



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Pruebas de neutralidad reflejan adaptaciones y cambios demográficos del Pleistoceno/Holoceno en dos especies de *Abies* del Eje Neovolcánico Transmexicano

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA:

Paulina Chavarría Ornelas



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno.

Chavarría
Ornelas
Paulina
0445519025103
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306643480

2. Datos del Asesor.

Dr
Jaramillo
Correa
Juan Pablo

3. Datos del sinodal 1

Dr
Piñero
Dalmau
Daniel Ignacio

4. Datos del sinodal 2

Dra
Castellanos
Morales
Gabriela

5. Datos del sinodal 3

Dra
Aguirre
Planter
Erika

5. Datos del sinodal 4

Dra
Garrido
Garduño
Tania

3. Datos del trabajo escrito

Pruebas de neutralidad reflejan adaptaciones y cambios demográficos del Pleistoceno/Holoceno en dos especies de Abies del Eje Neovolcánico Transmexicano
65p
2017

INDICE

| | |
|--|----|
| Agradecimientos..... | 4 |
| Resumen..... | 5 |
| Introducción..... | 6 |
| Teoría neutral de la evolución..... | 6 |
| Coalescencia..... | 7 |
| Adaptación en un contexto demográfico..... | 13 |
| Pruebas de neutralidad y demografía histórica..... | 14 |
| Simulaciones..... | 19 |
| Biología de <i>Abies</i> | 21 |
| Objetivos..... | 25 |
| Hipótesis..... | 26 |
| Método..... | 26 |
| Resultados..... | 32 |
| Discusión:..... | 49 |
| Conclusión..... | 57 |
| Literatura citada..... | 58 |
| Anexos..... | 65 |

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa por la dirección de esta tesis y por creer en mí.

Al Instituto de Ecología de la UNAM y a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todas las herramientas para mi formación académica.

A los proyectos CONACYT CB-2010-0153305 (Genómica ecológica y evolutiva de oyameles (Abies, Pinaceae) mexicanos: implicaciones para su manejo y conservación), PAPIIT IN208416 (Detección de genes asociados a la adaptación y la especiación en oyameles mexicanos) e IA201013 (Genómica ecológica de oyameles mexicanos II)

A mi padre, porque no hay un paso de mi vida que haya dado sin pensar en ti, por ser mi más grande orgullo, ejemplo y motivación y porque mi mayor sueño es volver a estar junto a ti.

A mi madre, por ser mi mejor amiga, compañera, cómplice y mi más grande amor. Porque ni con mi vida podría pagar todo lo que has hecho por mí.

A mis hermanos: Cintia, Ale, Tachi e Isaac, por su apoyo, enseñanzas y amor.

A mis amigas: Goldita, Jessie, Ody, Inari, Tona y Marianita, por todas las risas, lágrimas y felicidad que vivimos y seguiremos viviendo. Gracias por hacer tan placentera la universidad y por volverse parte de mi vida.

A mi esposo, por todos los momentos hermosos que hemos pasado juntos, por impulsarme cada día a ser una mejor persona, por apoyarme en todo momento y por regalarme la idea de un futuro maravilloso a tu lado.

RESUMEN

Las secuencias de ADN son archivos únicos de información, con las cuales podemos conocer la historia evolutiva de las poblaciones. Se han desarrollado una gran cantidad de pruebas estadísticas para detectar variaciones en estas secuencias con base en la teoría neutral de la evolución y el modelo de Wright-Fisher. Así como para poder predecir la acción conjunta de eventos demográficos y procesos selectivos durante la colonización y su influencia en la adaptación de las especies.

Es bien sabido que las poblaciones de árboles en América han sufrido eventos de reducción y expansión poblacionales durante los periodos glaciales y postglaciales, a través de los cuales se han enfrentado a diversos procesos de selección y adaptación a nuevos ambientes. Discernir entre eventos demográficos y adaptativos puede resultar en ocasiones complicado.

Para evaluar la sensibilidad de los métodos clásicos para detectar loci bajo selección natural se realizaron simulaciones de secuencias multilocus para ocho escenarios demográficos. Estos incluyeron coalescencia estándar, eventos de cuellos de botella y selección natural. Los escenarios pretendieron simular la historia demográfica de algunas coníferas de México, teniendo como constante inicial a las glaciaciones del Pleistoceno y como variable a la magnitud de los cuellos de botella que pudieron haber ocurrido durante el calentamiento del Holoceno. Estas simulaciones fueron utilizadas posteriormente para indagar si dichos patrones se ajustan para el caso de poblaciones naturales de *Abies religiosa* y *A. flinckii* del Eje Volcánico Transmexicano. Se identificaron huellas de eventos demográficos y genes candidatos a ser adaptativos en ambas especies, aunque tanto para los eventos de cuellos de botella, así como para los eventos de selección natural, fueron más severos los eventos y por ende más consistentes las huellas en las secuencias de ADN para las poblaciones de *Abies flinckii* que para las de *A. religiosa*.

INTRODUCCIÓN

Dobzhansky enunció la célebre frase *"Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución"*. Sin embargo, la evolución se puede apreciar en enfoques muy diversos. Para los fines que esta tesis persigue, se considerará a la evolución como el cambio en las frecuencias alélicas de una población a través de las generaciones (Curtis, 2007). La teoría de la genética de poblaciones utiliza este mismo enfoque para explicar los patrones evolutivos, en función de las fuerzas evolutivas a una escala ecológica (Eguiarte, y otros, 2013), para tratar de elucidar así cómo se ha moldeado la increíble diversidad de especies que han existido a través de la historia del fenómeno más fascinante, la vida.

Las variaciones en las secuencias de ADN son archivos únicos de información, con las cuales podemos conocer la historia evolutiva de las poblaciones; los cambios que la producen pueden deberse a factores intrínsecos o extrínsecos del organismo, que afectan su supervivencia o reproducción.

1. TEORÍA NEUTRAL DE LA EVOLUCIÓN

La única fuerza evolutiva que genera evolución a través de la adaptación es la selección natural. La adaptación es el proceso por el que algunos individuos de la población adquieren características a nivel génico, individual o poblacional, afectando su probabilidad de supervivencia o reproducción (Futuyma, 2013, Darwin, 1977). Podría parecer que en cada detalle de los organismos vivos hay evidencia de la selección natural, pues parecen estar muy bien adaptados a su ambiente, razón por la cual, durante el desarrollo de la teoría sintética de la evolución, casi todos los biólogos evolutivos suponían que la mayoría de las mutaciones tenían efectos adaptativos y todas las investigaciones se hacían en mutaciones con efectos morfológicos o fisiológicos.

Sin embargo, en 1966 Lewontin y Hubby encontraron una extensa variación genética que no concordaba con la visión genética de ese momento, pues la selección natural solo permitiría la existencia de una pequeña cantidad de polimorfismos (Hubby, y otros, 1966).

En 1968 Motoo Kimura calculó tasas evolutivas en secuencias de aminoácidos de distintas proteínas y encontró que las mismas proteínas evolucionaban a tasas constantes en distintos linajes y dicha constancia no podía ser resultado de la selección natural (Kimura, 1968). Para explicar estas discordancias desarrolló la teoría neutral de la evolución, la cual postula que la variación genética en alelos neutrales, se produce por mutación y se elimina por deriva génica (Kimura, 1983).

Con base en esta teoría podemos decir que la mayor parte de las variaciones de las secuencias de ADN son invisibles a la selección natural, lo que vuelve muy atractivo el utilizar estas diferencias entre las secuencias como un *reloj molecular* con el que podríamos determinar el tiempo de divergencia entre las distintas especies. También nos permitiría hacer inferencias de sus relaciones genealógicas, así como mapear geográficamente las estructuras poblacionales de las especies (Hartl, y otros, 2007).

2. COALESCENCIA

La vida solo puede ser vivida en prospectiva, pero debe ser entendida en retrospectiva.

Sören Kiekegaard (1843)

Tradicionalmente en el campo de la genética de poblaciones se veía al proceso evolutivo prediciendo la acción de las fuerzas evolutivas en prospectiva. Sin embargo, en las últimas décadas este modo ha ido cambiando a una visión en retrospectiva, que permite hacer inferencias sobre los eventos que afectaron a la población en el pasado (Hedrick, 2011).

Cuando se analiza una muestra de secuencias de ADN del presente, cada uno de los alelos que la compone puede tener una historia evolutiva distinta, pero siempre relacionada, pues en última instancia todas las especies que existen en la

actualidad tienen un único ancestro común. El ancestro común más reciente (MRCA, por sus siglas en inglés), del cual descienden todos los organismos de una población está dotado de ciertos alelos; cuando dos linajes de alelos se fusionan en uno solo en algún punto en el pasado, a través de procesos estocásticos, se le conoce como coalescencia (Hedrick, 2011) y la probabilidad de que estos dos alelos tengan un ancestro común en la generación anterior es de $1/(2N)$; donde N es el tamaño de la población (Hudson, 1991).

Una secuencia de ADN que se diferencia de otra por una o más mutaciones y pertenece a un conjunto de secuencias con un ancestro común reciente u homólogas se conoce como haplotipo (Scitable, 2014).

Basados en la teoría neutral de la evolución, Ronald Fisher (1930) y Sewall Wright (1931) desarrollaron un modelo de deriva génica a partir de la distribución binomial de frecuencias alélicas esperada en subpoblaciones. Este es conocido como el *modelo de Wright-Fisher* (Hartl, y otros, 2007) y supone que si una población es infinita, con generaciones discretas, panmíctica, de tamaño constante y sin ventajas adaptativas, mutaciones o migraciones, entonces, cualquier genotipo alcanzará el equilibrio después de una generación (Cook, 1979).

Cuando una población cumple los supuestos de este modelo no hay evolución porque no están cambiando las frecuencias alélicas; es a partir de las desviaciones de este modelo que se puede detectar la acción de las fuerzas evolutivas, es decir, los mecanismos que cambian la composición genética de la población a través del tiempo, estas son la mutación, la migración, la deriva génica y la selección natural.

A) MUTACIÓN

Todas las fuerzas evolutivas actúan sobre la variación genética preexistente y la única manera de generar una fuente nueva de variación es a través de la mutación. Las mutaciones en el ADN son originadas por errores en la replicación, alteraciones químicas de los nucleótidos o por radiaciones electromagnéticas

(Krebs, y otros, 2014). Estas pueden generar cambios o nuevos arreglos en la secuencia de ADN, así como deleciones e inserciones de fragmentos de la misma (Hartl, y otros, 2009). Esta es sin embargo una fuerza relativamente débil en el modelado de las frecuencias alélicas, ya que las tasas de mutación en las distintas especies son muy bajas. Además, si las nuevas mutaciones son deletéreas probablemente se eliminarán de la población en pocas generaciones (Krebs, y otros, 2014).

La probabilidad de preservación de una mutación dependerá de la probabilidad de su aparición y reparación. Si una mutación es neutral su “supervivencia” dependerá de la fuerza de la deriva génica y por lo tanto del tamaño poblacional. Si la mutación tiene efectos a nivel fenotípico, su preservación dependerá principalmente de la selección natural (Krebs, y otros, 2014).

B) MIGRACIÓN

La migración o flujo génico es muy parecida a la mutación, porque introduce nuevas variantes alélicas en las poblaciones, solo que éstas provienen de otras poblaciones, ya que cada población puede evolucionar de manera independiente y por lo tanto tener sus propias frecuencias alélicas. Las poblaciones varían en los alelos que comparten con otras poblaciones e incluso pueden poseer alelos raros o únicos. Es suficiente una porción relativamente pequeña de migrantes entre las poblaciones para disminuir la diferenciación genética obtenida y homogeneizarlas (Hudson, 1991). Los genes pueden ser transportados a través de individuos o gametas; por lo tanto el flujo génico dependerá de la capacidad específica de dispersión de cada especie. Solo los migrantes que se reproduzcan en la población contribuirán al mismo (Futuyma, 2013).

C) DERIVA GÉNICA

Uno de los principios del modelo de Wright-Fisher que generalmente no se cumple es que la población sea infinita. Dado que todas las poblaciones de especies

conocidas tienen un número limitado de individuos (Caponi, 2007), estas serán afectadas por la deriva génica.

La deriva génica es un proceso azaroso, del que no se puede conocer de antemano el resultado, pero del que sí se puede estimar su probabilidad. Por ejemplo, solo por azar, la composición de gametos que dará origen a la siguiente generación de una población contendrá un pool génico distinto al de la población parental. Aunque se produzcan grandes cantidades de gametos, no todas darán origen a individuos adultos en la siguiente generación. Esta desviación del cociente esperado se conoce como error de muestreo (Pierce, 2012).

El efecto de la deriva génica se incrementa conforme se reduce el tamaño de la población, y ésta induce una variación azarosa de sus frecuencias alélicas a través del tiempo. Lo que a su vez llevará a que se fijen o eliminen alelos de una población reduciendo la variabilidad genética y ocasionando que poblaciones que poseían frecuencias alélicas similares diverjan de manera gradual (Pierce, 2012).

La presencia de un cuello de botella incrementa el efecto de la deriva génica. Este ocurre cuando las poblaciones han sufrido una reducción drástica de su tamaño, lo que dejará una huella en las frecuencias alélicas de la población, al disminuir su variabilidad. Tal efecto dependerá de la magnitud y duración del cuello de botella (Biswas, y otros, 2006).

D) SELECCIÓN NATURAL

Charles Robert Darwin (1809-1882) y Alfred Russel Wallace (1823-1913), de manera independiente llegaron a la conclusión de que *“los cambios en la proporción de diferentes tipos de individuos son causadas por diferencias en su habilidad de sobrevivir y reproducirse, y que esos cambios resultan en la evolución de adaptaciones, características que parecen ser “diseñadas” para adaptar a los organismos a su ambiente”*, pero sin intervención de un ser supremo (Futuyma, 2013; Darwin, 1977).

En genética de poblaciones, la adaptación relativa se calcula a partir del genotipo de referencia que es el más favorecido, y su diferencial respecto a la adaptación relativa de otros genotipos, menos favorecidos. Esto se conoce como coeficiente de selección (s) (Wright, 1950). Por ejemplo, para el caso de coníferas se han estimado valores de coeficientes de selección de 0.04 y 0.01, en genes potencialmente adaptativos, los cuales son menores que los estimados para algunas características adquiridas durante la domesticación del maíz, con coeficientes de 0.06 (Prunier, y otros, 2011).

El camino que sigue la adaptación de los distintos genotipos en un locus puede ser clasificado de diversas maneras, se le llama selección *direccional* o *purificadora*, cuando un genotipo homocigo tiene ventaja adaptativa, *sobredominante* si tiene ventaja un genotipo heterocigo y *subdominante* si este último tiene desventaja adaptativa. También puede encontrarse como selección *positiva* y *negativa*, dependiendo de si una mutación es seleccionada a favor o en contra. Cuando se tratan características cuantitativas, la selección puede clasificarse como *estabilizadora* o *normalizadora*, si la característica fenotípica promedio es la mejor adaptada, y *diversificadora* o *disruptiva*, cuando dos o más fenotipos tienen ventaja adaptativa sobre el fenotipo promedio (Futuyma, 2013).

Con base en la teoría neutral sabemos que la mayor parte de la variabilidad genética de la población es el resultado de las mutaciones y la deriva génica y no de la selección natural. Partiendo de esta premisa, se desarrolló el modelo coalescente, el cual abre una amplia gama de usos de suma importancia para el campo de la genética de poblaciones como el cálculo del tiempo de coalescencia, la inferencia del tamaño efectivo de la población y la tasa de mutación de las especies, todo esto a partir del número de *sitios segregantes* (sitios nucleotídicos ocupados por dos o más nucleótidos) o *mismatches* (sitios nucleotídicos que varían entre pares de secuencias) de una alineación de secuencias muestreadas que se encuentran en equilibrio mutación-deriva. Este indica que las mutaciones actuales y antiguas han ocurrido a la misma tasa y que son eliminadas de la población únicamente por deriva génica también a una tasa constante (Hartl, y otros, 2007). Esto provee un marco para el desarrollo de pruebas estadísticas que

permiten la utilización de métodos de simulaciones computacionales muy eficientes (Rozas, 2002).

2.1 COALESCENCIA Y CAMBIOS EN EL TAMAÑO POBLACIONAL

En una población ideal con un tamaño constante, cuya genealogía es representada en función de sus tiempos de coalescencia en forma de *árbol*, se presentarán escasos nodos (mutaciones) y ramas relativamente largas cerca de la raíz (MRCA de todos los alelos de la muestra). Sin embargo, si existen fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones, estas afectarán directamente la probabilidad de distribución de los tiempos de coalescencia. Estos patrones de ramificación de los árboles coalescentes pueden utilizarse para hacer inferencias de demografía histórica en las poblaciones (Hartl, y otros, 2007).

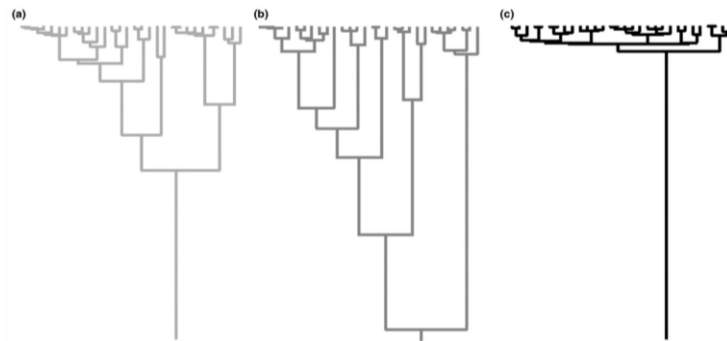


Figura 1. Huellas de crecimiento en las genealogías de poblaciones con (a) tamaño constante, (b) reducción exponencial y (c) crecimiento exponencial. Recuperada de Kuhner (2008).

Cuando ocurren eventos de expansión poblacional, se producirán ramas externas más largas (Fig. 1) (Kuhner, 2008), en donde se acumulan una gran cantidad de mutaciones de baja frecuencia, es decir, un exceso de mutaciones recientes. En el caso contrario, de eventos de contracción, fraccionamiento poblacional o selección balanceadora, las ramas largas generadas serán las internas (Fig. 1) (Kuhner, 2008), y contendrán un exceso de mutaciones de frecuencia intermedia, ya que existirán mutaciones antiguas en demasía (Ramírez-Soriano, y otros, 2008).

Cuando ocurren cuellos de botella, el árbol que se obtiene dependerá de la severidad del mismo. Por ejemplo, durante los cuellos de botella severos, se obtendrá de la muestra una genealogía en forma de estrella, pues casi ningún linaje sobrevivirá al mismo sin haber ‘coalescido’ y poco tiempo después habrá un exceso de mutaciones nuevas (Ramírez-Soriano, y otros, 2008). Cuando los cuellos de botella son moderados, se producirá un efecto similar a la selección balanceadora (Depaulis, y otros, 2003). Finalmente en escenarios que atravesaron cuellos de botella leves, muchos de sus linajes podrán escapar a la coalescencia, generando árboles con ramas internas largas. Como vemos, procesos distintos pueden generar genealogías similares y confundir su interpretación, para reducir esta confusión se han desarrollado una gran variedad de pruebas estadísticas basadas en la frecuencia de mutaciones, la distribución de haplotipos y la distribución de diferencias pareadas, que intentan rechazar la hipótesis nula de neutralidad (Ramírez-Soriano, y otros, 2008).

3. ADAPTACIÓN EN UN CONTEXTO DEMOGRÁFICO

Los organismos vivos se enfrentan a diversas dificultades generadas por el ambiente, que determinan su supervivencia y reproducción. Para poder hacer frente a tales desafíos, los organismos están dotados de diversos atributos morfológicos y fisiológicos, conocidos como adaptaciones, que son impulsados por el proceso de selección natural. Las adaptaciones son dinámicas y pueden tomar mayor o menor importancia dependiendo del estadio de vida por el que se curse (Boege, y otros, 2011).

En la biología evolutiva, que estudia la interfase de las presiones selectivas y los cambios de los ambientes que habitan los organismos, uno de los temas centrales recae en el entendimiento del proceso de adaptación, tanto en su origen como en su mantenimiento. Esto implica una desafiante tarea, pues siempre se ha tratado de fragmentar a los organismos en atributos, que por estar correspondidos a funciones específicas, en ocasiones son consideradas adaptaciones. Sin embargo

caracterizarlos es algo muy complejo, pues generalmente una función específica requiere la acción conjunta de diversos atributos. Es por esto que actualmente se buscan métodos que permitan discernir las partes fundamentales de los organismos, para permitir el estudio de la selección natural en modelos funcionales (Boege, y otros, 2011).

Por ejemplo, Grivet, y otros (2009) realizaron una investigación con *Pinus halepensis*, en la que examinaron la historia demográfica y el polimorfismo local de genes potencialmente adaptativos y encontraron que procesos demográficos como cuellos de botella y efectos fundadores llevan a una diversidad génica global reducida dentro de las poblaciones. Esto limita la eficacia de la selección natural y puede conducir a la supervivencia de genotipos sin ventajas adaptativas. Por otro lado, Pujol y otros (2008), utilizando la planta europea *Mercurialis annua* y experimentos de selección en diversas poblaciones, encontraron que los eventos de expansión poblacional pueden comprometer la capacidad de las especies de responder a la selección natural, pues estos eventos disminuyen la variación genética aditiva.

4. PRUEBAS DE NEUTRALIDAD Y DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

La capacidad de detectar las huellas de la adaptación depende de la magnitud de los eventos selectivos y de la sensibilidad de los métodos utilizados para distinguirlos de otras fuerzas que podrían mimetizar los efectos de la selección natural, como los eventos demográficos asociados a la deriva génica (Grivet, y otros, 2011). El tomar como hipótesis nula a la teoría neutral ha permitido la creación de pruebas que determinan si la variación genética es consistente con ella y hacer inferencias para detectar loci que estén siendo afectados potencialmente por la selección natural (Castillo, 2007).

En el presente estudio se utilizaron dos clases de pruebas estadísticas para detectar huellas de selección positiva: estadísticos Clase I (Tajima (D), Fu & Li's D (F_D y F_F), Ramos & Rosas (R2) y Fay & Wu (H)), que se basan en el espectro de frecuencia de las mutaciones y un estadístico Clase II (Fs's (F_S)), que se basa en

la estructura del desequilibrio de ligamiento; de manera específica en la distribución de haplotipos. Se eligieron estas pruebas porque se ha visto que juntas brindan información amplia y relevante para la inferencia de procesos evolutivos, tanto demográficos como selectivos (Grivet, y otros, 2009; Depaulis, y otros, 2003)

| CLASE | ESTADISTICO | DEFINICIÓN | REFERENCIAS |
|----------|--------------------|---|-----------------------------------|
| Clase I | Tajima (D) | <ul style="list-style-type: none"> Mide la diferencia entre dos estimadores de tasa mutacional, Θ_w y π | (Tajima, 1989) |
| | Fu & Li (FD, FF) | <ul style="list-style-type: none"> Diferencian mutaciones únicas antiguas y recientes, con base en su ubicación en las ramas de las genealogías, utilizando Θ_w y π respectivamente | (Fu, y otros, 1993) |
| | Fay & Wu (H) | <ul style="list-style-type: none"> Detecta la presencia de excesos en alelos derivados de alta frecuencia. | (Fay, y otros, 2000) |
| | Ramos & Rosas (R2) | <ul style="list-style-type: none"> Se basa en la diferencia entre el número de mutaciones únicas por secuencia y el número promedio de diferencias nucleotídicas | (Ramírez-Soriano, y otros, 2008), |
| Clase II | Fu (Fs) | <ul style="list-style-type: none"> Incorpora la distribución de haplotipos | (Fu, y otros, 1993) |

Tabla 1. Descripción de las pruebas estadísticas utilizadas

A) PRUEBA DE TAJIMA (D)

Basado en el modelo de sitios infinitos, Tajima (1989) propuso que la diferencia entre el número de sitios segregantes, S y la media de las diferencias pareadas entre las secuencias, π_n , permite inferir:

- Con valores positivos, selección balanceadora (genotipos heterocigos favorecidos), cuellos de botella recientes o la unión reciente de dos poblaciones (Tajima, 1989) (Fay, y otros, 2000).
- A partir de valores negativos, es decir, un exceso de alelos raros, o de baja frecuencia, se supone selección en contra de los genotipos con mutaciones deletéreas; es decir, selección purificadora, direccional o positiva. También se infieren cuellos de botella antiguos

o severos, así como expansión poblacional posterior a un cuello de botella reciente. (Hartl, y otros, 2007) (Castillo, 2007)

Como vemos, las diferencias respecto al modelo de sitios infinitos no necesariamente implican presencia de selección natural, pues la distribución de los parámetros utilizados es muy compleja. Hoy en día estas pruebas de significancia se fundamentan al ser comparados con valores obtenidos de simulaciones de coalescencia, sobre las que se profundizará en el siguiente apartado (Hartl, y otros, 2007).

B) PRUEBAS DE FU & LI'S D (F_D y F_F)

Las pruebas de F_D y F_F de Fu & Li, desarrolladas en 1993, son similares a la prueba de Tajima.

Estos consideran la distribución de mutaciones en la genealogía, en donde las mutaciones “viejas” se encuentran en las ramas internas del árbol, mientras que las mutaciones “nuevas” se ubican en las ramas externas. La comparación entre el número esperado de mutaciones en ambas ramas, es decir, la comparación entre las mutaciones ocurridas en el pasado remoto y más recientes es el principio utilizado para detectar selección natural. (Fu, y otros, 1993)

Así, cuando la población está siendo afectada por selección negativa, purificadora, por una expansión poblacional o cuello de botella severo, habrá un exceso de mutaciones en las ramas externas, dado que los alelos deletéreos se encuentran en bajas frecuencias. También es probable que ocurra esto si un alelo ventajoso ha sido fijado recientemente, pues la mayoría de las mutaciones de la población serían nuevas. Estos escenarios resultarán en estadísticos negativos (Depaulis, y otros, 2003, Ramírez-Soriano, y otros, 2008).

Por otro lado, si el locus está siendo afectado por selección balanceadora, habría deficiencia en mutaciones de ramas externas, arrojando estadísticos positivos. También se infieren cuellos de botella recientes. (Jensen, y otros, 2005)

La principal diferencia con la prueba de Tajima es que ésta utiliza la diferencia entre el número de sitios segregantes y la media de las diferencias pareadas entre las secuencias, mientras que las pruebas de Fu & Li utilizan las diferencias entre el número de sitios segregantes de las ramas externas y la media de las diferencias pareadas o la diferencia entre el número de sitios segregantes de las ramas externas e internas (Fu, y otros, 1993).

C) RAMOS & ROZAS (R_2)

El principio de esta prueba parte de la diferencia entre el número de mutaciones únicas (*singletons* en inglés) y el promedio de diferencias nucleotídicas pareadas (Rozas, 2002).

Con esta prueba se esperan valores bajos en escenarios de crecimiento poblacional severo y reciente. Se ha demostrado que esta prueba es muy sensible para detectar crecimiento poblacional, sobre todo con tamaños de muestra pequeños (Rozas, 2002). Sin embargo, otros eventos como el *hitchhiking* podrían producir genealogías similares.

D) PRUEBA DE FU'S (F_s)

Esta prueba fue desarrollada por Yun-Xin Fu en 1997 para detectar desviaciones del modelo neutral, caracterizadas por crecimiento poblacional, hitchhiking y selección de fondo.

Cuando el estadístico F_s arroja resultados negativos se supone un exceso de mutaciones recientes (alelos raros), indicando la presencia de expansión poblacional o hitchhiking (Fu, 1997).

Los resultados positivos permiten inferir una deficiencia de alelos, lo que podría esperarse de un cuello de botella reciente o de selección sobredominante.

E) PRUEBA DE FAY & WU (H)

Esta prueba fue desarrollada por Fay & Wu en el año 2000, y permite medir un exceso de variantes de alta frecuencia comparados con las variantes de frecuencia intermedia, aún con una cantidad baja de sitios segregantes, ya que una característica sobresaliente de la selección positiva es el exceso de variantes de alta frecuencia (Zeng, y otros, 2006). Al igual que la D de Tajima, la prueba H rechaza el modelo neutral cuando hay un exceso de variantes de baja y alta frecuencia. Sin embargo, la D de Tajima sólo lo rechaza cuando se presenta un exceso de variantes de baja frecuencia, y no de alta frecuencia, o viceversa (Fay, y otros, 2000).

Cuando se obtienen resultados positivos en la prueba H , se infiere un déficit de variantes derivados de alta y moderada frecuencia respecto a lo esperado bajo equilibrio, mientras que los resultados negativos indican un exceso de variantes derivados de alta frecuencia (Sterken, y otros, 2009)

Cuando la población decrece en tamaño, el número de variantes de baja frecuencia tiende a ser menor que el de las variantes de frecuencia intermedia y alta, como en el caso de los cuellos de botella recientes, lo que arroja valores negativos de H (Zeng, y otros, 2006); sin embargo para cuellos de botella antiguos, el signo se invierte.

Esta prueba fue diseñada primordialmente para detectar los rasgos característicos de los barridos selectivos y no se espera que sea adecuado para detectar cuellos de botella (Depaulis, y otros, 2003).

Algunos ejemplos de la utilización de estas pruebas son el estudio realizado por Grivet y otros (2009) con una especie de conífera mediterránea (*Pinus halepensis*), en donde se observaron valores promedio para la D de Tajima de: 0.159, 0.177 y -0.15, para la F_s de Fu de: 0.56, 1.848 y 1.047 y para la H de Fay & Wu -0.435, -1.231 y -0.906, respectivamente. Indicando que algunos de los genes analizados rechazan el modelo neutral, bajo los modelos demográficos que mejor se ajustaron a las historias de sus poblaciones y probablemente son adaptativos.

En otro estudio realizado por Pyhäjärvi, y otros (2007) con poblaciones europeas de *Pinus sylvestris*, se obtuvieron valores de estadísticos de resumen observados para la D de Tajima de: -0.53 y -0.51 y para la H de Fay & Wu de: -0.34 y -0.24, lo cual fue incompatible con el modelo neutral y sugirió un evento de cuello de botella antiguo.

Finalmente, en el caso de una población del abeto de Taiwan, *Cunninghamia konishii* que experimentó una expansión postglacial, Hwang y otros (2003) encontraron valores significativos para la D de Tajima de -2.41 y de -3.74 para el estadístico D^* de Fu & Li, que fueron compatibles con un modelo de expansión poblacional.

5. SIMULACIONES

Las simulaciones computacionales son programas desarrollados para representar abstracciones de sistemas complejos, como los sistemas vivos y los múltiples eventos que los afectan, entre ellos las fuerzas evolutivas (Hoban, y otros, 2012). Las simulaciones han sido utilizadas desde hace muchos años en el área de la genética de poblaciones, pero solo por expertos en programación. Afortunadamente en los últimos años se han desarrollado numerosos paquetes de

simulación accesibles a investigadores y estudiantes de diversas áreas (Hoban, y otros, 2012).

El fundamento de los programas de simulaciones es la generación de pseudo datos de secuencias polimórficas de ADN, bajo escenarios evolutivos y demográficos específicos que el usuario establece. Las aplicaciones potenciales de estos programas pueden englobarse en tres grandes grupos: predicciones, inferencias estadísticas y evaluación de métodos estadísticos (Hoban, y otros, 2012).

Una de las principales ventajas radica en la generación de muchas réplicas de pseudo datos ligados a procesos estocásticos, demográficos o evolutivos, que para muchas especies, de manera natural, sería muy difícil encontrar (Hoban, y otros, 2012).

Por ejemplo, Holliday y otros (2010) realizaron un estudio para determinar si la historia demográfica de recolonización postglacial en poblaciones de *Picea sitchensis*, conífera distribuida en el oeste de Norte América, sesgó el espectro de su frecuencia de mutaciones. Con el objeto de identificar si las desviaciones del modelo neutral fueron causadas por eventos demográficos, compararon los estadísticos de resumen observados de genes nucleares con los obtenidos a partir de la simulación de secuencias nucleares que inferían la historia demográfica de las poblaciones. Encontraron que la población atravesó diversos cuellos de botella durante el periodo de recolonización postglacial.

Igualmente, en la revisión realizada por Nosil, y otros (2009), utilizaron simulaciones computacionales para hacer predicciones sobre la selección divergente en regiones selectivas, entre otros tópicos, y encontraron que la variación en la distribución en sitios selectivos es lo que más concuerda con mucha de la literatura reciente.

Como podemos darnos cuenta, los métodos computacionales generalmente se utilizan en biología evolutiva para inferir hechos pasados o a futuro a partir de datos actuales. Inferir estos modelos representa una tarea difícil por tratarse de escenarios desconocidos, es por esto que la simulación de evolución *in silico* con

programas computacionales, pese a representar modelos simplificados, proporcionan generalmente la única forma de investigar y probar modelos evolutivos en condiciones controladas (Dalquen, y otros, 2012). Para el caso de muchos árboles forestales en México, que han sufrido eventos de reducciones y expansiones poblacionales durante periodos glaciales y postglaciales (Aguirre-Planter, y otros, 2000), a través de los cuales se han enfrentado a diversos procesos de selección y adaptación a nuevos ambientes, resultan un modelo ideal para la modelación y corroboración del efecto de tales eventos.

6. BIOLOGÍA DE *Abies*

Las coníferas son uno de los elementos más importantes de los bosques montañosos mexicanos, pues son primordiales en el mantenimiento de sus recursos hídricos. (Boege, y otros, 2011). México posee una alta representación de coníferas, dentro de cuatro familias principales: Pinaceae (4 géneros y 61 especies), Cupressaceae (4 géneros y 29 especies), Podocarpaceae (1 género y 3 especies) y Taxaceae (1 especie). Casi la mitad de estas especies son endémicas. En general, las coníferas pueden crecer desde el nivel del mar hasta por encima de los 4,000 m; sin embargo, poseen una distribución limitada. La mayor diversidad de especies se encuentra en los bosques montañosos de la Sierras Madres Occidental y Oriental (Gernandt, y otros, 2014).

Muchos de estos bosques han sufrido una reducción del área cubierta, desaparecido o cambiado su constitución, debido principalmente a incendios y tala indiscriminada. Si sumamos los efectos del calentamiento global, el escenario actual representa un panorama nada favorable para los bosques del país. De hecho al día de hoy hay 39 taxa de coníferas que se encuentran en alguna categoría de riesgo en la NOM-059-Semarnat-2010 (Gernandt, y otros, 2014; Semarnat, 2010)

6.1 *Abies religiosa*

Uno de los géneros más representados en los bosques del centro del país es el género *Abies*. Dentro de este encontramos de 6 a 10 especies en México. La más conocida es *Abies religiosa*, también llamada abeto, oyamel o pino de navidad.

Esta especie se distribuye mayoritariamente en manchones aislados de alta montaña. Es nativa de las montañas centrales de México (Eje Volcánico Transversal) a altitudes de 2,500 a 4,100 msnm en bosques frescos y con alta cantidad de lluvias, con veranos húmedos y caída de nieve en temporada invernal; lo que la hace muy resistente al frío (CENAPRED; CONANP; SEMARNAT, 2014).

Las temperaturas en los bosques de oyamel varían entre los -20 y los 25°C , con una media de 7° a 15°C . La precipitación media anual en estas es generalmente mayor a los 1,000 mm. Los suelos donde crece el oyamel son muy jóvenes, de origen volcánico y con pendientes muy pronunciadas. (CENAPRED; CONANP; SEMARNAT, 2014)

Abies religiosa, al igual que otras coníferas, es un modelo ideal para estudios de evolución adaptativa a través de la genética de poblaciones, debido a que no está domesticada, presenta una elevada diversidad genética, se caracteriza por una dispersión del polen anemófila, además de ser una especie longeva que ocupa una gran distribución geográfica con ambientes contrastantes. (Eguiarte Fruns, y otros, 1997).

6.2 *Abies flinckii*

También conocido como pinabete, oyamel de Guatemala, abeto de Guatemala, pashaque o romerillo es una conífera que pertenece a la familia Pinaceae. Se distribuye en México, en los estados de Jalisco y Michoacán (Aguirre-Planter, y otros, 2000). A causa de la pérdida de su hábitat, en México

se encuentra en protección especial según la NOM-059-Semarnat-2010 (Semarnat, 2010).

Esta especie puede alcanzar una altura de hasta 50 metros y un diámetro hasta de 1 metro. Se localiza desde los 2,400 a los 3,500 metros sobre el nivel del mar, en temperaturas entre los 3 y 10 °C (Semarnat, 2010).

Aún no existe un consenso sobre el origen e historia demográfica del género *Abies* en México. A partir de estudios paleobotánicos se ha determinado que este género probablemente se originó al oeste de Norteamérica, durante el Eoceno, hace aproximadamente 50 millones de años (Liu, 1971). En México, el registro de polen más antiguo data del Plioceno (hace aproximadamente 5 Ma) y fue hallado en Paraje de Solo, Veracruz (Graham, 1999). Se ha propuesto que durante los períodos glaciales las poblaciones de *Abies* colonizaron las áreas bajas de los desiertos del Norte de México (Eguiarte Fruns, y otros, 1997) para luego migrar a puntos más altos en las cordilleras del país.

De hecho, es bien sabido que las poblaciones de árboles han sufrido eventos de reducciones y expansiones poblacionales durante periodos glaciales y postglaciales (Hu, y otros, 2008), a través de los cuales se han enfrentado a diversos procesos de selección y adaptación a nuevos ambientes.

Se ha situado a los ciclos glaciales del Pleistoceno como la fuerza motriz que ha moldeado el aislamiento poblacional, y por ende, la especiación en diversos taxa. Durante los periodos glaciales, los taxa que habitaban las montañas migraron montaña abajo, donde tuvieron un gran flujo génico interpoblacional. Luego, durante el calentamiento del Holoceno, las poblaciones continuas colapsaron en varios manchones aislados de alta montaña, que han sido sometidos a fuerzas estocásticas como la deriva génica, que pudieron haber conducido a una rápida pérdida de variabilidad genética (Jaramillo-Correa, y otros, 2008). Sin embargo, aún no está claro si estos desplazamientos y cambios de hábitats se tradujeron en adaptaciones específicas a ciertas condiciones (pendiente, humedad, exposición a rayos UV, etc).

Se ha propuesto a través de estudios con alozimas, microsátélites, ADN mitocondrial y de cloroplasto, que la divergencia de *Abies flinckii*, *A. guatemalensis*, *A. hickeli* y *A. religiosa* se ha generado en manchones aislados a lo largo del Eje Neovolcánico Transmexicano y en sus límites de distribución, y que su diferenciación se ha modelado principalmente por la deriva génica después del colapso del Holoceno (Aguirre-Planter, y otros, 2000; Jaramillo-Correa, y otros, 2008; Jaramillo-Correa, y otros, 2009).

Dado que las poblaciones de *Abies* tienen gran importancia ecológica y económica (proveen madera, leña, árboles de ornato, protección a las cuencas hídricas, etc.) (Eguiarte Fruns, y otros, 1997), el poder detectar genes adaptativos en estas poblaciones permitiría diseñar estrategias óptimas para su conservación genética. Ya que los recursos para la conservación son limitados, sería importante conservar primero las poblaciones que contengan genes que les aporten algunas ventajas adaptativas y que a su vez les permitan hacer frente al calentamiento global.

Como hemos visto, discernir entre eventos demográficos y selectivos en ocasiones puede resultar complicado; en general se sabe que los primeros afectan de manera homogénea a todos los loci del genoma y que los segundos sólo tienen influencia en loci específicos que se encuentran afectados por la selección natural (Grivet, y otros, 2009). Sin embargo, cuando se estudian genes puntuales se ha visto que diversas fuerzas evolutivas pueden mimetizar los efectos de la selección natural, como eventos demográficos o estructura poblacional (Grivet, y otros, 2011). Este es el caso de los cuellos de botella, pues cuando la variación en el genoma es neutra, afecta de manera muy similar a los efectos generados por barridos selectivos, a causa de la presencia del efecto de *hitchhiking* de la mutación ventajosa (Depaulis, y otros, 2003). Estas particularidades pueden generar dificultades en la distinción y detección conjunta de eventos demográficos y selectivos, es por esto que el actual estudio pretende investigar la sensibilidad de las pruebas clásicas de neutralidad para identificar loci afectados por selección natural en poblaciones que hayan sufrido contracciones, así como indagar si dichos patrones se ajustan para el caso de *Abies religiosa* y *A. flinckii*.

OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar la sensibilidad de las pruebas clásicas de neutralidad para identificar loci afectados por selección natural en poblaciones que han sufrido contracciones de diferentes intensidades.
2. Determinar si los genes candidatos de *Abies religiosa* y *A. flinckii* se ajustan a lo esperado en un escenario de contracción poblacional y si alguno de ellos presenta señales de selección.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Observar cómo influye la variación de la fuerza de selección en la detección de loci adaptativos.
2. Reconocer si la sensibilidad de las pruebas clásicas de neutralidad varía en poblaciones que atraviesan contracciones de distintas magnitudes.
3. Indagar si la presencia de loci selectivos afecta los loci aledaños.

HIPÓTESIS

Dado que los procesos selectivos y demográficos pueden producir las mismas genealogías, se espera encontrar el mismo resultado en las pruebas de neutralidad para los loci que han sufrido cuellos de botella y para aquellos afectados por selección positiva, lo que podría dificultar la identificación de estos últimos en poblaciones que han sufrido cuellos de botella, sobre todo si estos fueron severos.

MÉTODO

Para evaluar la sensibilidad de los métodos clásicos para detectar loci bajo selección natural (Grivet, y otros, 2009; Depaulis, y otros, 2003), se simularon ocho escenarios demográficos de coalescencia multilocus con el programa mlcoalsim v1.42 (Ramos-Onsins, y otros, 2007). Cada escenario incluyó 1,000 iteraciones en donde se simularon 100 secuencias de 1,000 pares de bases con cinco sitios polimórficos. Estos valores de diversidad corresponden aproximadamente a los que se han observado en genes nucleares en coníferas de Norte América (Bouillé, y otros, 2005 ; Jaramillo-Correa, y otros, 2008).

Para tener una plataforma de partida, primero se simuló un escenario de coalescencia estándar, sin cambios en el tamaño poblacional ni eventos selectivos. Luego, en las simulaciones subsiguientes se incorporaron eventos de cuellos de botella y de selección natural, que se describen más adelante. Todas las simulaciones fueron modeladas con el parámetro de recombinación poblacional $4Nr=10$; donde N es el tamaño poblacional y r la tasa de recombinación por locus; así como el parámetro $\Theta w=4N\mu=10$; en el cual μ es la tasa de mutación por locus, ambos valores fueron elegidos porque se ha observado y se corroboró que con ellos la recombinación casi tiene ningún efecto (Ramírez-Soriano, y otros, 2008).

Cuellos de botella

Fueron modelados tres escenarios con historias demográficas similares. Inicialmente todos tuvieron un tamaño poblacional tres veces mayor al actual, con una posterior reducción poblacional repentina del 30% del tamaño actual y una expansión poblacional paulatina que concluyó con un incremento de 1.75 veces el tamaño inicial. Esta reducción correspondería a la que sufrieron la mayoría de especies de coníferas en el anterior interglaciar, incluyendo a *A. religiosa*, hace unos $125,000 \pm 5,000$ años (Web III, y otros, 1992). Luego fueron simulados los escenarios de los cuellos de botella de interés, que consistieron en reducciones súbitas del 50, 75 y 90% del tamaño poblacional inicial (C.B. 0.5, 0.75 y 0.9), tal como lo muestra la Figura 2. Todos estos cuellos de botella tuvieron una duración de 0.005 (en unidades de $4N_0$ generaciones desde el presente, donde N_0 representa el tamaño poblacional inicial) y representan la reducción poblacional a la que han estado sometidas las poblaciones de coníferas desde el inicio del periodo interglaciar actual, hace aproximadamente 11,500 años (Aguirre-Planter, y otros, 2000). Para simular el crecimiento posterior al cuello de botella se fijó una curva logística con el parámetro ts a 0.025. Es decir, estos escenarios pretendieron simular la historia demográfica de especies arbóreas del centro de México, como *Abies religiosa* y *A. flinckii*, teniendo como constante inicial a las glaciaciones del Pleistoceno y como variables a distintas magnitudes de cuellos de botella que han podido haber ocurrido durante el calentamiento del Holoceno (Web III, y otros, 1992; Jaramillo-Correa, y otros, 2008).

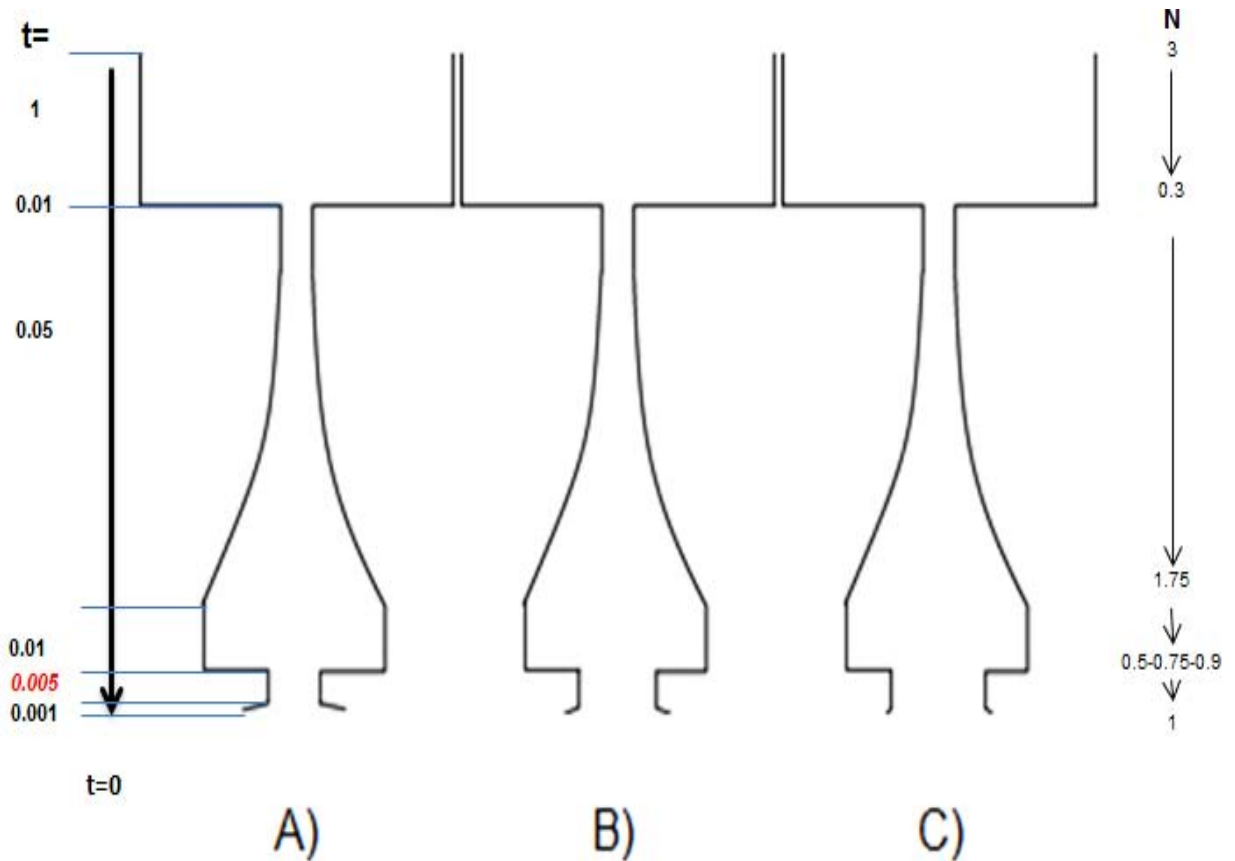


Figura 2. Muestra los tres escenarios de cuellos de botella de distintas magnitudes modeladas (t =duración del cuello de botella en unidades generacionales y N =tamaño poblacional), donde: A) Cuello de botella al 50% del tamaño en 0.005 B) C.B.) Cuello de botella al 75% del tamaño en 0.005 y C) Cuello de botella al 90% del tamaño en 0.005 (magnitud de la reducción del tamaño poblacional, respecto al tamaño inicial 1).

Selección natural

Para el caso de la selección natural ($\sigma=4Ns$, donde N es el tamaño efectivo de la población y s el coeficiente de selección), se modelaron tres escenarios de distintas magnitudes de selección natural positiva, que es la más fácil de detectar. En todos ellos el cuarto locus de las secuencias simuladas fue el afectado por la selección natural positiva, con valores de s de 0.005, 0.05 y 0.075 para cada escenario, respectivamente. Estos valores se asemejan de manera muy general a los detectados empíricamente en poblaciones de coníferas (Prunier, y otros, 2011;

Eckert, y otros, 2012) Para mayor facilidad se supuso que este locus estaba ubicado en la segunda mitad de la secuencia, en la posición 629. Se esperaría que la posición no afecte la capacidad de las pruebas de selección, aunque no fue probado en el trabajo actual.

La última simulación consistió en la modelación de un escenario en el que se combinaron un cuello de botella con una reducción súbita del 75% del tamaño poblacional inicial y un locus bajo selección con una fuerza s de 0.05, ambos moderados, se procedió a utilizar dichos valores pues representan los escenarios que obtuvieron, de manera independiente, mayor número de estadísticos de resumen significativos, esto con el fin de saber si es posible detectar un evento de selección natural cuando este ocurre en una población que ha sufrido un cuello de botella.

En este estudio se utilizaron simulaciones de coalescencia y estadísticos de resumen para probar hipótesis demográficas y de selección natural, ya que estos eventos generan perturbaciones en el número de polimorfismos esperados bajo el modelo neutral estándar. Sin embargo, ya que distinguir los efectos de ambas hipótesis puede resultar más complejo, una de las soluciones que se han propuesto consiste en estudiar diversos loci a lo largo del genoma para identificar a los que posean patrones atípicos, y así discernir eventos demográficos que afectan a todos los loci del genoma, de procesos selectivos que afectan únicamente a loci específicos (Grivet, y otros, 2009).

De esta forma se compararon los resultados de cada escenario modelado: coalescencia estándar, cuellos de botella y selección natural, con base en seis estadísticos de resumen; cuatro de ellos corresponden a estadísticos Clase I, es decir, que están basados en el espectro de frecuencia de las mutaciones. El primero de ellos fue la D de Tajima (Tajima, 1989), que mide la diferencia entre dos estimadores de tasa mutacional, Θ_w y π ; también se calcularon, la D y F de Fu & Li (Fu, y otros, 1993), que diferencian mutaciones únicas antiguas y recientes, con base en su ubicación en las ramas de las genealogías, utilizando Θ_w y π respectivamente; el tercer estadístico fue, la $R2$ de Ramos & Rosas (Ramírez-Soriano, y otros, 2008), el cual se basa en la diferencia entre el número de

mutaciones únicas por secuencia y el número promedio de diferencias nucleotídicas. Finalmente se utilizó la H de Fay & Wu (Fay, y otros, 2000), que detecta la presencia de excesos en alelos derivados de alta frecuencia. También se utilizó un estadístico Clase II, la F_s de Fu (Fu, 1997) que incorpora la distribución de haplotipos. Se eligieron estas pruebas porque se ha visto que juntas brindan información amplia y relevante para la inferencia de procesos evolutivos, tanto demográficos como selectivos y cubren adecuadamente los efectos de todos ellos a lo largo del espectro de frecuencias (Grivet, y otros, 2009).

Para detectar la existencia de diferencias significativas en el escenario estable, los escenarios bajo selección natural y cuellos de botella, inicialmente se utilizaron tablas de intervalos de confianza correspondientes a cada estadístico sumario (Tajima, 1989; Fay, y otros, 2000; Fu, 1997; Fu, y otros, 1993; Ramírez-Soriano, y otros, 2008). Sin embargo, dada la falta de poder estadístico que estas pueden tener (Teshima, y otros, 2006), también se compararon los valores obtenidos por los mismos estadísticos de resumen arrojados en cada uno de los escenarios perturbados, tanto por la selección natural como por los cuellos de botella, contra los valores de las pruebas del escenario estable, a través de análisis de varianza (ANOVA), para evaluar si la media de las poblaciones simuladas es igual. En los casos que no fue aceptada esta hipótesis se prosiguió con pruebas de *Tukey*, para crear intervalos de confianza de las diferencias pareadas entre las medias poblacionales (Minitab, 2016) con el programa Statistica v8. Estas se hicieron de manera general (i.e. considerando todos los loci de una secuencia de manera simultánea) y específicamente para el locus 4 (el afectado por la selección natural). La significancia también se determinó a través de una prueba probabilística a posteriori, con las mismas comparaciones entre escenarios utilizando el programa mlcoalsim v1.42; se obtuvieron valores entre 0 y 1 y se consideró a los valores más cercanos a 1 como los más probablemente veraces (Silva, y otros, 2001).

Finalmente, se realizaron diversas pruebas ANOVA y *Tukey* con el programa Statistica v8 y probabilidad a posteriori con el programa mlcoalsim v1.42, para comparar a los escenarios simulados afectados por la selección natural contra los

escenarios simulados bajo cuellos de botella. En estos, se utilizaron los primeros como valores observados y los segundos como valores esperados, para así estimar la probabilidad de que ambos tipos de escenarios produjeran valores similares de estadísticos de resumen.

Genes de Abies religiosa y A. flinckii

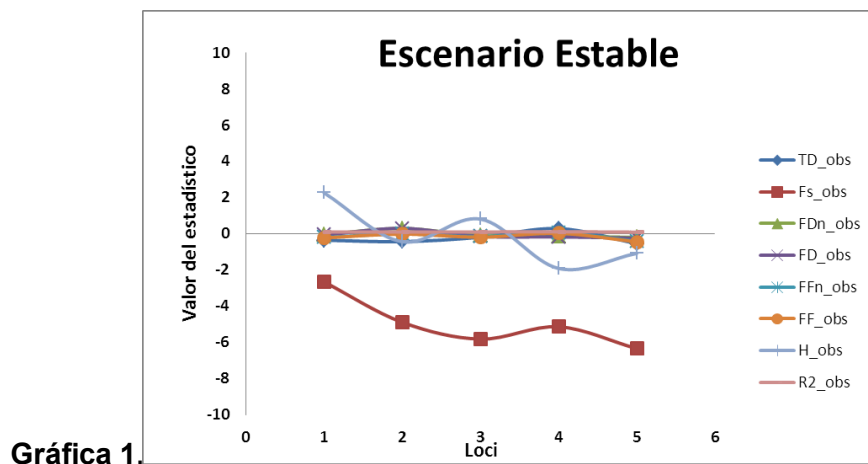
Con el propósito de detectar si los valores de los estadísticos de resumen obtenidos con los genes nucleares estudiados en *Abies religiosa* y *A. flinckii* (ver más abajo) son compatibles con alguno de los escenarios demográficos o selectivos modelados, se compararon los estadísticos de resumen de las poblaciones naturales con los de las poblaciones simuladas. Las comparaciones se realizaron directamente con los estadísticos de resumen de cada escenario y a través de la prueba de probabilidad posterior con el programa mlcoalsim v1.42, en donde los datos esperados fueron los de los escenarios simulados y los observados fueron el promedio de los genes obtenidos en las poblaciones naturales de *Abies religiosa* y *A. flinckii*. Ambas especies se estudiaron de forma independiente.

Se utilizaron como marcadores moleculares a once genes nucleares potencialmente adaptativos de 400 individuos de 20 poblaciones de *Abies religiosa* y *A. flinckii*, obtenidos de la tesis de maestría de Gustavo Ibrahim Giles Pérez, sobre la historia evolutiva de un complejo de especies de abetos del centro de México, del Instituto de Ecología, UNAM. Estos genes fueron elegidos de la base de datos generada por Roschanski y otros (2013) con una porción del transcriptoma de *Abies alba*, a partir de la cual también se eligieron los oligos utilizados (Apéndice 1). Estos marcadores fueron enviados a la Universidad de Washington para ser amplificados y secuenciados con el método secuenciación Sanger. Dichas secuencias fueron alineadas con el programa BioEdit, posteriormente se realizó una reconstrucción de haplotipos a la cual se le estimaron los estadísticos de resumen D de Tajima, F_s de Fu y H de Fay & Wu con el programa DNAsp v.5 (Librado, y otros, 2009).

RESULTADOS

Escenario con demografía estable

El escenario estable, que tuvo un tamaño constante y no estuvo afectado por eventos demográficos ni de selección natural, mostró estadísticos Clase I que fueron en su mayoría negativos, aunque hubo algunos positivos en los loci 2 y 4. Tal como se esperaba ninguno fue significativamente distinto de cero, a excepción del estadístico de resumen Clase II F_s , que fue negativo y significativamente distinto de cero para todos los loci, y del estadístico H , que fue significativamente positivo y negativo para diferentes loci a lo largo de la secuencia (Gráfica 1).



Gráfica 1.

Gráfica 1. Distribución de valores promedio para ocho estadísticos de resumen obtenidos con un escenario estable en 1000 simulaciones de 100 secuencias de 1000 pares de bases con cinco sitios polimórficos.

TD (Tajima's *D*), *FS* (Fu's *F_s*), *FD* y *FN* (Fu & Li's *F* y *D*), *FDn* y *FNn* (Fu & Li's *F* y *D* sin grupo externo), *H* (Fay & Wu's *H*) y *R2* (Ramos & Rozas *R2*).

Cuellos de botella

En los escenarios con cuello de botella severo y leve (C.B. 0.5 y C.B. 0.9), los valores promedio de los estadísticos de resumen Clase I: *D* de Tajima, *D* y *F* de

Fu & Li y R^2 de Ramos & Rosas arrojaron resultados positivos, pero ninguno fue significativamente distinto de cero. Para el escenario afectado por un cuello de botella moderado (C.B. 0.75), se obtuvieron valores positivos y significativos con los estadísticos D y F de Fu & Li (Tabla 2).

Con el estadístico F_s de Fu se obtuvieron valores positivos, la mayoría significativos; sin embargo, con el cuello de botella leve (C.B. 0.9), contrario a lo esperado, también se obtuvieron estadísticos negativos y significativos (Tabla 2).

Para el caso del estadístico H de Fay & Wu se obtuvieron valores significativos positivos y negativos (Tabla 2), pero en promedio resultaron valores negativos significativos para los tres escenarios con distintas reducciones poblacionales. No se pudo discernir entre escenarios con cuellos de botella de diferentes intensidades a partir de la prueba de ANOVA.

Sin embargo, al comparar a los escenarios con reducción poblacional contra el escenario estable, se encontraron diferencias significativas en todos los loci al menos con dos de los estadísticos de resumen utilizados, particularmente con la prueba de probabilidad posterior; es decir, los cuellos de botella afectaron a toda la secuencia y no a cada loci de manera independiente (Tablas 3 y 4). Esto fue corroborado con la prueba ANOVA, pues se encontraron diferencias significativas para todos los estadísticos ($p= 0.00017$ (D), $p= 0.00083$ (F_s), $p= 0.0001$ (FD_n), $p= 0.00003$ (FD), $p= 0.00002$ (FF_n), $p= 0.00001$ (FF) y $p= 0.00016$ (R^2)) excepto con la H de Fay & Wu.

Tabla 2. Valores promedio e intervalos de confianza de ocho estadísticos de resumen obtenidos para los ocho escenarios simulados: Escenario estable, C.B 0.5 (Cuello de botella al 50% del tamaño), C.B 0.75 (Cuello de botella al 75% del tamaño) y C.B 0.9 (Cuello de botella al 90% del tamaño), SN 0.005 (Selección natural, s 0.005), SN 0.05 (Selección natural, s 0.05), SN 0.075 (selección natural, s 0.075) y CB 0.75 y SN 0.05 (Cuello de botella al 75% del tamaño y Selección natural, s 0.05).

| | TD | F_s | FD_n | FD | FF_n | FF | H | R₂ |
|--------------------------|---------------|----------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|--------------|-----------------|----------------------|
| Escenario Estable | -0.257 | -4.980** | -0.048 | -0.076 | -0.157 | -0.182 | -0.081 | 0.087 |
| I.C. (99%) | -0.631/0.118 | -6.609/-3.352 | -0.272/0.176 | -0.323/0.170 | -0.363/0.048 | -0.399/0.035 | -1.975/1.813 | 0.076/0.098 |
| C.B 0.5 | 0.908 | 6.174** | 1.187 | 1.344 | 1.279 | 1.378 | -4.879** | 0.122 |
| I.C. (99%) | 0.507/1.309 | 1.650/10.698 | 0.930/1.444 | 1.067/1.622 | 0.919/1.640 | 1.005/1.752 | -16.276/6.518 | 0.110/0.133 |
| C.B 0.75 | 1.24 | 5.239** | 1.212 | 1.341* | 1.470** | 1.564* | -2.216** | 0.131 |
| I.C. (99%) | 0.873/1.608 | 4/6.477 | 0.871/1.553 | 0.972/1.709 | 1.087/1.852 | 1.161/1.967 | -5.694/1.262 | 0.120/0.142 |
| C.B 0.9 | 0.667 | 2.019** | 1.243 | 1.167 | 1.061 | 1.138 | -9.471** | 0.115 |
| I.C. (99%) | 0.320/1.014 | -2.275/6.312 | 0.944/1.543 | 0.757/1.577 | 0.684/1.437 | 0.746/1.530 | -16.307/-2.634 | 0.105/0.125 |
| SN 0.005 | -0.662 | -5.558** | -0.652 | -0.685 | -0.798 | -0.831 | 0.922 | 0.075 |
| I.C. (99%) | -1.248/-0.075 | -7.274/-3.842 | -1.917/0.613 | -1.969/0.598 | -2.008/0.412 | -2.056/0.394 | -0.079/1.923 | 0.057/0.092 |
| SN 0.05 | -0.542 | -4.289** | -0.293 | -0.306 | -0.476 | -0.494 | 0.267 | 0.079 |
| I.C. (99%) | -1.022/-0.062 | -5.408/-3.171 | -1.234/0.648 | -1.261/0.659 | -1.381/0.429 | -1.407/0.418 | -0.929/1.463 | 0.066/0.0924 |
| SN 0.075 | -0.574 | -5.597** | -0.799 | -0.843 | -0.867 | -0.902 | -0.507 | 0.078 |
| I.C. (99%) | -1.266/0.119 | -8.089/-3.104 | -2.066/0.467 | -2.125/0.440 | -2.156/0.373 | -2.156/0.352 | -2.460/1.446 | 0.059/0.098 |
| CB 0.75 y SN 0.05 | 0.847 | 3.586** | 0.618 | 0.729 | 0.864 | 0.948 | -1.182 | 0.116 |
| I.C. (99%) | -0.385/2.080 | -1.503/8.675 | -0.694/1.928 | -0.662/2.119 | -0.641/2.369 | -0.620/2.515 | -2.934/0.570 | 0.073/0.160 |

Valores significativamente diferentes de cero (** p<0.01,* p<0.05)

Tabla 3. Probabilidad posterior de que los valores simulados sean menores o iguales que los observados, por locus. Comparando un escenario estable contra un escenario afectado por a) un cuello de botella al 75%, b) un escenario afectado por selección natural ($s = 0.05$), y c) un escenario mixto CB 0.75 y SN 0.05 (Cuello de botella al 75% del tamaño y Selección natural, $s = 0.05$). También se comparó d) un escenario afectado por selección natural ($s = 0.05$) contra un escenario afectado por un cuello de botella al 75%. Finalmente se comparó el escenario mixto CB 0.75 y SN 0.05 contra el escenario afectado por e) selección natural ($s = 0.05$) y f) cuello de botella al 75%.

| Escenario simulado \leq Escenario observado | TD | Fs | FD* | FF* | FD | FF | H | R2 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| a) locus_1 CB 0.75 vs Estable | 0.033 | 0.005 | 0.069 | 0.027 | 0.046 | 0.021 | 0.661 | 0.031 |
| b) locus_1 Estable vs SN 0.05 | 0.306 | 0.62 | 0.451 | 0.373 | 0.445 | 0.367 | 0.652 | 0.308 |
| c) locus_1 Estable vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.992 | 1 | 0.995 | 0.999 | 0.996 | 0.999 | 0.366 | 0.992 |
| d) locus_1 CB 0.75 vs SN 0.05 | 0.024 | 0.018 | 0.069 | 0.026 | 0.045 | 0.021 | 0.761 | 0.02 |
| e) locus_1 CB 0.75 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.831 | 0.813 | 0.937 | 0.933 | 0.938 | 0.935 | 0.662 | 0.837 |
| f) locus_1 SN 0.05 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.992 | 1 | 0.995 | 0.999 | 0.996 | 0.999 | 0.366 | 0.992 |
| a) locus_2 CB 0.75 vs Estable | 0.027 | 0.003 | 0.072 | 0.038 | 0.058 | 0.029 | 0.625 | 0.026 |
| b) locus_2 Estable vs SN 0.05 | 0.276 | 0.373 | 0.628 | 0.508 | 0.63 | 0.507 | 0.338 | 0.283 |
| c) locus_2 Estable vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.949 | 1 | 0.978 | 0.986 | 0.981 | 0.988 | 0.12 | 0.947 |
| d) locus_2 CB 0.75 vs SN 0.05 | 0.015 | 0.004 | 0.132 | 0.046 | 0.114 | 0.037 | 0.611 | 0.014 |
| e) locus_2 CB 0.75 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.509 | 0.875 | 0.784 | 0.688 | 0.782 | 0.689 | 0.441 | 0.514 |
| f) locus_2 SN 0.05 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.949 | 1 | 0.978 | 0.986 | 0.981 | 0.988 | 0.12 | 0.947 |
| a) locus_3 CB 0.75 vs Estable | 0.023 | 0.003 | 0.066 | 0.034 | 0.052 | 0.023 | 0.641 | 0.022 |
| b) locus_3 Estable vs SN 0.05 | 0.414 | 0.287 | 0.457 | 0.436 | 0.445 | 0.425 | 0.506 | 0.421 |
| c) locus_3 Estable vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.995 | 0.999 | 0.97 | 0.997 | 0.971 | 0.997 | 0.493 | 0.994 |
| d) locus_3 CB 0.75 vs SN 0.05 | 0.027 | 0.001 | 0.06 | 0.034 | 0.045 | 0.022 | 0.674 | 0.025 |
| e) locus_3 CB 0.75 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.92 | 0.835 | 0.778 | 0.902 | 0.778 | 0.902 | 0.694 | 0.92 |
| f) locus_3 SN 0.05 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.995 | 0.999 | 0.97 | 0.997 | 0.971 | 0.997 | 0.493 | 0.994 |
| Locus selectivo a) locus_4 CB 0.75 vs Estable | 0.033 | 0.002 | 0.062 | 0.033 | 0.048 | 0.025 | 0.647 | 0.033 |
| b) locus_4 Estable vs SN 0.05 | 0.015 | 0.384 | 0.012 | 0.004 | 0.014 | 0.005 | 0.397 | 0.02 |
| c) locus_4 Estable vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.009 | 0.234 | 0.02 | 0.007 | 0.02 | 0.007 | 0.398 | 0 |
| d) locus_4 CB 0.75 vs SN 0.05 | 0 | 0.004 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.652 | 0 |
| e) locus_4 CB 0.75 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.001 | 0.002 | 0.002 | 0 | 0.001 | 0 | 0.664 | 0 |
| f) locus_4 SN 0.05 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.009 | 0.234 | 0.02 | 0.007 | 0.02 | 0.007 | 0.398 | 0 |
| a) locus_5 CB 0.75 vs Estable | 0.025 | 0.003 | 0.062 | 0.032 | 0.048 | 0.026 | 0.663 | 0.02 |
| b) locus_5 Estable vs SN 0.05 | 0.421 | 0.549 | 0.758 | 0.643 | 0.755 | 0.641 | 0.288 | 0.432 |
| c) locus_5 Estable vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.988 | 1 | 0.791 | 0.946 | 0.837 | 0.959 | 0.23 | 0.984 |
| d) locus_5 CB 0.75 vs SN 0.05 | 0.028 | 0.009 | 0.211 | 0.076 | 0.186 | 0.064 | 0.614 | 0.028 |
| e) locus_5 CB 0.75 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.799 | 0.876 | 0.305 | 0.558 | 0.346 | 0.594 | 0.545 | 0.787 |
| f) locus_5 SN 0.05 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.988 | 1 | 0.791 | 0.946 | 0.837 | 0.959 | 0.23 | 0.984 |

- Valores distintos significativos (escenario simulado es menor o igual que el observado)
- Valores distintos significativos (escenario simulado es mayor que el observado)

Tabla 4. Probabilidad posterior de que los valores de ocho estadísticos Clase I y II obtenidos para los escenarios simulados sean menores o iguales que los observados. Contrastando el valor promedio de todos los escenarios simulados: Escenario estable, cuellos de botella con reducciones al 50% (C.B.0.5), 75% (C.B 0.75) y 90% (C.B 9 %) del tamaño inicial, selección natural s 0.005, s 0.05 y s 0.075 y un escenario que combina una reducción poblacional (C.B 0.75) y un evento selectivo s 0.05.

| Escenario simulado \leq Escenario observado | <i>TD</i> | <i>F_s</i> | <i>FD*</i> | <i>FF*</i> | <i>FD</i> | <i>FF</i> | <i>H</i> | <i>R2</i> |
|---|--------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|--------------|
| 1) Estable vs Estable | 0.376 | 0.367 | 0.478 | 0.420 | 0.461 | 0.416 | 0.389 | 0.377 |
| 2) Estable vs C.B 0.5 | 0.921 | 1 | 0.952 | 0.968 | 0.962 | 0.971 | 0.108 | 0.913 |
| 3) C.B 0.5 vs Estable | 0.007 | 0 | 0.026 | 0.010 | 0.015 | 0.006 | 0.63 | 0.007 |
| 4) Estable vs C.B 0.75 | 0.972 | 0.999 | 0.956 | 0.985 | 0.962 | 0.986 | 0.223 | 0.967 |
| 5) C.B 0.75 vs Estable | 0.028 | 0.003 | 0.066 | 0.033 | 0.050 | 0.025 | 0.647 | 0.026 |
| 6) Estable vs C.B 0.9 | 0.856 | 0.982 | 0.961 | 0.932 | 0.931 | 0.938 | 0.032 | 0.853 |
| 7) C.B 0.9 vs Estable | 0.043 | 0.009 | 0.099 | 0.048 | 0.078 | 0.037 | 0.663 | 0.041 |
| 8) Estable vs S.N. 0.005 | 0.178 | 0.315 | 0.203 | 0.161 | 0.204 | 0.162 | 0.501 | 0.184 |
| 9) S.N. 0.005 vs Estable | 0.502 | 0.428 | 0.579 | 0.539 | 0.571 | 0.535 | 0.320 | 0.493 |
| 10) Estable vs S.N. 0.05 | 0.228 | 0.438 | 0.339 | 0.265 | 0.346 | 0.268 | 0.425 | 0.240 |
| 11) S.N. 0.05 vs Estable | 0.502 | 0.431 | 0.571 | 0.535 | 0.562 | 0.530 | 0.319 | 0.492 |
| 12) Estable vs S.N. 0.075 | 0.214 | 0.312 | 0.159 | 0.143 | 0.163 | 0.142 | 0.349 | 0.225 |
| 13) S.N. 0.075 vs Estable | 0.521 | 0.433 | 0.568 | 0.536 | 0.561 | 0.533 | 0.318 | 0.509 |
| 14) Estable vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.906 | 0.996 | 0.790 | 0.881 | 0.817 | 0.895 | 0.291 | 0.867 |
| 15) CB 0.75 y SN 0.05 vs Estable | 0.222 | 0.137 | 0.251 | 0.223 | 0.238 | 0.217 | 0.522 | 0.208 |
| 16) C.B 0.5 vs S.N 0.005 | 0.001 | 0.000 | 0.006 | 0.002 | 0.002 | 0.001 | 0.667 | 0.001 |
| 17) S.N 0.005 vs C.B 0.5 | 0.944 | 1.000 | 0.962 | 0.976 | 0.971 | 0.978 | 0.087 | 0.938 |
| 18) C.B 0.5 vs S.N 0.05 | 0.002 | 0.000 | 0.012 | 0.004 | 0.008 | 0.002 | 0.644 | 0.002 |
| 19) S.N 0.05 vs C.B 0.5 | 0.944 | 1.000 | 0.962 | 0.977 | 0.970 | 0.978 | 0.086 | 0.937 |
| 20) C.B 0.5 vs S.N 0.075 | 0.002 | 0.000 | 0.004 | 0.002 | 0.002 | 0.001 | 0.615 | 0.002 |
| 21) S.N 0.075 vs C.B 0.5 | 0.938 | 1.000 | 0.958 | 0.972 | 0.967 | 0.975 | 0.089 | 0.931 |
| 22) C.B 0.75 vs C.B 0.75 | 0.669 | 0.714 | 0.590 | 0.660 | 0.588 | 0.658 | 0.559 | 0.662 |
| 23) C.B 0.75 vs S.N 0.005 | 0.009 | 0.002 | 0.020 | 0.008 | 0.013 | 0.005 | 0.691 | 0.008 |
| 24) S.N 0.005 vs C.B 0.75 | 0.980 | 0.999 | 0.966 | 0.989 | 0.971 | 0.990 | 0.185 | 0.976 |
| 25) C.B 0.75 vs S.N 0.05 | 0.013 | 0.005 | 0.043 | 0.017 | 0.033 | 0.011 | 0.662 | 0.012 |
| 26) S.N 0.05 vs C.B 0.75 | 0.982 | 0.999 | 0.965 | 0.990 | 0.970 | 0.991 | 0.178 | 0.978 |
| 27) C.B 0.75 vs S.N 0.075 | 0.011 | 0.002 | 0.016 | 0.007 | 0.009 | 0.004 | 0.630 | 0.010 |
| 28) S.N 0.075 vs C.B 0.75 | 0.975 | 0.999 | 0.962 | 0.989 | 0.967 | 0.989 | 0.186 | 0.972 |
| 29) C.B 0.9 vs S.N 0.005 | 0.011 | 0.006 | 0.030 | 0.013 | 0.022 | 0.007 | 0.713 | 0.010 |
| 30) S.N 0.005 vs C.B 0.9 | 0.892 | 0.986 | 0.969 | 0.947 | 0.945 | 0.952 | 0.025 | 0.888 |
| 31) C.B 0.9 vs S.N 0.05 | 0.018 | 0.013 | 0.062 | 0.023 | 0.049 | 0.017 | 0.679 | 0.017 |
| 32) S.N 0.05 vs C.B 0.9 | 0.892 | 0.985 | 0.969 | 0.950 | 0.946 | 0.954 | 0.026 | 0.889 |
| 33) S.N 0.05 vs S.N 0.05 | 0.385 | 0.498 | 0.470 | 0.411 | 0.476 | 0.414 | 0.544 | 0.385 |
| 34) C.B 0.9 vs S.N 0.075 | 0.016 | 0.006 | 0.024 | 0.011 | 0.015 | 0.006 | 0.640 | 0.016 |
| 35) S.N 0.075 vs C.B 0.9 | 0.886 | 0.989 | 0.966 | 0.940 | 0.945 | 0.945 | 0.024 | 0.881 |
| 36) CB 0.75 y SN 0.05 vs C.B 0.75 | 0.736 | 0.772 | 0.670 | 0.729 | 0.669 | 0.728 | 0.448 | 0.730 |
| 37) C.B 0.75 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.417 | 0.659 | 0.301 | 0.336 | 0.315 | 0.346 | 0.607 | 0.346 |
| 38) CB 0.75 y SN 0.05 vs S.N 0.05 | 0.209 | 0.155 | 0.230 | 0.211 | 0.221 | 0.206 | 0.729 | 0.196 |
| 39) S.N 0.05 vs CB 0.75 y SN 0.05 | 0.931 | 0.997 | 0.833 | 0.909 | 0.854 | 0.918 | 0.236 | 0.903 |

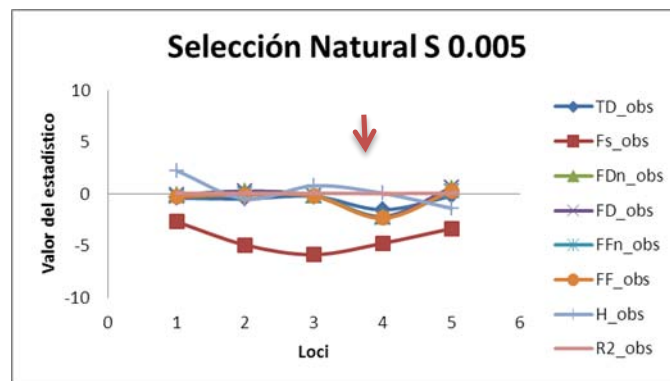
Selección natural

En todos los escenarios modelados, el locus que se encontraba bajo selección natural mostró valores significativamente más negativos con los estadísticos Clase I; estos valores fueron más negativos en el escenario bajo fuerza de selección más intensa ($s = 0.075$) que en los demás. El estadístico H de Fay & Wu arrojó valores significativos positivos y negativos, sin permitir discernir un patrón particular. Con los estadísticos F_s (Clase II), se tuvieron estadísticos negativos y significativamente distintos de cero en todos los loci para los escenarios bajo selección natural (Tabla 2).

Al comparar estos escenarios afectados por la selección natural con el escenario estable en cada locus, se encontraron diferencias significativas con todos los estadísticos, aunque con la prueba a posteriori se obtuvieron valores más cercanos a cero en el locus afectado por la selección natural para la mayoría de los estadísticos (Tabla 3); por lo tanto fue posible identificar el locus de interés en cada uno de ellos. Sin embargo, al realizar las mismas comparaciones con un ANOVA seguido de una prueba de *Tukey*, no se hallaron diferencias significativas entre los escenarios, únicamente fue posible encontrar diferencias significativas con la prueba de ANOVA al ser comparados los valores del promedio de los estadísticos de resumen de los loci aledaños (3 y 5) contra el locus afectado por la selección natural (4), con todos los estadísticos ($p = 0.00002$ (D), $p = 0.00044$ (FD_n), $p = 0.00055$ (FD), $p = 0.00019$ (FF_n), $p = 0.00022$ (FF) y $p = 0.00008$ (R_2)) excepto F_s de Fu y H de Fay & Wu.

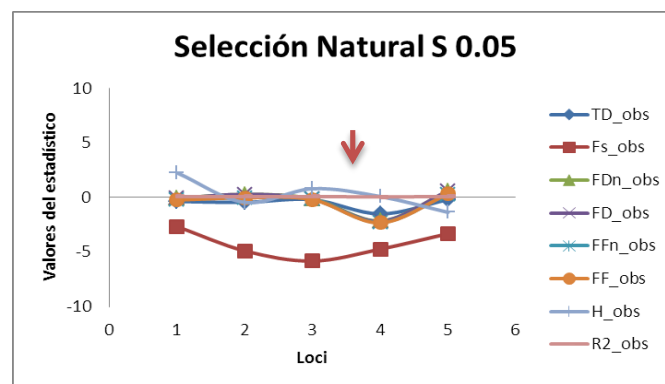
Finalmente cuando se comparó el valor de los loci neutrales contra el valor promedio de los loci afectados por la selección natural con la prueba de probabilidad posterior, el escenario estable no fue mayor que los escenarios con selección natural. Cuando se utilizó a los escenarios selectivos como datos observados, todos los estadísticos de resumen excepto la H de Fay & Wu arrojaron valores cercanos al 0.2, por lo tanto es posible distinguir que el escenario observado con selección natural es menor o igual que el escenario estable simulado, sin embargo cuando los valores promedio de los estadísticos de

resumen del escenario estable fueron utilizados como datos observados, todos los estadísticos de resumen excepto la H de Fay & Wu arrojaron valores en promedio cercanos al 0.5, por lo que no es posible distinguir valores distintos entre un escenario estable observado y uno simulado bajo selección natural, únicamente es posible utilizando un escenario estable simulado y un escenario bajo selección natural observado (Tabla 4).



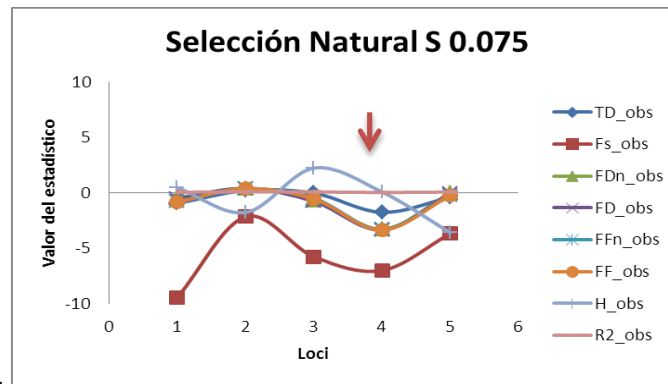
Gráfica 2.

Gráfica 2. Distribución de valores para ocho estadísticos Clase I y II obtenidos para el escenario bajo selección natural s 0.005 en 100 simulaciones de 1000 pares de bases con cinco sitios polimórficos. La flecha indica el locus afectado por selección natural.



Gráfica 3.

Gráficas 3. Distribución de valores para ocho estadísticos Clase I y II obtenidos para el escenario bajo selección natural s 0.05 en 100 simulaciones de 1000 pares de bases con cinco sitios polimórficos. La flecha indica el locus afectado por selección natural.



Gráfica 4.

Gráficas 4. Distribución de valores para ocho estadísticos Clase I y II obtenidos para el escenario bajo selección natural s 0.075 en 100 simulaciones de 1000 pares de bases con cinco sitios polimórficos. La flecha indica el locus afectado por selección natural.

Comparación entre eventos demográficos y selectivos

Cuando se compararon los escenarios de cuellos de botella contra los escenarios bajo selección natural con el ANOVA seguido de una prueba *Tukey* se encontraron diferencias significativas en la totalidad de los estadísticos ($p=0.00001$ (D), $p=0.0000$ (F_s), $p=0.00212$ (FD_n), $p=0.00149$ (FD), $p=0.00054$ (FF_n), $p=0.00030$ (FF) y $p=0.00001$ (R_2)), excepto con la H de Fay & Wu.

Realizando las mismas comparaciones con la prueba de probabilidad posterior fue posible encontrar diferencias significativas entre los escenarios con cuellos de botella y los escenarios afectados por la selección natural en todos los loci, obteniendo valores más cercanos a cero en el locus 4, afectado por la selección natural (Tabla 3). No obstante, todos los loci arrojaron valores cercanos a cero.

Al buscar de manera específica al locus 4 (L4), a través de la comparación de los escenarios de cuellos de botella contra cada locus de los escenarios bajo selección natural con el ANOVA seguido de una prueba *Tukey*, fue posible identificar al locus de interés con los estadísticos de resumen D y F de Fu & Li (CB 0.5 vs. SN 0.005 $p=0.00173$ (FD_n), CB 0.5 vs. SN 0.05 $p=0.00461$ (FD_n), CB 0.5 vs. SN 0.075 $p=0.00148$ (FD_n), CB 0.5 vs. SN 0.005 $p=0.00518$ (FF), CB 0.75 vs. SN 0.005 $p=0.00498$ (FD_n), CB 0.75 vs. SN 0.005 $p=0.00552$ (FD), CB 0.75 vs. SN 0.005 $p=0.00542$ (FF), CB 0.9 vs. SN 0.005 $p=0.00295$ (FD_n), CB 0.9 vs.

SN 0.075 $p= 0.00252$ (FDn), CB 0.9 vs. SN 0.005 $p= 0.00787$ (FFn),). Esto fue más fácil cuando la fuerza de la selección natural fue más leve ($s=0.005$). Cabe mencionar que al realizar estas comparaciones, con los estadísticos F_s de F_u y H de Fay & Wu no se encontraron diferencias entre escenarios.

Escenario afectado por un proceso demográfico y uno selectivo

En el escenario donde se combinaron un cuello de botella (C.B. 0.75) y un proceso selectivo (s 0.05), ambos de intensidad intermedia, todos los estadísticos, menos H y F_s , arrojaron resultados positivos no significativos en todos los loci, excepto en el locus bajo selección natural (Gráfica 5). Para este locus, los valores fueron significativamente negativos, lo que nos permitiría diferenciarlo de los demás.

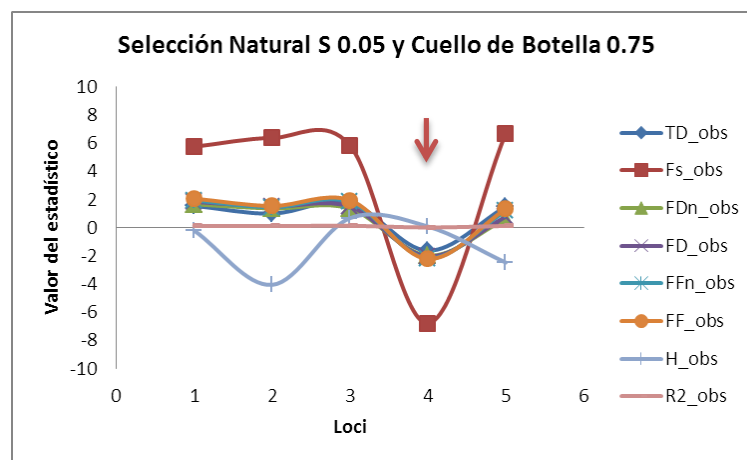
Sin embargo, al aplicar la prueba de ANOVA comparando el promedio de los valores del escenario combinado contra el promedio de los estadísticos de resumen del escenario bajo selección natural (s 0.05), únicamente se pudo identificar el cuello de botella con el estadístico F_s de F_u (Gráfica 6). Al comparar el escenario combinado contra el escenario afectado únicamente por el cuello de botella moderado (C.B 0.75), no fue posible distinguir en ningún caso el efecto de la selección natural en el escenario combinado.

Cuando se realizaron las mismas comparaciones con la prueba de probabilidad posterior de los valores promedio del escenario combinado contra los estadísticos de resumen de un escenario bajo selección natural (s 0.05), se obtuvieron valores cercanos a uno en todos los loci con todos los estadísticos excepto con la H de Fay & Wu. Únicamente para el locus 4 se obtuvieron valores muy cercanos a cero con todos los estadísticos menos con la F_s de F_u y la H de Fay & Wu (Tabla 3). Al comparar el escenario combinado contra el escenario afectado únicamente por el cuello de botella 0.75, la mayoría de los estadísticos fueron significativamente distintos de uno, pero se hallaron valores más cercanos a cero en el L4, afectado por la selección natural (Tabla 3). Por lo tanto fue posible identificar al locus

adaptativo cuando este ocurre en un escenario con reducción poblacional al comparar cada locus de manera independiente. Sin embargo, al promediar los valores, las cifras obtenidas no permiten diferenciar entre escenarios (Tabla 4, comparaciones 36 y 37).

Finalmente, al comparar el escenario afectado por selección natural s 0.05 y cuello de botella 0.75 contra el escenario estable, con la prueba a posteriori, se encontraron diferencias significativas en el locus bajo selección con todos los estadísticos de resumen, excepto con la H de Fay & Wu (Tabla 3). Al comparar al escenario estable contra el valor promedio de estadísticos de resumen del escenario combinado, con la misma prueba, casi todos los estadísticos mostraron valores de probabilidad posterior mayores que 0.8 (Tabla 4 comparación 14). Curiosamente, al aplicar la prueba de ANOVA realizando las mismas comparaciones únicamente se encontraron diferencias significativas con el estadístico F_s de Fu ($p= 0.1251$), con el resto de los estadísticos no fue posible.

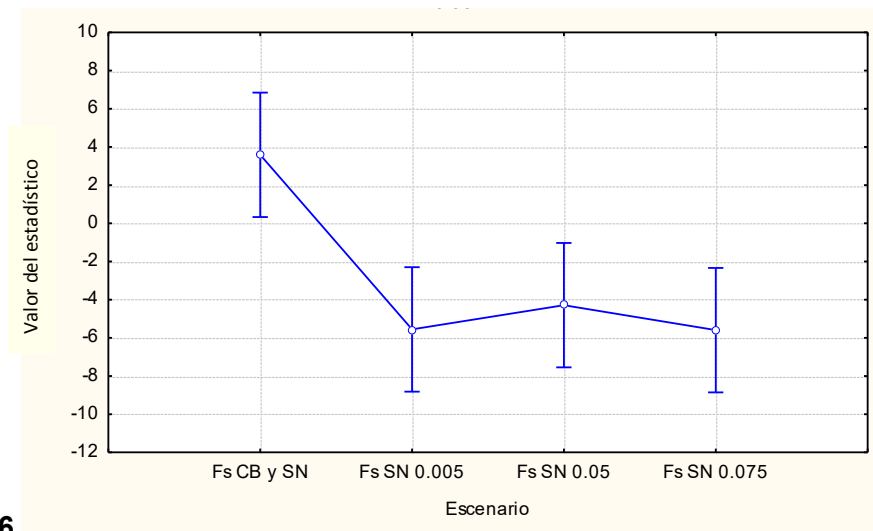
Gráfica 5. Distribución de valores promedio para ocho estadísticos de resumen obtenidos con un escenario bajo selección natural s 0.05 y cuello de botella 0.75 en 100 simulaciones de 1000 pares de bases con cinco sitios polimórficos.



Gráfica 5.

Gráfica 5. Comparación del estadístico de resumen F_s de Fu obtenido para el escenario bajo selección natural s 0.05 y cuello de botella al 75% y para los estadísticos obtenidos en un escenario afectado por selección natural s 0.005, s 0.05 y s 0.075. Las barras verticales indican intervalos de confianza del 95%.

***F_s* de *F_u* en escenario mixto (CB y SN) y escenarios con selección natural (SN)**



Gráfica 6.

Gráfica 6. Valor del estadístico de resumen F_s de F_u obtenido en los escenarios simulados: Mixto (afectado por selección natural y cuello de botella) y en los escenarios simulados afectados por distintas severidades de selección natural (SN 0.005, SN 0.05, SN 0.075). Las barras verticales indican intervalos de confianza del 95%.

Genes nucleares de Abies religiosa y A. flinckii

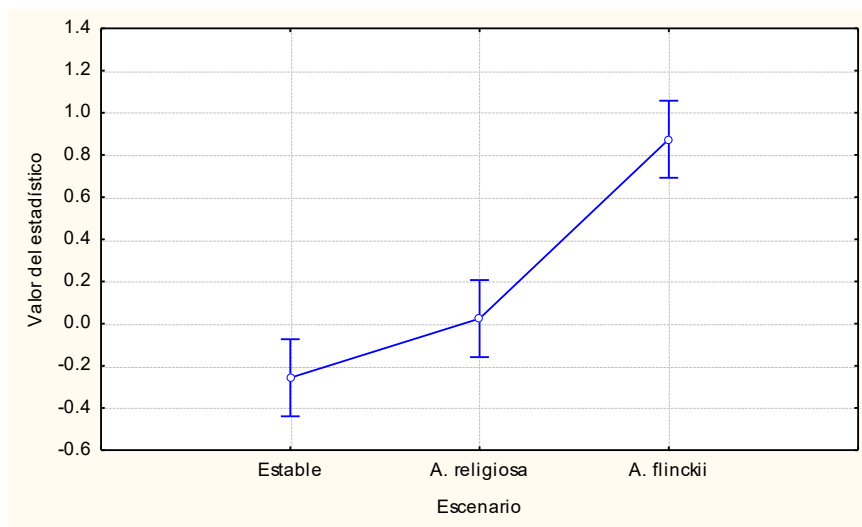
Cuando se comparó el escenario estable, sin eventos demográficos ni selectivos, contra el promedio del total de genes estudiados, los valores de probabilidad obtenidos fueron cercanos a 1 (Tabla 6), indicando que el patrón observado en un escenario estable fue menor o igual que el obtenido en ambas especies de *Abies*. Esto se pudo corroborar con la prueba *ANOVA* y *Tukey*, las cuales muestran que efectivamente los estadísticos de resumen de D de Tajima y F_s de F_u de *A. flinckii* son significativamente mayores que los del escenario estable; sin embargo, cuando se compararon los estadísticos de *A. religiosa* ésta prueba sólo fue capaz de encontrar diferencias significativas respecto al escenario estable con la F_s de F_u (Gráficas 6 y 7).

Tabla 5. Valores de estadísticos de resumen obtenidos en genes potencialmente adaptativos de las poblaciones estudiadas de *Abies flinckii* y *A. religiosa*.

| <i>A. flinckii</i> | CeSa4 | Cobra-like protein | Aqua MIP 1b | LhCA4 | Xilosiltransf. | Aqua MIP 1 | Myb STR | Myb 6 | Promedio |
|--------------------|--------|--------------------|-------------|--------|----------------|------------|---------|-------|----------|
| <i>TD_obs</i> | 2.590 | 2.509 | 1.846 | -0.364 | 0.270 | 0.299 | -0.184 | 0.028 | 0.874 |
| <i>F_obs</i> | 8.483 | 8.346 | 1.633 | 0.701 | 1.292 | -0.036 | 0.062 | 0.272 | 2.594 |
| <i>H_obs</i> | -0.379 | 0.284 | 0.662 | -0.352 | -0.205 | -0.102 | -0.084 | x | -0.025 |

| <i>A. religiosa</i> | CeSa4 | Cobra-like protein | Aqua MIP 1b | LhCA4 | Xilosiltransf. | Aqua MIP 1 | Heat shock p. | Myb STR | Myb 6 | Promedio |
|---------------------|-------|--------------------|-------------|-------|----------------|------------|---------------|---------|--------|----------|
| <i>TD_obs</i> | 1.213 | 1.232 | 0.843 | 0.749 | -1.082 | -0.595 | -0.784 | -1.105 | -0.255 | 0.024 |
| <i>F_obs</i> | 1.389 | 4.525 | -2.497 | 1.242 | -0.925 | -0.412 | -0.239 | -0.972 | -0.049 | 0.229 |
| <i>H_obs</i> | 1.612 | -4.977 | 1.826 | 0.054 | 0.433 | -0.282 | 0.105 | 0.109 | x | -0.140 |

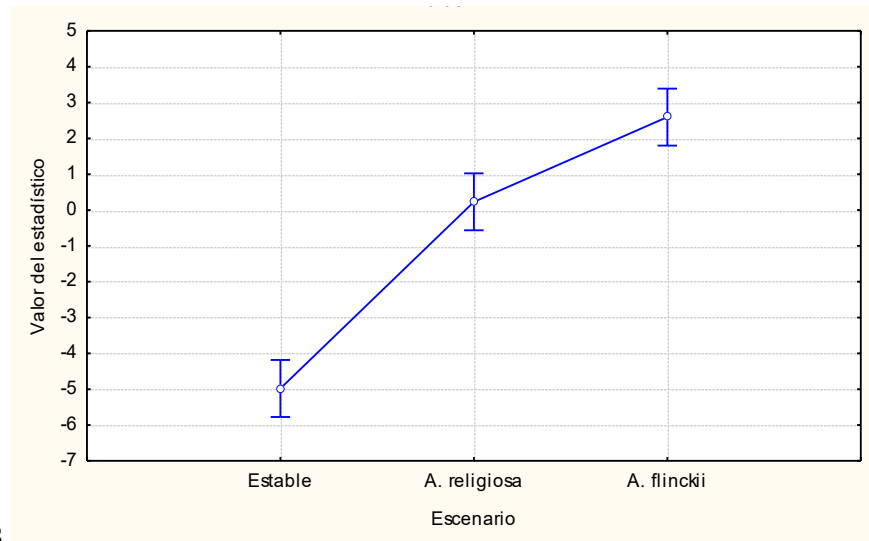
Valores de *D* de Tajima en escenario simulado estable y en poblaciones de *Abies*



Gráfica 7.

Gráfica 7. Valor de los estadísticos de resumen *D* de Tajima obtenidos en los genes observados en poblaciones de *Abies religiosa* y *A. flinckii* y del escenario estable simulado. Las barras verticales indican intervalos de confianza del 95%.

Valores de F_s de F_u en escenario simulado estable y en poblaciones de *Abies*



Gráfica 8.

Gráfica 8. Valor de los estadísticos de resumen F_s de F_u obtenidos en los genes observados en poblaciones de *Abies religiosa* y *A. flinckii* y del escenario estable simulado. Las barras verticales indican intervalos de confianza del 95%.

Al comparar los tres escenarios de cuellos de botella modelados, con reducciones al 50, 75 y 90% del tamaño inicial contra el promedio del total de genes estudiados en ambas especies de *Abies* con la prueba de probabilidad posterior en el programa mlcoalsim v1.42 (Tabla 6), se observó que todos los valores obtenidos fueron distintos de uno, aunque los valores de D de *Tajima* y F_s de F_u obtenidos para *Abies flinckii* fueron cercanos a 0.5 y los de *Abies religiosa* cercanos a cero. Esto indica que el valor promedio de los escenarios modelados con reducción poblacional fue mayor que el esperado en los genes de *Abies religiosa* y *A. flinckii*

Tabla 6. Probabilidad posterior de que los valores simulados sean menores o iguales que los observados en las poblaciones de *Abies* estudiadas. Contrastando el valor promedio del escenario estable y los tres escenarios con reducción poblacional analizados, al 50, 75 y 90% del valor inicial (C.B 0.5, 0.75 y 0.9)

| Escenario simulado \leq Escenario observado | <i>TD</i> | <i>F_s</i> | <i>H</i> |
|---|--------------|----------------------|----------|
| 7. Estable vs <i>A. religiosa</i> | 0.542 | 0.917 | 0.396 |
| 8. Estable vs <i>A. flinckii</i> | 0.911 | 0.989 | 0.417 |
| 9. C.B 0.5 vs <i>A. religiosa</i> | 0.027 | 0.032 | 0.628 |
| 10. C.B 0.5 vs <i>A. flinckii</i> | 0.408 | 0.189 | 0.629 |
| 11. C.B 0.75 vs <i>A. religiosa</i> | 0.057 | 0.137 | 0.650 |
| 12. C.B 0.75 vs <i>A. flinckii</i> | 0.410 | 0.427 | 0.652 |
| 13. C.B 0.9 vs <i>A. religiosa</i> | 0.085 | 0.215 | 0.664 |
| 14. C.B 0.9 vs <i>A. flinckii</i> | 0.444 | 0.542 | 0.664 |

- **Valores distintos significativos (escenario simulado es menor o igual que el observado)**
- **Valores distintos significativos (escenario simulado es mayor que el observado)**

Sin embargo, al aplicar las pruebas ANOVA y Tukey, no se encontraron diferencias significativas entre los escenarios con reducción poblacional modelados y el valor promedio de los genes de *Abies religiosa* y *A. flinckii* con la *F_s* de Fu, pero sí se encontraron diferencias significativas con la *D* de Tajima para *Abies religiosa* ($p=0.00019$). Con esta prueba fue evidente que el promedio de genes de *A. flinckii* es más parecido al escenario simulado con reducción poblacional al 50% (Gráfica 8). Se obtuvieron resultados contradictorios con ambos estadísticos de resumen, pues para *Abies religiosa* con la *D* de Tajima pudo intuirse un escenario estable, mientras con la *F_s* de Fu parecen corresponder los valores a los de un cuello de botella al 90% de la población inicial en ambas poblaciones de *Abies* (Gráfica 9)

Posteriormente se compararon de manera individual a los genes de *A. flinckii* contra el escenario afectado por una reducción poblacional al 50% para identificar si alguno de ellos se diferenciaba de este patrón general, sugiriendo la acción de

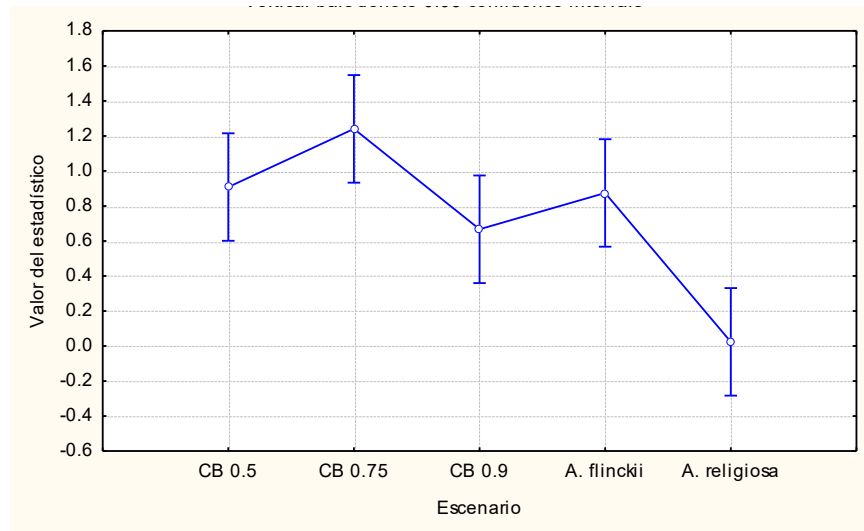
la selección natural. Se encontraron valores muy cercanos a 1 con la D de Tajima en los genes CeSa₄, Cobra-like protein y Aqua MIP 1b (Gráfica 10), que reflejan el probable efecto de una reducción poblacional del 50% del tamaño inicial. Pudo corroborarse este resultado con las pruebas ANOVA y Tukey, pues no hubo diferencias significativas para los estadísticos D de Tajima y F_s de Fu al ser comparados con el escenario afectado por un cuello de botella al 50%.

También se compararon de manera individual a los genes de *A. religiosa* contra el escenario afectado por una reducción poblacional al 90% para identificar si alguno de ellos se diferenciaba de este patrón general y se encontraron valores distintos de uno en todos los genes.

Los genes, Xilosiltransf, Aqua MIP 1, Myb STR, Myb 6 y Heat shock podrían considerarse genes candidatos a ser adaptativos en ambas especies de *Abies*, pues estos genes rechazaron lo esperado al ser comparados contra el escenario estable y los escenarios con reducción poblacional gen por gen.

Finalmente se realizaron pruebas de ANOVA y Tukey para analizar de manera independiente a cada gen de *A. flinckii* contra el promedio de estadísticos de resumen de los tres escenarios modelados con selección natural: leve, moderada y severa ($\alpha = 0.005$, $\alpha = 0.05$ y $\alpha = 0.075$) y se pudo corroborar que los genes candidatos sí corresponden a lo esperado en escenarios de selección natural (Gráfica 11) sin poder discernir algún tipo de mayor soporte hacia alguno de los tres escenarios con distintas magnitudes de selección natural analizadas.

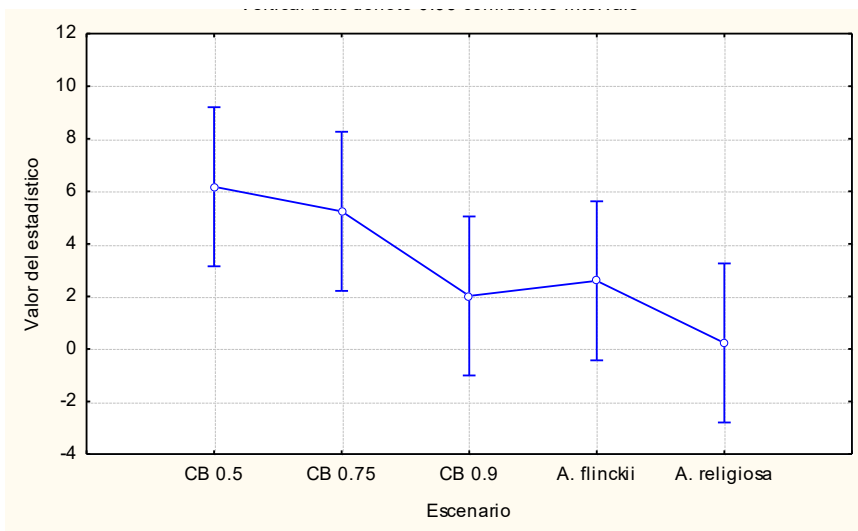
Valores de D de Tajima en escenarios simulado con contracción poblacional y en poblaciones de *Abies*



Gráfica 8.

Gráfica 8. Valor del estadístico de resumen D de Tajima obtenido en los genes observados en poblaciones de *Abies religiosa* y *A. flinckii* y de los escenarios simulados con reducción poblacional al 50, 75 y 90% (C.B 0.5, 0.75 y 0.9). Las barras verticales indican intervalos de confianza del 95%.

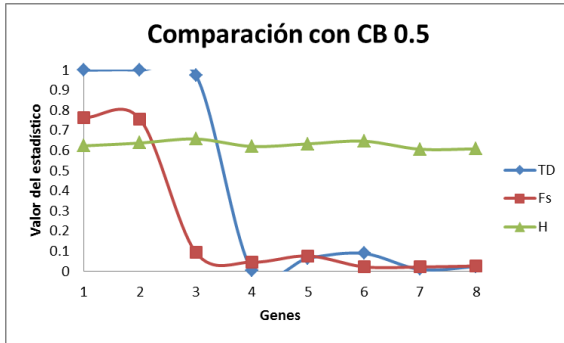
Valores de F_s de Fu en escenarios simulados con contracción poblacional y en poblaciones de *Abies*



Gráfica 9.

Gráfica 9. Valor del estadístico de resumen F_s de Fu obtenido en los genes observados en poblaciones de *Abies religiosa* y *A. flinckii* y de los escenarios simulados con reducción poblacional al 50, 75 y 90% (C.B 0.5, 0.75 y 0.9). Las barras verticales indican intervalos de confianza del 95%.

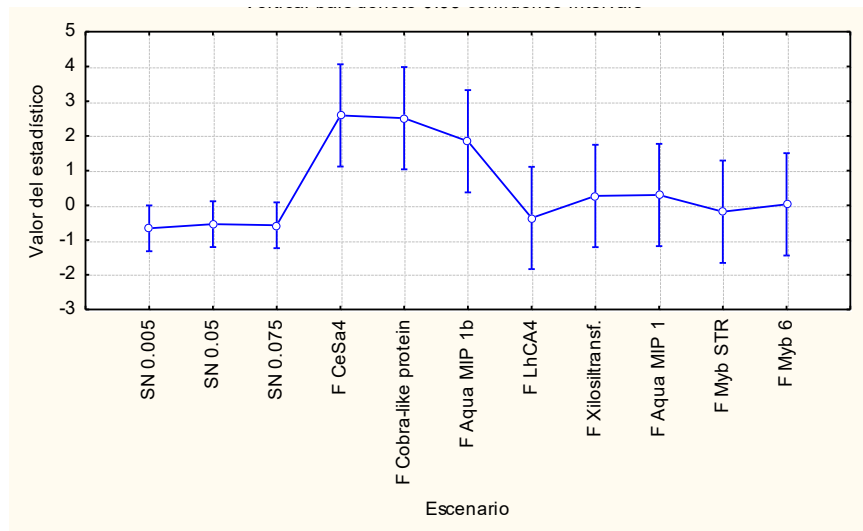
Gráfica 10.



| Genes | TD | Fs | H |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
| 1. CeSa4 | 1* | 0.764 | 0.624 |
| 2. Cobra-like protein | 1* | 0.757 | 0.638 |
| 3. Aqua MIP 1b | 0.975* | 0.094 | 0.658 |
| 4. LhCA4 | 0.003 | 0.046 | 0.621 |
| 5. Xilosiltransf. | 0.066 | 0.077 | 0.634 |
| 6. Aqua MIP 1 | 0.089 | 0.023 | 0.647 |
| 7. Myb STR | 0.01 | 0.022 | 0.607 |
| 8. Myb 6 | 0.024 | 0.027 | 0.609 |
| Promedio | 0.396 | 0.226 | 0.630 |

- **Valores distintos significativos (escenario simulado es menor o igual que el observado)**
- **Valores distintos significativos (escenario simulado es mayor que el observado)**

Gráfica 10. Probabilidad posterior de que los valores simulados en un escenario modelado con reducción poblacional del 50% CB 0.5 sean menores o iguales de aquellos encontrados en *Abies flinckii*.



Gráfica11.

Gráfica 11. Valor del estadístico de resumen *D* de Tajima obtenido en cada gen observado en las poblaciones de *A. flinckii* y de los escenarios simulados con selección natural de distintas severidades (*s* 0.005, *s* 0.05 y *s* 0.075). Las barras verticales indican intervalos de confianza del 95%.

DISCUSIÓN

En esta tesis evaluamos la sensibilidad de los métodos clásicos para detectar loci bajo selección natural usando simulaciones multilocus, para probar hipótesis demográficas y de selección natural, y se encontró que las poblaciones que han sufrido cuellos de botella pueden ser diferenciadas de las estables con estos métodos, y que se puede identificar selección natural positiva en estas poblaciones, pero únicamente locus específica. Al usar estos resultados para inferir patrones de selección en genes nucleares de *Abies religiosa* y *A. flinckii*, pudieron identificarse cinco de los nueve genes analizados como candidatos a ser adaptativos en *A. flinckii*.

Escenario estable

Tomando como hipótesis nula a la teoría neutral, los estadísticos de resumen Clase I corroboraron que en el escenario estable simulado la variación genética es consistente con ella (Hedrick, 2011), pues ninguno de ellos fue significativamente distinto de cero, únicamente la H de *Fay & Wu*, que detecta la presencia de excesos en alelos derivados de alta frecuencia, y el estadístico Clase II F_s de *Fu*, que incorpora la distribución de haplotipos, arrojaron resultados significativamente distintos de cero, lo que se toma como evidencia en contra de la neutralidad de las mutaciones (*Fu*, 1997), pues el poder de los métodos estadísticos para detectar selección difieren en los parámetros que asumen y esto determina el poder que pueden tener. Estudios recientes sugieren que las pruebas basadas en desequilibrio de ligamiento contienen fuertes supuestos respecto a las tasas de recombinación, y éstas son muy variables entre regiones de la secuencia y entre especies estrechamente relacionadas, por lo que en ocasiones no se recomienda mucho utilizarlas para detectar selección natural, no obstante, la estructura de haplotipos puede ser altamente informativa (*Nielsen*, 2005).

Cuellos de botella

Dentro de los estadísticos de resumen Clase I, únicamente pudo identificarse un cuello de botella moderado (C.B. 0.75), con la D y F de Fu & Li. Para el caso particular del estadístico Clase I H de Fay & Wu, en promedio se obtuvieron valores negativos significativos para los tres escenarios con distintas reducciones poblacionales. Con la F_s de Fu pueden identificarse el efecto de los cuellos de botella de distintas intensidades en todos los escenarios, Depaulis y otros (2003) encontraron que los estadísticos Clase II son más útiles para detectar cuellos de botella recientes y moderados. Todos los valores obtenidos con los estadísticos corresponden a lo esperado para un cuello de botella reciente, en el cual inicialmente se incrementa la proporción de variantes de media a alta frecuencia (Fu, y otros, 1993; Fu, 1997; Zeng, y otros, 2006; Holliday, y otros, 2010). Se ha visto que con cuellos de botella severos se obtienen estadísticos D de Tajima y Fu & Li's FD negativos, pues se genera un exceso de variantes de baja frecuencia (Depaulis, y otros, 2003), pero en ninguno de los escenarios con reducción poblacional aquí planteados se obtuvieron esos resultados, por lo que sería recomendable en próximas investigaciones modelar eventos de mayor magnitud. Con el cuello de botella leve (C.B. 0.9), y contrario a lo esperado, con la F_s de Fu también se obtuvieron estadísticos negativos y significativos, que reflejan un exceso de mutaciones recientes, lo cual ocurre en eventos de expansión poblacional o *hitchhiking*. Por lo tanto, fue posible identificar cuellos de botella moderados con mayor número de estadísticos, Depaulis y otros (2003) también encontraron que los cuellos de botella moderados pueden ser más fáciles de detectar. Desafortunadamente, identificar uno de un cuello de botella de intensidad leve (C.B. 0.9), parece no ser fácil con los parámetros aquí utilizados.

Cabe mencionar que cuando se compararon los escenarios con reducción poblacional contra el escenario estable, con todos los estadísticos de resumen y para todos los casos fue posible su distinción con las pruebas de probabilidad posterior y ANOVA, exceptuando a la H de Fay & Wu.

Selección Natural

En todos los escenarios modelados, el locus que se encontraba bajo selección natural mostró valores significativamente más negativos con los estadísticos Clase I. Estos resultados son consistentes con un escenario afectado por selección natural positiva (Tajima, 1989). Sin embargo, el estadístico H de Fay & Wu en ningún caso fue capaz de detectar el locus bajo selección natural.

Con el estadístico F_s (Clase II), se tuvieron estadísticos negativos y significativamente distintos de cero en todos los loci para los escenarios bajo selección natural. Por lo tanto, los loci neutrales también resultan en valores significativamente negativos, y a pesar de que fue más negativo el locus bajo selección natural, sería muy difícil detectarlo bajo este contexto.

Existen casos especiales en los que dos genes en el mismo cromosoma, generalmente con cercanía física, segregan juntos, y esto puede evidenciar el fenómeno llamado *hitchhiking* genético, en donde un alelo neutral puede heredarse de generación en generación debido a que se encuentra ligado a un alelo de otro locus que presenta alguna mutación favorecida selectivamente, el poder distinguir un locus que esté afectado por *hitchhiking* genético de un locus selectivo puede resultar un reto (Fay, y otros, 2000) pues ambos resultan en estadísticos del mismo signo, si a esto le aunamos el hecho de que todos los loci del genoma pueden estar siendo afectados por los mismos eventos demográficos y por ende estar segregando juntos, el panorama se puede ensombrecer aún más.

Cuando se comparó locus por locus al escenario estable contra los escenarios afectados por la selección natural, en todos los casos fue posible identificar al locus selectivo, pero cuando se compara el promedio de los loci de ambos escenarios no es posible distinguirlos, lo cual afecta la estimación de coeficientes de selección a partir de estos valores, hecho que *per se* es difícil de calcular con precisión (Prunier, y otros, 2011). De igual manera, cuando se compararon los escenarios demográficos contra los selectivos fue posible distinguirlos pues arrojaron valores de cero absoluto, sin embargo todos los loci arrojaron valores cercanos a cero al utilizar la prueba de probabilidad posterior (Tabla 3), y esto

evidentemente podría confundir la identificación del locus afectado por la selección natural.

Cabe notar que en este estudio sólo se analizó la selección positiva, pues es la más fácil de detectar y porque las simulaciones generadas se hicieron a nivel nucleotídico, no de aminoácidos. Para buscar selección negativa o purificadora, se pueden emplear pruebas como HKA, cuyo principio se basa en utilizar el ratio entre las tasas de sustitución no sinónima y sinónima (dn/ds), pues en un escenario de evolución neutral se espera que ambas sean iguales, sin embargo con la selección negativa disminuye el número de dn y por ende el valor de dn/ds y viceversa con la selección positiva. Bajo este principio Palmé y otros(2009) investigaron selección natural en una filogenia de pinos hecha con 18 genes nucleares, y se encontró que la selección purificadora era relativamente común, al igual que en otras plantas superiores, de igual forma encontraron evidencias de selección positiva en un árbol construido con el gen Dehidrina 1.

Escenario afectado por un proceso demográfico y uno selectivo

Cuando se simularon de manera conjunta un escenario demográfico y uno selectivo, únicamente fue posible identificar al locus afectado por la selección natural con la D y F de Fu & Li.

El estadístico Clase II F_s de Fu, fue el único con el que utilizando el valor promedio de los estadísticos se pudo detectar el cuello de botella y la selección natural, por lo que considero que es el mejor estadístico para detectar ambos escenarios juntos. Sin embargo, debido a que este estadístico arroja valores negativos significativos en loci neutrales, sería bueno combinarlo con otros, tal como se hizo en este trabajo.

Concordando con la idea de que la utilización conjunta de diversos estadísticos de resumen brindan información amplia y relevante para la inferencia de procesos evolutivos (Grivet, y otros, 2009) es evidente que cada estadístico puede ser más

apropiado para detectar distintos escenarios, aunque de acuerdo a las simulaciones efectuadas, utilizando únicamente la D y F de Fu & Li y la F_s de Fu sería suficiente para detectar selección natural positiva en una población que se está contrayendo, pero únicamente haciendo análisis loci específicos, pues utilizando el valor promedio de los loci estudiados, su identificación fue muy difícil. Esto es de esperarse, ya que los eventos demográficos pueden mimetizar los efectos de la selección natural (Grivet, y otros, 2011).

Genes nucleares de A. finckii y A. religiosa

Las pruebas de neutralidad que se realizaron en el presente trabajo, evidenciaron un cuello de botella severo, del 50% del valor inicial en las poblaciones de *A. finckii* estudiadas, esto puede deberse al colapso poblacional que han atravesado diversas coníferas durante el calentamiento del Holoceno, que ha reducido sus poblaciones a pocos manchones aislados de alta montaña, escenario que ha empeorado debido a la pérdida de su hábitat, pues en México se encuentra en protección especial según la NOM-059-Semarnat-2010. (Semarnat, 2010); mientras que en *A. religiosa*, que es uno de los géneros más representados en los bosques del centro del país, se sospecha, la presencia de un cuello de botella leve, de aproximadamente 90% del valor inicial, que ha ocurrido desde el inicio del periodo interglaciario actual, hace aproximadamente 11,500 años.

Los cuellos de botella de diferentes edades parecen ser la norma de varias coníferas templadas y subtropicales. Por ejemplo, en *Pinus halepensis* el patrón de polimorfismo hallado en poblaciones de Italia concordó con un cuello de botella severo y reciente, compatible con el último máximo glacial hace 18,000 años (Grivet, y otros, 2009), mientras que en poblaciones de *Picea abies* (L.) Karst de Suiza, Alemania, Rusia, Suecia, Rumania e Italia, los datos de las pruebas multilocus de neutralidad utilizadas fueron compatibles con la simulación de un cuello de botella severo y antiguo seguido de un crecimiento poblacional moderado (Heuertz, y otros, 2006). Por su parte Holliday y otros (2010) encontraron evidencias de cuellos de botella con pruebas de neutralidad

multilocus en poblaciones de *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. de Norte América y concluyeron que éstos fueron producto de migraciones y colonizaciones postglaciales de los últimos 13 000 años. En México se ha propuesto a través de estudios con alozimas y microsatélites en ADN mitocondrial y de cloroplasto, que *Abies flinckii* y *A. religiosa* pudieron haber atravesado reducciones poblacionales que disminuyeron su variabilidad genética y generaron diferenciación, causando deriva genética después del colapso del Holoceno. (Aguirre-Planter, y otros, 2000; Jaramillo-Correa, y otros, 2008; Jaramillo-Correa, y otros, 2009). Considerando que la mayoría de especies de coníferas han sufrido reducciones poblacionales y la distribución más limitada de *A. flinckii* (Aguirre-Planter, y otros, 2000), que de *A. religiosa* (Eguiarte Fruns, y otros, 1997), es lógico pensar en la presencia de cuellos de botella en estas poblaciones, severos en las primeras y leves en las segundas.

Cuando se analizaron de manera puntual cada uno de los genes de *A. religiosa* y *A. flinckii*, en este último pudieron identificarse cinco genes como candidatos a ser adaptativos de manera clara. En *A. religiosa* no se obtuvieron valores tan evidentes, pero sí se observó una tendencia similar en los mismos genes que en *A. flinckii*, esto podría indicar que las poblaciones de *A. religiosa* han estado sometidas a presiones selectivas menos severas, aunque ambas especies tienen historias evolutivas similares y por ende probablemente sean los mismos genes los que les han conferido ventajas adaptativas a ambas especies. Es posible también que otras coníferas que compartan su distribución e historia también muestren señales similares en los mismos, pues se han hallado huellas de selección natural en otras especies de coníferas del Eje Neovolcánico Transmexicano (Moreno-Letelier, y otros, 2014), pues este comprende una topografía heterogénea de distintas edades geológicas, donde la distribución de las especies fue objeto de cambios de altitud y clima durante las fluctuaciones del pleistoceno (Mastretta-Yanes, y otros, 2015) por lo que valdría la pena continuar con este perfil de investigación en el futuro.

Los genes nucleares candidatos a ser adaptativos identificados en nuestras dos especies de *Abies* fueron: un gen de *Xilosiltransferasa*, implicados en la

elongación de los pelos radiculares y en el proceso biosintético xiloglucano (Roschanski, y otros, 2013). Este fue identificado como candidato en *P. radiata* y *P. taeda* con una importante participación en el proceso de síntesis de la pared celular (Ade, y otros, 2014) y se ha demostrado que alteraciones en genes de esta familia resultan en cambios significativos en las propiedades mecánicas de *Arabidopsis thaliana* (Cavalier, y otros, 2008); *Aqua MIP 1*, que pertenece a un grupo de proteínas intrínsecas de la membrana, implicadas en la respuesta a la privación y transporte de agua, el transporte transmembrana y la respuesta al estrés salino (Kujala, y otros, 2012). Han sido identificadas células y tejidos con alta expresión de estos genes en plántulas, raíces de diversas edades y acículas de *P. abies*, lo cual indica su potencial para estar implicado en adaptación (Oliviusson, y otros, 2001), así como Depaulis y otros (2003), que encontraron evidencia de ser adaptativos en poblaciones de *P. pinaster* del mediterráneo; *Myb STR* y *Myb 6* que son factores de transcripción y regulatorios de síntesis de lignina, así como del metabolismo de fenilpropanoides en angiospermas y gimnospermas, además de la formación de tejido primario y secundario (Bedon, y otros, 2007). Genes de la familia MYB, han sido identificados y analizados en *Picea glauca* y *Pinus taeda* L. por Bedon, Grima-Pettenati, & Mackay, 2007 como motores de las respuestas ante sequía y defoliación. Por último, los genes *Heat shock p*, que participan en el proceso de biosíntesis de auxina y el plegamiento de proteínas en respuesta a diversas condiciones (Roschanski, y otros, 2013). El efecto de estas proteínas heat shock ha sido investigado para diversas coníferas como *Pinus banksiana* Lamb., *P. taeda* L., *P. contorta* Dougl., *Picea mariana* (Mill.) BSP, *P. glauca* (Moench) Voss., fundamentalmente en el estadio embrionario (Gifford, y otros, 1994; Dong, y otros, 1996). Según diversos autores, en los refugios pleistocénicos los climas glaciales también estuvieron caracterizados por drásticas reducciones de precipitación (Ramírez-Barahona, y Eguiarte, 2013), por lo que la implicación de estos genes en la adaptación al cambio climático sería muy probable, y podría demostrarse, como se ha hecho en repetidas ocasiones, con experimentos de jardín común (Eveno, y otros, 2008).

No fue posible determinar la fuerza de la selección natural que está actuando en los genes candidatos con la prueba de probabilidad posterior, ya que ésta prueba únicamente indica que los valores simulados en el locus afectado por selección natural son menores o iguales que los observados en las poblaciones de *Abies* y en todos los genes se obtienen valores cercanos a uno, sin permitir discernir diferencias entre los escenarios, por lo que deberían realizarse otras comparaciones que nos permitan identificar la fuerza de la selección natural que está actuando en estas poblaciones. Prunier y otros (2011) estimaron coeficientes de selección entre 0.04 y 0.01 en *Picea mariana* utilizando la fórmula desarrollada por Curtis y Cook (1978), con datos de frecuencias alélicas y número de generaciones, mientras que Wang y otros (1999) calcularon valores entre 0.04 y 0.08 para el maíz durante su domesticación, utilizando valores estimados de la tasa de recombinación y la posición del sitio bajo selección. Por lo que para calcular estos valores sería necesario, en futuras investigaciones, obtener valores precisos de la posición de los sitios bajo selección y estimar la tasa de recombinación genética en *Abies*.

Las expansiones y contracciones poblacionales en coníferas generalmente se traducen en presiones selectivas, debido a los cambios de hábitats que han generado. El conocer las adaptaciones específicas que pudieron haberse generado ante estas condiciones de cambio climático y altitud durante el Pleistoceno, es de crucial importancia para la conservación y manejo de los bosques mexicanos ante el cambio climático, pues nos permitiría conservar poblaciones con mayor probabilidad de supervivencia ante sequías.

CONCLUSIÓN

Con las simulaciones realizadas en el presente trabajo podemos concluir que todos los escenarios de distintas magnitudes de cuellos de botella pudieron ser identificados al compararse contra el escenario estable, por lo que considero indispensable el uso de simulaciones para la adecuada detección de eventos demográficos, que con la utilización exclusiva de pruebas de neutralidad no sería posible identificar.

Es importante resaltar que la selección natural positiva simulada pudo identificarse únicamente de manera locus-específica, no al promediar todos los loci ni al compararse contra otros escenarios.

Al utilizar los valores de poblaciones simuladas para analizar a poblaciones naturales de *A. religiosa* y *A. flinckii* fuimos capaces de identificar la presencia de cuellos de botella en *A. flinckii*. Sin embargo, esto dificultó la detección de genes adaptativos en las mismas poblaciones, ya que cuando algunos loci reflejan selección positiva y otros reflejan contracción poblacional reciente y ambos escenarios resultan en valores estadísticos opuestos, se anulan sus valores al promediarse y se dificulta la detección de cualquiera de los dos eventos.

La detección de loci adaptativos sigue siendo un reto en la actualidad y considero indispensable la utilización de simulaciones para futuras investigaciones, pero requerimos de pruebas más sensibles que sean capaces de detectar loci adaptativos aun cuando sean analizados en conjunto con otros loci que reflejen cambios demográficos.

LITERATURA CITADA

Ade C. P. [y otros] Family 34 glycosyltransferase (GT34) genes and proteins in *Pinus radiata* (radiata pine) and *Pinus taeda* (loblolly pine). [Publicación periódica] // *Plant Journal*. - 2014. 78: 305–318.

Aguirre-Planter E., Furnier G.R. y Eguiarte L.E. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. [Publicación periódica] // *American Journal Of Botany* . - 2000. - 87(3): 362–371.

Bedon F., Grima-Pettenati J. y Mackay J. Conifer R2R3-MYB transcription factors: sequence analyses and gene expression in wood-forming tissues of white spruce (*Picea glauca*) [Publicación periódica] // *Plant Biology* 2007 7(17).

Biswas Shameek y Akey Joshua M. Genomic insights into positive selection [Publicación periódica] // *TRENDS in Genetics* . - 2006. - 22 (8): 437-447.

Boege K [y otros] La ecología evolutiva: interfase de la ecología y la evolución. [Publicación periódica] // *Ciencias* 103. - 2011. - págs. 28-37.

Bouillé Marie y Bousquet Jean. Trans-species shared polymorphisms at orthologous nuclear gene loci among distant species in the conifer *Picea* (Pinaceae): Implications for the long-term maintenance of genetic diversity in trees. [Publicación periódica] // *American Journal of Botany* . - 2005 . - 92(1): 63–73.

Caponi Gustavo El retorno de la ontogenia: un conflicto de ideales de orden natural en la biología evolucionaria actual [Publicación periódica]. - São Paulo : Scientiæ zudia, 2007. - 5(1):9-34 .

Castillo Amanda La selección natural a nivel molecular [Sección de libro] // *Ecología Molecular / aut. libro Eguiarte Luis, E., Souza Valeria. y Aguirre Xitlali (compiladores)*. - Ciudad de México : Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, 2007.

Cavalier D.M. [y otros] Disrupting Two *Arabidopsis thaliana* Xylosyltransferase Genes Results in Plants Deficient in Xyloglucan, a Major Primary Cell Wall Component [Publicación periódica] // *American Society of Plant Biologists* . - 2008 . - 20(6): 1519-1537.

CENAPRED; CONANP; SEMARNAT Parque Nacional Izta-Popo [En línea]. - MAB: Parque Nacional Izta-Popo Zoquiapan, 27 de mayo de 2014. - 22 de septiembre de 2015. - <http://iztapopo.conanp.gob.mx/>.

CONABIO Naturalista [En línea] // *Naturalista*. - 12 de mayo de 2016. - http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/207476-Abies-flinckii#cite_note-3.

Cook L.M. La población y el gen [Sección de libro] // *Genética de Poblaciones*. - Barcelona : Ediciones Omega, 1979.

Curtis CF y Cook LM, Wood, RJ Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting evolution of resistance in mosquitos [Publicación periódica] // Ecological Entomology. - 1978. - 3:273–287.

Curtis Schnek Los procesos del cambio evolutivo [Sección de libro] // Biología / aut. libro Curtis Schnek y Massarini Barnes. - [s.l.] : Editorial Médica Panamericana, 2007.

Dalquen D.A. [y otros] ALF—A Simulation Framework for Genome Evolution [Publicación periódica] // Mol. Biol. Evol. - 2012. - 29(4):1115–1123.

Darwin Charles Selección natural o la supervivencia de los más adecuados [Sección de libro] // El Origen de las Especies / aut. libro Darwin Charles. - México, D.F. : Bruguera Mexicana de Ediciones, S.A., 1977. - Vol. 1.

Depaulis Frantz., Mousset Sylvain. y Veuille Michel. Power of Neutrality Tests to Detect Bottlenecks and Hitchhiking [Publicación periódica] // Journal of Molecular Evolution. - 2003. – (57). - págs. S190-S200.

Dong J. y Dunstan D.I. Characterization of three heat-shock-protein genes and their developmental regulation during somatic embryogenesis in white spruce [*Picea glauca*(Moench) Voss] [Publicación periódica] // Planta. - 1996. – 200: 85-91.

Eckert A. J. [y otros] Spatially Variable Natural Selection and the Divergence Between Parapatric Subspecies of Lodgepole Pine (*Pinus contorta*, Pinaceae) [Publicación periódica] // American Journal of Botany. – 2012.-99 (8): 1323-1334.

Eguiarte Fruns L. E. y Furnier. G. R. Niveles y patrones de variación genética del género *Abies* en México [Informe]. - México, D.F : Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. B138, 1997.

Eguiarte L.E [y otros] Genómica de Poblaciones: Nada en la Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica y nada en la genómica va a tener sentido si no es a la luz de la evolución. [Publicación periódica]. - México : Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2013. - Vol. 16.

Eveno E [y otros] Contrasting patterns of selection at *Pinus pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses. [Publicación periódica] // Molecular Biology and Evolution. - 2008. - 25: 417–437.

Fay Justin C. y Wu Chung-I Hitchhiking Under Positive Darwinian Selection [Publicación periódica] // Genetics. - 2000. - págs. 155: 1405–1413.

Fu Yun-Xin New Statistical Tests of Neutrality for DNA Samples From a Population [Publicación periódica]. - [s.l.] : Genetics Society of America, 1996. – 143:557-570

Fu Yun-Xin Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection [Publicación periódica] // Genetics. - 1997. - 147: 915-925.

Fu Yun-Xin y Li Wen-Hsiung Statistical Tests of Neutrality of Mutations [Publicación periódica] // Genetics. - 1993. - págs. 693-709.

Fu Yun-Xin y Li Wen-Hsiung. Statistical Tests of Neutrality of Mutations [Publicación periódica] // Genetics. - [s.l.] : Genetics Society of America, 1993. - 133: 693-709.

Futuyma Douglas J. Evolutionary Biology [Sección de libro] // Evolution. Third Edition. - Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, Inc., 2013.

Futuyma Douglas J. Genetic Drift: Evolution at Random [Sección de libro] // Evolution. Second edition. - Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, Inc., 2009.

Futuyma Douglas J. Natural Selection and Adaptation [Sección de libro] // Evolution. Third Edition. - Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, Inc., 2013.

Futuyma Douglas J. The Genetic Theory of Natural Selection [Sección de libro] // Evolution. Third Edition. - Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, Inc, 2013.

Futuyma Douglas J. The Origin of Genetic Variation [Sección de libro] // Evolution. Third Edition. - Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, Inc., 2013.

Futuyma Douglas J. Variation: The Foundation of Evolution [Sección de libro] // Evolution. Third edition. - Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, 2013.

Gernandt D.S. y Pérez-de la Rosa J.A. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México Biodiversity of Pinophyta (conifers) in Mexico [Publicación periódica] // Revista Mexicana de Biodiversidad . - 2014. - 85: S126-S133.

Gifford D.J. y Taleisnik E. Heat-shock response of Pinus and Picea seedlings [Publicación periódica] // Tree Physiology . - 1994. - 14: 103-110 .

Graham Allan The Tertiary History of the Northern Temperate Element in the Northern [Publicación periódica] // American Journal of Botany. - 1999. - 86(1): 32–38.

Grivet D [y otros] Molecular Footprints of Local Adaptation in Two Mediterranean Conifers [Publicación periódica] // Mol. Biol. Evol. - 2011. - 28(1):101–116.

Grivet D [y otros] Patterns of polymorphism resulting from long-range colonization in the Mediterranean conifer Aleppo pine [Publicación periódica]. - [s.l.] : New Phytologist, 2009.

Hartl Daniel L. y Clark Andrew G. Mutation and the Neutral Theory [Sección de libro] // Principles of Population Genetics. Fourth edition. - Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2007.

Hartl Daniel L. y Clark Andrew G. Random Genetic Drift [Sección de libro] // Principles of Population Genetics. - Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2007.

Hartl Daniel L. y Jones Elizabeth L. Molecular Evolution and Population Genetics [Sección de libro] // Genetics: Analysis of Genes and Genomas 7th Ed.. - Sadbury, Massachussets : Jones and Bartlett Publishers, 2009.

Hedrick Philip W. Neutral Theory and Coalescence [Sección de libro] // Genetics of Populations. Fourth Edition. - Sudbury, Massachusetts : Jones and Bartlett Publishers, 2011.

Heuertz M. [y otros] Demographic History of Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst] Multilocus Patterns of Nucleotide Diversity, Linkage Disequilibrium and Demographic History of Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst] [Publicación periódica] // Genetics . - 2006. - 174: 2095–2105.

Hoban Sean, Bertorelle Giorgio y Gaggiotti Oscar E. Computer simulations: tools for population and evolutionary genetics [Publicación periódica] // Nature. - 2012. - Vol. 13. - págs. 110-122.

Holliday J.A. [y otros] Postglacial history of a widespread conifer produces inverse clines in selective neutrality tests [Publicación periódica] // Molecular Ecology. - 2010. - págs. 19, 3857–3864.

Hu F. S., Hampe A. y Petit R. J. Paleoeecology meets genetics: deciphering past vegetational dynamics [Publicación periódica] // The Ecological Society of America. - 2008. - págs. 371-379.

Hubby J.L. y Lewontin R.C. A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations. I. the Number of Alleles at Different Loci in *DROSOPHILA PSEUDOOBSCURA* [Publicación periódica]. - Chicago : Genetics, 1966 . - 2: 577–594.

Hudson Richard Gene genealogies and the coalescent process [Sección de libro] // Evolutionary Biology / aut. libro Futuyma Douglas y Antonouics Janis. - Oxford : Oxford Surveys, 1991. - Vol. 7.

Hwang S-Y. [y otros] Blackwell Publishing Ltd. Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation [Publicación periódica] // Molecular Ecology . - 2003. - págs. 2689–2695.

Jaramillo-Correa J.P [y otros] Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern México and Guatemala [Publicación periódica] // Molecular Ecology. - 2008. - págs. 2476–2490.

Jaramillo-Correa JP [y otros] Inferring the past from the present phylogeographic structure of North American forest trees: seeing the forest for the genes [Publicación periódica] // Canadian Journal of Forest Research. - 2009. - 39(2): 286-307.

Jensen J.D. [y otros] Distinguishing Between Selective Sweeps and Demography Using DNA Polymorphism Data [Publicación periódica] // Genetics. - 2005. - 170: 1401–1410.

Kimura Motoo Evolutionary Rate at the Molecular Level [Publicación periódica]. - Mishima, Japon : Nature, 1968. – 217:624-626.

- Kimura Motoo** On the probability of fixation of mutant genes in a population [Publicación periódica]. - Wisconsin : Genetics 47(7): 13-7 IQ June 1962 , 1962. - 7
- Kimura Motoo** The neutral mutation-random drift hypothesis as an evolutionary paradigm [Sección de libro] // The Neutral Theory of Molecular Evolution. - National Institute of Genetics, Japan : Cambridge University Press, 1983. – págs. 34-40.
- Krebs Jocelyn E., Goldstein Elliot S. y Kilpatrick Stephen T.** Genome Evolution [Sección de libro] // Lewin´s Genes XI. - Burlington, MA : Jones & Bartlett Learning, 2014.
- Kuhner Mary K.** Coalescent genealogy samplers: windows into population history [Publicación periódica]. - Seattle : Trends in Ecology and Evolution, 2008. - 24(2).
- Kujala S.T. y Savolainen O.** Sequence variation patterns along a latitudinal cline in Scots pine (*Pinus sylvestris*): signs of clinal adaptation? [Publicación periódica] // Tree Genetics & Genomes . - 2012. - 8:1451–1467.
- Librado P. y Rozas J.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [Publicación periódica]. - [s.l.] : Bioinformatics, 2009. - 25(11): 1451-1452
- Liu T. S.** A monograph of the genus *Abies* [Libro]. - Nacional Taiwan University, China, 608 : Department of Forestry, College of Agriculture., 1971.
- Mastretta-Yanes A. [y otros]** Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt [Publicación periódica]. - [s.l.] : Journal of Biogeography , 2015. – 42 : 1586–1600
- Minitab** Minitab Statistical Software [En línea] // Minitab Statistical Software. - Minitab Inc., 2016. - 11 de noviembre de 2016. - <http://www.minitab.com/es-mx/company/>.
- Moreno-Letelier A., Mastretta-Yanes A. y Barraclough T.G.** Late Miocene lineage divergence and ecological differentiation of rare endemic *Juniperus blancoi*: clues for the diversification of North American conifers [Publicación periódica]. - [s.l.] : New Phytologist, 2014. -203: 335–347
- Nielsen Rasmus** Molecular Signatures of Natural Selection [Publicación periódica] // Annu. Rev. Genet.. - 2005. - 39:197-218.
- Nosil P., Funk D.J. y Ortiz-Barrientos D.** Divergent selection and heterogeneous genomic divergence [Publicación periódica] // Molecular Ecology . - 2009 . 18: 375–402 .
- Oliviusson P., Salaj J. y Hakman I.** Expression pattern of transcripts encoding water channel-like proteins in Norway spruce (*Picea abies*) [Publicación periódica] // Plant Molecular Biology . - 2001. - 46: 289–299.
- Palmé AE. [y otros]** Selection on Nuclear Genes in a *Pinus* Phylogeny [Publicación periódica] // Mol. Biol. Evol.. - 2009. - 26(4): 893–905.

Pierce Benjamin A. Population Genetics [Sección de libro] // Genetics 4th Ed.. - New York : W. H. Freeman and Company , 2012.

Prunier J.Laroche, J., Beaulieu J. y Bousquet J. Scanning the genome for gene SNPs related to climate adaptation and estimating selection at the molecular level in boreal black spruce [Publicación periódica] // Molecular Ecology. - 2011. - págs. 1702–1716.

Pujol B. y Pannell J.R. Reduced Responses to Selection After Species Range Expansion [Publicación periódica] // Science. - 2008. - pág. 96.

Pyhäjärvi T. [y otros] Demographic History Has Influenced Nucleotide Diversity in European Pinus sylvestris Populations [Publicación periódica] // Genetics . - 2007. - págs. 1713–1724.

Ramírez Lerma Juan José UNAM en línea [En línea] // Tesis del sistema bibliotecario UNAM. - Caracterización de genes de la subfamilia de factores de transcripción R2R3-MYB en el abeto Abies religiosa, 2012. - 03 de marzo de 2017. - <http://132.248.9.195/ptd2013/julio/303593207/Index.html>.

Ramírez-Barahona S. y Eguiarte L.E The role of glacial cycles in promoting genetic diversity in the Neotropics: the case of cloud forests during the Last Glacial Maximum [Publicación periódica]. - [s.l.] : Ecology and Evolution, 2013. - (3): 725–738.

Ramírez-Soriano A. [y otros] Statistical Power Analysis of Neutrality Tests Under Demographic Expansions, Contractions and Bottle Necks With Recombination. [Publicación periódica] // Genetics. - 2008. – 179: 555-267.

Ramos-Onsins Sebastian E. y Mitchell-Olds. Thomas mlcoalsim: Multilocus Coalescent Simulations [Publicación periódica] // Evolutionary Bioinformatics. - 2007. - págs. 1-4.

Roschanski A.M. [y otros] Annotation and resequencing of genes from de novo transcriptome assembly of Abies Alba (Pinaceae) [Publicación periódica] // . Applications in Plant Sciences . - 2013. - pág. 1 (1) 1 a 8.

Rozas Sebastian E. Ramos-Onsins and Julio Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth [Publicación periódica] // Mol. Biol. Evol. . - 2002. - págs. 2092-2100.

Scitable Scitable [En línea] // Scitable. - Nature education, 2014. - 10 de febrero de 2017. - <http://www.nature.com/scitable/definition/haplotype-haplotypes-142>.

Semarnat Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT [Informe]. - Jueves 30 de diciembre de 2010 : Diario Oficial de la Federación (DOF), 2010.

Silva L.C. y Benavides A. El enfoque bayesiano: otra manera de inferir [Publicación periódica]. - Ciudad de la Habana, Cuba. : Gaceta Sanitaria , 2001. -15 (4): 341-346 : Vol. 15.

Sterken R [y otros] A Population Genomics Study of the Arabidopsis Core Cell Cycle Genes Shows the Signature of Natural Selection [Publicación periódica] // The Plant Cell. - [s.l.] : The Plant Cell, 2009. - 2987-2998 : Vol. 21. - págs. 21: 2987–2998.

Tajima F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism [Publicación periódica] // Genetics . - 1989. - 123: 585-595.

Teshima K., Coop G. y Przeworski M. How reliable are empirical genomic scans for selective sweeps? [Publicación periódica] // Genome Reserch. - 2006. - 16:702–712.

Wang RL [y otros] The limits of selection during maize domestication [Publicación periódica] // Nature. - 1999. - 398: 236–239.

Web III T. y Bartlein P.J. Global Changes During the Last 3 Million Years: Climatic Controls and Biotic Responses [Publicación periódica] // Annual Reviews of Ecology and Systematics. - 1992. - 23:141-173.

Wright Sewall The Genetical Structure of Populations [Publicación periódica]. - Chicago : Annals of Eugenics, 1950. - págs. 323-254.

Zeng Kai [y otros] Statistical Tests for Detecting Positive Selection by Utilizing High-Frequency Variants [Publicación periódica] // Genetics . - 2006. - 174: 1431–1439.

Anexo 1. Tabla de genes nucleares utilizados

| | Genes Nucleares | ID | Longitud total (nt) | Secuencias de oligos (5' - 3') |
|-----|---|---------------------------------------|---------------------|---|
| 1) | CeSa4 <i>Pinus taeda</i> cellulose synthase catalytic subunit (CesA1) mRNA, complete cds (0.0) | 3918 (Roschanski, y otros, 2013) | 346 | F: TTCCAAGGTCTTCTCAAGGT R: TGAAGAGTAGGAGTTTCGGT |
| 2) | Cobra-like protein <i>Pinus pinaster</i> COBRA-like protein gene, partial cds (0) | 9652 (Roschanski, y otros, 2013) | 453 | F: TGCAAAGAAAGTCAAGGCCGA R: CCCATACGGTGTAAATGGCT |
| 3) | Aqua MIP 1b <i>P. abies</i> mRNA for porin Mip1 (6E-157) | 8248 (Roschanski, y otros, 2013) | 728 | F:CAAGTATTCGAAAGGCAGC R:ACAAAGGTGCCACAATCTC |
| 4) | LhCA4 <i>P. sylvestris</i> Lhca4*1-2 mRNA encoding Lhca4 protein (type 4 protein of light-harvesting complex of photosystem I) (partial) (7E-179) | 8855 (Roschanski, y otros, 2013) | 850 | F: TATTTGCTGGTCGGGATTCCG R: CTGCACTAGGTTCTCGAACG |
| 5) | Xilosiltransf. <i>Pinus taeda</i> mRNA for alpha-1, 6-xylosyltransferase (x34.1 gene) (0.0) | 14455 (Roschanski, y otros, 2013) | 759 | F: GAACAAGATCGACTACTGCC R: TTTGATGGCCTTGAAAGCAG |
| 6) | Aqua MIP 1 <i>P. abies</i> mRNA for porin Mip1 (6E-157) | 23660 (Roschanski, y otros, 2013) | 744 | F: AGGAAGATGTTAGGCTCGGG R: GAAGCCCTTCACAACTCCAG |
| 7) | Myb STR | MybSTR (Ramírez Lerma, 2012) | 566 | F: TGGCGYTCSTTCCCAAGGC R:CCAGTAGTCTTTATCTCGTTGTC |
| 8) | Myb 6 | Myb6 (Ramírez Lerma, 2012) | 394 | F: TGGCGYTCSTTCCCAAGGC R:CCAGTAGTCTTTATCTCGTTGTC |
| 9) | Heat shock protein. <i>Medicago truncatula</i> heat shock protein (MTR_7g024390) mRNA, complete cds (0) | 27033 (Roschanski, y otros, 2013) | 422 | F: TTTACTCCACCATTACGAGG R:TTCGCAATGATAGGATTGCA |
| 10) | Fructose 1,6 diphosphate aldolase <i>Metasequoia glyptostroboides</i> fructose-1,6-diphosphate aldolase mRNA, complete cds (2E-74) | 14514 (Roschanski, y otros, 2013) | 308 | F: GGGTTCTGATTCTCCAAGG R:CTGCATACTTGGCCAAAGT |
| 11) | Myb9 | Myb9 (Ramírez Lerma, 2012) | 409 | F: TGGCGYTCSTTCCCAAGGC R:CCAGTAGTCTTTATCTCGTTGTC |