



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

El uso de microsatélites en el análisis de la estructura
genética de una metapoblación de *Tillandsia recurvata*

TESIS

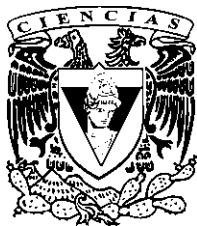
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ERICK GARCÍA MORALES

Co-Tutoras: Dra. María Teresa Valverde Valdés y
Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

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

“El uso de microsatélites en el análisis de la estructura genética de una metapoblación de Tillandsia recurvata”

realizado por **García Morales Erick**, con número de cuenta **095126443**, quien opta por titularse en la opción **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

| | | | |
|-------------------------|------|------------------------------------|--|
| Propietario | Dr. | Daniel Piñero Dalmau | |
| Propietario | Dra. | Ella Vázquez Domínguez | |
| Tutor(a) Propietario | Dra. | María Teresa Valverde Valdés | |
| Suplente | Dr. | Efraín Tovar Sánchez | |
| Suplente Co-Tutor(a) | Dra. | María del Carmen Mandujano Sánchez | |

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Univeritaria, D. F., a 23 de marzo del 2007
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

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

1. Datos del alumno

García
Morales
Erick
57109229
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biólogo
095126443

2. Datos del asesor

Dra.
María Teresa
Valverde
Valdés

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Daniel
Piñero
Dalmau

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Ella
Vázquez
Domínguez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Efraín
Tovar
Sánchez

6. Datos del sinodal 4

Dra.
María del Carmen
Mandujano
Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

El uso de microsatélites en el análisis de la estructura genética de una metapoblación de
Tillandsia recurvata
80 p
2007

Agradecimientos

Agradezco a los sinodales: Dra. Ma. Teresa Valverde Valdés, Dra. Ma. Del Carmen Mandujano Sánchez, Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dra. Ella Vázquez Domínguez y Dr. Efraín Tovar Sánchez, la revisión de la tesis ya que sus aportaciones me permitieron mejorar el trabajo y ahondar más en ciertos temas.

Agradezco en especial a mis tutoras, Tere y Meli, por sus consejos tanto en lo académico como en lo personal y por su tolerancia y apoyo durante todo el tiempo que hemos compartido realizando este trabajo.

También me gustaría agradecer a (los) profesores de la Facultad que me enseñaron el rumbo en la biología y en especial a integrar los conocimientos que me brindaron, este agradecimiento en especial para Francisco Sour, Pedro García, Zenón Cano, Jorge Meave, Oscar Flores, Tere Valverde y Eduardo Pérez.

La ayuda y los consejos técnicos en el laboratorio que me dieron: Rocío Esteban, Rubén Pérez y Mariana Rojas, sin los cuales este trabajo hubiera sido aún más difícil de realizar.

Además conté con la ayuda y amistad de mis compañeros del Laboratorio de Dinámica de Poblaciones: Jordan (Ki... gracias por revisar mi tesis), Isra(guate), Lucy(fer), Gis(mo), Lauris(psssssss), Rodrigo, Angélica y César (mi chilaquil), tanto en la realización del trabajo como en los peores y mejores momentos que me han ocurrido durante mi estancia en el laboratorio. Muy en especial a Concepción (Poni-Feral) por revisar mi tesis y por darme tan buenos momentos.

De manera muy personal y con mucho cariño a mis padres, Eduardo y Leonor, hermanos, Sandra y Lalo y a toda mi familia por su amor, apoyo incondicional, confianza y paciencia ilimitada que ha tenido conmigo durante toda mi vida y que se que así seguirá siendo.

A mis amigos de la carrera por los buenos tiempos que pasamos en la Facultad de Ciencias, Brian, Fernando, Edgardo y Ana Laura, Mónica, Mauricio, Tomas y Dulce, Roco y los que por alguna razón se me pasa mencionar. Sontecomapan Forever. Además a Silvia (babosa), David y Rubi.

A (los) demás amigos del Laboratorio de Dinámica de Poblaciones que me hicieron más amenos lo momentos de trabajo: Cynthia, Habacuc (galletita), Tania (tapatiux), Yup, Juan y Leo, Karla, Pao con mucho amor y deseos de que todo mejore (wish you where here), Hugo (ligues), Violeta, Alejandra(s), Nico, y SuSilla, Ruth, (Ran)Angela.

A todas las personas que he querido y que me han enseñado muchas cosas acerca de cómo compartir y de cómo enamoarse de tan variadas maneras: Evelin, Ixchel, América, Liber, Clau (hasta las nubes) y Gaby.

Este proyecto se realizó con con una beca y el financiamiento del proyecto PAPIIT IN221401 de la Dra. Valverde y “SEMARNAT-CONACYT 0350” de la Dra. Mandujano.

Índice

Página

RESUMEN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| 1.1 Presentación | 1 |
| 1.2 Antecedentes | |
| 1.2.1 Las metapoblaciones como un ejemplo de estructuración espacial de las poblaciones | 3 |
| 1.2.2 Polémicas en torno a la teoría metapoblacional | 6 |
| 1.2.3 El hábito epífito y las metapoblaciones | 7 |
| 1.2.4 Marcadores moleculares | 11 |
| 1.3 Justificación del trabajo | 16 |
| 1.4 Objetivos | |
| Objetivo general | 17 |
| Objetivos particulares | 17 |
| 1.5 Hipótesis | 18 |

CAPÍTULO 2. MÉTODOS

| | |
|--|----|
| 2.1 La especie en estudio | 19 |
| 2.2 El sitio de estudio | 22 |
| 2.3 Muestreo del material biológico | 23 |
| 2.4 Desarrollo de los microsatélites | 26 |
| 2.5 Evaluación de la diversidad genética de los microsatélites | |
| 2.5.1 Extracción de ADN | 29 |
| 2.5.2 PCR (para los 12 microsatélites) | 31 |

| | |
|---|----|
| 2.5.3 Separación y visualización del producto de PCR en geles de poliacrilamida | 32 |
| 2.6 Análisis de datos | 33 |
| 2.6.1 Análisis de la variación genética intra-poblacional | 34 |
| 2.6.2 Análisis de la variación genética inter-poblacional | 36 |
| CAPÍTULO 3. RESULTADOS | |
| 3.1 Polimorfismo de los 12 loci de microsatélites de <i>Tillandsia recurvata</i> | 41 |
| 3.2 Variación genética intra-poblacional | 42 |
| 3.3 Estructura genética inter-poblacional | |
| 3.3.1 Diferenciación genética entre poblaciones | 48 |
| 3.3.2 Distribución de la variabilidad genética entre los niveles de agrupación espacial | 49 |
| 3.3.3 Estimación de la migración entre poblaciones | 51 |
| 3.3.4 Distancias genéticas entre poblaciones | 52 |
| 3.3.5 Relación entre la estructura genética y la distancia geográfica | 53 |
| CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN | |
| 4.1 Polimorfismo de los 12 loci de microsatélites de <i>Tillandsia recurvata</i> | 56 |
| 4.2 Variación genética intra-poblacional | 58 |
| 4.3 Estructura genética de las seis poblaciones de <i>Tillandsia recurvata</i> | 60 |
| 4.3.1 Distribución de la variabilidad genética entre los niveles de agrupación espacial | 63 |

| | |
|---|----|
| 4.3.2 Relación entre la estructura genética y la estructura espacial | 64 |
| 4.4 Conclusiones | 66 |
| APÉNDICE 1 | |
| Protocolo de PCR para los loci polimórficos | 68 |
| APÉNDICE 2 | |
| Preparación de geles de poliacrilamida | 69 |
| APÉNDICE 3 | |
| Tinción con plata de geles de poliacrilamida | 71 |
| APÉNDICE 4 | |
| Tablas de las frecuencias observadas en cuatro loci de microsatélites | 72 |
| LITERATURA CITADA | 73 |

RESUMEN

El concepto metapoblacional se puede aplicar a especies que se distribuyen formando poblaciones locales conectadas por medio de migración. La permanencia la especie a nivel regional está determinada por eventos de colonización y de extinción. El concepto de metapoblaciones se puede aplicar a especies que habitan “parches” discretos en el espacio y efímeros en el tiempo como puede ocurrir con algunas plantas epífitas, que al establecerse en árboles (parches discretos y efímeros) forman poblaciones locales conectadas por medio de la dispersión de semillas, colonizando eventualmente nuevos hospederos. La importancia de la dispersión entre poblaciones locales se puede evaluar midiendo el nivel de diferenciación genética entre ellas. En este estudio se probaron 12 loci de microsatélites, para analizar el nivel de variación en seis poblaciones de *Tillandsia recurvata* ubicadas a diferentes distancias en Tehuacan, Pue., México. 4 loci resultaron polimórficos. Los resultados obtenidos muestran que no hay gran diferenciación entre las poblaciones muestreadas (medida por la F_{st} y D_A) y que la mayor parte de la variabilidad encontrada (*c.a.* 93%) se ubica dentro de las poblaciones y no entre los sitios, como se esperaba. Además no se observó relación de la distancia entre poblaciones y su nivel de diferenciación genética ni entre la distancia geográfica y el número de migrantes (M), debido probablemente a la capacidad de dispersión de las semillas. Se propone que el modelo clásico de metapoblaciones no es el mas adecuado para está especie y un modelo como el de “patch-tracking” representa mejor la dinámica espacial de *T. recurvata*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Presentación

Los estudios metapoblacionales se han visto rezagados en plantas, pues éstas presentan una serie de características que dificultan su análisis bajo esta perspectiva, tales como la formación de bancos de semillas, problemas para medir o cuantificar la dispersión de propágulos, el fenómeno de clonalidad y la dificultad para identificar los eventos de extinción y colonización (Husband y Barrett, 1996; Freckleton y Watkinson, 2002).

Debido al hábitat naturalmente fragmentado que ocupan las epífitas, a su forma de dispersión (anemocoria y zoocoria) y a la ocupación de parches claramente efímeros, los sistemas epífita-hospedero parecen sistemas ideales para estudiarlos bajo un enfoque metapoblacional (Bernal, 2006). Sin embargo, hasta la fecha solo se ha desarrollado claramente este enfoque en estudios con musgos (Snäll *et al.*, 2004).

En esta tesis se parte del supuesto de que la epífita *Tillandsia recurvata* (L.) existe en la naturaleza formando metapoblaciones, en donde cada árbol hospedero ocupado por *T. recurvata* funge como una población local. Para poner a prueba esta hipótesis, realizamos un estudio de la estructura genética de esta especie por medio del uso de microsatélites, para conocer si los individuos establecidos en cada árbol hospedero se diferencian como una población independiente a nivel genético y si esta diferenciación es más marcada conforme aumenta la distancia a la que se encuentran los parches. Además, se tenía el

interés de evaluar la dispersión entre poblaciones , para tener una idea de su importancia a nivel metapoblacional, tanto en la colonización de árboles, como en el contacto entre poblaciones. A la vez, se pretendió probar qué tan robusta es la herramienta de los microsatélites en el análisis genético de poblaciones, para plantear futuras preguntas metapoblacionales relacionadas, por ejemplo, con la dispersión de semillas.

A continuación se presenta una revisión de la literatura sobre los temas relevantes para este trabajo, en particular, el concepto metapoblacional y su aplicación en plantas epífitas, el uso de marcadores moleculares y, finalmente, el análisis de la dispersión de semillas a través de técnicas genéticas.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Las metapoblaciones como un ejemplo de estructuración espacial de las poblaciones

Las poblaciones son agrupaciones de individuos de la misma especie que habitan en la misma área en un tiempo dado (Silvertown y Lovett, 1995). En la naturaleza las poblaciones no se encuentran aisladas unas de otras; rara vez los individuos de una misma especie se distribuyen de forma continua en el espacio (Husband y Barrett, 1996). Más bien, es frecuente que encontremos poblaciones locales ocupando “parches” propicios que se presentan en el paisaje de manera discontinua. Este fenómeno ha sido reconocido por algunos investigadores que han enfatizado la existencia de una estructura espacial en la distribución de los individuos de una especie y han observado que esta estructura espacial tiene repercusiones a nivel demográfico, genético y evolutivo (Hanski, 2002).

Uno de los primeros investigadores que reconoció el efecto de la estructura espacial sobre la evolución de grupos de organismos fue Sewall Wright (1931; 1940), quien propuso que cuando una especie presenta una distribución con una estructura espacial formando “subpoblaciones”, la evolución puede tomar lugar de manera más rápida, en especial si hay procesos de extinción y recolonización de estas subpoblaciones a nivel local. Posteriormente, Andrewartha y Birch (1954) hablaron acerca del riesgo de extinción de las poblaciones e ilustraron cómo podría ser la dinámica de extinción y colonización de poblaciones locales. Estos autores ya reconocían la influencia que tienen la cantidad de “parches” disponibles para ser colonizados y la tasa de migración sobre el estado de la población a nivel regional (Hanski, 2002). Con estas observaciones, en realidad, estos autores

comenzaban a reconocer la existencia de metapoblaciones, aunque aún sin nombrarlas de manera explícita.

En 1969, el entomólogo Richard Levins plantea un modelo que explica la dinámica de colonización y extinción de poblaciones de una especie que se distribuye de manera discontinua en el espacio, formando poblaciones locales distribuidas en el paisaje, en el cual es posible distinguir parches propicios para el establecimiento de la especie en cuestión inmersos en una matriz de hábitat no colonizable, dando lugar a metapoblaciones. Este modelo plantea que la dinámica regional de la especie dependerá del número de parches propicios disponibles, la proporción de parches ocupados, la probabilidad de extinción de las poblaciones locales y la tasa de migración, de la cual depende la colonización de nuevos parches (Levins, 1969). El modelo metapoblacional de Levins contempla la existencia de un estado de balance que ocurre cuando la proporción de parches ocupados se mantiene constante, lo cual sólo es posible si la tasa de colonización excede a la tasa de extinción (Levins, 1969).

Según Hanski (1991) y Hanski y Gilpin (1997), el modelo original de Levins ignora el efecto del área y de la localización espacial de los parches, por lo cual considera que los parches son del mismo tamaño y no se ven afectados en su probabilidad de ser colonizados por su grado de aislamiento. Además, supone que cada población local tiene una dinámica totalmente independiente (*i.e.* asincronía en el comportamiento de las poblaciones) y que los eventos de migración no tienen un efecto en la sincronía de estas dinámicas. Estas observaciones de Hanski en torno al modelo original de Levins sirvieron para poner en evidencia que los sistemas naturales no cumplen completamente con los supuestos del modelo

y, por lo tanto, abren la posibilidad de que el modelo original pueda ser modificado para ser más compatible con el funcionamiento espacio-temporal de las especies estudiadas. Sin embargo, es importante rescatar que el modelo de Levins (1969) es el primer intento formal de explicar la dinámica regional de una especie que ocupa hábitats discretos distribuidos en el espacio de manera discontinua.

Actualmente se han propuesto nuevos enfoques a la teoría metapoblacional que consideran la existencia de diferentes tipos de metapoblaciones. En ellos se contempla una variedad de escenarios espaciales y de dinámicas demográficas locales que pueden englobarse dentro del concepto metapoblacional. Uno de los tipos de metapoblación que se han reconocido, por ejemplo, es el de fuente-sumidero, en el cual se contempla una población fuente (establecida de forma permanente en un parche de gran tamaño y con condiciones de alta calidad), de la cual surgen los migrantes que llegan a varias poblaciones sumidero (establecidas en parches de menor tamaño y con condiciones de menor calidad); estas últimas poseen una dinámica poblacional muy variable que ocasiona que tengan altas probabilidades de extinguirse y sólo se mantienen gracias a la llegada de individuos de la población fuente (Pulliam, 1988; Harrison, 1991). Otro tipo de metapoblación que se ha reconocido recientemente es el llamado rastreo de parches ("patch tracking metapopulations"-Thomas, 1994), que reconoce que los parches mismos presentan una dinámica espacial de aparición/desaparición, de tal forma que no son siempre los mismos parches los que están disponibles para ser colonizados a través del tiempo. Este tipo de dinámica metapoblacional se ha descrito en particular para especies epífitas, en las que un árbol hospedero está disponible para ser colonizado sólo durante un tiempo y posteriormente

desaparece o deja de ser adecuado para la colonización (Snäll *et al.*, 2003; Snäll *et al.*, 2004; Snäll *et al.*, 2005b).

1.2.2 Polémicas en torno a la teoría metapoblacional

Una de las primeras ideas que ha resultado polémica en el contexto de la teoría metapoblacional es el nivel de generalidad en cuanto a la distribución fragmentada de las especies en la naturaleza. ¿Es común que la distribución de las especies suceda a través de la formación de poblaciones locales a manera de parches?, ¿o más bien éstas se distribuyen de manera continua en el espacio? Algunos autores sugieren que este tipo de distribuciones fragmentadas son más bien una generalidad, en lugar de una excepción (Husband y Barrett, 1996). Esto es particularmente claro en aquellas especies que se establecen en hábitats naturalmente discontinuos o efímeros (Overton, 1994; Valverde y Silvertown, 1997; Husband y Barrett, 1998; Lyons *et al.*, 2000; Tremblay y Ackerman, 2001; García *et al.*, 2003; Snäll *et al.*, 2003; Snäll *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2005; Dahlgren y Ehrlen, 2005; Jäkäläniemi *et al.*, 2005; Snäll *et al.*, 2005a; Snäll *et al.*, 2005b). En algunas especies vegetales esta forma de distribución, aunada a su inmovilidad y su limitada dispersión, parecen características ideales para aplicar un enfoque metapoblacional (Husband y Barrett, 1996). Sin embargo, también se pueden presentar aspectos que dificulten la aplicación de este enfoque, tales como la posibilidad de identificar los parches habitables para la especie; esto puede no ser sencillo debido a que la mayor parte de las veces no se conocen *a priori* las condiciones necesarias para el establecimiento de la especie. Adicionalmente, una misma especie podría establecerse en una gran variedad de

sitios con condiciones diferentes (Freckleton y Watkinson, 2002; Ehrlén y Eriksson, 2003). Para solucionar este problema algunos autores han optado por delimitar de forma arbitraria los parches, con el objeto de poder utilizar un enfoque metapoblacional (Watkinson *et al.*, 2000; Freckleton y Watkinson, 2002).

Otro parámetro difícil de determinar es la frecuencia de eventos de extinción en casos en los que las poblaciones locales pueden regenerarse a partir de un banco de semillas. La emergencia de nuevos individuos a partir del banco de semillas podría considerarse tanto como un evento de colonización, como una forma de permanencia de una misma población a través del tiempo (Husband y Barrett, 1996; Freckleton y Watkinson, 2002). Por otro lado, la posibilidad de estimar tasas de extinción en especies con ciclos de vida largos, puede ser extremadamente difícil.

La migración de individuos entre poblaciones en especies vegetales ocurre por medio de la dispersión de propágulos. Sin embargo, el proceso de dispersión presenta muchas dificultades para medirse y observarse de forma directa (Freckleton y Watkinson, 2002). Lo anterior limita en cierta medida la posibilidad de aplicar un enfoque metapoblacional a especies vegetales, debido a la incertidumbre que representa la cuantificación de este proceso de dispersión, que es fundamental en el ensamble de las poblaciones locales de una metapoblación (Freckleton y Watkinson, 2002).

1.2.3 El hábito epífita y las metapoblaciones

El hábito epífita implica el confinamiento de los individuos de una especie a vivir sobre un hospedero (*i.e.* otra planta) que provee un sustrato para que la especie

huésped pueda realizar cada etapa de su ciclo de vida. Las condiciones ambientales que prevalecen en este hábitat tan particular pueden llegar a ser muy restrictivas en cuanto a humedad y nutrientes, o muy variables en cuanto a temperatura y disponibilidad de luz (Madison, 1977). Por esta razón, las especies epífitas han desarrollado diferentes características morfológicas, fisiológicas y de historia de vida que les permiten sobrevivir en este tipo de hábitat (Madison, 1977; Benzing, 1990).

Algunas de las adaptaciones que presentan las epífitas se encuentran bien representadas en la familia *Bromeliaceae*. Pittendrigh (1948) propuso una clasificación de las diferentes formas de vida que se presentan en esta familia, en la que define cuatro tipos principales: a) El tipo suelo-raíz: son especies terrestres con un sistema de raíces que se ancla al suelo, de donde obtienen nutrientes y agua; b) El tipo tanque-raíz: se trata de especies que pueden ser terrestres o epífitas y que forman depósitos de agua en forma de tanque en la base de las hojas; esos depósitos no poseen una gran capacidad de retención de agua, sin embargo, cuentan con un buen sistema de raíces con el cual obtienen los nutrientes y agua necesarios para su supervivencia; c) El tipo tanque con tricomas absorbentes: todas las plantas de este grupo son epífitas y también forman depósitos de agua, pero éstos se encuentran mejor desarrollados que en el tipo anterior y presentan una mayor capacidad de retención de agua y de acumulación de materia orgánica; en estas especies las raíces sólo cumplen una función de sostén al sustrato; d) El tipo atmosférico: son especies epífitas donde las hojas están completamente cubiertas por tricomas o escamas que absorben agua y

nutrientes directamente de la atmósfera; sus raíces sirven para fijarse al sustrato y no presentan un tanque muy desarrollado, o bien éste es inexistente por completo.

Debido a las restricciones del hábitat epífita, esta forma de vida puede implicar que las especies tengan una preferencia en cuanto a los hospederos en los que se establecen, dependiendo de las condiciones ambientales que se presentan en diferentes partes de su copa. De esta forma, la abundancia de epífitas puede variar marcadamente entre los hospederos potenciales (Benzing, 1990; Lyons *et al.*, 2000; Callaway *et al.*, 2002; Bernal, 2006). Esta “selección de hábitat” puede darse incluso entre los diferentes micrositios dentro del mismo hospedero (Lyons *et al.*, 2000; Callaway *et al.*, 2002; Hernández, 2003; Bernal *et al.*, 2005; Winkler *et al.*, 2005). La distribución naturalmente fragmentada de las especies con hábito epífita sugiere que éstas pueden ser estudiadas de manera adecuada bajo un enfoque metapoblacional (Overton, 1994; Snäll *et al.*, 2005a).

En las plantas epífitas la dispersión de semillas es el fenómeno que determina la colonización de nuevos árboles (parches), así como el contacto entre las poblaciones locales ya establecidas. Una vez que los frutos maduran y liberan las semillas, éstas deben llegar a los micrositios propicios en la copa del hospedero potencial para poder germinar y establecerse como plántulas (Benzing, 1990). Durante este proceso, un gran número de semillas puede perderse debido a que no alcanzan estos “sitios seguros” para el establecimiento (Bernal, 2006), lo cual implica que la dispersión representa una fase riesgosa, pero a la vez crucial para el establecimiento de nuevas poblaciones locales. Debido a la importancia de la dispersión, las especies con hábito epífita han desarrollado, a través de la

evolución, diversas estrategias de dispersión que les permiten colonizar nuevos hospederos (Benzing, 1990).

En general, podemos hablar de dos tipos de dispersión entre las especies epífitas: las que utilizan al viento como vector (anemocoria) y las que utilizan a un animal como vector (zoocoria) (Benzing, 1990). El tipo más común de dispersión entre plantas epífitas es la anemocoria, ya que se presenta en el 84% de las especies con este hábito de crecimiento (*i.e.* 1190 especies, en 37 géneros, presentan semillas plumosas, principalmente en las familias Asclepidaceae y Bromeliaceae-Benzing, 1990). Entre las epífitas que son dispersadas por animales, el vector de dispersión más común son las aves (Benzing, 1990).

Los dos tipos de dispersión mencionados anteriormente difieren en términos de los destinos que pueden alcanzar las semillas. Los micrositios que alcanzan las semillas con dispersión zoocórica están determinados por el comportamiento del animal que las dispersa, *e.g.* distancias de vuelo, ámbitos hogareños, comportamiento de búsqueda de alimento y preferencias hacia distintos tipos de perchas (Howe y Samllwood, 1982; Hamrick *et al.*, 1993; Overton, 1994; Wang y Smith, 2002; Wehncke, 2004). Por otro lado, en las semillas con síndrome anemócoro, el proceso de dispersión se considera más aleatorio, pues el destino de las semillas depende de muchas variables difíciles de cuantificar (*e.g.* altura de liberación, peso de la semilla, presencia de apéndices plumosos, velocidad y dirección del viento, entre otros-Willson, 1993).

En un contexto metapoblacional, las características del hábitat que ocupan las plantas epífitas impiden que se formen bancos de semillas a mediano y a largo plazo (*i.e.* la probabilidad de que las semillas liberadas en una temporada se

almacenen en las ramas de los hospederos a subsecuentes temporadas debe ser muy baja), de tal manera que la formación de nuevas poblaciones locales debe darse a partir de semillas que ingresen por medio de la dispersión, a diferencia de lo que ocurre en otras poblaciones vegetales en las que la regeneración puede ocurrir a partir del banco de semillas (Husband y Barrett, 1996). Esto representa otra de las razones por las cuales las plantas epífitas pueden constituir sistemas adecuados para ser estudiados desde el punto de vista metapoblacional (Bernal *et al.*, 2005).

A su vez, la muerte de los hospederos determina que se presente la extinción de las poblaciones locales; de hecho, el lapso de vida del hospedero determina el tiempo de permanencia del sustrato colonizable. Esto hace posible la estimación de la probabilidad de extinción de una población local (Snäll *et al.*, 2005b). Además, es posible definir qué árboles presentan las características propicias para el establecimiento de la epífita (Overton, 1994; Snäll *et al.*, 2003; Snäll *et al.*, 2005a, b) y, por lo tanto, si se conoce la tasa y la curva de dispersión, es posible estimar la tasa de colonización de parches, un parámetro de fundamental importancia en todo estudio metapoblacional.

1.2.4 Marcadores moleculares

En la primera mitad del siglo XX Sewall Wright (1931, 1940) observó que muchas especies presentan una distribución espacial a manera de poblaciones locales o “subpoblaciones” dispersas en el espacio. Desde entonces los genetistas de poblaciones consideran de gran interés el estudio de la diferenciación genética que existe entre estas subpoblaciones, así como los procesos que las afectan,

tales como los sistemas reproductivos, la dinámica de dispersión de los propágulos, la disposición espacial de los parches propicios para el establecimiento y los procesos de colonización/extinción de subpoblaciones (Olivieri *et al.*, 1995; Hamrick y Godt, 1996; Parker *et al.*, 1998), ya que éstos tienen consecuencias importantes a nivel evolutivo. Este enfoque es precisamente el que la teoría metapoblacional ha retomado, ahora desde una perspectiva más ecológica, pero sin dejar de lado los aspectos genéticos que involucra.

En la actualidad el análisis genético de las poblaciones y el efecto de los procesos mencionados anteriormente se lleva a cabo a través del uso de diferentes marcadores moleculares, por medio de técnicas que han tenido un gran desarrollo en las últimas décadas. Estas herramientas nos proporcionan diferente información dependiendo del tipo de marcador utilizado (Cruzan, 1998; Karp *et al.*, 1998); por ejemplo, en diferentes marcadores moleculares puede variar el nivel de resolución en términos de la diferenciación a distintas escalas espaciales, el número de loci polimórficos y el nivel de polimorfismo presente en las poblaciones (Parker *et al.*, 1998). Debido a la alta variedad de información que pueden proporcionar los diferentes tipos de marcadores, es de gran importancia que la elección del marcador a utilizar se adecue al tipo de pregunta que se desea responder (e.g. que el nivel de resolución que ofrece el marcador sea el adecuado según la escala espacial y/o temporal abordada-Parker *et al.*, 1998).

El estudio genético de las poblaciones puede utilizarse para abordar procesos que ocurren a diferentes escalas espacio-temporales, desde la especiación o adaptación local, hasta procesos de flujo de polen y dispersión de semillas en espacios y tiempos muy puntuales (Cruzan, 1998; Parker *et al.*, 1998;

Ouborg *et al.*, 1999). Esto se puede llevar a cabo a través de diferentes enfoques, por ejemplo, estudiando la diferenciación genética entre individuos, el nivel de variación genética de una población o el grado de diferenciación entre poblaciones, así como a través de análisis de paternidad (Parker *et al.*, 1998). Estos tipos de análisis nos dan información acerca de diversos procesos biológicos, tales como la dinámica reproductiva, los patrones de dispersión y las rutas de migración de los organismos, y la dinámica de colonización/extinción de poblaciones; además, nos permiten hacer inferencias históricas acerca de la dinámica de las poblaciones y las repercusiones de esta dinámica en la estructura genética actual (Escalante, 2001).

Algunos de los marcadores moleculares más utilizados actualmente son las isoenzimas, los RAPD, los RFLP, los ISSR, los minisatélites y los microsátélites. Los diferentes tipos de marcadores son adecuados para responder preguntas ecológicas y evolutivas diferentes (Karp *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1998; Ouborg *et al.*, 1999; Borner y Branchard, 2001) (Tabla 1). Es importante elegir el marcador adecuado considerando el conocimiento disponible acerca de las especies en estudio, el tipo de pregunta a abordar, la escala espacio-temporal del análisis y los recursos económicos y de tiempo con los que se cuenta.

Actualmente se ha propuesto que el marcador molecular con más ventajas para llevar a cabo estudios de genética de poblaciones a escalas espaciales finas son los microsátélites, ya que se trata de un marcador molecular altamente variable, con loci multialélicos y de tipo codominante (*i.e.* se pueden distinguir los homocigotos de los heterocigotos-Karp *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1998; Goldstein y Schlötterer, 2001). De esta forma, resultan útiles para estudios de dispersión o

de paternidad, que pueden ser fundamentales para comprender la dinámica de las metapoblaciones. De hecho, muchos estudios, tanto en plantas como en animales, han demostrado que estos marcadores presentan un buen nivel de variabilidad y que tienen un nivel de resolución adecuado para poder diferenciar poblaciones (Estoup *et al.*, 1995; Chase *et al.*, 1996; Fontaine *et al.*, 1997; Newman y Squire, 2001; Walser *et al.*, 2005; Moynihan *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso de microsatélites también presenta algunas desventajas: pueden llegar a tener un alto costo económico y en tiempo (Tabla 1), debido a que se requiere de la construcción de una librería genómica y del diseño de oligonucleótidos específicos para amplificar secciones puntuales del genoma (Parker *et al.*, 1998; Squirrel *et al.*, 2003).

Tabla 1. Características de los principales marcadores moleculares utilizados en los estudios poblacionales (Cruzan, 1998; Karp *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1998; Ouborg *et al.*, 1999; Bornet y Branchard, 2001; Goldstein y Schlötterer, 2001).

| Marcador | Tipo de herencia | Alelos por locus polimorfito | Temas que pueden abordarse | Costo Relativo |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|--|--|
| Isoenzimas | Codominante | 2-5 | Variación intra-poblacional y estructuración de poblaciones | Barato y rápido, aunque laborioso para la selección de buffers |
| RFLP | Dominante | 2 | Variación intra-poblacional y estructuración de poblaciones | Barato pero laborioso |
| RAPD | Dominante | 2 | Variación intra-poblacional y estructuración de poblaciones; análisis de paternidad por asignación; estructura clonal | Barato y rápido por el uso de oligonucleótidos no específicos |
| Minisatélites | Codominante | 2-50 | Análisis de paternidad por exclusión o por asignación; variación intra-poblacional y estructuración de poblaciones; "fingerprinting" | Laborioso por el desarrollo de oligonucleótidos específicos para cada especie. Difícil lectura de resultados |
| Microsatelites | Codominante | 2-50 | Análisis de paternidad por exclusión o por asignación; variación intra-poblacional y estructuración de poblaciones | Laborioso por el desarrollo de oligonucleótidos específicos para cada especie |
| ISSR | Dominante | 2 | Variación intra-poblacional y estructuración de poblaciones; estructura clonal | Barato y rápido por el uso de oligonucleótidos no específicos |

1.3 Justificación del trabajo

En el contexto mencionado anteriormente, proponemos que el análisis de la estructura genética de las poblaciones por medio de herramientas moleculares es de gran utilidad para abordar una diversidad de preguntas metapoblacionales (Hastings y Harrison, 1994). Debido a la escala espacial relativamente pequeña que se abarca en este estudio, se requiere de un marcador molecular altamente variable para poder detectar diferencias genéticas entre poblaciones contiguas. En el caso de *T. recurvata*, se ha estudiado la variación genética utilizando isoenzimas (Soltis *et al.*, 1987), pero el nivel de variación detectado fue muy bajo. Muchos autores recomiendan el uso de microsatélites para el análisis de la variación genética inter e intra-poblacional debido a su alta variabilidad (Parker *et al.*, 1998). Por esta razón, en esta tesis se evaluó el nivel de variación de 12 *loci* de microsatélites desarrollados para *T. recurvata*.

1. 4 Objetivos

Objetivo general.

En esta tesis se aborda el estudio de la variación genética de la epífita *Tillandsia recurvata* en la región de Tehuacán, Puebla, a través del uso de microsatélites, con el objeto de evaluar el nivel de resolución que ofrece esta herramienta molecular para responder preguntas sobre su dinámica metapoblacional.

Objetivos particulares.

- Analizar el nivel de polimorfismo de 12 loci de microsatélites desarrollados para *T. recurvata*.
- Conocer la variación inter- e intra-poblacional en seis poblaciones de *T. recurvata* ubicadas a diferentes distancias entre ellas. Se consideró a una población local como un hospedero colonizado, de tal manera que este análisis permitiría confirmar si realmente cada árbol colonizado puede ser concebido como una población local dentro de una metapoblación.
- Evaluar la relación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones.
- Estimar el número de migrantes por generación en las poblaciones estudiadas.

1. 5 Hipótesis

Tillandsia recurvata es una planta epífita de zonas áridas. Su reproducción se da principalmente por auto-polinización, como lo sugiere su morfología floral y los bajos niveles de variación genética que se han observado utilizando isoenzimas (Soltis *et al.*, 1987). La dispersión de sus semillas se lleva a cabo por medio del viento y se ha observado que la mayoría de las semillas dispersadas llegan a micrositios ubicados a cortas distancias de la planta parental (Bernal, 2006). Por lo tanto, se espera que la migración y colonización se den entre los hospederos más próximos y que esto se refleje en un nivel de diferenciación genética más elevado entre poblaciones relativamente más lejanas que entre las poblaciones relativamente cercanas.

CAPÍTULO 2

MÉTODOS

2.1 La especie en estudio

Tillandsia recurvata (L.) pertenece a la Familia Bromeliaceae. Es una planta herbácea, epífita, que puede establecerse en una gran variedad de sustratos (e.g. *Prosopis laeviagata*, *Acacia bilimekii* y *Cercidium praecox*) , incluso en los cables de las líneas eléctricas (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003). El tallo de la planta se agrupa en masas esféricas que presentan una altura que varía de 4 a 15 cm; sus hojas son dísticas, ovaladas, de 5 a 10 cm de largo (Rzedowski y Rzedowski, 2001) y se encuentran cubiertas de tricomas absorbentes (Benzing, 1990) (Figura 1). Las inflorescencias son terminales y se producen en un escapo de hasta 13 cm de largo; cada inflorescencia posee de 1 a 2 flores tubulares (Figura 2) y en algunas ocasiones hasta cinco; la época de floración es en el otoño. El fruto es una vaina elíptico-ovada de hasta 3 cm de largo que contiene semillas plumosas (ca. 60 semillas por cápsula—Bernal, 2006) que se liberan a finales del invierno y principios de la primavera (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

T. recurvata es una especie de amplia distribución, aunque se encuentra restringida al continente americano y se le puede encontrar desde el sur de los Estados Unidos, hasta Argentina y Chile, en altitudes de 100 a 2900 m (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Esta planta habita preferentemente en bosques de encino, en matorrales xerófilos y ocasionalmente en bosques de pino-encino (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003). En las zonas más secas, como en los matorrales xerófilos, puede llegar a ser muy abundante como epífita y en cada

árbol se pueden encontrar desde unos cuantos hasta 500 individuos (Bernal *et al.*, 2005), aunque pueden alcanzar densidades mucho mayores, en cuyo caso esta epífita se considera como una parásita estructural, pues puede llegar a ocasionar cierto daño al hospedero, como en *Cercidium praecox*, la cual posee tallos fotosintéticos y a altas densidades, *T. recurvata* inhibe la fotosíntesis del hospedero (Montaña *et al.*, 1997).

No se tiene información detallada acerca de la biología reproductiva de *T. recurvata*, sin embargo, debido a la forma de las flores (tubulares, alargadas, con los estilos y estambres inmersos en el fondo del cáliz—Figura 2), se cree que prevalece la autofecundación. Esta hipótesis se apoya, además, en un estudio de variación genética con isoenzimas, en el que se observó muy baja variación genética entre individuos (Soltis *et al.*, 1987).

Los nombres comunes de *T. recurvata* son: heno, gallitos, pachtle, paxtle, paisté y paistle (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003). Esta especie se utiliza con fines medicinales en forma de infusión para la tos, bronquitis, dolor de espalda y como antiabortiva. La planta quemada y molida se utiliza para tratar quemaduras. Además, se utiliza para adornar los nacimientos navideños (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).



Figura 1. Individuo de *Tillandsia recurvata* (L.).

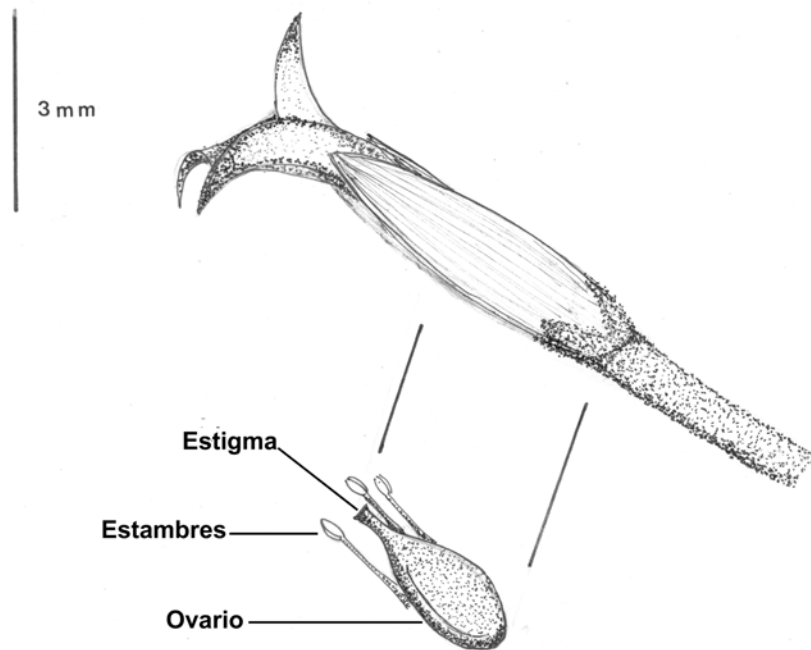


Figura 2. Esquema de la flor de *Tillandsia recurvata*; se observan los estambres y el estigma muy cercanos entre sí e inmersos en la corola (ilustración: Mariana Rojas Aréchiga).

2.2 El sitio de estudio

El material biológico para realizar este estudio fue colectado en el Valle de Tehuacán. Se muestrearon seis poblaciones localizadas en tres sitios cercanos al poblado de Zapotitlán Salinas (18° 20' N, 97° 28' O, 1550 m de altitud), en el sureste del estado de Puebla. El primer sitio se encuentra sobre la carretera Tehuacán-Huajuapán, cerca de la Colonia San Martín (18° 15' N, 97° 32' O); el segundo sitio se ubicó en el camino de terracería que va a Santa Ana-Teloxtóc (18° 18' N, 97° 31' O); y el tercer sitio se localizó en el Jardín Botánico Helia Bravo (18° 19' N, 97° 27' O) (Fig. 3). En cada sitio se colectó material de dos poblaciones, como se detalla más adelante.

El Valle de Tehuacán presenta un clima semiárido con lluvias en verano; la temperatura media anual es de 22°C y la precipitación es de 400 mm/año (García, 1981; Zavala-Hurtado, 1982). Las condiciones semiáridas de la región son resultado de la sombra orográfica que produce la Sierra Madre Oriental, la cual se encuentra hacia el este del Valle (Valiente-Banuet *et al.*, 2000). El suelo que se encuentra comúnmente en esta región es de yeso y caliza, poco profundo y halomórfico (Byers, 1967).

La vegetación de cada sitio de colecta varió en su composición específica. El sitio 1 era una tetechera de *Neobuxbaumia mezcalaensis* y *Neobuxbaumia macrocephala*; en este tipo de vegetación hay una gran diversidad de arbustos y árboles entre los que destacan *Yucca periculosa*, *Beaucarnea gracilis* y *Acacia constricta* (Valiente-Banuet *et al.*, 2000). El tipo de vegetación del sitio 2 fue una selva baja espinosa (mezquital de *Prosopis laevigata*); este tipo de vegetación se encuentra dominada por arbustos perennes y además son frecuentes algunas

cactáceas columnares tales como *Myrtillocactus geometrizans*, *Pachycereus marginatus* y *Stenocereus pruinosus* (Valiente-Banuet *et al.*, 2000). En el sitio 3 la vegetación era una tetechera de *Neobuxbaumia tetezo*, según Valiente-Banuet *et al.* (2000), donde además podemos encontrar árboles y arbustos como *Mimosa luisiana*, *Bursera aloexylon* y *Ceiba parviflora*.

2.3 Muestreo del material biológico

En cada uno de los tres sitios elegidos se seleccionaron dos árboles colonizados por *T. recurvata*, en la selección de estos árboles se consideraron a los hospederos mas frecuentes de *T. recurvata* (*i.e.* *Prosopis laeviagata*, *Acacia bilimekii* y *Cercidium praecox*). Además, se consideró un árbol focal que no tuviera contacto con la copa del árbol mas próximo y en el cual existiera una población de *T. recurvata* con una densidad alta en comparación con las poblaciones vecinas. De cada hospedero se colectaron 25 individuos adultos de la epífita *T. recurvata*. Este par de árboles hospederos (concibiendo a cada uno como una población local), estaban a una distancia de ca. 16 m uno del otro, sin que otros árboles colonizados por *T. recurvata* se encontraran entre ellos. Esta distancia se eligió con el objeto de asegurarnos de muestrear poblaciones locales relativamente independientes en cada sitio, basándonos en los experimentos de Bernal (2006), que sugieren que de las semillas dispersadas, entre el 3 y el 19% se mantienen en el árbol focal y menos del 1% se dispersan a una distancia de 7 m; sin embargo, en los experimentos de Bernal (2006), no fue posible conocer el destino final de la mayor parte de las semillas (del 56 al 67%).

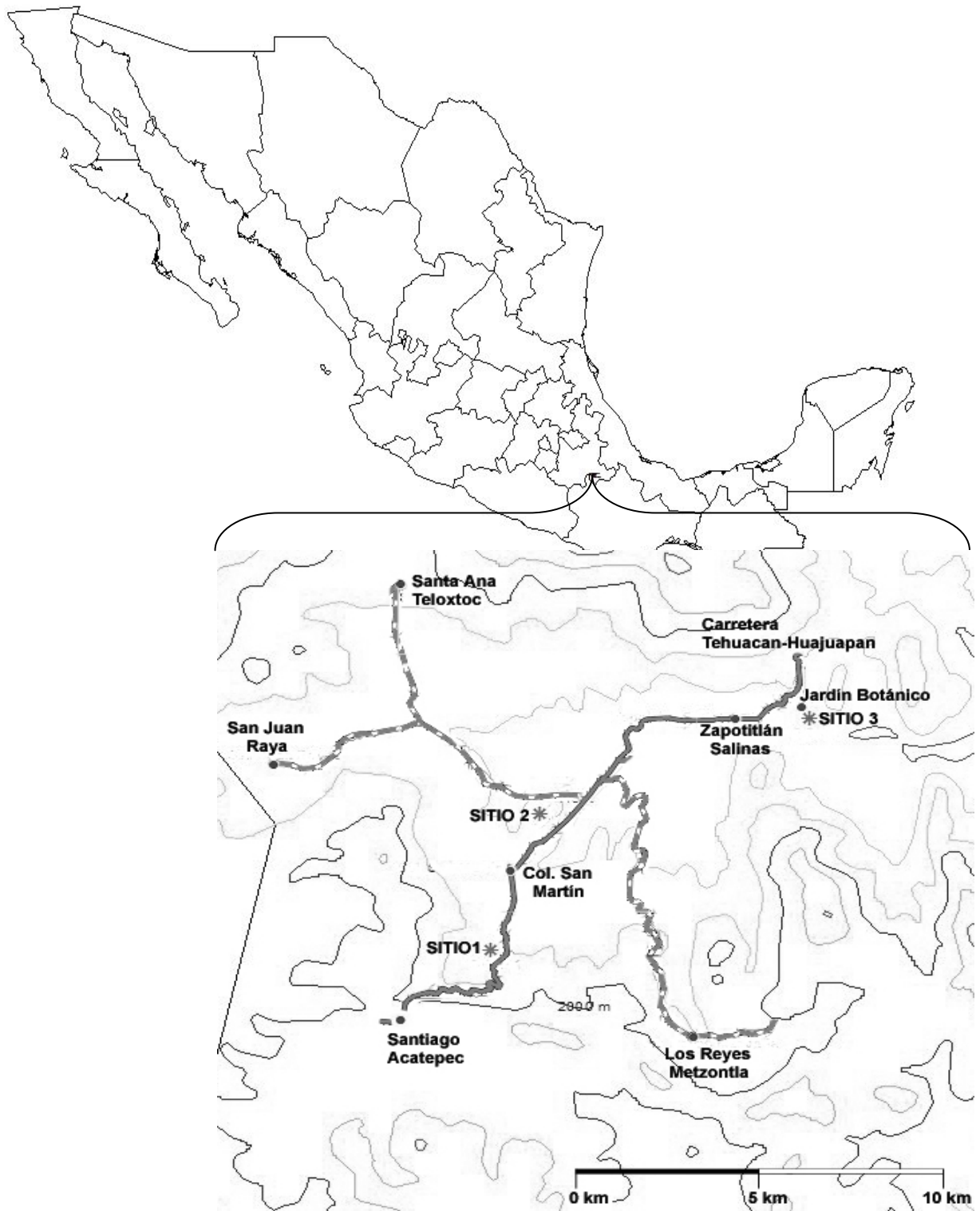


Figura 3. Ubicación de los tres sitios de colecta del material biológico de seis poblaciones de *Tillandsia recurvata*. SITIO 1 = Colonia San Martín; SITIO 2 = Camino a Santa Ana Teloxtoc; SITIO 3 = Jardín Botánico Helia Bravo.

Se utilizó el programa ArcView GIS 3.2 (1999) para calcular las distancias lineales entre los tres sitios de colecta, por medio de sus datos precisos de localización (longitud y latitud) tomados con un GPS. La distancia en línea recta entre los sitios 1 y 2 fue de 6.4 km; entre los sitios 2 y 3 fue de 7.9 km; y entre los sitios 1 y 3 fue de 13.1 km. Así, el muestreo incluyó dos escalas geográficas a partir de las cuales se pretende interpretar los resultados de variación y diferenciación genética entre poblaciones: la escala local (poblaciones localizadas a 16 m de distancia) y la escala regional (poblaciones localizadas a kilómetros de distancia—Fig. 4).

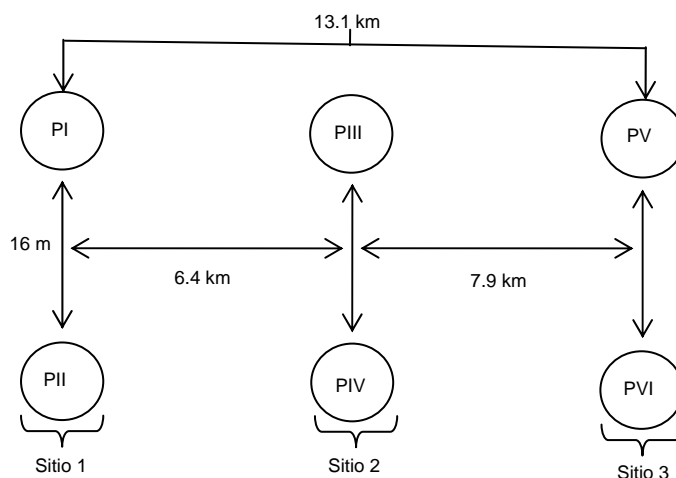


Figura 4. Distancia entre las poblaciones de *Tillandsia recurvata* muestreadas en tres sitios cercanos al poblado de Zapotitlán Salinas, Pue. Los círculos representan los árboles que fueron seleccionados (población local) y el número romano en su interior es el número de cada población. Las flechas indican la distancia entre las poblaciones.

2.4 Desarrollo de los microsatélites

Los microsatélites que se utilizaron en este trabajo fueron diseñados por los Dres. Teresa Valverde, Jan van Groenendael y Joop Ouborg, en la Universidad de Nijmegen, Holanda (marzo a junio de 2001). En la presente tesis no se abordará en detalle el diseño de los microsatélites, sino la evaluación de su nivel de variabilidad. Sin embargo, a continuación se esbozan, de manera general, los pasos que se siguieron para el diseño de los microsatélites:

1. Extracción de ADN.
2. Digestión- El ADN extraído se fragmentó con la enzima de restricción Mbo I; los fragmentos generados se encontraron entre 300 y 1500 pb.
3. Ligación- Los fragmentos seleccionados en la digestión se ligaron con un adaptador específico de la enzima Mbo I, para que los “*primers*” (oligonucleótidos) que se usarían posteriormente reconocieran dichos fragmentos para amplificarlos por medio de PCR.
4. PCR inicial- Los fragmentos ligados de ADN se amplificaron a través de una reacción de PCR.
5. Preparación e hibridización de filtros- Se prepararon filtros con diversos motivos de microsatélites (GA₁₂, GT₁₂, AGT₉, TGA₉, TGT₁₀, TCT₁₀, GAG₈, GTG₈, CGT₈, GCC₇, GCT₈, TAA₁₂, TGTT₈, GTAT₈, GATA₈, GACA₈, GGAT₇ y TCTT₈) a los que posteriormente se añadieron los fragmentos de ADN previamente aislados y amplificados para que los microsatélites presentes en el genoma de *T. recurvata* se alinearan con los motivos. El resto del ADN que no se alineó con los motivos se lavó y fue eliminado.

7. Aislamiento, lavado y amplificación de fragmentos de ADN con secuencias de microsatélites- Los filtros se lavaron con tres soluciones diferentes para posteriormente aislar los fragmentos de ADN que se hibridaron. Posteriormente estos fragmentos se amplificaron por medio de un PCR utilizando el oligonucleótido específico de la enzima de restricción usada anteriormente (Mbo I).

8. Ligamiento de los fragmentos de ADN a un vector- Los productos de PCR de los fragmentos de ADN alineados con los motivos de los microsatélites, se ligaron al vector pGEMT Easy Vector System I por medio de la Ligasa T4, para usar el vector como un plásmido y ser introducido en bacterias competentes.

9. Clonación del vector en bacterias- El vector con los fragmentos de ADN se insertó en bacterias competentes por medio de un choque de calor. Posteriormente las bacterias se cultivaron para formar colonias.

10. Selección de colonias- Las colonias fueron sembradas en filtros hybond, así como en placas de microtubos, para posteriormente ser marcadas radiactivamente y así poder detectar aquellas que contuvieran microsatélites. En total se sembraron 1536 colonias en 16 placas de microtubos.

11. Identificación de colonias con microsatélites por medio de marcaje radiactivo- A los filtros hybond se añadieron nuevamente los motivos de los microsatélites, así como una marca radioactiva (γ - P32 ATP) para poder identificar las colonias que contuvieran el vector clonado con el microsatélite en su secuencia.

12. Aislamiento de los fragmentos con microsatélites de las colonias de bacterias– De las colonias identificadas por radioactividad se hicieron las extracciones de los vectores (por medio de minipreps) que contenían los fragmentos que se alinearon con los motivos de microsatélites.

13. Secuenciación de fragmentos– Los vectores aislados se secuenciaron, para conocer la secuencia de los microsatélites y de sus regiones vecinas.

14. Diseño de los oligonucleótidos para amplificar los microsatélites- Para poder amplificar sólo el fragmento donde se localiza el microsatélite, se utilizó el programa PRIMER3 en el diseño de un par de oligonucleótidos (“forward” y “reverse”) para cada locus de microsatélite identificado (en total, se identificaron 12 loci - Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de 12 loci de microsatélites de *Tillandsia recurvata*. Producto esperado = tamaño del producto esperado en pares de bases (pb). T° = temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, en grados centígrados, F = cadena sentido (“forward”), R = cadena antisentido (“reverse”). El nombre de cada locus hace referencia a la especie (Till), al motivo que conforma el microsatélite (ej. GA) y al número de veces que se repite este motivo (ej. 23).

| Locus | Secuencia de los oligonucleotidos | T° | Motivo | Producto esperado |
|--------------|--------------------------------------|----|------------------|-------------------|
| TillGA23 | F: TGC- GTA-AAG- GGA- ATT-AGG-GTT-AG | 59 | GA23 | 165 |
| | R: CAT-ATT-CTC-CCG-CCC-TTA-TC | | | |
| TillGT22 | F: GAA-GGA- GAC-CGG-TAT-AA | 51 | GT22 | 174 |
| | R: GAA-TCA-AAG-GTT-TCG-TGA-TA | | | |
| TillCT15 | F: TTC-GCC-TTC-CTC-ATT-CAA-GTA-T | 60 | CT15 | 144 |
| | R: TAG-AGG-GGC-CGG-GGC-TTT-AC | | | |
| TillCT20 | F: TCT-GAA-CCA-CAA-CTC-AAC-ACG | 60 | CT20 | 201 |
| | R: GAA-ACA-GTA-GGC-GCA-GTG-TG | | | |
| TillAG20 | F: TGA-AAG-AAG-AGG-GAC-CAA-AGG | 48 | AG20 | 126 |
| | R: GCT-CTA-CTC-CGC-ACA-CTC-CT | | | |
| TillGA20 | F: CAC-TTC-TCT-CCT-CCC-TCC-TCT | 60 | GA20 | 153 |
| | R: AAA-ACC-ATT-TCA-TCC-TCT-TCC-A | | | |
| TillGT22CA60 | F: CCG-CGA-CGA-GTT-CAC-TAG-AT | 48 | GT22 CA60 | 252 |
| | R: GGG-ACG-ACT-GAT-TGA-CGA-AC | | | |
| TillGATA13 | F: TGG-TAT-GCC-CAC-TAA-GTC-TAC-TG | 58 | GATA13 | 204 |
| | R: AGG-CCA-GAG-AGA-TGG-ATG-TAA | | | |
| TillCA27 | F: ATC-TGA-TGC-CCA-AGA-AGA-GC | 48 | CA27 | 160 |
| | R: CCA-GAT-CAG-TTA-TGG-GCA-AA | | | |
| TillGA25 | F: GAA-CTC-TAT-AAG-AGG-GCA-AGA-GAG-G | 48 | GA25 | 154 |
| | R: TGG-TGT-TCA-GTA-AAT-GCT-TTG-G | | | |
| TillGA21 | F: ATC-TCC-GGA-GTT-GTG-GGA-GT | 48 | GA21 GAAGAG7 | 167 |
| | R: CTT-CAT-CGT-CCG-TCT-CCT-TC | | | |
| TillAG3GT46 | F: GGT-GGT-GTG-TGT-GAG-TGA-GG | 50 | AG3 GT46 GA23 | 189 |
| | R: GCG-TCT-CAA-TCC-CGA-ATA-GT | | | |

2.5 Evaluación de la diversidad genética de los loci de microsatélites

2.5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de los individuos de *T. recurvata* colectados en las poblaciones seleccionadas se realizó con el kit de extracción de la marca Bio

Rad (# catálogo 732-6343). El protocolo original de este kit fue modificado para trabajar con esta especie con el fin de mejorar el rendimiento de la extracción, ya que en pruebas preliminares el protocolo estándar no mostró un buen rendimiento. Las dos modificaciones que se hicieron consistieron en aumentar la cantidad de tejido vegetal de 10 mg a 50 mg; además, el volumen de las soluciones utilizadas se duplicó.

Los pasos que incluye el protocolo de extracción se describen brevemente a continuación, incluyendo las modificaciones al protocolo original:

1. Lisis celular– Se molieron 50 mg de tejido foliar de *T. recurvata*, congelándolo con nitrógeno líquido y triturándolo hasta que quedara como un polvo blanco. Éste se recogió con una espátula y se colocó en un tubo de 1.5 ml al que se le adicionaron 600µl de solución de lisis, agitando posteriormente para crear una mezcla homogénea que se incubó a 65°C por 45 minutos en un termobloque.

2. Tratamiento con RNAsa– Los tubos se sacaron del termobloque para añadirles 3 µl de la solución de RNAsa (Rnase A Solution, 4mg/ml), se mezclaron por inversión 25 veces y se incubaron por 45 minutos a 65°C en el termobloque.

3. Precipitación de proteínas– Pasado el tiempo de incubación con la RNAsa, los tubos se sacaron del termobloque y se dejaron enfriar hasta llegar a temperatura ambiente; se añadieron 200 µl de solución precipitadora de proteínas; se mezclaron con el vórtex durante 20 segundos y se centrifugaron a 14000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Cada tubo contenía el ADN en suspensión y las proteínas se encontraban formando un botón en el fondo del

tubo. Si el botón no se encontraba compacto y se observaban partículas en el sobrenadante, el tubo se volvía a mezclar y se incubaba en hielo por 5 minutos para centrifugar de nueva cuenta.

4. Precipitación de ADN– El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo nuevo que contenía 600 μ l de isopropanol. La solución se mezcló por inversión 50 veces y se centrifugó a 14000 rpm por un minuto. El sobrenadante se tiró cuidando de conservar el botón del ADN y se dejó escurrir el tubo sobre una toalla absorbente. Posteriormente se añadieron 600 μ l de etanol al 70% y se mezcló el tubo por inversión varias veces, centrifugando posteriormente a 14000 rpm por un minuto. De nueva cuenta se tiró el sobrenadante y se dejó secar el tubo entre 10 y 15 minutos.

5. Hidratación de ADN– Se añadieron 50 μ l de solución de hidratación del kit y se dejó hidratar a temperatura ambiente durante toda la noche.

2.5.2 PCR (para los 12 microsatélites)

Para conocer las condiciones de PCR ideales para la amplificación de los 12 loci de microsatélites reportados en la Tabla 2, se realizaron gradientes de concentraciones, tanto de los oligonucleótidos como de $MgCl_2$, utilizando un individuo de cada población. Con esto, además, se identificaron de manera preliminar los loci polimorficos. Las concentraciones de los oligonucleótidos probadas en los gradientes fueron de 0.6, 0.8 y 1.0 μ M y las de $MgCl_2$ de 2.0, 2.5 y 3.0 mM. Las reacciones de los gradientes se hicieron a un volumen final de 12.5 μ l y por separado para cada locus, llevándose a cabo en un termociclador PT-100 de

MJ Research con la temperatura de alineamiento correspondiente para cada locus (Tabla 2) y los siguientes ciclos para todos los pares de oligonucleotidos:

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo |
|---|------------------|----------|
| Paso 1 (desnaturalización inicial) 35 ciclos de: | 95 | 5 min |
| Paso 2 (desnaturalización) | 92 | 45 seg |
| Paso 3 (alineamiento) | 48 | 45 seg |
| Paso 4 (extensión) | 72 | 1:30 min |
| Paso 5 (extensión final) | 72 | 10 min |

De las concentraciones probadas, se seleccionaron aquellas en las que se visualizó mejor el producto en la zona esperada (ver sección 2.5.3 para detalles de la visualización de los productos amplificados) y que además amplificaran un patrón de bandeo constante y distinguible de las bandas tartamudas (stutter bands).

Las concentraciones de oligonucleótidos y de MgCl₂ elegidas para trabajar con los loci seleccionados por ser polimórficos, fueron de 1.0 μM y 3.0 mM, respectivamente. Los otros reactivos utilizados para las reacciones fueron: amortiguador de reacción 10X (incluido con la Polimerasa), mezcla de dNTP's (10mM marca Fermentas), amplificasa (Biotecnologías Universitarias), agua ultrapura y el ADN de cada individuo. Siempre se utilizaron las mismas concentraciones de estos reactivos, tanto para los gradientes como para el trabajo posterior (para detalles al respecto, ver el Apéndice 1).

2.5.3 Separación y visualización del producto de PCR en geles de poliacrilamida

Los productos de PCR se corrieron en geles desnaturalizantes de Poliacrilamida al 6% (ver detalles de la preparación en el Apéndice 2) a un voltaje constante de

1300 volts durante 3 horas y 10 minutos. Se utilizó un marcador molecular (escalera) de 10 pares de bases (pb) como referencia, para conocer el tamaño de los productos amplificados (Figura 5). Los geles se revelaron con una tinción de nitrato de plata (ver protocolo en el Apéndice 3) para visualizar los productos de PCR (Figura 5).

La lectura de los geles para determinar el tamaño de los productos de PCR se realizó por medio del programa Lab Works ver. 4.5 (Media Cybernetics, 2003). Este programa permite conocer tanto la intensidad como el peso molecular de cada banda y así poder diferenciar las banda reales de las bandas “artefacto” o tartamudas (Figura 5); estas bandas tartamudas son producto de errores de la ADN-polimerasa durante la reacción de PCR y se observan en el gel como bandas adicionales de una menor intensidad y menor peso que las bandas correspondientes a los microsatélites. Con la información obtenida del peso molecular de las bandas de los microsatélites, se construyó una matriz con los alelos presentes en cada individuo para cada locus.

2.6 Análisis de datos

Para conocer el nivel de variación genética de *T. recurvata*, así como la distribución de ésta entre las poblaciones muestreadas, se realizó el análisis de los datos en dos secciones, según el tipo de descriptores de la variación genética utilizados en cada caso: a) descriptores de la variación presente dentro de las poblaciones y b) descriptores de la variación genética entre las poblaciones; entre estos últimos se encuentran las variables que consideran la distribución espacial

de las poblaciones y la manera en la que ésta se relaciona con la distribución de la diversidad genética.

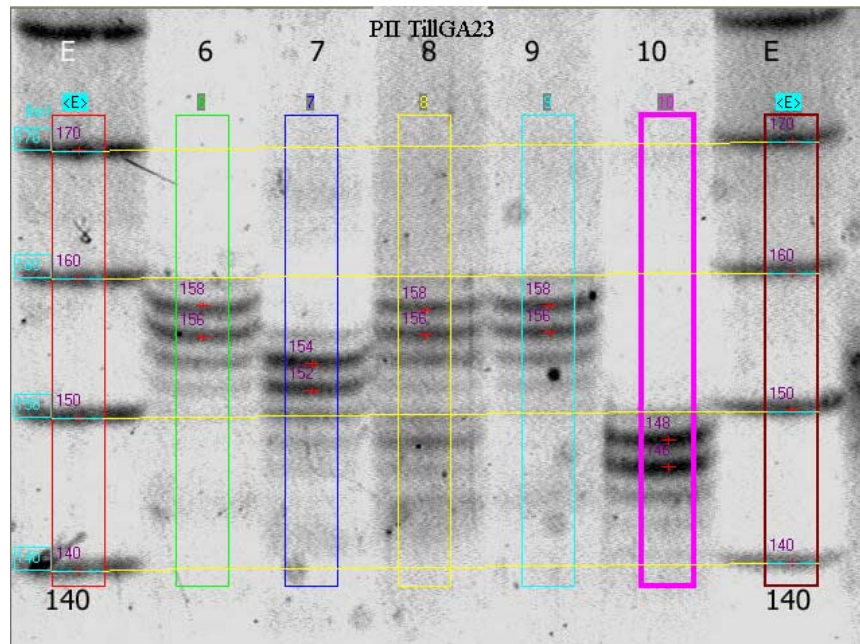


Figura 5. Imagen resultado de la electroforesis y del análisis de los productos de PCR en geles de poliacrilamida con tinción de plata. Las cruces indican los alelos encontrados, E = marcador molecular de 10 pb. PII= población II, TillGA23 = nombre del locus, 6-10 = identificación de los individuos, 140 = 140 pares de bases.

2.6.1 Análisis de la variación genética intra-poblacional

A partir de los microsatélites que resultaron polimorficos se analizó la diversidad genética de las poblaciones de *T. recurvata* estudiadas. Para esto, se utilizaron diversos descriptores de la variación genética intra-poblacional, tales como el número de alelos por locus (N_a), la frecuencia alélica para cada locus en cada población, el número efectivo de alelos (N_e), el número de alelos privados por población y la heterocigosis observada y esperada (H_o y H_e respectivamente). El

cálculo de estos parámetros se realizó con la ayuda del programa GenAlEx versión 6 (Peakall y Smouse, 2006).

El número efectivo de alelos (N_e) es el recíproco de la homocigocidad (Nei, 1987) y proporciona un estimador del número de alelos con la misma frecuencia; además, permite comparaciones de diversidad alélica entre loci con distribuciones de frecuencias alélicas muy diferentes (Peakall y Smouse, 2006). El valor de N_e por lo general es más pequeño que el del número de alelos (Nei, 1987). GenAlEx calcula el valor de N_e según la siguiente ecuación (Brown y Weir, 1983):

$$N_e = \frac{1}{1-H_e}$$

en donde H_e es la heterocigosis esperada según el equilibrio de Hardy-Weinberg.

La desviación que existe con respecto a las proporciones esperadas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg es uno de los primeros pasos en el estudio de la estructura genética poblacional, debido a que indica si las proporciones genotípicas se desvían de las proporciones esperadas en el caso de que en la población los apareamientos sean al azar (panmixia), de que el tamaño poblacional sea tan grande de tal manera que no haya deriva génica, de que no ocurran procesos de mutación ni de migración y de que la selección no actúe sobre ella (Rousset y Raymond, 1995; Hedrick, 2000). Para probar si había desviaciones de las proporciones genotípicas esperadas por Hardy-Weinberg en las poblaciones de *T. recurvata* estudiadas se utilizó el programa GENEPOP, versión 3.4 (Raymond y Rousset, 1995). Este análisis se realizó para cada locus en cada población y adicionalmente una prueba global (todos los loci en todas las poblaciones).

Por otro lado, se calculó para cada población y para cada locus el índice de fijación (F), que mide las desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg basándose en la heterocigosis observada y esperada (Nei, 1987; Hedrick, 2000). El valor de F puede ser positivo o negativo, dependiendo de los factores que afectan a la población (Nei, 1987). Un valor de F cercano a cero indica que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (Hedrick, 2000); si el valor de F es positivo, nos indica que hay una deficiencia de heterocigotos debida a procesos de endogamia. De hecho, si no existe otro factor que afecte a la población, F se considera una medida del índice de endogamia de Wright (Nei, 1987); un valor de F negativo nos habla de un exceso de heterocigotos (Hedrick, 2000). Este índice se calculó con el programa GENEPOP, el cual se basa en Weir y Cockerham (1984).

2.6.2 Análisis de la variación genética inter-poblacional

La distribución de la variabilidad genética a nivel regional entre las poblaciones de *T. recurvata* en el Valle de Tehuacán se analizó a través de descriptores que miden la variación inter-poblacional. Estos parámetros nos ayudan a entender la influencia de diversos procesos evolutivos en los patrones de diversidad genética que encontramos (Hedrick, 2000). A continuación se describen los parámetros utilizados en este estudio.

El índice de fijación de Wright (F), del cual se habló anteriormente, se extiende para el caso de poblaciones subdivididas con el objetivo de comparar el grado de diferenciación entre los diferentes niveles de inclusión en los que se estructuran las poblaciones (Hartl y Clark, 1997). De esta forma, podemos analizar

cómo se encuentra repartida la variación genética entre los distintos niveles de subdivisión. En este sentido, los niveles a los cuales puede ser analizada la variación genética son: el total de la población (T), las subpoblaciones (S), y los individuos que conforman las subpoblaciones (I) (Hedrick, 2000). Los estadísticos F evalúan la reducción proporcional de la heterocigosis de los individuos respecto de las subpoblaciones (F_{IS}), de los individuos respecto al total de la población (F_{IT}) y de las subpoblaciones respecto al total de la población (F_{ST}) (Nei, 1987; Hartl y Clark, 1997).

De esta forma, la variable F_{ST} es en sí una medida de la diferenciación entre las poblaciones y su valor siempre es positivo (Hedrick, 2000), mientras que F_{IS} y F_{IT} son medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg en las subpoblaciones o en la población total, respectivamente, y pueden tomar valores positivos, en el caso de que haya una deficiencia de heterocigotos, o valores negativos cuando hay exceso de heterocigotos (Hedrick, 2000).

El cálculo de los estadísticos F de Wrigth se realizó de dos maneras: utilizando las frecuencias de los alelos, por medio del programa GenAlEx y por medio del cálculo de F_{IS} , F_{SC} , F_{CT} y F_{IT} (que son sus equivalentes) a través de un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) usando el programa ARLEQUIN, versión 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Este último permite el cálculo de estos índices por medio de una prueba estadística de permutación aleatoria (Peakall y Smouse, 2006). Otro estadístico calculado por medio del AMOVA, también con el programa ARLEQUIN, fue R_{ST} el cual es análogo a la F_{ST} de Wright; sin embargo, a diferencia de éste, el estadístico R_{ST} se desarrolló específicamente para su aplicación a microsatélites, ya que se basa en el modelo de mutación por pasos

(Slatkin, 1995), el cual es el modelo de mutación más aceptado para estos marcadores moleculares (Slatkin, 1995; Goldstein y Schlötterer, 2001).

Adicionalmente, el AMOVA analiza la distribución de la varianza genética entre los diferentes niveles jerárquicos de agrupación, por lo cual este análisis indica el porcentaje de variación contenida en los diferentes niveles de agrupación poblacional considerados en el estudio. Como se mencionó anteriormente, el AMOVA puede aplicarse vía el número de alelos diferentes (F_{ST}) o por la suma de las diferencias cuadradas (R_{ST}) (Excoffier *et al.*, 2005).

Una medida indirecta del flujo genético entre las subpoblaciones de una población es la estimación del número de migrantes (Nm), el cual se puede calcular por medio del método de alelos privados; este último considera las frecuencias de los alelos privados de cada subpoblación (Slatkin, 1985). En este trabajo, Nm es un indicador indirecto del flujo génico entre subpoblaciones y se calculó con el programa GENEPOP.

Otra manera en la que se puede calcular Nm es a través de F_{ST} , a partir de la cual se puede obtener una matriz de valores de Nm para cada par de poblaciones. Esta forma de calcular Nm supone que un par de poblaciones de tamaño N se selecciona de un universo de poblaciones que intercambian una fracción de migrantes m por generación y que la tasa de mutación u , es tan baja, que permite medir la tasa de migración m . De esta forma, podemos calcular M como el número absoluto de migrantes entre pares de poblaciones para cada generación de la siguiente forma:

$$M = \frac{1 - F_{ST}}{2F_{ST}}$$

esto se realizó con el programa ARLEQUIN.

Para evaluar la variación encontrada entre las diferentes poblaciones, se calcularon las distancias genéticas de Nei (Nei, 1987) entre pares de poblaciones. En el caso de marcadores moleculares selectivamente neutros, como los microsatélites, y bajo el modelo de alelos infinitos, se espera que las distancias genéticas incrementen de manera lineal con el tiempo (Nei, 1972; Hedrick, 2000); por tanto, esta medida es un buen indicador del grado de diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas por medio de microsatélites. Cuando se trabaja con muestras inferiores a los 50 individuos se recomienda usar la distancia genética corregida (D_A) (Hedrick, 2000), la cual se calculó con el programa ARLEQUIN, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$D_A = \hat{\pi}_{12} - \frac{\hat{\pi}_1 + \hat{\pi}_2}{2}$$

donde $\hat{\pi}_1$ y $\hat{\pi}_2$ son la diversidad haplotípica en las poblaciones 1 y 2 respectivamente y $\hat{\pi}_{12}$ es el promedio de las diferencias entre dos haplotipos elegidos al azar de las poblaciones 1 y 2 y es igual a $\sum_{ij} x_i y_j \delta_{ij}$, donde x_i y y_j son la frecuencia del i ésimo haplotipo en las poblaciones X y Y respectivamente y δ_{ij} es el número de diferencias entre el haplotipo i y el haplotipo j (Nei y Li, 1979; Excoffier *et al.*, 2005).

Se realizaron correlaciones lineales simples entre las distancias genéticas de Nei corregidas (D_A) y las distancias geográficas entre pares de poblaciones, entre el número absoluto de migrantes (M) y las distancias geográficas y entre las distancias genéticas de Nei corregidas (D_A) y el número absoluto de migrantes (M). Para conocer si existe una relación entre las distancias genéticas y las

distancias geográficas, así como entre las distancias geográficas y el número de migrantes (M), se realizó una prueba de Mantel. Este análisis prueba si existen diferencias significativas entre dos o más matrices; en este caso comparamos una matriz con las distancias geográficas entre pares de poblaciones (en kilómetros- Fig. 4) y una matriz con los valores de D_A calculados. La matriz de distancias geográficas se comparó también con la matriz de valores de M. Este análisis se realizó con el programa ARLEQUIN, versión 3.0.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Polimorfismo de los 12 loci de microsatélites de *Tillandsia recurvata*

Se estandarizaron los protocolos de PCR para la amplificación de 12 pares de oligonucleotidos (primers) de microsatélites diseñados para *T. recurvata* (Tabla 2). De los 12 loci probados resultaron polimorficos sólo cuatro de ellos: TillGA23, TillGT22, TillCT15 y TillCT20 (Tabla 3); éstos presentaron un alto grado de polimorfismo, observándose entre 8 y 17 alelos por locus. El locus con un menor número de alelos fue TillCT15 con solo 8 alelos y el locus con un mayor número de alelos fue TillGA23, con 17 alelos en las seis poblaciones muestreadas en el Valle de Tehuacán (Tabla 3). Esto se refleja de igual manera en el número de alelos efectivos (N_a) y en la heterocigosis esperada (H_e) (Tabla 3).

Respecto a la heterocigosis observada (H_o), se observaron desviaciones de las proporciones esperadas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg en los cuatro loci analizados. Estas desviaciones tienen que ver en tres de los casos con una deficiencia de heterocigotos (en los loci TillGA23, TillGT22 y TillCT20) (ver Tabla 3). En el caso del locus TillCT15, la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg que se observó se debe a un exceso de heterocigotos (ver Tabla 3).

Tabla 3. Loci polimórficos de microsatélites para *Tillandsia recurvata*. N= número de individuos analizados por loci, N_a = número de alelos presentes; N_e = número efectivo de alelos; H_o = heterocigosis observada; H_e = heterocigosis esperada y F = índice de fijación.

| Locus | Intervalo de tamaño del producto (pb) | N | N_a | N_e | H_o | H_e | F |
|----------|---------------------------------------|-----|-------|-------|--------|-------|--------|
| TillGA23 | 125 - 167 | 150 | 17 | 7.4 | 0.832* | 0.865 | 0.043 |
| TillGT22 | 164 - 190 | 150 | 11 | 5.3 | 0.719* | 0.811 | 0.110 |
| TillCT15 | 140 - 154 | 150 | 8 | 3.3 | 0.872* | 0.694 | -0.264 |
| TillCT20 | 179 - 201 | 150 | 9 | 4.6 | 0.673* | 0.785 | 0.149 |

* = desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg ($P < 0.0001$).

3.2 Variación genética intra-poblacional

Los valores de número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), alelos privados (AP), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación (F) se calcularon para cada locus en cada población y se muestran en las Tablas 4 a 7. Además, el promedio de estas variables (tomando en cuenta los cuatro loci en conjunto) para cada población se muestran en las Figuras 6 a 9 (ver también Apéndice 4 para tablas de alelos y sus frecuencias).

El locus que presentó una mayor variación en cuanto al número de alelos presentes por población fue TillGA23, que en la población I sólo presentó 5 alelos mientras que en la población II, se encontraron 13 alelos (Tabla 4). Los demás loci presentaron una menor variación en términos del número de alelos presentes en cada población (Tablas 5 a 7).

En cuanto al promedio del número de alelos por población, observamos que las poblaciones V y VI presentaron un mayor número de alelos, con 7.25 alelos

cada una, mientras que la población I sólo presentó 5 alelos en promedio (Figura 6).

Con respecto al número de alelos privados, se encontraron 13 de un total de 45 alelos globales para todos los loci; cuatro de ellos se observaron en el locus TillGA23: dos en la población II, uno en la población V y otro más en la población VI (Tabla 4). Por su parte, el locus TillCT20 fue el que presentó el menor número de alelos privados, con uno en la población I y otro en la población III (Tabla 7).

Tomando en cuenta el promedio para todos los loci, la población VI fue la que presentó un mayor número de alelos privados (Figura 8), mientras que las poblaciones I y III fueron las que tuvieron un menor número alelos privados, con uno alelo privado para cada una (Figura 8).

Tabla 4. Valores para el locus TillGA23 de: N= número de individuos, N_a = número de alelos; N_e = número efectivo de alelos; AP = número de alelos privados; H_o = heterocigosis observada; H_e = heterocigosis esperada y F = índice de fijación, para cada población muestreada de *Tillandsia recurvata* en los tres sitios estudiados en el Valle de Tehuacán.

| Población | N | N_a | N_e | AP | H_o | H_e | F |
|-----------|----|-------|-------|----|--------|-------|--------|
| I | 25 | 5 | 2.9 | 0 | 0.960* | 0.652 | -0.456 |
| II | 25 | 13 | 8.7 | 2 | 0.920* | 0.886 | -0.018 |
| III | 25 | 9 | 5.5 | 0 | 0.739* | 0.819 | 0.119 |
| IV | 25 | 8 | 5.2 | 0 | 0.833* | 0.807 | -0.011 |
| V | 25 | 11 | 9.4 | 1 | 0.762* | 0.893 | 0.171 |
| VI | 25 | 9 | 4.0 | 1 | 0.760* | 0.748 | -0.004 |

* = desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg ($P < 0.0001$).

Tabla 5. Valores para el locus TillGT22 de: N= número de individuos, N_a = número de alelos; N_e = número efectivo de alelos; AP = número de alelos privados; H_o = heterocigosis observada; H_e = heterocigosis esperada y F = índice de fijación, para cada población muestreada de *Tillandsia recurvata* en los tres sitios estudiados en el Valle de Tehuacán.

| Población | N | N_a | N_e | AP | H_o | H_e | F |
|-----------|----|-------|-------|----|--------------------|-------|--------|
| I | 25 | 6 | 4.3 | 0 | 0.760* | 0.770 | 0.033 |
| II | 25 | 5 | 4.4 | 0 | 1.000* | 0.774 | -0.274 |
| III | 25 | 6 | 4.1 | 0 | 0.833 ⁺ | 0.754 | -0.085 |
| IV | 25 | 8 | 3.8 | 2 | 0.480* | 0.736 | 0.366 |
| V | 25 | 6 | 3.3 | 0 | 0.364* | 0.698 | 0.497 |
| VI | 25 | 9 | 6.2 | 2 | 0.840* | 0.838 | -0.018 |

* = desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg ($P < 0.005$).

Tabla 6. Valores para el locus TillCT15 de: N= número de individuos, N_a = número de alelos; N_e = número efectivo de alelos; AP= número de alelos privados; H_o = heterocigosis observada; H_e = heterocigosis esperada y F = índice de fijación, para cada población muestreada de *Tillandsia recurvata* en los tres sitios estudiados en el Valle de Tehuacán.

| Población | N | N_a | N_e | AP | H_o | H_e | F |
|-----------|----|-------|-------|----|---------|-------|--------|
| I | 25 | 3 | 2.5 | 0 | 0.760** | 0.602 | -0.243 |
| II | 25 | 4 | 3.3 | 0 | 0.880* | 0.698 | -0.242 |
| III | 25 | 4 | 3.3 | 0 | 1.000* | 0.698 | -0.413 |
| IV | 25 | 5 | 3.1 | 1 | 0.800* | 0.674 | -0.166 |
| V | 25 | 5 | 2.2 | 1 | 0.920* | 0.555 | -0.645 |
| VI | 25 | 6 | 2.7 | 1 | 0.880* | 0.635 | -0.368 |

* = desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg ($P < 0.001$).

** = desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$).

Tabla 7. Valores para el locus TillCT20 de: N= número de individuos, N_a = número de alelos; N_e = número efectivo de alelos; AP = número de alelos privados; H_o = heterocigosis observada; H_e = heterocigosis esperada y F = índice de fijación, para cada población muestreada de *Tillandsia recurvata* en los tres sitios estudiados en el Valle de Tehuacán.

| Población | N | N_a | N_e | AP | H_o | H_e | F |
|-----------|----|-------|-------|----|---------------------|-------|--------|
| I | 25 | 6 | 3.3 | 1 | 0.720* | 0.698 | -0.011 |
| II | 25 | 6 | 3.6 | 0 | 0.880* | 0.722 | -0.200 |
| III | 25 | 8 | 4.4 | 1 | 0.800* | 0.774 | -0.013 |
| IV | 25 | 4 | 2.4 | 0 | 0.560 ^{ns} | 0.583 | 0.060 |
| V | 25 | 7 | 3.7 | 0 | 0.560* | 0.729 | 0.251 |
| VI | 25 | 5 | 3.3 | 0 | 0.520* | 0.698 | 0.274 |

* = desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg ($P < 0.005$).

^{ns} = no hubo desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg.

La prueba de Hardy-Weinberg mostró que todos los locus en todas las poblaciones se desviaron de las proporciones esperadas (Tablas 4 a 7), a excepción del loci TillCT20 en la población IV, en el que las H_o y la H_e fueron muy similares (Tabla 7). Estas desviaciones de las proporciones esperadas se confirman al considerar el índice de fijación (F), que en la mayor parte de los casos presenta un valor negativo, lo que nos indica un exceso de heterocigotos (Tablas 4 a 7). El locus TillCT15 en la población V fue el que presentó el índice de fijación mas bajo ($F = -0.657$ -Tabla 6); de hecho, en este locus se observó que todas las poblaciones presentaron valores negativos de F (Tabla 6). Con respecto a los loci TillGT22 y TillCT20, la mitad de las poblaciones presentaron valores negativos de F (Tablas 5 y 7).

El exceso de heterocigotos que sugieren los valores negativos de F se pueden ver de manera gráfica en la Figura 9, en donde queda claro que el número de heterocigotos observados es superior al esperado en las poblaciones I, II, III y VI.

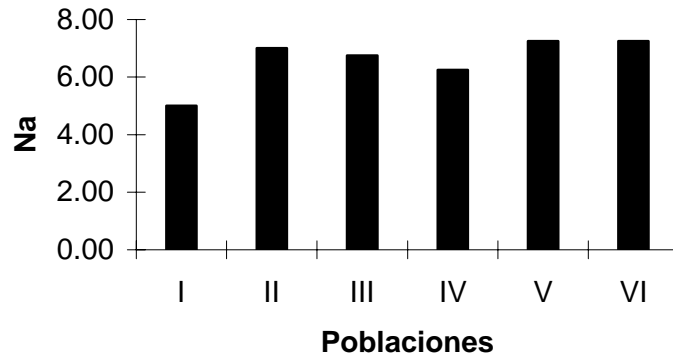


Figura 6. Número promedio de alelos (N_a) por población para los loci TillGA23, TillGT22, TillCT15 y TillCT20, analizados en las seis poblaciones de *Tillandsia recurvata* colectadas en el Valle de Tehuacán.

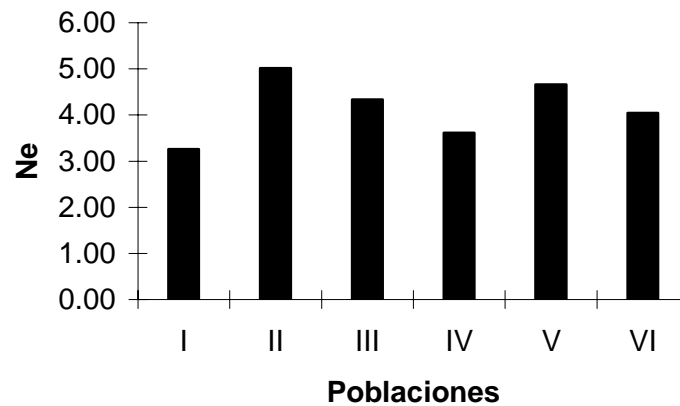


Figura 7. Número promedio de alelos efectivos por población para los loci TillGA23, TillGT22, TillCT15 y TillCT20, analizados en las seis poblaciones de *Tillandsia recurvata* colectadas en el Valle de Tehuacán.

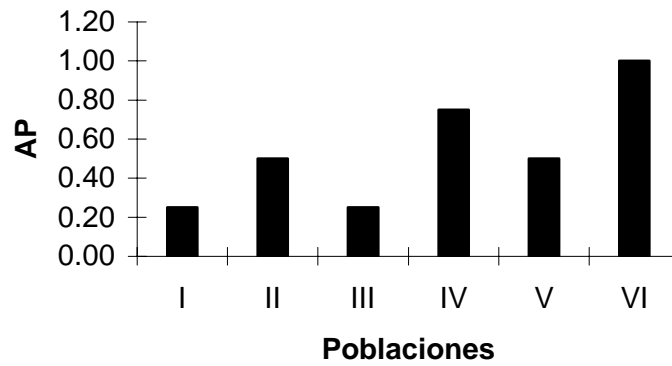


Figura 8. Número promedio del número de alelos privados (AP) por población para los loci TillGA23, TillGT22, TillCT15 y TillCT20, analizados en las seis poblaciones de *Tillandsia recurvata* colectadas en el Valle de Tehuacán.

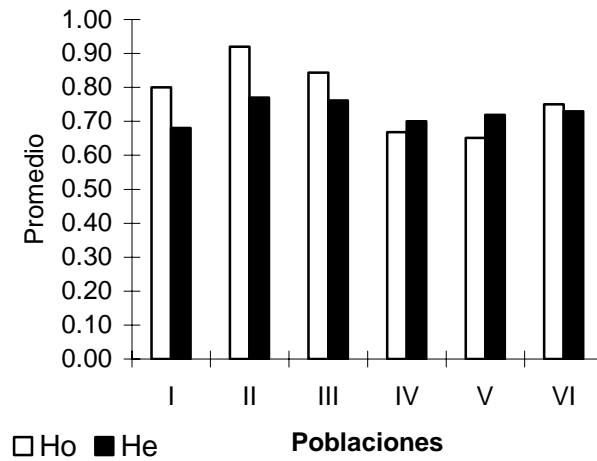


Figura 9. Promedio de la heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e) para cada población para los loci TillGA23, TillGT22, TillCT15 y TillCT20, analizados en las seis poblaciones de *Tillandsia recurvata* colectadas en el Valle de Tehuacán.

3.3 Estructura genética inter-poblacional

3.3.1 Diferenciación genética entre poblaciones

Para conocer el grado de diferenciación entre poblaciones tomando en cuenta los diferentes niveles de distribución espacial, se calcularon los estadísticos de Wright utilizando las frecuencias alélicas (Tabla 8).

En el caso de la F_{IS} , observamos que para los loci TillGA23 y TillCT15 los valores fueron negativos (Tabla 8), lo cual indica que en estos loci hay un exceso de heterocigotos, aunque muy ligero en el caso del primero. Por su parte, los loci TillGT22 y TillCT20 mostraron un leve exceso de homocigotos, reflejado en los valores positivos de este estadístico (Tabla 8). El promedio del valor de F_{IS} fue negativo (-0.072); lo que indica globalmente un exceso de heterocigotos para estos cuatro loci entre los individuos de las subpoblaciones estudiadas.

Con respecto a F_{IT} , se observó que el único locus con un exceso de heterocigotos fue TillCT15, que mostró un valor negativo para esta variable (Tabla 8). Sin embargo, el promedio global de F_{IT} fue positivo, aunque muy bajo (0.011), lo que sugiere que en el Valle de Tehuacán los individuos de *T. recurvata* muestran un leve exceso de heterocigosis.

Con respecto a los valores de F_{ST} , todos los locus indican que existe una subdivisión de la variación genética de esta especie en la región estudiada. El valor de F_{ST} más alto (0.108) fue para el locus TillCT20. Por su parte, el valor promedio de F_{ST} fue de 0.078 (Tabla 8), lo cual confirma que sí se observa cierto grado de diferenciación entre las poblaciones muestreadas.

Tabla 8. Estadísticos de Wright calculados a través de las frecuencias alélicas para cada locus de los microsatélites polimórficos de *Tillandsia recurvata*.

| | TillGA23 | TillGT22 | TillCT15 | TillCT20 | Promedio |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| F_{IS} | -0.035 | 0.064 | -0.356 | 0.039 | -0.072 |
| F_{IT} | 0.042 | 0.119 | -0.258 | 0.142 | 0.011 |
| F_{ST} | 0.075 | 0.059 | 0.072 | 0.108 | 0.078 |

3.3.2 Distribución de la variabilidad genética entre los niveles de agrupación espacial

Para conocer como se distribuye la variación genética entre los diferentes niveles de estructuración poblacional analizados, se utilizó el análisis molecular de varianza (AMOVA), tanto con base en el número de alelos diferentes y que estima los equivalentes a los estadísticos de Wright (F_{CT} , F_{SC} y F_{ST}), como en base de la suma de las diferencias cuadradas y que calcula R_{ST} . En ambos casos el análisis se realizó agrupando las seis poblaciones muestreadas en tres grupos con un par de poblaciones por grupo como se muestra y se explica en la Figura 4.

Los resultados del AMOVA con base en el número de alelos diferentes mostraron que el mayor porcentaje de variación (93.08%) se encuentra en las poblaciones (Tabla 9); sin embargo, el valor del índice de fijación asociado fue bajo ($F_{IT} = 0.069$) aunque significativo ($P < 0.0001$).

El siguiente nivel analizado fue la variación entre las poblaciones ubicadas en los tres sitios; en este caso se observó que un 9.48% de la variación se encuentra en este nivel (Tabla 9). Este nivel mostró el valor del índice de fijación más alto, con $F_{SC} = 0.092$ (Tabla 9) el cual fue altamente significativo ($P < 0.0001$ -Tabla 9). Por último, se analizó la variación existente entre los grupos y se encontró un valor negativo en el porcentaje de variación (-2.56%);

el índice de fijación asociado también mostró un valor negativo, ($F_{CT} = -0.026$) el cual no resultó significativo ($P = 0.933$).

Tabla 9. Resultados del AMOVA con base en el número de alelos diferentes (F_{ST}). Se muestran los índices de fijación (F) para cada jerarquía así como la prueba de significancia.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Componentes de la varianza | % de variación | Índices de fijación | Pruebas de significancia |
|------------------------------------|--------------------|----------------------------|----------------|---------------------|--------------------------|
| Entre grupos | 2 | $\sigma a^2 = -0.041$ | -2.56 | $F_{CT} = -0.026$ | 0.933+-0.000 |
| Entre poblaciones dentro de grupos | 3 | $\sigma b^2 = 0.152$ | 9.48 | $F_{SC} = 0.092$ | 0.000+-0.000 |
| Dentro de poblaciones | 294 | $\sigma c^2 = 1.496$ | 93.08 | $F_{ST} = 0.069$ | 0.000+-0.000 |
| Total | 299 | $\sigma^2 = 1.607$ | | | |

Los resultados del análisis de AMOVA con base en la suma de las diferencias cuadradas mostraron resultados similares a los encontrados con el método del número de alelos diferentes. El nivel intra-poblacional es donde se encuentra distribuida la mayor parte de la variación encontrada (92.12% - Tabla 10) con un índice de fijación bajo pero significativo ($F_{ST} = 0.079$, $P = 0.003$ - Tabla 10).

El porcentaje que se obtuvo para la variación entre las poblaciones de los grupos fue de 9.20%, siendo el nivel con el segundo mayor porcentaje de la variación total, al igual que en el método de alelos diferentes (comparar con Tabla 9). El índice de fijación para este nivel fue de $F_{SC} = 0.091$ (Tabla 10) y fue altamente significativo ($P = 0.002$). Por último, el nivel correspondiente a la variación entre grupos mostró el menor porcentaje de variación (-1.32%). Este nivel también resultó ser el que explicó menor porcentaje de la variación con el método de alelos diferentes (comparar con Tabla 9). En este caso, el índice de

fijación mostró un valor negativo de $F_{CT} = -0.013$ (Tabla 10) que no fue significativo ($P = 0.393$).

Tabla 10. Resultados del AMOVA con base en la suma de las diferencias cuadradas (R_{ST}). Se muestran los índices de fijación para cada jerarquía así como la prueba de significancia.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Componentes de la varianza | % de variación | Índices de fijación | Pruebas de significancia |
|------------------------------------|--------------------|----------------------------|----------------|---------------------|--------------------------|
| Entre grupos | 2 | $\sigma_a^2 = -30.434$ | -1.32 | $F_{CT} = -0.013$ | 0.393 +- 0.013 |
| Entre poblaciones dentro de grupos | 3 | $\sigma_b^2 = 211.740$ | 9.20 | $F_{SC} = 0.091$ | 0.002 +- 0.001 |
| Dentro de las poblaciones | 294 | $\sigma_c^2 = 2120.308$ | 92.12 | $F_{ST} = 0.079$ | 0.003 +- 0.001 |
| Total | 299 | $\sigma^2 = 2301.615$ | | | |

3.3.3 Estimación de la migración entre poblaciones

El flujo genético producto de la migración entre las poblaciones se estimó por dos métodos diferentes: el primero fue el que se basa en el número de alelos privados que se encuentran en cada población y el cual calcula el número efectivo de migrantes (Nm). El valor obtenido para este estimador fue alto, presentando un valor de $Nm = 4.77$. El segundo método utilizado para cuantificar la migración se basa en el valor de F_{ST} y da lugar a una matriz compuesta por los valores del número absoluto de migrantes (M) entre pares de poblaciones (Tabla 11).

Los valores de M señalan que la migración más alta no fue la que se da entre los pares de poblaciones de cada grupo, contrario a lo esperado. El valor de M más alto que se observó entre pares de poblaciones del mismo grupo fue de 12.775, entre PIII y PIV (Tabla 11). Pero se encontraron valores de M aun más altos entre PI y PIII ($M = 14.407$), y entre PII y PIII ($M = 13.606$) que en ninguno de los dos casos las poblaciones se ubican en el mismo sitio (Figura 4). El resto de

los valores de M se encontraron muy cercanos entre sí para los demás pares de poblaciones, siendo $M = 2.942$ el más bajo, correspondiente a la migración entre PV y PVI, que pertenecen al mismo grupo, localizado en el Sitio III (Ver Figura 4).

Tabla 11. Matriz del número absoluto de migrantes por generación (M) calculado entre pares de poblaciones de *Tillandsia recurvata*, con base en los valores de F_{ST} .

| | <i>P I</i> | <i>P II</i> | <i>P III</i> | <i>P IV</i> | <i>P V</i> | <i>P VI</i> |
|--------------|------------|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|
| <i>P I</i> | 0 | | | | | |
| <i>P II</i> | 5.131 | 0 | | | | |
| <i>P III</i> | 14.407 | 13.606 | 0 | | | |
| <i>P IV</i> | 9.654 | 5.538 | 12.775 | 0 | | |
| <i>P V</i> | 4.628 | 5.950 | 6.426 | 5.682 | 0 | |
| <i>P VI</i> | 4.144 | 4.823 | 12.520 | 8.276 | 2.942 | 0 |

3.3.4 Distancias genéticas entre poblaciones

Para calcular el grado de diferenciación entre los pares de poblaciones se utilizaron las distancias genéticas de Nei corregidas (D_A). De manera consistente con los resultados de la sección anterior, el mayor nivel de diferenciación genética se observó entre PV y PVI ($D_A = 0.507$) (Tabla 12). Esto no corresponde con lo esperado, pues estas dos poblaciones se localizan en un mismo sitio y la distancia entre ellas es de 16 m. Por otro lado, el valor más bajo de diferenciación lo presentaron PI y PIII ($D_A = 0.104$), poblaciones de sitios distintos (Sitio 1 y Sitio 2, respectivamente) que se localizan a una distancia de 6.436 km entre ellas (Figura 4).

Analizando los demás pares de poblaciones del mismo grupo, para el Sitio 1 (formado por PI y PII) se calculó una $D_A = 0.288$ (Tabla 12); y el Sitio 2, donde se localizan PIII y PIV, mostró un valor de $D_A = 0.119$ (Tabla 12).

Tabla 12. Matriz de las distancias genéticas de Nei corregidas (D_A) para los pares de poblaciones de *Tillandsia recurvata* estudiadas.

| | <i>P I</i> | <i>P II</i> | <i>P III</i> | <i>P IV</i> | <i>P V</i> | <i>P VI</i> |
|--------------|------------|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|
| P I | 0 | | | | | |
| P II | 0.288 | 0 | | | | |
| P III | 0.104 | 0.116 | 0 | | | |
| P IV | 0.146 | 0.271 | 0.119 | 0 | | |
| P V | 0.312 | 0.258 | 0.240 | 0.258 | 0 | |
| P VI | 0.347 | 0.317 | 0.123 | 0.177 | 0.507 | 0 |

3.3.5 Relación entre la estructura genética y la distancia geográfica

La correlación entre el número absoluto de migrantes (M) y la distancia geográfica entre pares de poblaciones fue negativa y no significativa ($R^2 = 0.035$, $P = 0.502$, Figura 10).

Por otro lado, la correlación entre las distancias genéticas de Nei corregidas (D_A) y las distancias geográficas fue positiva y no significativa ($R^2 = 0.006$, $P = 0.786$, Figura 11).

Por otro lado, la correlación entre D_A y M fue negativa y altamente significativa ($R^2 = 0.937$, $P < 0.0001$, Figura 12).

Para tener una idea bien fundamentada acerca de las correlaciones mencionadas anteriormente se realizó una prueba de Mantel entre las matrices de: a) M y distancias geográficas; b) D_A y distancias geográficas y c) M y D_A .

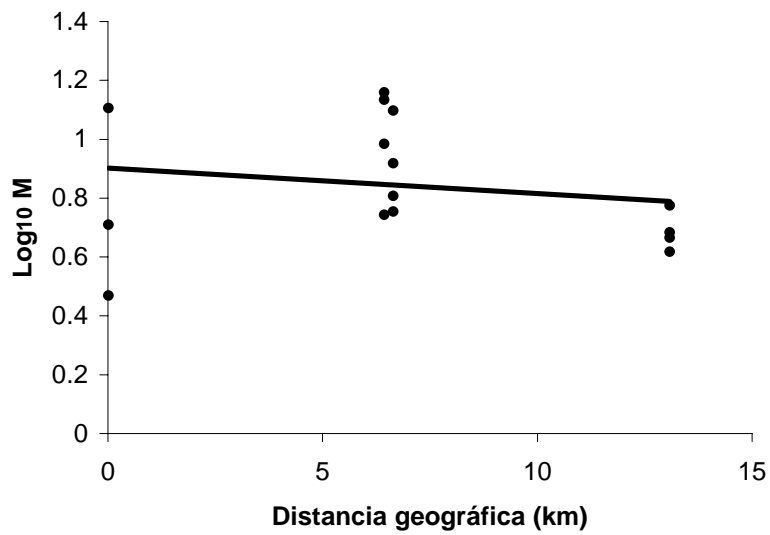


Figura 10. Correlación entre el número absoluto de migrantes (M) calculado a partir de F_{ST} y las distancias geográficas entre pares de poblaciones de *Tillandsia recurvata* ($R^2 = 0.035$, $P = 0.502$).

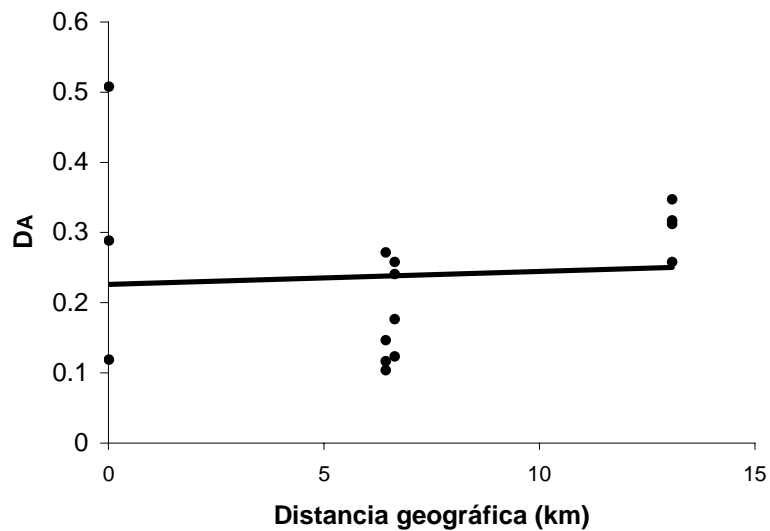


Figura 11. Correlación entre las distancia genética de Nei corregida (D_A) y las distancias geográficas entre pares de poblaciones de *Tillandsia recurvata* ($R^2 = 0.006$, $P = 0.786$).

Los resultados de las pruebas de Mantel corroboraron estas observaciones. La prueba de Mantel entre M y las distancias geográficas arrojó un coeficiente de correlación negativo y bajo ($r = -0.245$), y no significativo ($P = 0.82$).

La prueba de Mantel entre D_A y las distancias geográficas mostró un coeficiente de correlación también muy bajo ($r = 0.076$) y además no se encontró que hubiera alguna correlación entre estas variables ($P = 0.32$).

Por último, si se encontró una correlación entre M y D_A , con un índice de correlación de $r = -0.904$ ($P < 0.0001$).

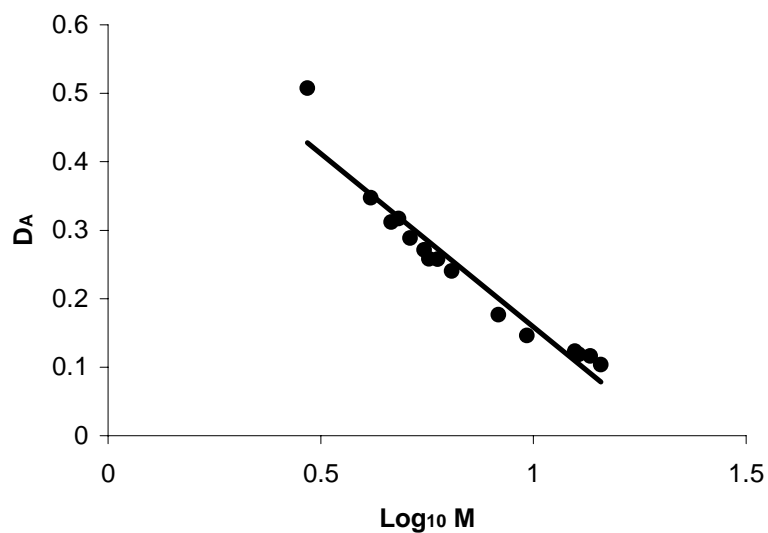


Figura 12. Correlación entre las distancia genética de Nei corregida (D_A) y el número de migrantes absoluto de *Tillandsia recurvata* ($R^2 = 0.904$, $P < 0.0001$).

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Polimorfismo de los 12 loci de microsatélites de *Tillandsia recurvata*

El número de loci polimórficos totales con el que se trabajó fue relativamente bajo, comparado con otros trabajos en plantas donde se ocupan entre seis y ocho loci para evaluar la diversidad y estructura genética (Schueler *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007; Moynihan *et al.*, 2007; Pollux *et al.*, 2007), ya que de los 12 pares de oligonucleótidos diseñados para amplificar microsatélites de *T. recurvata*, sólo cuatro de ellos amplificaron loci polimórficos (Tabla 3). A pesar de esto los resultados son alentadores, ya que esto representa un 25% de loci polimórficos, lo que resulta ser una buena proporción de polimorfismo comparado con otros estudios donde se han encontrado porcentajes de polimorfismo similares (Boneh *et al.*, 2003; Moynihan *et al.*, 2007). Tal es el caso de un par de miembros de esta misma familia: *Tillandsia fasciculata* y *Guzmania monostachya*, para las que se amplificaron 15 loci de microsatélites los cuales resultaron polimórficos en un 20% y 33%, respectivamente (Boneh *et al.*, 2003).

Algunos estudios de variación genética en especies epífitas han usado entre tres y seis loci de microsatélites (Boneh *et al.*, 2003; Walser *et al.*, 2005), por lo tanto, el uso de cuatro loci en *T. recurvata* podría ser suficiente para abordar preguntas ecológicas y evolutivas.

El nivel de variación genética observado en los microsatélites de esta especie mostró ser informativo a pesar de ser pocos los loci analizados, ya que se encontraron entre 8 y 17 alelos con un promedio de 11.5 alelos por locus. En otras

especies de la misma familia (*T. fasciculata* y *G. monostachya*) se reportan valores promedio de 4.2 y 2.3 alelos por locus, respectivamente (Boneh *et al.*, 2003).

En *Cercidiphyllum japonicum* (Cercidiphyllaceae) el número de alelos encontrados en cinco loci de microsatélites fue de entre 21 y 30, con un promedio de 26.6 (Sato *et al.*, 2006). Esta especie muestra una variabilidad superior a la encontrada en *T. recurvata*, en la que el locus con un mayor número de alelos fue el TillGA23, con 17 alelos. A pesar de esto, podemos considerar que el número de alelos encontrados en los cuatro loci de microsatélites analizados en *T. recurvata* representa un nivel medio de polimorfismo.

La heterocigosis esperada medida con microsatélites en *T. recurvata* varió entre 0.673 y 0.832, lo cual representa un grado de heterocigosis alto, sobre todo considerando que se trata de una especie en la que predomina la autopolinización (Soltis *et al.*, 1987) y cuya dispersión de semillas es anemócora (Bernal, 2006). Hamrick y Godt (1989) reportan valores de heterocigocidad esperada de entre 0.124 y 0.144, respectivamente, para especies con dispersión anemócora o con autopolinización (aunque es importante tomar en cuenta que estos autores analizan resultados de estudios realizados con isoenzimas). Si comparamos los valores de H_e de *T. recurvata* con los reportados para *G. monostachya* ($H_e = 0.037$ a 0.074) usando microsatélites (Boneh *et al.*, 2003), puede confirmarse que los obtenidos en este estudio son más altos, éstos son similares al compararlos con *T. fasciculata* ($H_e = 0.316 - 1.00$, Boneh *et al.*, 2003) y *C. japonicum* ($H_e = 0.774 - 0.857$), también usando microsatélites (Sato *et al.*, 2006).

4.2 Variación genética intra-poblacional

Soltis *et al.* (1987) utilizando isoenzimas concluyen que *T. recurvata* es una especie en la que predomina la autopolinización al no encontrar variación en las poblaciones estudiadas, sin embargo, encuentran diferentes alelos fijos en las poblaciones; los resultados de éste estudio nos muestran que los microsatélites son una herramienta más útil en el estudio de la genética de poblaciones al ser mas informativos, lo que nos lleva a preguntarnos si realmente esta es una especie donde predomina la autopolinización o el efecto de la dispersión o el acomodo de los hospederos en el paisaje tiene un mayor efecto en la estructuración de la variación genética. Al hacer una comparación con otras especie con los mismos caracteres de vida encontramos que ocurre lo mismo (autopolinización y dispersión anemócora, Hamrick y Godt, 1989).

En este trabajo, los valores de N_a para los microsatélites variaron entre 3 y 13 (Tablas 4 a 7). Para esta misma especie, Soltis *et al.* (1987) usando isoenzimas, reportan un número promedio de 1.5 alelos para en el locus con la mayor variabilidad reportada. Según Hamrick y Godt (1989), el valor promedio de polimorfismo por población (A_p) usando isoenzimas es de 1.31 para especies con autopolinización y de 1.16 para especies con dispersión anemócora, lo cual coincide con lo obtenido por Soltis *et al.* (1987) en *T. recurvata*.

Respecto a N_e , se observa el mismo patrón, ya que en *T. recurvata* se encuentran valores de entre 2.515 (para la población I con el locus TillCT15) y 9.383 (para la población V con el locus TillGA23), mientras que con isoenzimas se reporta un valor de 1.10 alelos efectivos por locus en poblaciones de especies con

autopolinización y de 1.16 para especies con dispersión de semillas por viento (Hamrick y Godt, 1989).

Para H_e , en este trabajo *T. recurvata* presentó valores desde 0.602 (en la población I para el locus TillCT15) hasta 0.893 (en la población V con el locus TillGA23), mientras que en estudios con isoenzimas se reportan valores de $H_e=0.074$ en especies con autopolinización y de 0.123 en especies con dispersión de semillas por viento (Hamrick y Godt, 1989).

La variación a una escala más fina como la analizada en este trabajo es mucho mayor cuando se trabaja con microsatélites, inclusive considerando que Soltis *et al.* (1987) colectaron muestras de dos estados diferentes (*i.e.* Baja California Sur y Tamaulipas) y en el presente trabajo se colectaron muestras a una escala más fina (*i.e.* árboles hospederos del Tehuacán). Lo anterior nos indica que los microsatélites nos proporcionan más información en especies en la cuales los caracteres de vida podrían afectar la cantidad de información con otro tipo de marcador molecular como las isoenzimas.

La prueba de Hardy-Weinberg mostró que, en general, las poblaciones estudiadas de *T. recurvata* no están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto, junto con los valores obtenidos de F , que en la mayor parte de las poblaciones señalan un exceso de heterocigotos, contradice lo esperado considerando la forma de reproducción que parece tener esta especie (*i.e.* autopolinización). En especies que se autopolinizan, se esperarían valores de F que indicaran una mayor homocigosis, como fue el caso de los resultados de Soltis *et al.* (1987). El exceso de heterocigotos podría sugerir que la autopolinización no es tan frecuente como se pensaba originalmente en esta especie; en este sentido, sería importante realizar

estudios detallados de la biología reproductiva de *T. recurvata* para aclarar la manera en la que el tipo de reproducción afecta el patrón encontrado. Otra posible explicación para el exceso de heterocigotos encontrado sería por medio de la selección que se da en los diferentes estadios de vida, la cual podría ocasionar la pérdida de homocigotos cuando estos se encuentran en estado de plántula y por lo tanto la heterocigosis observada dependerá de la proporción de sobrevivientes de cada genotipo representado inicialmente (Hedrick, 2000). En este trabajo no es posible abordar esta pregunta debido a que el muestreo solo incluyó plantas adultas; sin embargo, Cynthia Ramírez Padilla actualmente está realizando un estudio utilizando los microsatélites aquí evaluados, en el cual se incluyen ambos estadios de crecimiento para evaluar este tipo de preguntas.

A pesar del exceso de heterocigotos, se encontró un gran número de alelos privados (13 de 45 alelos en total) en las poblaciones estudiadas. Esto sugiere que existe cierto grado de aislamiento entre las poblaciones; sin embargo, la migración podría estar jugando un papel importante aumentando el flujo génico entre poblaciones y consecuentemente diluyendo el efecto del aislamiento genético entre individuos como producto de la presunta autopolinización.

4.3 Estructura genética de las seis poblaciones de *Tillandsia recurvata*

Los valores promedio de los estadísticos F calculados utilizando las frecuencias alélicas nos indican la manera en la que la variabilidad genética está repartida en los diferentes niveles de análisis espacial. En lo que se refiere a la variación al interior de las poblaciones, el valor promedio de $F_{IS} = -0.072$ sugiere que, en general, las poblaciones presentan un exceso de heterocigotos. Sin embargo, si

examinamos este parámetro para cada locus individualmente, observamos valores positivos en TillGT22 y TillCT20, lo cual sugiere que en estos loci hay un mayor número de homocigotos, las diferencias observadas entre los loci nos habla de un efecto de selección en unos y no en otros (Nei, 1987; Hedrick, 2000). Por otro lado, en el total de los individuos analizados se observó lo contrario ($F_{IT} = 0.011$), lo cual indica que a este nivel existe un pequeño exceso de homocigotos. El contraste encontrado entre los valores de F_{IS} y F_{IT} nos indica que a nivel de especie existe cierto grado de endogamia, tal vez debida a la forma de reproducción que se cree presenta *T. recurvata*. Por otro lado los valores de F_{IS} nos indican que la autocruza no tiene un efecto tan significativo a nivel de las poblaciones locales como lo tiene a nivel de especie.

Con respecto al valor promedio de $F_{ST} = 0.078$, éste indica que existe cierto nivel de diferenciación entre las seis poblaciones estudiadas, aunque esta diferenciación es muy pequeña. Este resultado, junto con la existencia de alelos privados en todas las poblaciones, sugiere que efectivamente hay cierto nivel de separación entre poblaciones; sin embargo, esta separación es más clara a nivel espacial que a nivel genético, por lo que aún no se tienen elementos para asegurar que *T. recurvata* presenta una estructura metapoblacional en la que cada hospedero se comporta como un parche habitable capaz de sostener a una población local. Para concluir inequívocamente con respecto a lo anterior, hubiéramos requerido de un mayor nivel de diferenciación genética entre poblaciones. Probablemente si hubiéramos contado con un mayor número de microsatélites, o un mayor número de individuos muestreados, hubiéramos podido resolver esta cuestión más detalladamente.

Un modelo metapoblacional que sugerimos puede explicar la dinámica de *T. recurvata* es el de “patch-tracking” (Snäll *et al.*, 2003; Snäll *et al.*, 2005a) en el cual el establecimiento de las poblaciones depende de la dinámica de los hospederos y la capacidad de la especie de dispersarse a estos sitios, lo cual implica que si esto ocurriese en esta especie la variación genética estaría afectada por esta dinámica, ocasionado una falta de estructuración debida a la alta capacidad de dispersión de la especie.

González-Astorga *et al.* (2004) realizaron un trabajo con *Tillandsia achyrostachys*, una epífita de los bosques tropicales secos de Oaxaca. Esta especie es polinizada por aves, llevando a una polinización cruzada y sus promedios de los estadísticos F (utilizando isoenzimas) son: $F_{IS} = 0.433$, $F_{IT} = 0.651$ y $F_{ST} = 0.391$. Estos autores concluyen que la deriva génica y la endogamia son las causas de las deficiencias de heterocigotos que observan. Esto contrasta con el caso de *T. recurvata*, en la que observamos un escenario diferente: en *T. recurvata* aparentemente el principal factor que afecta la estructura genética es la dispersión de semillas, la cual introduce nuevos alelos a las poblaciones y podría propiciar un aumento en la proporción de heterocigotos (si es que es posible la polinización cruzada) al interior de las poblaciones. A su vez, esto podría homogenizar la variación genética entre las poblaciones, reduciendo las diferencias entre ellas.

4.3.1 Distribución de la variabilidad genética entre los niveles de agrupación espacial

Los resultados de la prueba de AMOVA, tanto para la calculada por el método de número de alelos diferentes como para la calculada con base en la suma de las diferencias cuadradas ubican el mayor porcentaje de la variación dentro de las poblaciones (93.08% y 92.12% respectivamente). Debido a que las mayores distancias geográficas se presentan entre sitios, se esperaba que una buena parte de la variación total se observara entre sitios. Contrario a lo esperado el análisis de AMOVA muestra que la mayor parte de la variabilidad en el sistema de *T. recurvata* estudiado se encuentra dentro de las poblaciones y no entre los tres sitios; en los cuales los resultados de los AMOVA con los dos métodos utilizados ubicaron los porcentajes más bajos de variabilidad entre los sitios. A pesar de ello, los resultados obtenidos indican que sí hay una estructuración o diferenciación entre las poblaciones que ocupan diferentes hospederos, pero no se puede reconocer una estructuración en un nivel de agrupamiento superior.

Los resultados obtenidos con *T. recurvata* son similares a los reportados para el líquen epífito *Lobaria pulmonaria*, en el cual se encontró que en los cinco sitios estudiados la mayor parte de la variación se da al interior de las poblaciones (Walser *et al.*, 2005). Sin embargo, en el caso de *L. pulmonaria* se consideró a una población como un grupo de hospederos colonizados por la especie, mientras que en el presente trabajo se consideró a cada hospedero como una población independiente. La diferencia entre estas dos especies sugiere que la escala a la que se forman las poblaciones locales en diferentes epífitas puede diferir,

seguramente como función de la manera en la que la dispersión y el tipo de reproducción se ven afectadas por la distancia.

4.3.2 Relación entre la estructura genética y la estructura espacial

La ausencia de correlaciones significativas entre la distancia geográfica y la distancia genética (Figura 10), así como entre la distancia geográfica y la migración (Figura 11), indica que no hay un patrón en el flujo génico entre poblaciones que sea dependiente de la distancia entre hospederos, a diferencia de lo que se esperaba (i.e. en especies con una dispersión anemócora, se esperaría una distribución leptocúrtica de la sombra de semillas en torno a la fuente de dispersión - Willson, 1993).

En *T. recurvata* no se ha determinado con precisión la distancia que pueden alcanzar las semillas dispersadas. Según los resultados de Bernal (2006), quien pudo observar el destino a corto plazo de cerca del 44% de las semillas de *T. recurvata* liberadas a partir de un hospedero experimental, se encontró que la mayor parte de las semillas permanecen en el mismo hospedero fuente (19%), mientras que sólo un 1% alcanza una distancia máxima de 7 m. Con base en los resultados de este experimento, se esperaba observar una correlación entre los parámetros genéticos mencionados anteriormente y la distancia geográfica de las poblaciones. Sin embargo, la ausencia de correlación, también apoyada por los resultados de las pruebas de Mantel realizadas, apunta en la dirección de que el proceso de dispersión en esta especie es mucho más complejo de lo que los resultados de Bernal (2006) sugerían.

A pesar de que la distancia geográfica no está asociada a la migración (M) y tampoco a la distancia genética entre poblaciones (D_A), la correlación entre M y D_A , así como la prueba de Mantel entre estos parámetros, mostró ser negativa y altamente significativa. Esto indica que la migración (que es independiente de la distancia) es el factor determinante de la diferenciación entre las poblaciones y, por lo tanto, nuevamente llegamos a la conclusión de que los patrones de dispersión son más complejos de los que se ha podido medir hasta el momento, pues seguramente son afectados por factores como la altura de liberación (*i.e.* la ubicación en la copa del árbol), las corrientes locales de aire y la presencia de irregularidades topográficas, entre otros.

Debido a todo lo anterior, puede sugerirse que las poblaciones de *T. recurvata* parecen ajustarse al modelo de islas de Wright, bajo el cual un nuevo alelo en una población tiene la misma probabilidad de dispersarse hacia todas las poblaciones, independientemente de las distancias entre ellas (Hamrick y Nason, 1996). Este resultado deberá de ser corroborado con un estudio más detallado que permita evaluar la dispersión de semillas con mayor precisión. Actualmente, Cynthia Ramírez Padilla (en preparación) está utilizando los microsatélites aquí evaluados para abordar este tipo de preguntas.

4.4 Conclusiones

1. Los cuatro microsatélites polimórficos analizados en *Tillandsia recurvata*, presentaron un mayor nivel de polimorfismo que las isoenzimas utilizadas por otros autores en la misma especie. Esto indica que los microsatélites son apropiados para el estudio de esta especie en una escala espacial reducida, debido al mayor grado de resolución que presentan.
2. Los resultados de este trabajo encuentran un alto nivel de heterocigosis, lo cual pone en duda que la autocruza (sugerida por Soltis *et al.*, 1987) sea el tipo de reproducción predominante en esta especie o de que sea el proceso determinante en la estructuración espacial de la variación genética o de un efecto de selección.
3. Las seis poblaciones de *T. recurvata* analizadas en este trabajo muestran desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg y los índices de fijación indican que éstas se deben a un exceso de heterocigotos, contrario a lo esperado según el tipo de reproducción propuesto para esta especie.
4. El proceso que parece ser determinante de la estructuración de la diversidad genética entre las poblaciones estudiadas de *T. recurvata*, es la dispersión, la cual parece diluir el efecto de la autocruza.
5. Aunque el flujo genético entre poblaciones es diferencial entre las diferentes poblaciones, no está correlacionado con la distancia geográfica entre poblaciones.
6. Se sugiere que la poca estructuración que presentó *T. recurvata* se asemeja al modelo de islas de Wright, en el que la ausencia de correlación entre las distancias genéticas y geográficas o entre la migración y la

distancia geográfica, sugiere que los alelos presentes en una población tienen la misma probabilidad de llegar a cualquier otra población, independientemente de la distancia entre ellas.

7. Los resultados obtenidos nos sugieren que el modelo tradicional de metapoblaciones no es el adecuado en el caso de *T. recurvata* y sus hospederos, pues la diferenciación genética entre las poblaciones es muy pequeña y la migración es alta para poder hablar de poblaciones locales independientes. Por lo tanto se sugiere que un modelo como el de “patch-tracking” (Snäll *et al.*, 2003) es más adecuado en el caso de una especie como *T. recurvata* donde el establecimiento de las poblaciones depende de la dinámica de los hospederos y de la capacidad de dispersión de la especie.

APÉNDICE 1

Protocolo de PCR para los loci polimórficos

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando una mezcla base (Master Stock) y una mezcla maestra (Master Mix) cuya composición se detalla en las tablas A1 y A2 respectivamente.

Tabla A1.1 Master Stock. Se muestra la cantidad utilizada por reacción y para 100 reacciones.

| Sustancia | [Original] | [Final] | Cantidad (μ l) | X 100 |
|-------------------|------------|---------|---------------------|-------|
| MgCl ₂ | 30 mM | 3.0 mM | 1.2 | 120 |
| Buffer | 10 X | 10 x | 1.2 | 120 |
| dNTP | 2.5 mM | 0.2 mM | 1 | 100 |
| dH ₂ O | | | 1 | 100 |
| Total | | | 4.4 | |

Tabla A1.2 Master Mix. Se muestran las cantidades utilizadas por reacción.

| Sustancia | [Original] | [Final] | Cantidad (μ l) |
|-------------------|---------------------|-------------|---------------------|
| MS | | | 4.4 |
| Primer F | 10 μ M | 1.0 μ M | 1.2 |
| Primer R | 10 μ M | 1.0 μ M | 1.2 |
| Taq | 5 unidades/ μ l | 1 unidad | 0.2 |
| DNA | 20 ng/ μ l | | 1 |
| dH ₂ O | | | 4.5 |
| Total | | | 12.5 |

APÉNDICE 2

Preparación de geles de poliacrilamida

Para preparar los geles de poliacrilamida al 6% en los que se corrieron y visualizaron los productos de PCR, se siguieron los siguientes procedimientos, utilizando el material que se detalla a continuación:

Stock de poliacrilamida al 6% (250 ml)

- 37.5 ml de poliacrilamida al 40%
- 25 ml TBE 10X
- 105 g UREA 7M
- 50 ml de agua destilada

Total = 167.5 ml

Se diluye todo en agua destilada, aforando a 250 ml.

Para preparar los geles se sobrepusieron dos palcas de vidrio, de 41 cm de largo por 32 cm de ancho, entre las que se colocaron un par de separadores de plástico de 0.4 mm de grosor (grosor del gel). Las placas y los separadores se unieron por medio de pinzas (Fig. A1). Antes de montar los vidrios, se lavaron con agua y jabón y se limpiaron con alcohol. A uno de los vidrios se le dio un tratamiento para adherir el gel, aplicando una mezcla de pegamento que contenía 990 μ l de etanol absoluto, 3 μ l de Bind Silene (Pharmacia biotech No. 17-1330-01) y 7 μ l de ácido acético al 10%. Esta mezcla se esparció uniformemente por la cara interna del vidrio. El otro vidrio se trató aplicando una capa uniforme de Rain-X anti fog (super pinauto), para evitar que el gel se adhiriera a este vidrio.

Una vez que los vidrios se montaron cara a cara con los separadores y las pinzas, se añadieron 60 ml de poliacrilamida al 6 %, 180 μ l de APS y 50 μ l de temed para que polimerice.

Se vació la mezcla entre los vidrios, haciéndola penetrar por la parte superior y evitando que se formaran burbujas (Fig. A1). Se dejó polimerizar el gel durante 45 minutos y posteriormente se montó en la cámara de electroforesis, la cual se llenó con Buffer TBE 1X para precorrer por 15 minutos a 1300 volts y así eliminar los excesos de urea.

A los productos de PCR se les agregó un tercio del volumen de buffer de corrida de dos frentes y se preparó la escalera que muestra bandas cada 10 pares de bases (8 partes de buffer de corrida de dos frentes por 2 de escalera). Por último las reacciones de PCR y la escalera se desnaturalizaron por medio de calor en el temociclador a 95° C durante 5 minutos para posteriormente cargarse cada reacción por separado en un pozo del gel. Se cargaron 3 μ l de escalera y 8 μ l de la reacción de PCR.

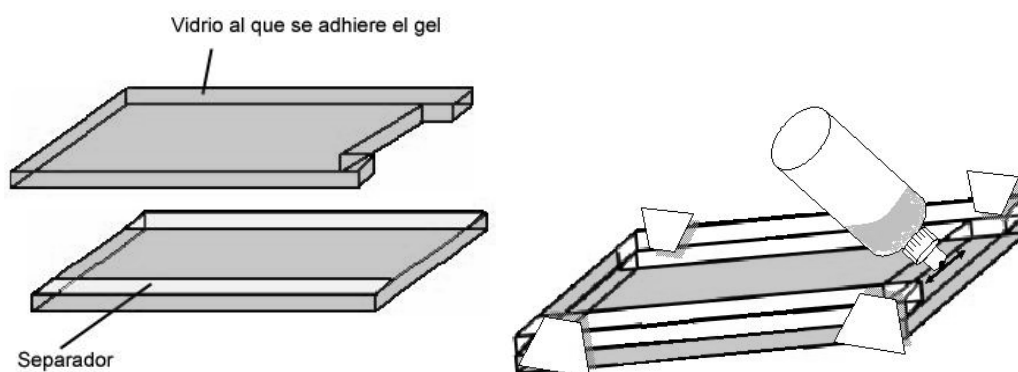


Figura A2.1. Diagrama del montaje del "sándwich" para la preparación del gel de poliacrilamida.

APÉNDICE 3

Tinción con plata de geles de poliacrilamida

Una vez que se corrió el gel se desmontaron los vidrios separándolos con cuidado para así poder teñir el gel sobre el vidrio al que queda adherido. Los pasos que se siguieron en la tinción se describen a continuación:

1. Solución fijadora. 30 minutos en una solución de ácido acético glacial al 10%.
2. Enjuague. Se enjuagó el gel durante 10 minutos en agua destilada.
3. Solución de plata. Esta solución se preparó con 1 g de nitrato de plata y 1.5 ml de formaldehído en un litro de agua destilada, el gel se mantuvo 20 minutos en esta solución.
4. Enjuague. Se enjuagó el gel durante unos segundos en agua destilada.
5. Solución reveladora. Esta solución se preparó con 30 gramos de carbonato de calcio, 1.5 ml de formaldehído, 1 ml de tiosulfato de sodio en un litro de agua destilada; el gel se mantuvo hasta que las bandas fueron visibles.
6. Solución de paro. Una vez que se visualizaron las bandas en el gel este se sometió a la misma solución de ácido acético al 10% que se ocupó en la fijación, esto por alrededor de 5 minutos, después se el gel se enjuagó durante 5 minutos en agua destilada.

El agua destilada que se utilizó se mantuvo en refrigeración para obtener una mejor tinción y evitar que se tiñera el fondo.

Durante todos los pasos el vidrio con el gel se mantuvo en una charola en agitación.

APÉNDICE 4

Tablas de las frecuencias observadas en cuatro loci de microsatélites

Tabla A4.1 Frecuencias por población de los alelos observados en el locus TillGA23.

| <i>Alelo</i> | 125 | 137 | 139 | 141 | 143 | 145 | 147 | 149 | 151 | 153 | 155 | 157 | 159 | 161 | 163 | 165 | 167 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Población I | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.040 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.080 | 0.420 | 0.400 | 0.060 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Población II | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.040 | 0.000 | 0.060 | 0.100 | 0.020 | 0.140 | 0.140 | 0.140 | 0.180 | 0.040 | 0.060 | 0.040 | 0.020 | 0.020 |
| Población III | 0.000 | 0.087 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.043 | 0.065 | 0.109 | 0.000 | 0.130 | 0.326 | 0.174 | 0.043 | 0.022 | 0.000 | 0.000 |
| Población IV | 0.000 | 0.042 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.063 | 0.021 | 0.000 | 0.021 | 0.229 | 0.167 | 0.250 | 0.208 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Población V | 0.095 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.095 | 0.048 | 0.048 | 0.048 | 0.071 | 0.071 | 0.143 | 0.167 | 0.119 | 0.095 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Población VI | 0.000 | 0.000 | 0.100 | 0.060 | 0.020 | 0.060 | 0.040 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.020 | 0.080 | 0.440 | 0.180 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

Tabla A4.2 Frecuencias por población de los alelos observados en el locus TillGT22.

| <i>Alelo</i> | 166 | 168 | 174 | 176 | 178 | 180 | 182 | 184 | 186 | 188 | 190 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Población I | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.020 | 0.180 | 0.220 | 0.300 | 0.240 | 0.040 | 0.000 |
| Población II | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.200 | 0.340 | 0.140 | 0.000 | 0.160 | 0.160 |
| Población III | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.125 | 0.271 | 0.333 | 0.208 | 0.042 | 0.021 | 0.000 |
| Población IV | 0.020 | 0.020 | 0.000 | 0.000 | 0.060 | 0.160 | 0.320 | 0.000 | 0.360 | 0.040 | 0.020 |
| Población V | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.023 | 0.114 | 0.477 | 0.159 | 0.182 | 0.045 | 0.000 |
| Población VI | 0.000 | 0.000 | 0.020 | 0.020 | 0.120 | 0.260 | 0.140 | 0.080 | 0.140 | 0.180 | 0.040 |

Tabla A4.3 Frecuencias por población de los alelos observados en el locus TillCT15.

| <i>Alelo</i> | 140 | 142 | 144 | 146 | 148 | 151 | 153 | 155 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Población I | 0.000 | 0.220 | 0.540 | 0.240 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Población II | 0.000 | 0.320 | 0.400 | 0.160 | 0.120 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Población III | 0.000 | 0.174 | 0.391 | 0.326 | 0.109 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Población IV | 0.020 | 0.320 | 0.440 | 0.160 | 0.060 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Población V | 0.000 | 0.500 | 0.440 | 0.020 | 0.000 | 0.020 | 0.020 | 0.000 |
| Población VI | 0.000 | 0.040 | 0.320 | 0.500 | 0.100 | 0.000 | 0.020 | 0.020 |

Tabla A4.1 Frecuencias por población de los alelos observados en el locus TillCT20.

| <i>Alelo</i> | 179 | 187 | 189 | 191 | 193 | 195 | 197 | 199 | 201 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Población I | 0.000 | 0.080 | 0.180 | 0.000 | 0.480 | 0.160 | 0.080 | 0.000 | 0.020 |
| Población II | 0.000 | 0.000 | 0.020 | 0.020 | 0.080 | 0.340 | 0.340 | 0.200 | 0.000 |
| Población III | 0.020 | 0.040 | 0.080 | 0.020 | 0.380 | 0.180 | 0.160 | 0.120 | 0.000 |
| Población IV | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.600 | 0.120 | 0.180 | 0.100 | 0.000 |
| Población V | 0.000 | 0.040 | 0.160 | 0.440 | 0.200 | 0.020 | 0.060 | 0.080 | 0.000 |
| Población VI | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.020 | 0.460 | 0.160 | 0.180 | 0.180 | 0.000 |

LITERATURA CITADA

- Andrewartha, H.G. y Birch, L. C. (1954). The Distribution and Abundance of Animals. Chicago, University Chicago Press.
- Benzing, D. H. (1990). Vascular epiphytes: general biology and related biota. New York, Cambridge University Press. 354 pp.
- Bernal, R. (2006). Estudio metapoblacional de *Tillandsia recurvata* L. en el Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biologicas, Facultad de Ciencias. México, UNAM. 169 pp.
- Bernal, R., Valverde, T. y Hernández, L. (2005). Habitat preference of the epiphyte *Tillandsia recurvata* (Bromeliaceae) in a semi-desert environment in Central Mexico. Canadian Journal of Botany, **83**: 1238-247.
- Boneh, L., Kuperus, P. y van Tienderen, P. H. (2003). Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. Molecular Ecology Notes, **3**: 302–303.
- Bornet, B. y Branchard, M. (2001). Non anchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genomic fingerprints. Plant Molecular Ecology Biology Reporter, **19**: 209-215.
- Brown, A. H. D. y Weir, B. S. (1983). Measuring genetic variability in plant populations. 219-239. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part, A. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Byers, D. S. (1967). Climate and hidrology en. 48-65 pp. Byers, D. S. ed. The prehistory of the Tehuacan Valley. University of Texas Press. Austin. Volumen 1. Environment and subsistence.
- Callaway, R. M., Reinhart, K. O., Moore, G. W., Moore, D. J. y Pennings, S. C. (2002). Epiphyte host preferences and host traits: mechanisms for species-specific interactions. Oecologia, **132**: 221–230.
- Cruzan, M. B. (1998). Genetic markers in plant evolutionary ecology. Ecology, **79**: 400-412.

- Chase, M., Kesseli, R. y Bawa, K. (1996). Microsatellites markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany*, **83**: 57-57.
- Dahlgren, J. P. y Ehrlen, J. (2005). Distribution patterns of vascular plants in lakes - the role of metapopulation dynamics. *Ecography*, **28**: 49-58.
- Ehrlen, J. y Eriksson, O. (2003). Large-scale spatial dynamics of plants: a response to Freckleton & Watkinson. *Journal of Ecology*, **91**: 316-320.
- Escalante, A. H. (2001). Estructura genética de *Pinus pinceana* usando como marcadores moleculares microsatélites de cloroplasto (cpSSR's). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. México, UNAM. 97 pp.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M. y Cornuett, J. M . (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, **140**: 679-695.
- Excoffier, L., Laval, G. y Scheneider, S. (2005). Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47-50.
- Fontaine, P. M., Dodson, J., Bernatchez, L. y Slettan, A. (1997). A genetic test of metapopulation structure in Atlantic salmon (*Salmon salar*) using microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 2434-2442.
- Freckleton, R. P. y Watkinson, A. R. (2002). Large-scale spatial dynamics of plants: metapopulations, regional ensembles and patchy populations. *Journal of Ecology*, **90**: 419-434.
- García, E. (1981). Modificaciones al sistema climático de Köppen. México, Instituto de Geografía, UNAM. 239 pp.
- García, M. D., Rico, V. y Serrano, H. (2003). Distribution and abundance of *Tillandsia* spp. (Bromeliaceae) in the Zapotitlán Valley, Puebla, México. *Plant Ecology*, **166**: 207-215.
- Goldstein, D. B. y Schlötterer, C. (2001). Microsatellites. Evolution and applications. Oxford, Oxford University Press. 352 pp.

- González-Astorga, J., Cruz-Angón, A., Flores-Palacios, A. y Vovides, A. P: (2004). Diversity and genetic structure of the mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceaa). *Annals of Botany*, **94**: 545-551.
- Hamrick, J. L y Godt, M. J. W (1989). Allozyme diversity in plants. 43-63. En: Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. y Weir, B. S. (eds.). *Plant population gentics, breeding and genetic resources*. Sinauer Press. Sunderland, Massachusetts.
- Hamrick, J. L y Godt, M. J. W (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil Trans R Soc London B*, **351**: 1291-1298.
- Hamrick, J. L y Nason, A. D. (1996). Consequence of dispersal in plants. 203-236. En: Rhodes, O. E. Jr. y Chesser, R. K. (eds.). *Population ecology in space and time*. The University of Chicago Press. Chicago.
- Hamrick, J. L., Murawski, D. A. y Nason, A. D. (1993). The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio*, **107-108**: 281-297.
- Hanski, I. (1991). Single-species metapopulation dynamics: concepts, models and observations. *Biological Journal of the Linnean Society*, **42**: 17-38.
- Hanski, I. (2002). *Metapopulation ecology*. Oxford, Oxford University Press. 313 pp.
- Hanski, I. y Gilpin, M. E. (1997). *Metapopulation biology: ecology, genetics and evolution*. San Diego, California, Academic Press. 511 pp.
- Harrison, S. (1991). Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **42**: 72-88.
- Hartl, D. L. y Clark, A. G. (1997). *Principles of population genetics*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. 542 pp.
- Hastings, A. y Harrison, S. (1994). Metapopulation dynamics and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **25**: 167-188.
- Hedrick, P. W. (2000). *Genetics of population*. Sudbury, Massachusetts, Jones and Bartlett Publishers. 553 pp.

- Hernández, L. (2003). Patrón de germinación y establecimiento de plántulas de *Tillandsia recurvata* L.: una contribución al estudio de su dinámica metapoblacional. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. México, UNAM. 71 pp.
- Howe, H. F. y Samllwood, J. (1982). Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **13**: 201-228.
- Husband, B. C. y Barrett, S. C. H. (1996). A metapopulation perspective in plant population biology. *Journal of Ecology*, **84**: 461-469.
- Husband, B. C. y Barrett, S. C. H. (1998). Spatial and temporal variation in population size of *Eichhornia paniculata* in ephemeral habitats: implications for metapopulation dynamics. *Journal of Ecology*, **86**: 1021-1031.
- Jäkäläniemi, A., Tuomi, J., Siikamäki, P. y Kilpiä, A. (2005). Colonization-extinction and patch dynamics of the perennial riparian plant, *Silene tatarica*. *Journal of Ecology*, **93**: 670-680.
- Jones, T. H, Vaillancourt, R. E. y Potts, B. M. (2007). Detection and visualization of spatial genetic structure in continuous *Eucalyptus globulus* forest. *Molecular Ecology Notes*, **16**: 697–707.
- Karp, A., Isaac, P. G. y Ingram, D. S. (1998). Molecular tools for screening biodiversity. Londres, Chapman & Hall. 498 pp.
- Levins, R. (1969). Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America*, **15**: 237-240.
- Lyons, B., Nadkarni, N. M. y North, M. P. (2000). Spatial distribution and succession of epiphytes on *Tsuga heterophylla* (western hemlock) in an old-growth douglas-fir forest. *Canadian Journal of Botany*, **78**: 957-967.
- Madison, M. (1977). Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. *Selbyana*, **2**: 1-13.
- Montaña, C., Dirzo, R. y Flores, A. (1997). Structural parasitism of an epiphytic Bromeliad upon *Cerdidium praecox* in an Inertropical semiarid ecosystem. *Biotropica*, **29**: 517-521.

- Moynihan, J., Meerow, A. W. y Francisco-Ortega, J. (2007). Isolation, characterization and cross-species amplification of microsatellite loci in the cycad genus *Dioon* (Zamiaceae). Potential utilization in population genetics studies of *Dioon edule*. *Molecular Ecology Notes* **7**: 72-74.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106**: 283-292.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press. 512 pp.
- Nei, M. y Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**: 5269-5273.
- Newman, R. A. y Squire, T. (2001). Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology*, **10**: 1087–1100.
- Olivieri, I., Michalakis, Y. y Gouyon, P. H. (1995). Metapopulation genetics and evolution dispersal. *The American Naturalist*, **146**: 202-228.
- Ouborg, N. J., Piquot, Y. y Van Groenendael, M. (1999). Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*, **87**: 551-568.
- Overton, J. M. (1994). Dispersal and infection in mistletoe metapopulations. *Journal of Ecology*, **82**: 711-723.
- Parker, G. P., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C. y Fuerst, P. A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, **79**: 361-382.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288-295.
- Pittendrigh, C. S. (1948). The bromeliad-anopheles-malaria complex in Trinidad. I- the bromeliad flora. *Evolution*, **2**: 58-89.

- Pollux, B. J. A. , Jong, M. D. E., Steegh, A. , Verbruggen, E. , Van Groenendael, J. M. y Ouborg, N. J. (2007). Reproductive strategy, clonal structure and genetic diversity in populations of the aquatic macrophyte *Sparganium emersum* in river systems. *Molecular Ecology*, **16**: 313–325.
- Pulliam, H. R. (1988). Sources, sinks, and population regulation. *The American Naturalist*, **132**: 652-661.
- Raymond, M. y Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.
- Rousset, F. y Raymond, M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, **140**: 1415-1419.
- Rzedowski, G. C. y Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. Pátzcuaro, Michoacán, CONABIO. 1406 pp.
- Sato, T., Isagi, Y., Sakio, H. y Goto, S. (2006). Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. *Heredity*, **96**: 79-84.
- Schueler, S., Tusch, A. y Scholz, F. (2006). Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. *Molecular Ecology*, **15**: 3231–3243.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Secretaría de Manejo de Recursos Naturales. (2003). "Diagnóstico de los recursos forestales no maderables y maderables no tradicionales de zonas áridas y semiáridas en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca." de www.semarnat.gob.mx.
- Silvertown, J. W. y Lovett, J. (1995). Introduction to plant population biology. Oxford, Blackwell Science. 210 pp.
- Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, **39**: 53-65.
- Slatkin, M. (1995). A Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**: 457-462.
- Snäll, T., Ehrlen, J. y Rydin, H. (2005a). Colonization-extinction dynamics of an epiphyte metapopulation in a dynamic landscape. *Ecology*, **86**.

- Snäll, T., Fogelqvist, J., Ribeiro JR, P. J. y Lascoux, M. (2004). Spatial genetic structure in two congeneric epiphytes with different dispersal strategies analysed by three different methods. *Molecular Ecology*, **13**: 2109–2119.
- Snäll, T., Pennanen, J., Kivistö, L. y Hanski, I. (2005b). Modelling epiphyte metapopulation dynamics in a dynamics forest landscape. *Oikos*, **109**: 209-222.
- Snäll, T., Ribeiro, P. J. y Rydin, H. (2003). Spatial occurrence and colonisations in patch-tracking metapopulations: local conditions versus dispersal. *Oikos*, **103**: 566–578.
- Soltis, D. E., Gilmartin, A. M., Rieseberg, L. y Gardner, S. (1987). Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionatha* and *Tillandsia recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, **74**: 531-537.
- Squirrel, J., Hollingsworth, P. M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A. J., Gibby, M. y Powell, W. (2003). How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology*, **12**: 1339–1348.
- Thomas, C. D. (1994). Extinction, colonization, and metapopulation: environmental tracking by rare species. *Conservation Biology*, **8**: 373-378.
- Tremblay, R. L. y Ackerman, J. D. (2001). Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society*, **72**: 47–62.
- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Del Coro, M., Villaseñor, J. L. y Ortega, J. (2000). La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Botánica*, **67**: 24-74.
- Valverde, T. y Silvertown, J. (1997). A metapopulation model for *Primula vulgaris*, a temperate forest understorey herb. *Journal of Ecology*, **85**: 193-210.
- Walser, J. D., Holderegger, R., Gugerli, F., Hoebee, S. E. y Scheidegger, C. (2005). Microsatellites reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. *Molecular Ecology*, **14**: 457–467.
- Wang, B. C. y Smith, T. B. (2002). Closing the seed dispersal loop. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**: 379-385.

- Watkinson, A. R., Freckleton, R. P. y Forrester, L. (2000). Population dynamics of *Vulpia ciliata*: regional, patch and local dynamics. *Journal of Ecology*, **88**: 1012-1029.
- Wehncke, E. V. (2004). Ecología de la dispersión de semillas por primates del género *Cebus* (cebiidae). Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Ecología. México, UNAM. 165 pp.
- Weir, B. S. y Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.
- Willson, M. F. (1993). Dispersal mode, seed shadows, and colonization patterns. *Vegetatio*, **107-108**: 261-280.
- Winkler, M., Hülber, K. y Hietz, P. (2005). Effect of canopy position on germination and seedling survival epiphytic bromeliads in a mexican humid montane forest. *Annals of Botany*, **95**: 1039-1047.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**: 97-159.
- Wright, S. (1940). Breeding structure of populations in relation to speciation. *The American Naturalist*, **74**: 222-231.
- Zavala-Hurtado, J. A. (1982). Estudio ecológico en el valle semiárido de Zapotitlán, Puebla. I. Clasificación numérica de la vegetación basada en atributos binarios de presencia o ausencia de las especies. *Biótica*, **7**: 99-120.