos. Además, el análisis de Structure exhibió mayor significancia estadística que BAPS, ya que se obtuvo una probabilidad posterior de encontrar k grupos genéticos más alta que la obtenida en BAPS. Los análisis de Structure y SAMOVA no mostraron una clara separación entre las dos especies analizadas. Se obtuvieron dos grupos genéticos diferentes, agrupando a las poblaciones de *A. religiosa* y AF14 en un grupo, y a la población AF18 en otro. Esto podría indicar que todas las poblaciones pertenecen a la misma especie y que AF18 haya tenido altos niveles de deriva génica que la ha diferenciado de las demás por aislamiento geográfico. Esto vendría a complementar la filogenia obtenida por Aguirre-Planter et al.

(2012), que tampoco mostró una clara separación taxonómica entre las especies de *Abies* en Mesoamérica, incluyendo a *A. flinckii* y *A. religiosa*, dado que las poblaciones analizadas no formaron grupos monofiléticos. Sin embargo, los estudios realizados con isoenzimas y marcadores citoplasmáticos (Aguirre-Planter et al. 2000; Jaramillo-Correa et al. 2008) obtuvieron diferencias genéticas significativas entre *A. flinckii* y los demás taxa. Tomando en cuenta los resultados de este último análisis, en este estudio también se encontraron diferencias genéticas entre los dos taxa, aunque una de las poblaciones de *A. flinckii* exhibió genotipos intermedios, dados los polimorfismos compartidos con *A. religiosa*. La discusión taxonómica a nivel morfológico en estas dos especies tampoco está resuelta. Algunos autores consideran a *A. flinckii* una variedad de *A. guatemalensis* y *A. religiosa* dadas las similitudes que presentan (Liu, 1971; Farjón, 1999), mientras que otros la catalogan como una especie distinta principalmente por las diferencias en tamaño de los conos de semilla y por la diferencia temporal en su crecimiento vegetativo (Rushford, 1989; Aguirre-Planter et al., 2000).

El concepto de especie varía dependiendo de la definición que se utilice para delimitarla. En el proceso de especiación, los linajes pueden mostrar propiedades que se ajusten a una u otra definición que aportan evidencia de su separación y divergencia como especies distintas. Se ha sugerido que solo cuando la divergencia cumple la mayoría de las propiedades esperadas bajo la mayor parte de las definiciones, se encontrará consenso en la separación como especies distintas (De Queiroz, 2007). Los *Abies* y muchos otros grupos de coníferas muestran bajas tasas de diversificación debido a sus características de historia de vida (Mao et al. 2010; Buschiazzi et al. 2012; Aguirre-Planter et al. 2012), y puede ser que no haya pasado suficiente tiempo para diferenciarse completamente dado el mantenimiento de polimorfismos ancestrales por grandes tamaños efectivos históricos y/o a la posibilidad de flujo génico interespecífico, así como los tiempos generacionales largos que han impedido la formación de grupos monofiléticos (Aguirre-Planter et al. 2012).

La divergencia probablemente reciente y la posibilidad de hibridación en estas dos especies complican la labor de encontrar un patrón genético divergente entre ellas. La

inclusión futura de un mayor número de poblaciones del oeste y centro de la Faja Volcánica Transmexicana sobre todo de *A. flinckii*, y de un mayor número de loci para realizar un muestreo filogeográfico completo serán importantes. Sin embargo, existen otros métodos que pueden utilizarse para esta tarea. Una forma de delimitar especies que divergieron recientemente y aún comparten muchos polimorfismos ancestrales es utilizar métodos de coalescencia para modelar probabilísticamente la relación entre los árboles genéticos de cada locus analizado y la historia de las especies bajo diferentes modelos evolutivos, por ejemplo, uno asumiendo que son especies separadas, y otro que es solo una especie. Este método puede mostrar la delimitación de especies a pesar del arreglo de linajes incompletos (Knowles & Carstens, 2007). Sin embargo, este análisis es muy sensible a la cantidad de loci utilizados. Requiere un número mayor de loci (alrededor de ocho) para reducir la tasa de error de falsos negativos y aumentar la precisión en la delimitación de las especies. Además, sería conveniente utilizar también marcadores citoplasmáticos, dada su herencia uniparental, que permite una mayor profundidad en el árbol filogenético de las especies por menores tamaños efectivos poblacionales (Knowles & Carstens, 2007).

Otro uno de los métodos más eficientes hasta ahora para delimitar especies cercanamente relacionadas, y lograr diferenciar entre polimorfismos ancestrales compartidos y flujo génico interespecífico, es la secuenciación de siguiente generación o secuenciación de corta lectura. Consiste en un escaneo genómico de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que permite comparar la proporción y distribución de alelos fijos y alelos variables entre especies. Las regiones cromosómicas que muestran alta divergencia entre especies pueden indicar “continentes o islas” de especiación, mientras que las regiones con poca divergencia son indicadores de polimorfismos ancestrales compartidos o de flujo génico reciente (Stölting et al. 2013). Se espera que esta última causa de alelos compartidos resulte en bloques de material genético en desequilibrio de ligamiento de una especie embebidos en el genoma de la otra especie, mientras que los polimorfismos ancestrales compartidos exhiban un patrón más esporádico de alelos compartidos en los cromosomas (Stölting et al. 2013).

Para llevar a cabo el análisis descrito en el párrafo anterior en las dos especies de *Abies*, habría que muestrear y realizar el escaneo genómico en pocos genotipos puros de ambas especies en los que no se hubiera encontrado admixia reciente. En este estudio se encontraron varios individuos que podrían utilizarse para este fin, sobre todo en las poblaciones AR53 y AF18. Además, a partir de la secuenciación de siguiente generación también se pueden obtener y ensamblar *de novo* o a partir de un genoma de referencia transcriptomas de las dos especies que permitan determinar el grado de divergencia nucleotídica en regiones codificantes de su genoma (Chelaifa et al. 2009; Martin et al. 2011; Roschanski et al. 2013)

7.4. Implicaciones en la conservación.

Además de los cambios climáticos del pasado, los *Abies* en México han estado sujetos a las actividades económicas de la población humana, incluyendo la deforestación y la explotación del suelo, las cuales han fomentado el aislamiento de sus poblaciones en alta montaña (Norton, 1986; Sánchez-González et al. 2005; Figueroa-Rangel et al. 2008). Esto es particularmente pronunciado en la Faja Volcánica Transmexicana, debido a su compleja topografía y a la alta densidad de población que albergan los estados en esta zona (alrededor de 61, 387, 181 habitantes, el 54.6% de la población total del país; INEGI). Las poblaciones de *Abies* en la zona presentan mayor diferenciación genética que en otras partes de su distribución en México, tanto en isoenzimas, como en marcadores citoplásmicos (Aguirre-Planter et al. 2000; Jaramillo-Correa et al. 2008). En este estudio también se observaron poblaciones altamente diferenciadas genéticamente entre sí. Esto representa una dificultad en términos de conservación dada la necesidad de preservar el mayor número de poblaciones posibles para abarcar la mayor cantidad de diversidad genética.

A pesar de que los límites taxonómicos no están completamente definidos aún, las evidencias de divergencia genética y morfológica entre las poblaciones analizadas de *A. religiosa* y *A. flinckii* en este y otros estudios (Rushford, 1989; Aguirre-Planter et al. 2000; Jaramillo-Correa et al. 2008; Aguirre-Planter et al. 2012) indican que es necesario tratarlas de forma independiente para su conservación. Dado que *A. flinckii* está representada por pocas poblaciones en la Faja Volcánica Transmexicana y que las dos poblaciones analizadas en este estudio exhibieron altos niveles de diferenciación genética, la conservación de estas poblaciones es de gran importancia para preservar su potencial evolutivo. Por ejemplo, la población AF18 se encuentra aislada en Cumbre de Guadalupe, Jalisco, en la periferia de la distribución de la especie y con riesgo de pérdida de diversidad. En este caso no solo sería necesaria la conservación *in situ* de la población, sino la implementación de medidas de conservación *ex situ*, a través de bancos de semilla con el propósito de almacenar y preservar su diversidad genética, y plantaciones forestales con uso comercial y como auxiliares en la rehabilitación *in situ* (Ledig, 1988; Guerrant et al. 2004). Por otro lado, AF14 exhibió altos niveles de diversidad genética y es una población que está probablemente intercambiando genes con las poblaciones de *A. religiosa* cercanas, por lo que podría ser una fuente de variación única con capacidades diferentes de resistencia a presiones ambientales. La hibridación en plantas tiene un papel importante como herramienta evolutiva. Por ejemplo, linajes con una historia de hibridación pueden exhibir altos niveles de diversidad genética, dada la introducción de esta variación por introgresión, que además remodela la arquitectura genética de los individuos híbridos. Este aumento en la diversidad genética y la nueva combinación de genes puede promover el desarrollo y adquisición de nuevas adaptaciones, y la posibilidad de diversificación por colonización de nuevos nichos ecológicos (Rieseberg et al. 2003; Mallet et al. 2007)

Las poblaciones de *A. religiosa* analizadas en este estudio mostraron en general alta diversidad genética intrapoblacional. Esta especie está representada por un mayor número de poblaciones distribuidas de forma más continua en la Faja Volcánica Transmexicana. Los resultados obtenidos indican que la población AR48 localizada en

Cofre de Perote, Veracruz, debe tener prioridad en conservación, debido a la alta diversidad genética que presenta. Por otro lado, la población AR55 en Tancítaro, Michoacán, también exhibió altos niveles de variabilidad genética entre sus individuos y mostró relativamente alta diferenciación genética con las otras poblaciones de *A. religiosa*, por lo que esta población también debe ser incluida en los planes de conservación con la intención de abarcar la mayor diversidad genética posible en esta especie.

Los altos niveles de endogamia encontrados en todas las poblaciones sugieren que la diversidad genética puede disminuir con el tiempo, y por ende la habilidad de estas dos especies a responder a cambios ambientales. Además, las poblaciones corren el riesgo de enfrentar depresión por endogamia, disminuyendo su capacidad de reproducción y sobrevivencia (Frankham, 2003). Por estas razones, se recomienda realizar un programa de conservación *ex situ* de plantaciones forestales controladas para preservar las poblaciones con los niveles más altos de diversidad genética, y estas ser utilizadas eventualmente en programas de reforestación para contrarrestar los efectos de la endogamia. Además, es crucial introducir e intercambiar individuos entre poblaciones para ampliar la poza genética dentro de cada una y favorecer el entrecruzamiento de individuos no emparentados en las siguientes generaciones. Este tipo de estrategia ha sido recomendada para especies de cactus en la región central de México (Jiménez-Sierra et al. 2007) y para otras coníferas en el país (Molina-Freaner et al. 2001; Delgado et al. 2002; Flores-López et al. 2004) que enfrentan retos genéticos y de origen antropogénico similares.

Sin embargo, la estructura genética de las especies puede afectar los esfuerzos de restauración por introducción de diversidad genética a las poblaciones dada la posibilidad de depresión por exogamia, ocasionada tanto por la incompatibilidad cromosómica o genética a partir la ruptura de las asociaciones entre loci (desequilibrio de ligamiento) como por la reducción en la adaptación a las condiciones ambientales locales por individuos que expresen fenotipos intermedios que no son favorecidos localmente (Allendorf et al. 2010).

A pesar de que en especies con altos niveles de entrecruzamiento y flujo génico, como es el caso de los *Abies*, la adaptación local y los complejos genéticos coadaptados son menos probables (McKay et al. 2005), es necesario poder predecir y evitar la depresión por exogamia para lograr el objetivo en la conservación de estas poblaciones. Por lo tanto, un mayor entendimiento de los patrones espaciales de la variación adaptativa es necesario para tomar decisiones en la introducción en intercambio de individuos entre poblaciones y asegurar su habilidad para responder a los cambios climáticos (McKay et al. 2005).

Las nuevas aproximaciones genómicas (por ejemplo, la secuenciación de siguiente generación a partir de SNP's) permiten la estimación simultánea de procesos neutrales, como los niveles de flujo génico para inferir patrones de aislamiento reproductivo e historia demográfica, así como la identificación de regiones genómicas que se encuentran bajo selección natural por adaptación local, y su comparación entre poblaciones para comprender la divergencia de estas en los genes adaptativos y predecir los efectos en la adecuación cuando estas regiones son combinadas (Allendorf et al. 2010) Además, el intercambio e introducción de individuos debe tomar en cuenta las variables climáticas y ambientales de las poblaciones involucradas en la restauración. Entre más variables tengan en común, como la elevación y los índices de composición, menos probable es que se origine depresión por exogamia en las poblaciones (McKay et al 2005). La genómica del paisaje permite englobar todos estos análisis para identificar unidades evolutivas significativas al localizar límites en el paisaje que separa grupos demográficamente independientes (Manel et al. 2003).

8. CONCLUSIONES

Las poblaciones de *Abies religiosa* y *A. flinckii* analizadas en este estudio exhibieron en general altos niveles de diversidad genética. Estos valores fueron más altos a los documentados en coníferas con distribuciones continuas y restringidas en Europa, Norte América y Asia, pero similares a los encontrados en México y Centro América.

En *A. religiosa*, la población más oriental (AR48) obtuvo los niveles más altos de diversidad genética, probablemente por representar una de las primeras áreas colonizadas por la especie en México, mientras que las demás poblaciones analizadas podrían representar colonizaciones posteriores. Dentro de las poblaciones de *A. flinckii*, la población AF18 presentó los niveles más bajos de diversidad genética, atribuidos a deriva génica y aislamiento geográfico con flujo génico restringido. En cambio, la población AF14 exhibió niveles de diversidad genética similares a los encontrados en las poblaciones de *A. religiosa*, probablemente por la posibilidad de flujo génico con otras poblaciones de *A. flinckii* e inclusive con poblaciones de *A. religiosa*, y por el mantenimiento de grandes tamaños efectivos poblacionales.

Contrario a lo esperado, los niveles de diversidad genética observados no fueron significativamente distintos en las dos especies. Una posible explicación a esto sería que haya existido flujo génico entre *A. flinckii* y *A. religiosa*, dada su divergencia probablemente reciente, lo cual haya permitido la introducción de nuevas variantes en *A. flinckii*. Además, es posible que las poblaciones observadas actualmente sean remanentes de poblaciones ancestrales grandes que recientemente experimentaron una reducción de tamaño en el actual interglacial, pero que aún no son notorias las consecuencias de su fragmentación en la diversidad genética. Esta hipótesis es apoyada por los niveles significativos de endogamia encontrados en todas las poblaciones, y por la reducción en sus tamaños efectivos observada a partir de la prueba *M* de cuellos de botella.

Los niveles de diferenciación genética obtenidos entre poblaciones fueron altos para las dos especies de *Abies*, mayores a los exhibidos en coníferas con diferentes distribuciones en Estados Unidos y Canadá, y similares a los observados en México. Este patrón es explicado por la topografía y el clima asociado característico de la región que mantiene a las poblaciones separadas por muchos kilómetros y restringe la migración.

Los análisis de detección de grupos genéticos agruparon a la población AF14 junto con las poblaciones de *A. religiosa*, y a AF18 en un grupo separado. Esto también fue notorio en los índices de diferenciación genética, que exhibieron mayor diferenciación entre AF14 y AF18 que entre AF14 y las poblaciones de *A. religiosa*. Esta falta de concordancia entre los grupos genéticos y la separación de las especies puede ser explicada por el mantenimiento de polimorfismos ancestrales debido a grandes tamaños efectivos poblacionales históricos y/o a flujo génico interespecífico reciente. En este último caso, puede ser que la población AF14 se encuentre hibridando actualmente con las poblaciones de *A. religiosa*.

En términos de conservación, es importante considerar a *A. flinckii* y *A. religiosa* como dos especies distintas dadas las evidencias de divergencia que existen entre sus poblaciones. La preservación del mayor número de poblaciones resulta necesaria para conservar tanta diversidad genética como sea posible, dados los altos niveles de diferenciación genética obtenidos entre las poblaciones y la alta densidad poblacional humana que existe en los estados que abarcan la Faja Volcánica Transmexicana. Es necesario dar mayor importancia en la conservación *in situ* a las poblaciones con mayor diversidad genética y a la población AF14 de *A. flinckii* que puede representar una zona de hibridación. Sin embargo, dada la posibilidad de pérdida de diversidad genética a largo plazo en todas las poblaciones, se recomienda la implementación de estrategias de conservación *ex situ* para almacenar la diversidad genética y asegurar la rehabilitación de las poblaciones.

9. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Planter, E., Furnier, G. R., & Eguiarte, L. E. (2000). Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany*, 87(3), 362-371.
- Aguirre-Planter, E., Jaramillo-Correa, J. P., Gómez-Acevedo, S., Khasa, D. P., Bousquet, J., & Eguiarte, L. E. (2012). Phylogeny, diversification rates and species boundaries of Mesoamerican firs (*Abies*, Pinaceae) in a genus-wide context. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 263-274.
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 11(10), 697-709.
- Al-Rabab'ah, M. A., & Williams, C. G. (2002). Population dynamics of *Pinus taeda* L. based on nuclear microsatellites. *Forest Ecology and Management*, 163(1), 263-271.
- Balloux, F., & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11(2), 155-165.
- Becerra, J. X. (2005). Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10919-10923.
- Bennett, K. D., & Provan, J. (2008). What do we mean by 'refugia'? *Quaternary Science Reviews*, 27(27), 2449-2455.
- Bertorelle, G., Benazzo, A., & Mona, S. (2010). ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Molecular Ecology*, 19(13), 2609-2625.
- Boys, J., Cherry, M., & Dayanandan, S. (2005). Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of red pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *American Journal of Botany*, 92(5), 833-841.
- Bryson, R. W., Murphy, R. W., Lathrop, A., & Lazcano-Villareal, D. (2011). Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: a case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes. *Journal of Biogeography*, 38(4), 697-710.

- Buschiazzo, E., Ritland, C., Bohlmann, J., & Ritland, K. (2012). Slow but not low: genomic comparisons reveal slower evolutionary rate and higher dN/dS in conifers compared to angiosperms. *BMC evolutionary biology*, 12(1), 8.
- Caballero, M., Lozano-García, S., Vázquez-Selem, L., & Ortega, B. (2010). Evidencias de cambio climático y ambiental en registros glaciales y en cuencas lacustres del centro de México durante el último máximo glacial. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 62(3), 359-377.
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621-631.
- Charlesworth, D. (2003). Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1434), 1051-1070.
- Chelaifa, H., Monnier, A., & Ainouche, M. (2010). Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae). *New Phytologist*, 186(1), 161-174.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., & Tang, J. (2008). BAPS: Bayesian analysis of population structure. Manual, Version, 5.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., & Tang, J. (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics*, 9(1), 539.
- Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001-2014.
- Corona, A. M., Toledo, V. H., & Morrone, J. J. (2007). Does the Trans-mexican Volcanic Belt represent a natural biogeographical unit? An analysis of the distributional patterns of Coleoptera. *Journal of Biogeography*, 34(6), 1008-1015.
- Crawford, N. G. (2009). SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 556-557.
- Critchfield, W. B. (1988). Hybridization of the California firs. *Forest Science*, 34(1), 139-151.

- Dakin, E. E., & Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5), 504-509.
- Davis, M. B., & Shaw, R. G. (2001). Range shifts and adaptive responses to Quaternary climate change. *Science*, 292(5517), 673-679.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879-886.
- DeSalle, R., & Amato, G. (2004). The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 702-712.
- Delgado, P., Cuenca, A., Escalante, A. E., Molina-Freaner, F., & Piñero, D. (2002). Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 27-37.
- Delgado, P., Piñero, D., Chaos, A., Pérez-Nasser, N., & Alvarez-Buylla, E. R. (1999). High population differentiation and genetic variation in the endangered Mexican pine *Pinus rzedowskii* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 86(5), 669-676.
- Dempster, A. P., Laird, N. M., & Rubin, D. B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1-38.
- Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., & Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3166-3170.
- Donahue, J. K., Dvorak, W. S., Gutierrez, E. A., & Kane, M. B. (1985). *Abies guatemalensis*: a two year status report. CAMCORE bulletin on tropical forestry Number 3. School of Forest Resources, North Carolina State University, EUA.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution*, 22(5), 1185-1192.
- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. (2008). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2571-2581.

- Dupont, L., Lazrek, F., Porco, D., King, R. A., Rougerie, R., Symondson, W. & Mathieu, J. (2011). New insight into the genetic structure of the *Allolobophora chlorotica* aggregate in Europe using microsatellite and mitochondrial data. *Pedobiologia*, 54(4), 217-224.
- Dvorak, W. S., Potter, K. M., Hipkins, V. D., & Hodge, G. R. (2009). Genetic diversity and gene exchange in *Pinus oocarpa*, a Mesoamerican pine with resistance to the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *International Journal of Plant Sciences*, 170(5), 609-626.
- Eckenwalder, J.E. (2009). *Conifers of the World*. Timber Press, EUA, 720 pp.
- Eckert, C. G., Samis, K. E., & Loughheed, S. C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17(5), 1170-1188.
- Edwards-Burke, M., Hamrick, J., & Price, R. (1997). Frequency and direction of hybridization in sympatric populations of *Pinus taeda* and *P. echinata* (Pinaceae). *American journal of botany*, 84(7), 879-879.
- Estoup, A., Jarne, P., & Cornuet, J. M. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11(9), 1591-1604.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574-578.
- FAO. (1986) *Databook on endangered tree and shrub species and provenances*. FAO. Forestry Paper 77. Food and Agriculture Organization, Italia.
- Farjon, A. (1990). *Pinaceae: drawings and descriptions of the genera Abies, Cedrus, Pseudolarix, Keteleeria, Nothotsuga, Tsuga, Cathaya, Pseudotsuga, Larix, and Picea*. Koeltz Scientific Books, Alemaina, 330 pp.

- Felsenstein, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Ferrari P. L. (2000). Avances en el conocimiento de la Faja Volcánica Transmexicana durante la última década. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, 53(1), 84-92.
- Ferrari, P.L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., & Manea, M. (2012). The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. Tectonophysics, 522, 122-149.
- Figuroa-Rangel, B. L., Willis, K. J., & Olvera-Vargas, M. (2008). 4200 years of pine-dominated upland forest dynamics in west-central Mexico: Human or natural legacy. Ecology, 89(7), 1893-1907.
- Fisher R. A. (1930). The genetical theory of natural selection. Oxford University Press.
- Flores-López, C., López-Upton, J., & Vargas-Hernández, J. J. (2005). Indicadores reproductivos en poblaciones naturales de *Picea mexicana* Martínez. Agrociencia, 39(1), 117-126.
- Frankham, R. (2003). Genetics and conservation biology. Comptes Rendus Biologies, 326, 22-29.
- Freeland, J.R & Petersen, S.D. (2011) Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Inglaterra, 464 pp.
- Gaggiotti, O. E., Lange, O., Rassmann, K., & Gliddon, C. (2002). A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. Molecular Ecology, 8(9), 1513-1520.
- Garrett, P. W. (1979). Species hybridization in the genus *Pinus*. Forest Service, US Department of Agriculture, Northeastern Forest Experiment Station, pp.17
- Garza, J. C., & Williamson, E. G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. Molecular ecology, 10(2), 305-318.
- Guerrant, E., Havens, K. and Maunder, M. (2004). Strategies for Survival: ex-situ plant conservation. Island Press, Washington, pp. 03-17.

- Gillespie JH. (2004) Population genetics: a concise guide. Johns Hopkins University Press, EUA, 217 pp.
- Gómez-Tuena, A., Orozco-Esquivel, M. T., & Ferrari, L. (2005). Petrogénesis ígnea de la faja Volcánica Transmexicana. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 57(3), 227-283.
- González-Astorga J, Castillo-Campos G. 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatic* Castillo-Campos and Lorence (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Ann Bot*, 93: 521-538.
- González-Rodríguez, A., Arias, D. M., Valencia, S., & Oyama, K. (2004). Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany*, 91(3), 401-409.
- Goudet, J. (2001). FSTAT, version 2.9. 3, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne University, Switzerland.
- Graham, A. (1999). The Tertiary history of the northern temperate element in the northern Latin American biota. *American Journal of Botany*, 86(1), 32-38.
- Griffiths AJF, Millar JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. (1996) An introduction to genetic analysis. W. H. Freeman and Company, EUA, 915 pp
- Gugger, P. F., González-Rodríguez, A., Rodríguez-Correa, H., Sugita, S., & Cavender-Bares, J. (2011). Southward Pleistocene migration of Douglas-fir into Mexico: phylogeography, ecological niche modeling, and conservation of 'rear edge' populations. *New Phytologist*, 189(4), 1185-1199.
- Guo, S. W., & Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.
- Hamilton, M. (2011). Population genetics. John Wiley & Sons, Inglaterra, 424 pp.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1345), 1291-1298.

- Harding, R. M., Boyce, A. J., & Clegg, J. B. (1992). The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*, 132(3), 847-859.
- Hays, J. D., Imbrie, J., & Shackleton, N. J. (1976, December). Variations in the Earth's orbit: Pacemaker of the ice ages. *American Association for the Advancement of Science*.
- Hedrick P.W. (2005a) *Genetics of populations*, Jones and Bartlett Publishers, EUA, 737 pp.
- Hedrick, P. W. (2005b). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59(8), 1633-1638.
- Heller, R., & Siegmund, H. R. (2009). Relationship between three measures of genetic differentiation G_{ST} , D_{EST} and G'_{ST} : how wrong have we been?. *Molecular Ecology*, 18(10), 2080-2083.
- Hermann RK. 1985. *The genus Pseudotsuga: ancestral history and past distribution*. Corvallis, OR, USA: Forest Research Laboratory, Oregon State University.
- Hernández X. E. (1985). *Xolocotzia: obras de Efraím Hernández Xolocotzi, Tomo 1*, Revista de Geografía agrícola Universidad Autónoma de Chapingo, México, 428 pp.
- Heuertz, M., Hausman, J. F., Hardy, O. J., Vendramin, G. G., Frascaria-Lacoste, N., & Vekemans, X. (2004). Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*, 58(5), 976-988.
- Hewitt, G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Hewitt, G. M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10(3), 537-549.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1442), 183-195.
- Hey, J., and R. Nielsen. (2004). Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167:747–760.

Hu, F. S., Hampe, A., & Petit, R. J. (2008). Paleoeecology meets genetics: deciphering past vegetational dynamics. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(7), 371-379.

Hunt, R. S. (1993). *Abies*. *Flora of North America* vol. 2, 354-362.

INEGI, Censo de Población y Vivienda 2010.

Isoda, K., & Shiraishi, S. (2001). Allelic sequence polymorphisms in the intron region of the nuclear-encoded GapC gene preceded the speciation of three closely related *Abies* species (Pinaceae). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 102(2), 244-250.

Jaramillo-Correa, J. P., Aguirre-Planter, E., Khasa, D. P., Eguiarte, L. E., Piñero, D., Furnier, G. R., & Bousquet, J. (2008). Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern México and Guatemala. *Molecular ecology*, 17(10), 2476-2490.

Jaramillo-Correa, J. P., Beaulieu, J., Khasa, D. P., & Bousquet, J. (2009). Inferring the past from the present phylogeographic structure of North American forest trees: seeing the forest for the genes. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(2), 286-307.

Jiménez-Sierra, C., Mandujano, M. C., & Eguiarte, L. E. (2007). Are populations of the candy barrel cactus (*Echinocactus platyacanthus*) in the desert of Tehuacán, Mexico at risk? Population projection matrix and life table response analysis. *Biological Conservation*, 135(2), 278-292.

Jost, L. (2008). G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17(18), 4015-4026.

Khasa, D. P., Jaramillo-Correa, J. P., Jaquish, B., & Bousquet, J. (2006). Contrasting microsatellite variation between subalpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns. *Molecular ecology*, 15(13), 3907-3918.

Kimura, M., & Ohta, T. (1969). The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. *Genetics*, 61(3), 763.

Knowles, L. L., & Carstens, B. C. (2007). Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic biology*, 56(6), 887-895.

- Kobliha, J., Stejskal, J., Škorpík, P., & Frampton, J. (2013). Recent results of Czech-American fir hybridization research. *J. For. Sci*, 59(2), 64-71.
- Kormuták, A., Vooková, B., Salaj, T., Ěamek, V., Galgóci, M., Mačka, P. & Kobliha, J. (2012). Crossability relationships between noble, manchurian and caucasian firs. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 54(2), 21-24.
- Ledig, F. T., Bermejo-Velázquez, B., & Vargas-Hernández, J. (2000). Genetic differentiation in Mexican conifers. Memoria del 16^{avo} taller de biología forestal de América del Norte: Impacto del cambio ambiental global sobre los bosques e impacto de los bosques sobre el cambio ambiental global. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo rural, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, México.
- Ledig, F. T., Hodgskiss, P. D., & Jacob-Cervantes, V. (2002). Genetic diversity, mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martinez. *Conservation Genetics*, 3(2), 113-122.
- Li P, Adams WT. (1989). Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Canadian Journal of Forest Research* 19: 149–161.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A & Nevo E. (2008) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11(12), 2453-2465.
- Li, Z., Zou, J., Mao, K., Lin, K., Li, H., Liu, J., ... & Lascoux, M. (2012). Population genetic evidence for complex evolutionary histories of four high altitude juniper species in the Qinghai–Tibetan Plateau. *Evolution*, 66(3), 831-845.
- Liu, T. S. (1971). A monograph of the genus *Abies*. Department of Forestry, College Of Agriculture., National Taiwan University, China, 608.
- Maguire, T. L., & Sedgley, M. (1997). Genetic diversity in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) with emphasis on *Banksia cuneata*, a rare and endangered species. *Heredity*, 79(4), 394-401.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(4), 189-197.

- Mao, K., Hao, G., Liu, J., Adams, R. P., & Milne, R. I. (2010). Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals. *New Phytologist*, 188(1), 254-272.
- Marko, P. B., & Hart, M. W. (2011). The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends in ecology & evolution*, 26(9), 448-456.
- Marshall, C. J., & Liebherr, J. K. (2001). Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of biogeography*, 27(1), 203-216.
- Martin, J. A., & Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), 671-682.
- Martinez, M. (1948). Los *Abies* mexicanos. *Anales del Instituto de Biología de Mexico* 19, 11–104.
- Metcalfe, S. E. (2006). Late Quaternary Environments of the Northern Deserts and Central Transvolcanic Belt of Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93(2), 258-273.
- McCormack, J. E., Heled, J., Delaney, K. S., Peterson, A. T., & Knowles, L. L. (2011). Calibrating divergence times on species trees versus gene trees: implications for speciation history of *Aphelocoma* jays. *Evolution*, 65(1), 184-202.
- McKay, J. K., Christian, C. E., Harrison, S., & Rice, K. J. (2005). "How local is local?"—a review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology*, 13(3), 432-440.
- Molina-Freaner, F., Delgado, P., Piñero, D., Perez-Nasser, N., & Alvarez-Buylla, E. (2001). Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. *Canadian Journal of Botany*, 79(2), 131-138.
- Moreno-Letelier, A., & Piñero, D. (2009). Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography*, 36(1), 121-131.
- Morrone, J. J. (2005). Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 76(2), 207-252.
- Morrone, J. J. (2009). *Evolutionary Biogeography: An Integrative Approach With Case Studies*. Columbia University Press.

- Mulcahy, D. G., & Mendelson, J. R. (2000). Phylogeography and Speciation of the Morphologically Variable, Widespread Species *Bufo valliceps* Based on Molecular Evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17(2), 173-189.
- Naravae, F., & Taylor, K. (1997). Pinaceae. Flora de Veracruz fasciculo 98. Instituto de Ecología-University of California. México.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
- Newton, A. C., Allnutt, T. R., Gillies, A. C. M., Lowe, A. J., & Ennos, R. A. (1999). Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(4), 140-145.
- Norton, B. G. (1986). *The preservation of species*. Princeton University Press.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13(5), 1143-1155.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R & Vieira MC. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294-307
- Ornelas, J. F., Sosa, V., Soltis, D. E., Daza, J. M., González, C., Soltis, P. & Ruiz-Sanchez, E. (2013). Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of northern Mesoamerica. *PloS one*, 8(2).
- Parks, M., Cronn, R., & Liston, A. (2009). Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC biology*, 7(1), 84.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. (2006). Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295.

- Peery, M. Z., Kirby, R., Reid, B. N., Stoelting, R., Doucet-B  er, E., Robinson, S. & Palsboll, P. J. (2012). Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology*, 21(14), 3403-3418.
- Peñaloza-Ramírez, J. M., González-Rodríguez, A., Mendoza-Cuenca, L., Caron, H., Kremer, A., & Oyama, K. (2010). Interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico. *Annals of botany*, 105(3), 389-399.
- Perron, M., & Bousquet, J. (2003). Natural hybridization between black spruce and red spruce. *Molecular Ecology*, 6(8), 725-734.
- Perry, J.P. (1991) *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, OR.
- Potter, K. M., Frampton, J. F., Josserand, S. A, & Nelson, C. D. (2008). Genetic variation and population structure in Fraser fir (*Abies fraseri*): a microsatellite assessment of young trees. *Canadian journal of forest research*, 38(8), 2128-2137.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Ranker, T.A. 1994. Evolution of high genetic variability in the rare Hawaiian fern *Adenophorus periens* and implications for conservation management. *Biol Conserv*, 70: 19-24.
- Rasmussen, K. K., Andersen, U. S., Frauenfelder, N., & Kollmann, J. (2008). Microsatellite markers for the endangered fir *Abies guatemalensis* (Pinaceae). *Molecular Ecology Resources*, 8(6), 1307-1309.
- Rasmussen, K. K., Strandby, U., & Kollmann, J. (2010). High genetic diversity within but limited differentiation among populations of the vulnerable Guatemalan fir. *Journal of Tropical Forest Science*, 22(3), 247-259.
- Reyes-Hernández VJ, Vargas-Hernández JJ, López-Upton J, Vaquera-Huerta H. 2005. Variación morfológica y anat  mica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Acta Botánica Mexicana* 70, 47-67.
- Richter, T. S., Soltis P. S., Soltis D. E. (1994). Genetic variation within and among populations of the narrow endemic, *Dipbium viridescens* (Ranunculaceae). *Am J Bot*, 81, 1070-1076.

- Roschanski, A. M., Fady, B., Ziegenhagen, B., & Liepelt, S. (2013). Annotation and re-sequencing of genes from de novo transcriptome assembly of *Abies alba* (Pinaceae). *Applications in Plant Sciences*, 1(1), 1-8.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103-106.
- Ruiz-Sanchez, E., & Specht, C. D. (2013). Influence of the geological history of the Trans-Mexican Volcanic Belt on the diversification of *Nolina parviflora* (Asparagaceae: Nolinoideae). *Journal of Biogeography*.
- Rushforth, K. D. (1989). Two new species of *Abies* (Pinaceae) from western Mexico. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh*, 46.
- Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*. Editorial Limusa, México, 432 pp.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sánchez-González, A., López-Mata, L., & Granados-Sánchez, D. (2005). Semejanza florística entre los bosques de *Abies religiosa* (HBK) Cham. & Schltdl. de la Faja Volcánica Transmexicana. *Investigaciones geográficas*, (56), 62-76.
- Selkoe KA & Toonen RJ. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9(5), 615-629.
- SEMARNAT, 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestre – Anexo Normativo III: Lista de especies en riesgo. SEMARNAT, UNDP.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139(1), 457-462.
- Soltis, D. E., Morris, A. B., McLachlan, J. S., Manos, P. S., & Soltis, P. S. (2006). Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology*, 15(14), 4261-4293.

- Stölting, N.K., Nipper, R., Lindtke D., Caseys C., Waeber S., Castiglione S. & Lexer C. (2013). Genomic scan for single nucleotide polymorphisms reveals patterns of divergence and gene flow between ecologically divergent species. *Molecular Ecology*, 22(3), 842-855.
- Strasburg, J. L., & Rieseberg, L. H. (2008). Molecular Demographic History of the Annual Sunflowers *Helianthus Annuus* and *H. Petiolaris* – Large Effective Population Sizes and Rates of Long-Term Gene Flow. *Evolution*, 62(8), 1936-1950.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(5), 199-203.
- Tachida H & Iizuka M. (1992) Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics*, 131(2), 471-478.
- Tang, S., Dai, W., Li, M., Zhang, Y., Geng, Y., Wang, L., & Zhong, Y. (2008). Genetic diversity of relictual and endangered plant *Abies ziyuanensis* (Pinaceae) revealed by AFLP and SSR markers. *Genetica*, 133(1), 21-30.
- Thuillet, A. C., Bru, D., David, J., Roumet, P., Santoni, S., Sourdille, P., & Bataillon, T. (2002). Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp durum desf. *Molecular Biology and Evolution*, 19(1), 122-125.
- Udupa, S., & Baum, M. (2001). High mutation rate and mutational bias at (TAA)_n microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 265(6), 1097-1103.
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110-117.
- Vázquez-Lobo, A. (1996). Evolución de hongos endófitos del género *Pinus* L: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Vázquez-Selem, L., & Heine, K. (2004). Late quaternary glaciation of Mexico. *Developments in Quaternary Sciences*, 2, 233-242.
- Vigouroux, Y., Jaqueth, J. S., Matsuoka, Y., Smith, O. S., Beavis, W. D., Smith, J. S. C., & Doebley, J. (2002). Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Molecular Biology and Evolution*, 19(8), 1251-1260.

- Wachowiak, W., Palmé, A. E., & Savolainen, O. (2011). Speciation history of three closely related pines *Pinus mugo* (T.), *P. uliginosa* (N.) and *P. sylvestris* (L.). *Molecular Ecology*, 20(8), 1729-1743.
- Wang J. (2005). Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 260(1459), 1395-1409.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Whitham, T. G., & Maschinski, J. (1996). Current hybrid policy and the importance of hybrid plants in conservation. In *Southwestern rare and endangered plants: proceedings of the second conference*. General technical report RM-283. US Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Ft. Collins, Colorado, pp. 103-112.
- Wright S (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, 97-159.
- Xiang, X., Cao, M., Zhou, Z., 2007. Fossil history and modern distribution of the genus *Abies* (Pinaceae). *Frontiers of Forestry in China* 2, 355–365.
- Xue, D. W., Ge, X. J., Hao, G., & Zhang, C. Q. (2004). High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Primula interjacens* by ISSR analysis. *ACTA BOTANICA SINICA-ENGLISH EDITION*-, 46(10), 1163-1169.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., & Boyle, T. (1999). POPGENE version1. 32, Microsoft window-base software for population genetic analysis: a quick user's guide. University of Alberta. Center for International Forestry Research, Alberta, Canada.
- Zawko G, Krauss S L, Dixon K W, Sivasithamparam K. (2001). Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogo obtectus* (Ericaceae) *Mol Ecol*, 10, 2389-2396.

10.ANEXOS

- **Métodos**

Anexo 1. Extracción de ADN en Plantas: Método MiniPrep (Vázquez-Lobo, 1996)

1. En un mortero moler alrededor de 1 g de tejido y moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, eliminar el máximo de fibras.
2. Moler el equivalente a un punta de espátula de tejido pulverizado (0.2 g) junto con 1 ml de buffer CTAB 2X (Tris-HCL 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 Mm, CTAB 2% Y b-ME 0.3%)
3. Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 13 000 rpm durante ocho minutos a 4°C.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 ul de CTAB 2X (agitar hasta despegar el tejido). Incubar en un baño a 60°C durante 10 minutos (agitar los tubos cada 3 min).
5. Agregar a cada tubo 600 ul de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7000 rpm durante 12 minutos a 4°C (10 a 15 minutos, hasta que el sobrenadante quede transparente).
6. Transladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 ul). Este paso es fundamental para obtener un ADN limpio, se debe evitar recuperar material de la difase que se forma.
7. Precipitar el ADN con 2/3 del volumen final (500 ul aproximadamente) de isopropanol frío. Dejar reposar de 30 minutos a 12 horas a -20°C.
8. Centrifugar a 13000 rpm durante cinco minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
9. Limpiar el pellet agregando 1 ml de etanol al 70% frío y centrifugando a 13000 rpm durante gfs1cinco minutos a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet, después resuspender el pellet con 200 ul de agua (o menor cantidad).

- **Resultados**

Anexo 2. Frecuencias alélicas por población de los cuatro loci microsatelitales analizados.

Alelo	Frecuencias alélicas en cada población						Número de copias
	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55	
Locus Ab07							
214	0.050	0.023	0	0	0	0	3
216	0.100	0.045	0	0	0.079	0	9
218	0.125	0.068	0	0	0.079	0	11
220	0.025	0	0.139	0.068	0.053	0.050	13
222	0	0.045	0	0.023	0.132	0.025	9
224	0.050	0.023	0.028	0.023	0	0	5
226	0.025	0.023	0.056	0.045	0.026	0.050	9
228	0.025	0.023	0.028	0.023	0	0.075	7
230	0.025	0.045	0.028	0.114	0	0.025	10
232	0.075	0.159	0	0.068	0	0.050	15
234	0.025	0.045	0.167	0.045	0	0.150	17
236	0.050	0.068	0.139	0.045	0.053	0.050	16
238	0.075	0.023	0.111	0.114	0.158	0.025	20
240	0.200	0.114	0.028	0.045	0.053	0.050	20
242	0.050	0.227	0.139	0.091	0	0.125	26
244	0.050	0.023	0.056	0.045	0.079	0.025	11
246	0.025	0.023	0	0	0.079	0.175	12
248	0	0	0	0.045	0.026	0	3
250	0	0	0.028	0.023	0.079	0.050	6
252	0	0.023	0	0.045	0.105	0.075	10
254	0.025	0	0.028	0	0	0	2

260	0	0	0.028	0.091	0	0	5
262	0	0	0	0.045	0	0	2

Locus Ab12	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55	
190	0.025	0	0	0	0	0	1
192	0.025	0	0	0	0	0	1
198	0	0	0	0	0	0.025	1
200	0.025	0	0.056	0	0	0	3
202	0.050	0.114	0.056	0	0	0.075	12
204	0	0.295	0.056	0.023	0	0.100	20
206	0	0.023	0.028	0	0	0	2
208	0	0.045	0	0	0	0	2
210	0.025	0.068	0	0.068	0	0	7
212	0	0.045	0	0	0	0.025	3
214	0.025	0.227	0.028	0	0	0.050	14
216	0.025	0.045	0	0	0.026	0	4
218	0	0.023	0	0	0	0.025	2
220	0	0.023	0	0.023	0	0	2
222	0.050	0.023	0	0.023	0	0.100	8
224	0.075	0	0.056	0	0.053	0	7
226	0.100	0	0.167	0.068	0.158	0.025	20
228	0.175	0.023	0.250	0.227	0.211	0.175	42
230	0.025	0	0.083	0.091	0.132	0.025	15
232	0.025	0.023	0.056	0.045	0.105	0.075	13
234	0.075	0	0	0.136	0.105	0.075	16
236	0	0	0	0.045	0.026	0.075	6
238	0.100	0	0.111	0.023	0.026	0.050	12
240	0.075	0.023	0	0	0.053	0	6

242	0.100	0	0.056	0.045	0.026	0	9
244	0	0	0	0.136	0.053	0.025	9
246	0	0	0	0	0	0.025	1
250	0	0	0	0	0	0.025	1
252	0	0	0	0	0.026	0.025	2
254	0	0	0	0.023	0	0	1

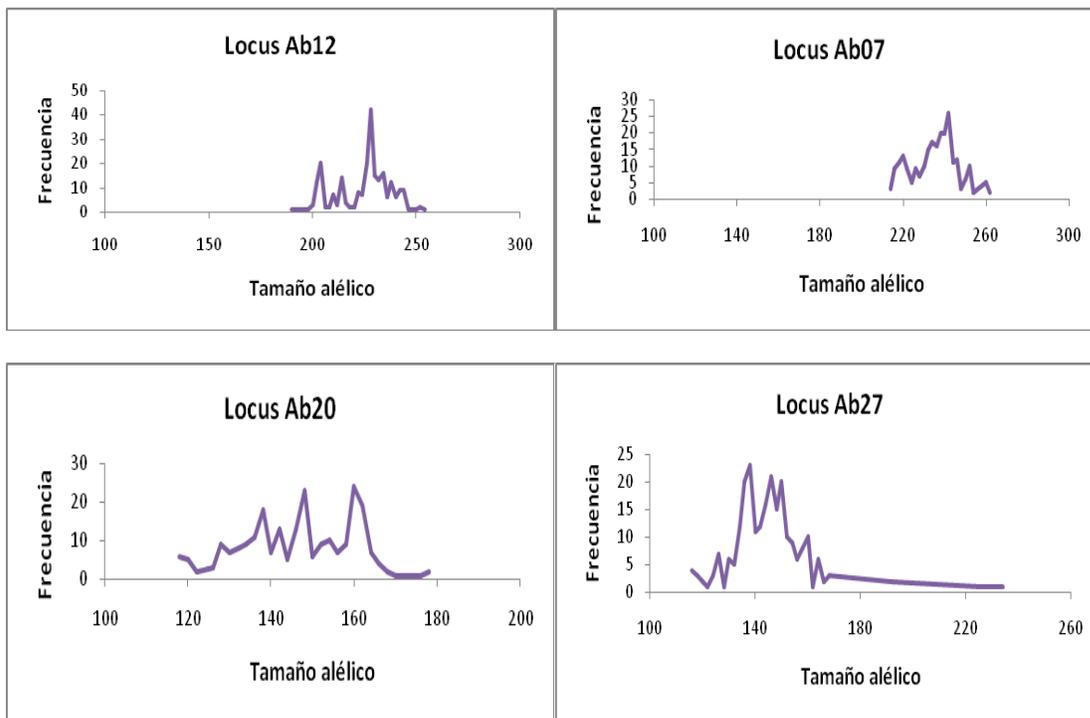
Locus Ab20	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55	
118	0.025	0.045	0.028	0	0	0.050	6
120	0	0.023	0.028	0.045	0	0.025	5
122	0	0	0	0	0	0.050	2
126	0	0	0.028	0.023	0	0.025	3
128	0	0.205	0	0	0	0	9
130	0	0.091	0.028	0.023	0	0.025	7
132	0.025	0.159	0	0	0	0	8
134	0	0.159	0	0	0.026	0.025	9
136	0.025	0.091	0.028	0.068	0.026	0.025	11
138	0.025	0	0.167	0.182	0.053	0.025	18
140	0.050	0.068	0.028	0.023	0	0	7
142	0.050	0	0.028	0	0.053	0.200	13
144	0.025	0	0	0.023	0	0.075	5
146	0.150	0	0	0.091	0	0.075	13
148	0.125	0.068	0	0.136	0.184	0.050	23
150	0	0	0.028	0.068	0.053	0	6
152	0.100	0	0	0	0.105	0.025	9
154	0.075	0.068	0.083	0.023	0	0	10
156	0	0	0	0.023	0.079	0.075	7
158	0	0.023	0.111	0.068	0.026	0	9

160	0.125	0	0.111	0.045	0.289	0.050	24
162	0.125	0	0.222	0.091	0	0.050	19
164	0.050	0	0	0.023	0.053	0.050	7
166	0	0	0.056	0	0	0.050	4
168	0.025	0	0	0	0.026	0	2
170	0	0	0.028	0	0	0	1
172	0	0	0	0.023	0	0	1
174	0	0	0	0	0.026	0	1
176	0	0	0	0	0	0.025	1
178	0	0	0	0.023	0	0.025	2

Locus Ab27	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55	
116	0	0	0	0.091	0	0	4
118	0	0	0.028	0	0.053	0	3
120	0	0	0	0	0.026	0.025	2
122	0	0	0	0.023	0	0	1
124	0	0	0	0.023	0.053	0	3
126	0	0	0	0.023	0.158	0	7
128	0	0	0	0	0.026	0	1
130	0.075	0	0.056	0.023	0	0	6
132	0.025	0	0.056	0.045	0	0	5
134	0	0.023	0.222	0.023	0	0.050	12
136	0	0.068	0.056	0.045	0.184	0.150	20
138	0.125	0.295	0.056	0.023	0	0.050	23
140	0.025	0.068	0.083	0.045	0.053	0	11
142	0	0.068	0.111	0	0.132	0	12
144	0	0.023	0.056	0.023	0.053	0.250	16
146	0.025	0.136	0	0.045	0.132	0.175	21

148	0.150	0.091	0	0.045	0.026	0.050	15
150	0.200	0.068	0.056	0.068	0.026	0.075	20
152	0	0	0.139	0.023	0.053	0.050	10
154	0	0.045	0	0.091	0.026	0.050	9
156	0	0	0.028	0.091	0	0.025	6
158	0.125	0.045	0	0.023	0	0	8
160	0.075	0.023	0	0.114	0	0.025	10
162	0.025	0	0	0	0	0	1
164	0.075	0.045	0	0.023	0	0	6
166	0.025	0	0	0.023	0	0	2
168	0.050	0	0	0	0	0.025	3
192	0	0	0	0.045	0	0	2
226	0	0	0.028	0	0	0	1
228	0	0	0	0.023	0	0	1
234	0	0	0.028	0	0	0	1

Anexo 3. Frecuencia de tamaños alélicos por locus.



Anexo 4. Frecuencia de alelos nulos por locus en cada población calculadas a partir de algoritmo EM propuesto por Dempster et al. (1977) y valores de F_{ST} según Weir y Cockerham (1984) recalculados con la corrección de ENA descrita en Chapuis y Estoup (2007; F_{ST-ENA})

	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55	F_{ST-ENA}
Ab07	0.051	0.08	0.048	0.155	0.15	0.073	0.019
Ab12	0.063	0.024	0.116	0.064	0.155	0	0.034
Ab20	0.033	0.172	0	0	0	0.055	0.042
Ab27	0.145	0.137	0.096	0.158	0.196	0.109	0.346

Anexo 5. Diversidad genética por locus por especie. N, número de individuos; Na, número observado de alelos; Ne, número efectivo de alelos (Kimura y Crow 1964); Ho, Heterocigosis observada, He, Heterocigosis esperada (*Según Levene (1949), **Según Nei (1973)).

	N	Na	Ne	Ho	He*	H_{Nei}**
<i>A. flinckii</i>						
Ab07	42	19	11.418	0.786	0.923	0.912
Ab12	42	23	13.115	0.810	0.935	0.924
Ab20	42	20	14.579	0.714	0.943	0.931
Ab27	42	18	9.535	0.595	0.906	0.895
Media		20	12.162	0.726	0.927	0.916
D.E.		2.160	2.176	0.096	0.016	0.016
<i>A. religiosa</i>						
Ab07	79	22	16.489	0.696	0.945	0.939
Ab12	79	28	11.185	0.747	0.916	0.911
Ab20	79	28	15.720	0.911	0.942	0.936
Ab27	79	30	17.360	0.633	0.948	0.942
Media		27	15.189	0.747	0.938	0.932
D.E.		3.464	2.752	0.119	0.015	0.015

Anexo 6. Distancia genética de Nei (1978; debajo de la diagonal) y distancia geográfica (km; arriba de la diagonal) entre todas las poblaciones.

	AF14	AF18	AR22	AR48	AR53	AR55
AF14		420.27	297.42	378.19	224.26	165.08
AF18	0.7513	-	136.34	793.95	630.04	266.25
AR22	0.5751	1.0761	-	675.42	516.08	136.01
AR48	0.4201	1.0566	0.3561	-	169.96	544.47
AR53	0.5516	1.4086	0.5891	0.4403	-	389.9
AR55	0.6615	0.7146	0.5518	0.5276	0.7146	-