



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Variación genética de *Taxodium mucronatum* en las
cuencas de México

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARIANA SUSANA HERNÁNDEZ LEAL



DIRECTOR DE TESIS:
DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
2009



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.



FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO ARRIAGA GONZALEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

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

"Variación genética de *Taraxacum macronatum* en las cuencas de México".

realizado por **Hernández Leal Mariana Susana** con número de cuenta **3-0181975-0** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Propietario Dr. David Sebastián Germán

Propietario Tutor Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Suplente Dra. Alejandra Vázquez Lobo Yurén

Suplente Biol. Jaime Guaca Pineda

Atestamos,

"POR MI REINA HARÁ EL ESPORTE"

Ciudad Universitaria, D. F., a 05 de noviembre de 2008

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOL.

Dr. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor titular; 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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Hernández

Leal

Mariana Susana

53 79 11 05

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

301819750

2. Datos del tutor

Dr Daniel Ignacio

Piñero

Dalmau

3. Datos del sinodal 1

Dr Luis

Eguiarte

Fruns

4. Datos del sinodal 2

Dr David Sebastián

Gernandt

5. Datos del sinodal 3

Dra Alejandra

Vázquez Lobo

Yurén

6. Datos del sinodal 4

Biól Jaime

Gasca

Pineda

7. Datos del trabajo escrito

Variación genética de *Taxodium mucronatum* en las cuencas de México

57p

2009

Agradecimientos

A mis padres Susana y Miguel Fernando y mis hermanos Zaolene y Miguel de Jesús por haberme apoyado siempre.

A mi tutor el Dr. Daniel Piñero por haber sido una gran guía en mi entendimiento de la Biología, la evolución y de la vida en general.

A la Dra Alejandra Vazquez-Lobo Yuren por ser mi tutora honoraria y una gran maestra y amiga, por haber mostrado tanto interes en este proyecto aunque los ahuehuetes no cooperaran mucho

A mis compañeros del laboratorio de Genética y evolución por sus comentarios, recomendaciones y música y por soportar mis neurosis con la limpieza del laboratorio.

A Oscar Rodríguez Ávila por su apoyo en el trabajo de laboratorio

A mis amigos de toda la carrera Ana, Andres, Diana, Isa, Lore, Jorge, Martha, por todas las aventuras que hemos pasado y por siempre brindarme sonrisas y aliento cuando los necesite.

A mi querida amiga Liliana, por todas las desveladas trabajando mucho y no tanto, los viajes a tierras lejanas y todas las aventuras que nos falta por cumplir.

A mis Sinodales Dr. Luis Eguiarte, Dr. David Gernandt y Jaime Gasca por revisar este trabajo y por sus muy valiosas observaciones acerca de este proyecto.

Resumen

La variación genética de *T. mucronatum* (Ahuehuete o Sabino) se encuentra poco estudiada. Esta especie se distribuye a lo largo del margen de ríos y lagos desde el sur de EUA hasta Guatemala.

Con este estudio se analizó la variación genética del DNA de cloroplasto en *T. mucronatum* así como los procesos demográficos que pudieron haber operado en las poblaciones para relacionarlos tanto con cambios climáticos como con la hidrografía de las cuencas en las cuales se encuentran las poblaciones. Se secuenció el DNA de 104 individuos provenientes de 7 poblaciones utilizando el espaciador *psbM-trnD*, se encontraron 7 haplotipos diferentes con los cuales se obtuvieron los índices de diversidad genética: $Hd=0.4617$, $\pi=0.000874$ y $\theta=0.001346$; además se obtuvo una red de haplotipos y una distribución *mismatch* con una curva pronunciada. Estos análisis concluyeron en una posible expansión poblacional durante el Pleistoceno hace 3.7×10^5 años. Periodo en el cual hubo un aumento en las precipitaciones y la humedad de la zona de estudio. Por medio de una búsqueda en la base de datos del GenBank se pudo determinar que el haplotipo ancestral no era el más frecuente.

El estadístico de prueba F_{ST} mostró la existencia de una diferenciación entre la población de Amado Nervo con respecto a las demás. Tanto la prueba de F_{ST} y S_{NN} mostraron diferenciación entre la población de Viveros de Coyoacán con respecto a las demás excepto con la de Maravatio

Abstract

The genetic variation of *Taxodium mucronatum* has been poorly studied. This species is distributed along river and lake margins from southern United States to Guatemala. This study analysed the genetic variation in chloroplast DNA of *T. mucronatum*, as well as the demographic processes that could have operated within its populations to relate them with both the climate changes and the hydrography of the basins where these populations are found. DNA sequences for the *psbM-trnD* spacer were obtained from 104 individuals belonging to 7 populations. Seven haplotypes were found, from which the genetic diversity indexes were obtained: $Hd=0.4617$, $\pi=0.000874$ and $\theta=0.001346$. A haplotype network was obtained, as well as a prominently curved mismatch distribution. These analyses lead to the conclusion of a possible population growth during the Pleistocene around 3.7×10^5 years ago.

During this period there was an increase in precipitation and humidity in the area of study. From a GenBank database query it could be determined that the ancestral haplotype was not the most common. The F_{ST} test statistic showed a differentiation of Amado Nervo in relation to all the other populations. Both the F_{ST} and S_{NN} showed positive values between Viveros de Coyoacan and the other populations, except for Maravatio.

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estructura de las poblaciones	2
1.2 Estimadores de la diferenciación poblacional	3
1.3 Filogeografía	4
1.4 diversidad genética	4
1.5 Demografía histórica	5
1.5.1 Árboles de genes y redes de haplotipos	6
1.5.2 Tamaños de muestra grandes	7
1.5.3 La distribución de frecuencias pareadas o <i>mismatch</i>	8
1.5.4 Pruebas de neutralidad	10
1.5.5 Tamaño efectivo de la población y diversidad haplotípica	11
1.5.6 Modelo Bayesiano de trazo horizontal	11
1.6 Antecedentes	11
1.6.1 Variación genética del cloroplasto	11
1.6.2 <i>Taxodium mucronatum</i>	12
1.6.3 Perfil geológico de la Meseta Central de México	17
1.7 Predicciones	20
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y METODOS	22
3.1 Colecta del material	22
3.2 Extracción de DNA	23
3.3 Demografía histórica	24
3.3.1 La distribución de frecuencias pareadas o <i>mismatch</i>	24
3.3.2 Red de haplotipos	24
3.3.3 Pruebas de neutralidad	24
3.4 Estimadores de la diversidad genética	25
3.5 Diferenciación poblacional	25
3.6 Estimación de Reloj Molecular	25
3.7 Tamaño efectivo de la población	25
3.8 Árbol filogenético	25

4. RESULTADOS	26
4.1 Diversidad genética	26
4.2 Estimaciones de la tasa de mutación para el cloroplasto de	27
<i>T. mucronatum</i>	
4.3 Distribución de la frecuencia de las diferencias pareadas (<i>mismatch</i>)	27
4.4 red de haplotipos	28
4.5 Pruebas de neutralidad	30
4.6 Árbol filogenético	31
4.7 Estimadores de la diferenciación poblacional	32
5 DISCUSIÓN	33
5.1 Estimadores de la diversidad genética	33
5.2 Distribución de la frecuencia de las diferencias pareadas (<i>mismatch</i>)	36
5.3 Red de haplotipos	37
5.4 Pruebas de neutralidad	38
5.5 Estimadores de la diferenciación poblacional	39
5.6 Tamaño efectivo de la población	40
5.7 Expansión poblacional	41
5.8 Causas de la poca diversidad genética en árboles longevos	42
6. CONCLUSIONES	44
6.1 Pruebas de neutralidad	44
6.2 Estructuración poblacional	45
7. APÉNDICES	46
8. LITERATURA CITADA	50

1. INTRODUCCIÓN

La estructura genética poblacional de una especie es el resultado de los procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como de la biogeografía histórica de los linajes genéticos. La estructura genética se origina por medio de la interacción entre las diferentes fuerzas evolutivas que a través del tiempo pueden llevar a que las poblaciones se diferencien genéticamente unas de otras. La variación dentro de una población se ve afectada principalmente por tres factores: la mutación, recombinación y el flujo génico. Las mutaciones introducen nueva variación genética, siendo la principal causa de la evolución. Sobre esta variación actúan las fuerzas de la deriva génica y la selección, la primera reduce la variación existente mientras que la segunda puede reducirla o mantenerla (Hartl y Clark 1997).

La deriva génica y la selección natural son las dos causas potenciales más importantes del cambio en las frecuencias alélicas influyendo en la diferenciación de las poblaciones. La deriva génica se interpreta como cambios al azar en las frecuencias de los alelos o de los haplotipos de una generación a otra debido al tamaño finito de las poblaciones. Mientras más pequeña sea una población la deriva génica actuará más rápido fijando o desapareciendo un alelo de la población (Futuyma, 2005). Por otra parte, la selección natural es el proceso por el cual los alelos en ciertas combinaciones genotípicas, aumentan la sobrevivencia y la reproducción de los individuos, lo cual lleva a que incrementen gradualmente su frecuencia en generaciones sucesivas dentro de una población. El mejoramiento progresivo en las poblaciones como resultado de la selección natural, constituye el proceso de la adaptación (Hartl y Clark, 1997). La selección natural esta basada en los supuestos de que:

- En todas las especies, se produce más descendencia de la que puede sobrevivir y llegar a reproducirse.
- Los organismos difieren en su habilidad para sobrevivir y reproducirse.
- En cada generación, los genotipos que promueven la sobrevivencia son más probables de llegar a la edad reproductiva por lo tanto, contribuyen desproporcionalmente a la descendencia de la siguiente generación.

1.1 Estructura de las poblaciones

Las poblaciones naturales generalmente no se encuentran completamente aisladas, sino que regularmente intercambian genes unas con otras en menor o mayor grado. Este fenómeno se conoce como flujo génico y homogeniza a las subpoblaciones de una especie. (Futuyma, 2005). Por otro lado, cuando una especie llega a tener una distribución muy amplia, puede ocupar sitios donde se originan barreras geográficas que impiden la migración de genes, lo cual subdivide a las poblaciones y lleva a una diferenciación selectiva entre las mismas (Hedrick, 2005).

La variación genética está estructurada no sólo por las fuerzas contemporáneas de flujo génico sino también por patrones históricos de relaciones entre las poblaciones ya que si, entre dos especies o poblaciones termina por completo el intercambio genético, el único determinante de similitud genética entre ellas serían los ancestros en común (Schaal *et al.*, 1998). En plantas, el flujo génico ocurre a través del movimiento de semillas y polen.

Al estudiar la variación a partir de la estructura genética de las poblaciones se pueden conocer las asociaciones históricas y procesos de reestructuración genética que pueden conducir a la especiación (Kirchman *et al.*, 2000). La variación en el tamaño efectivo de las poblaciones y las dinámicas de extensión y contracción de áreas de distribución, pueden contribuir a crear diferencias geográficas en la frecuencia de los alelos o haplotipos a través de la deriva génica, cuellos de botella o efectos de fundador (Bensch y Hasselquist, 1999).

El cambio en las frecuencias alélicas también se ve afectado críticamente por la estructura de apareamiento de las poblaciones. Esta estructura de apareamiento también tiene muchas consecuencias para los efectos de la selección natural. La mayoría de las especies se encuentran divididas en poblaciones, dentro de las cuales ocurren la mayoría de los apareamientos. También, los individuos pueden, por varias razones, preferir aparearse con sus parientes, a este fenómeno se le conoce como endogamia, cuyas principales consecuencias son:

- Redistribución de los alelos del estado heterócigo al homócigo. Las frecuencias genotípicas cambian relativamente al equilibrio Hardy-Weinberg, pero por si sola la endogamia no altera las frecuencias alélicas.

- Incremento de la varianza genética de los caracteres fenotípicos dentro de una población (Hedrick, 2005).

1.2 Estimadores de la diferenciación poblacional

Para conocer si una población es diferente de otra dentro de la distribución geográfica de la misma se utiliza el estadístico de F_{ST} , el cual es un estimado que surge a partir de la F de Wright original (Wright, 1951). Ésta nos permite determinar, a partir de la ecuación general de Hardy-Weinberg, si existen desviaciones del equilibrio debidas a que se viola el supuesto de apareamiento al azar (Gillespie, 2004) y se define como una medida de la diferencia que existe entre la probabilidad de tomar al azar dos alelos idénticos dentro de una población y la probabilidad de tomar al azar dos alelos idénticos en toda la especie (Gillespie, 2004).

Si las probabilidades son iguales F_{ST} será 0 y la conclusión será que no hay división entre las poblaciones, entre mayor sea el valor de F_{ST} más grande será la subdivisión. Si F_{ST} alcanza el valor de 1 las poblaciones son completamente diferentes. La probabilidad de que una mutación aparezca en un gameto de un locus es μ , conocida como la tasa de mutación. Cuando ocurre una mutación, se supone que es un único alelo, que difiere por estado de los otros alelos existentes en la población (Gillespie, 2004).

$$F_{ST} \approx \frac{1}{1 + 2N_{\mu}}$$

Otra manera de determinar si existe diferenciación entre dos o más poblaciones es mediante el estadístico del vecino mas cercano S_{nn} (Hudson, 2000), el cual es una medida de con cuanta frecuencia el vecino más cercano de una secuencia pertenece a la misma localidad geográfica (tomando en cuenta las diferencias nucleotídicas). Este estadístico se utiliza cuando los datos genéticos son colectados de muestras de individuos de dos o más localidades. Se asume que los datos haplotípicos provienen de secuencias de DNA o de datos de marcadores fuertemente ligados.

El estadístico toma valores de 0 a 1, por lo tanto un valor de S_{nn} cercano a 1 significa que las *poblaciones* de dos localidades se encuentran altamente diferenciadas entre si; cerca 0.5, cuando las poblaciones de dos localidades son parte de la misma población panmítica y 0

cuando pertenecen a la misma localidad geográfica. Para definir a S_{nn} supongamos que las secuencias de DNA son obtenidas de n individuos de dos diferentes localidades (el estadístico automáticamente toma dos localidades más). Se asume que todas las secuencias tienen la misma longitud sin *gaps* y se enumera cada secuencia arbitrariamente del 1 a n , se denota la secuencia del individuo i como S_i . D_j será el número de sitios nucleotídicos de los cuales S_i difiere de S_j . Por otra parte T_k es el número de vecinos más cercanos al individuo k . Si W_k es igual al número de individuos más cercanos a k que pertenecen a la misma localidad que k . Entonces $X_k = W_k / T_k$. donde, X_k es la fracción de vecinos más cercanos al individuo k que son de la misma localidad a k . X_k será 1 si el vecino más cercano pertenece a la misma localidad y 0 si pertenece a otra localidad. S_{nn} es simplemente el promedio de X_k (Hudson, 2000).

$$S_{nn} = \sum_{j=1}^n X_j / n$$

1.3 Filogeografía

La filogeografía es una rama de la biogeografía que trata de los procesos que rigen las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos o filogenéticos, principalmente dentro y entre especies con relaciones cercanas. Esta disciplina tiene que ver con la distribución espacial de los linajes de genes así como de eventos históricos y filogenéticos. Para poder analizar e interpretar la información en los genes se requiere de datos provenientes de disciplinas como la genética molecular y de poblaciones, la etología, la demografía, la sistemática filogenética, la paleontología, la geología y la geografía histórica. Esto hace que la filogeografía sea una disciplina integrativa (Avice, 2000).

1.4 Diversidad genética.

Existen diferentes formas de estimar la diversidad genética de una población. Uno de los estimadores, es π que mide la cantidad de variación nucleotídica en una población determinando la proporción de diferencias nucleotídicas que existen entre pares de secuencias y las pondera con la frecuencia de las mismas, se calcula como:

$$\pi = \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$$

En donde: p_i es la frecuencia de la secuencia, i , π_{ij} son la proporción de nucleótidos diferentes entre las secuencias i y j (Hedrick, 2005).

Otro estimador es θ , el cual mide la variación bajo el modelo neutral $\theta = 2Ne\mu$ para los genomas u organismos haploides, donde Ne es el tamaño efectivo de la población y μ es la tasa de mutación por gen por generación. (Hedrick, 2005). En el modelo neutral (Kimura, 1968), donde se supone que $\pi \approx \theta$, la gran mayoría de las sustituciones alélicas no son selectivamente ventajosas sobre las anteriores y por esta razón los polimorfismos moleculares y la variación son mantenidos por la mutación al mismo tiempo que son eliminadas por la deriva génica.

Diversidad haplotípica

Otro método para inferir la diversidad genética de una población a partir de datos de árboles de genes es la diversidad haplotípica.

$$H_d = 1 - \sum f_i^2$$

Donde f_i es la frecuencia del haplotipo i .

La diversidad haplotípica condensa la información acerca de los estados (alelos) y sus frecuencias de diferentes alelos en un locus, en lugar de la relación entre sus secuencias (Avise, 2000).

1.5 Demografía histórica

Uno de los objetivos de la biogeografía histórica es la reconstrucción de la historia de los linajes en espacio y tiempo. Es probable que cuando se presentan nuevas oportunidades en un nicho o cuando la población se recupera de un cuello de botella, muchas especies experimenten incrementos en su tamaño poblacional. En este tipo de poblaciones que tienen

un crecimiento rápido a partir de un pequeño número de individuos, es posible anticipar una filogenia de estrella con muchos linajes rastreados a un tiempo cercano a la expansión inicial de la población (Slatkin y Hudson, 1991).

La demografía de poblaciones nos permite detectar procesos que sucedieron en el pasado y que han dejado huella en las poblaciones actuales (Templeton, 2006).

1.5.1 Árboles de genes y redes de haplotipos

Dada una muestra de genes, la relación entre ellos puede ser trazada hacia atrás en el tiempo hasta el gen ancestral común. El camino genealógico que interconecta dicha muestra hasta el ancestro común es lo que se conoce como un árbol de genes. Un árbol de genes es un *pedigrí* de un grupo de genes que existe independientemente del potencial de mutación. La única porción de un árbol de genes que puede ser potencialmente estimada con datos genéticos es la porción marcada por un evento mutacional que define a los diferentes alelos. Este árbol de resolución más baja es el árbol de alelos o árbol de haplotipos (Figura 1) (Posada y Crandall, 2001). Los árboles de haplotipos no muestran información sobre la genealogía y sólo se limitan a mostrar los fragmentos de DNA que muestran diferencias entre las secuencias como por ejemplo: inserciones, deleciones o sustituciones nucleotídicas (Figura 2). Las redes de haplotipos, a diferencia de los árboles de genes, muestran las relaciones evolutivas entre un haplotipo y otro, sin orientación temporal de los eventos mutacionales, es por esta razón que se les conoce como árboles no enraizados (Templeton, 2006).

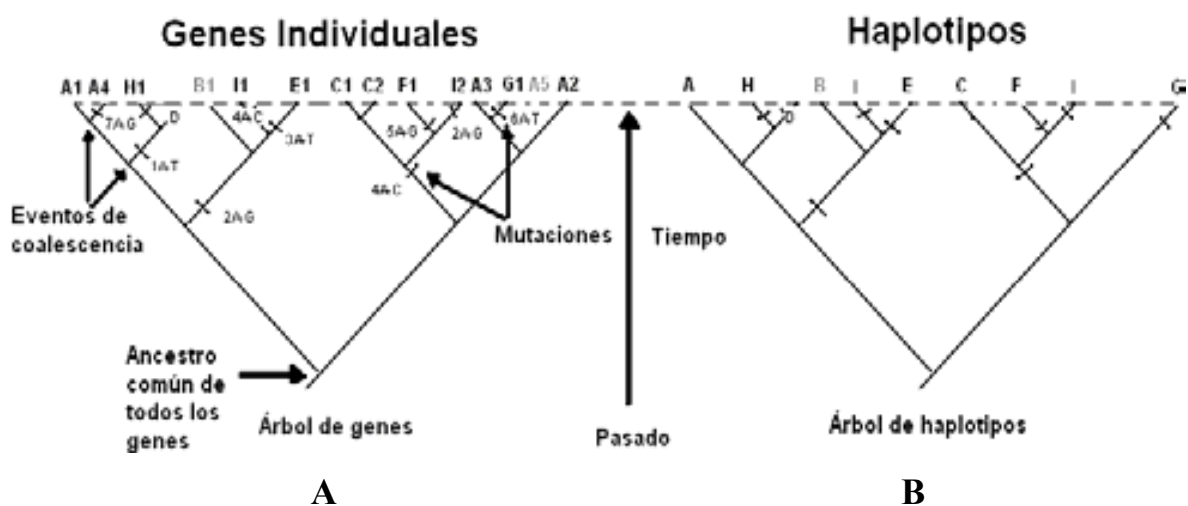


Figura 1 a) árbol de genes b) árbol de haplotipos. Tomado de Posada y Crandall, 2001.

El punto en el cual dos alelos encuentran el ancestro común más cercano se conoce como coalescencia (Hedrick, 2005). La teoría de la coalescencia describe la ancestría genética de una muestra y así poder hacer predicciones acerca de los patrones de la variación genética. La ancestría genética de una muestra, es decir la genealogía genética, es un grupo de relaciones ancestrales entre miembros de una muestra, que incluye tiempos de ancestría común (Wakeley, 2005).

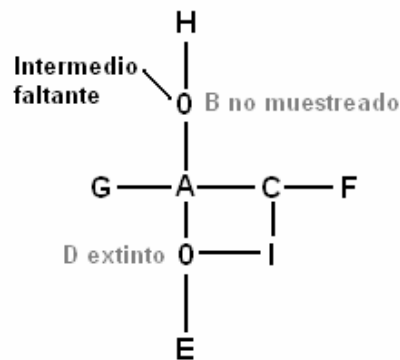


Figura 2. Red de haplotipos construida a partir del método de parsimonia estadística (Posada y Crandall, 2001).

1.5.2 Tamaños de muestra grandes

Un muestreo apropiado es crucial para un estudio filogenético. Típicamente, los estudios intraespecíficos requieren de muchos individuos para una comparación. Debido a la densidad de muestreo, especialmente cuando está aunada a una baja diversidad en la muestra, es frecuente que los juegos de datos intraespecíficos alcancen un tamaño de muestra considerable (>100), el cual requiere un tiempo de análisis computacional excesivo. Para este tipo de muestras es necesario el uso de métodos filogenéticos que permitan tomar en cuenta fenómenos como: nodos ancestrales persistentes, multifurcaciones y reticulaciones. La ventaja de las redes sobre los árboles estrictamente bifurcantes es que las redes describen de manera efectiva los procesos que actúan a nivel de especie, también proveen una forma de representar más de la información filogenética presente en los datos como por ejemplo: la presencia de *loops* en la red puede indicar un evento de recombinación o pueden ser producto de la homoplasia e indicar la ocurrencia de mutaciones reversas o paralelas. La mayoría de los métodos para la construcción de redes están basados en los métodos de distancia, los cuales

minimizan la distancia (número de mutaciones) entre los haplotipos (Posada y Crandall, 2001).

1.5.3 La distribución de frecuencias pareadas o mismatch

Cuando el tamaño de muestra lo permite, se pueden inferir aspectos de la historia reciente de las poblaciones al llevar a cabo análisis basados en la teoría de coalescencia (Slatkin y Hudson, 1991), la cual proporciona métodos para detectar eventos en el pasado de las poblaciones, tales como el incremento exponencial en tamaño (Zink y Blackwell-Rago, 2000).

La distribución *mismatch* es una representación gráfica del número de diferencias pareadas entre todas las secuencias de DNA en una muestra. En una población, la probabilidad de que dos genes neutrales difieran en i sitios nucleotídicos en t generaciones reflejará un equilibrio constante. Si una población se encuentra estacionaria por mucho tiempo, estas distribuciones de secuencias no recombinantes de DNA muestran un comportamiento errático y multimodal, mientras que las poblaciones que sufrieron un crecimiento generan distribuciones *mismatch* suaves y con un pico o unimodales (Figura 3). La posición de este pico refleja el tiempo de crecimiento de la población (Harpending, 1994). Si la población en un principio fue pequeña, la caída de la curva será más abrupta. Mientras mayor sea el incremento del tamaño poblacional, la altura de la curva será menor (Rogers y Harpending, 1992).

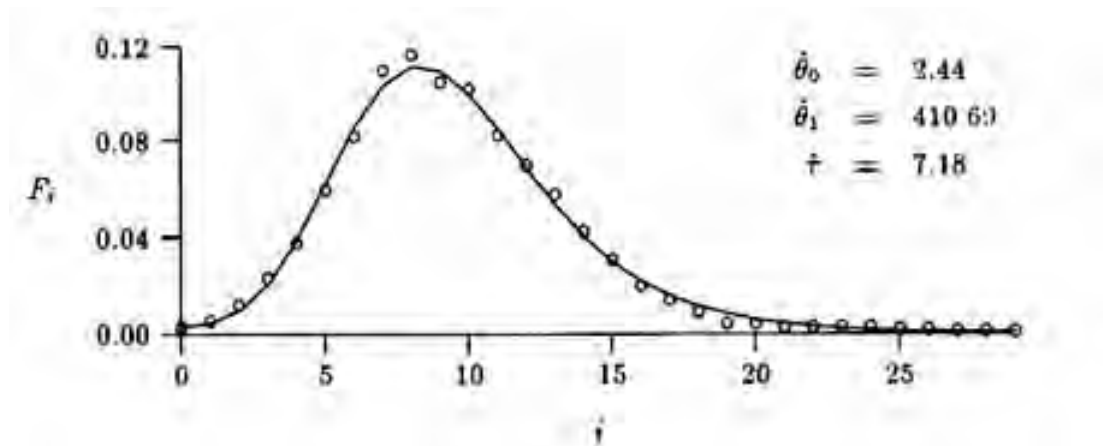


Figura 3. Modelo de una expansión repentina tomado de Cann et al. (1987). Los círculos muestran la distribución observada de las diferencias de los sitios de diferencias pareadas. La línea se obtuvo por medio de θ_0 (valor antes de la expansión) θ_1 , (valor después de la expansión) y la τ (tiempo mutacional a la divergencia) usando el método de mínimos cuadrados no lineales, i es el número de diferencias pareadas y F_i la frecuencia de las diferencias pareadas.

El número de las diferencias pareadas dentro de las secuencias indica el tiempo que ha transcurrido desde que las secuencias divergieron. El tiempo mutacional a la divergencia se denomina como τ , y se define como $\tau = 2\mu t$, en donde t es el tiempo en generaciones y μ es la tasa de mutación, las unidades de τ son $(1/2) \mu$ generaciones (Rogers y Harpending, 1992). Después de τ unidades de tiempo mutacional un par de individuos al azar diferirán en i sitios.

Cuando una población que se encuentra en equilibrio $\theta = \theta_0$ crece rápidamente (o se encoje) hasta $\theta = \theta_1$ se puede decir que la población sufrió un evento demográfico. Este crecimiento espontáneo se supone que ocurrió en τ unidades de tiempo mutacional en el pasado. En la ecuación (1) sustituyendo $\theta = \theta_0$ de la población en equilibrio y $\theta = \theta_1$ en la ecuación (2) obtendremos una distribución similar a la gráfica de la fig. 3. $F_i(\tau)$ es la probabilidad de que dos individuos difieran por i sitios en el tiempo τ (Rogers y Harpending, 1992).

$$\hat{F}_i \approx \frac{\theta^i}{(\theta + 1)^{i+1}} = \hat{F}_0(1 - \hat{F}_0)^i \quad (1)$$

$$F_i(\tau) = \hat{F}_i + e^{-\tau(1+\theta)} \sum_{j=0}^i \frac{\tau^j}{j!} (F_{i-j}(0) - \hat{F}_{i-j}) \quad (2)$$

Con este enfoque es posible discernir si la estructura genética presente en los patrones filogeográficos de una especie corresponde a procesos demográficos y eventos históricos antiguos, o bien es el resultado de procesos recientes que han continuado a lo largo de la historia de la especie (Avice, 2000). Los episodios de crecimiento y disminución poblacional dejan huella en la distribución de las diferencias entre los individuos de una población. Esto es debido a que una disminución poblacional causa pérdida de la diversidad de secuencias y el crecimiento provoca la retención de secuencias que de otra forma se hubieran perdido. Estas huellas se observan en histogramas donde se muestran las frecuencias relativas de pares de individuos que difieren en determinados sitios nucleotídicos (*mismatch*) (Rogers y Harpending 1992).

1.5.4 Pruebas de neutralidad

Prueba D de Tajima

Bajo el modelo de sitios infinitos, el cual asume que el número de sitios nucleotídicos es tan grande que cada nueva mutación sucede en un sitio nucleotídico que no haya mutado antes (Kimura, 1969), la probabilidad de que π se encuentre en estado neutral es:

$$E(\pi)=\theta$$

En donde $\theta=2N\mu$ para organismos o genomas haploides. Bajo el equilibrio neutral estos dos estimados, a pesar de reflejar diferentes tipos de información, debieran de dar valores similares. Los estimados relacionados con la cantidad de diversidad (θ , π) son similares a la medida de la heterocigosidad y no se encuentran influenciados por la presencia de alelos raros (únicos), a su vez el estimado de sitios segregantes (θ_S) cuenta de igual manera a todos los sitios segregantes y es fuertemente influenciado por la presencia de alelos raros. Como resultado, Tajima (1989) desarrolló una prueba para comparar las diferencias entre estos dos estimados donde $D = \theta_{\pi} - \theta_S$. Si la población se encuentra en equilibrio neutral entonces el valor D_T debe de ser cero (Hedrick, 2005).

Prueba D de Fu y Li

La prueba de neutralidad propuesta por Fu y Li (1993), utiliza el modelo de Tajima (1989), con lo que predice la relación entre θ y el número de “mutaciones externas”. Una mutación externa es una mutación que ocurre en una rama de la genealogía de los genes que termina en el alelo observado (una rama externa o terminal). La observación que Fu y Li hicieron fue que el número esperado de mutaciones externas es θ , independientemente del tamaño de la muestra. La prueba está basada en la idea de que la selección afectará el número de ramas exteriores o *singletons*, más de lo que afecta a las interiores. Fu y Li diseñaron estadísticos de prueba para la bondad de ajuste entre los números observados y esperados de mutaciones externas. Esta prueba tiene algunas ventajas sobre la prueba de Tajima. Aun así esta última, en general, es la mejor alternativa para probar hipótesis de barridos selectivos, cuellos de botella o subdivisiones de las poblaciones (Hartl y Clark, 1997).

1.5.5 Tamaño efectivo de la población y diversidad haplotípica

Si dos copias de un gen tienen un ancestro común t_{CA} generaciones atrás, y ese linaje experimenta un promedio de μ mutaciones por generación, entonces cada uno de los linajes habrá acumulado $\mu \times t_{CA}$ mutaciones desde que se separaron, por lo tanto el número de diferencias en pares de bases entre ellos será $\theta_s = 2\mu t_{CA}$. Si se eligen dos copias de genes al azar, el tiempo promedio para que coalescan es de $t_{CA} = N$ generaciones, y al sustituirlo en la fórmula anterior obtenemos $\theta_s = 2\mu N$. Esto quiere decir que, mientras más grande sea una población, más lentamente se perderán las genealogías de genes por causa de la deriva génica. Por lo tanto, los genes presentes en poblaciones grandes tienen una genealogía más antigua que las poblaciones pequeñas ya que han tenido más tiempo para acumular diferencias por medio de la mutación. De hecho, si se tiene un estimado de la tasa de mutación (μ) y medimos la proporción promedio de sitios que difieren en las copias de los genes entre pares de poblaciones (θ_s), se puede estimar el tamaño efectivo de la población (Futuyma, 2005).

1.5.6 Modelo Bayesiano de sky-line

El modelo Bayesiano de Sky-line hace uso del método de muestreo conocido como la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC por sus siglas en inglés) para estimar una distribución posterior del tamaño efectivo de la población a través del tiempo utilizando directamente muestras de secuencias de genes, dado cualquier modelo de sustitución nucleotídica. A diferencia de otros métodos que infieren la historia demográfica a partir de una genealogía estimada y, por lo tanto, ignoran el error asociado con las reconstrucciones filogenéticas, el método Bayesiano de *sky-line* incluye intervalos de certidumbre para el tamaño efectivo de la población estimado en cada punto hacia atrás en el tiempo, hasta el ancestro común más reciente de las secuencias de genes. Estos intervalos de certidumbre representan las incertidumbres tanto filogenéticas como las coalescentes. Además el efecto promediador de la MCMC produce estimados más suaves que otros métodos (Drumond *et al.*, 2005).

1.6 Antecedentes

1.6.1 Variación genética del cloroplasto

Las secuencias de DNA de cloroplasto (cpDNA) son ampliamente utilizadas para investigar las relaciones interespecíficas en plantas (Palmer *et al.*, 1988; Clegg *et al.*, 1991), pero la tasa evolutiva baja de esta molécula es una seria limitación en el nivel intraespecífico. Las regiones

no codificantes del cpDNA al no tener presiones evolutivas, muestran las frecuencias más altas de mutación (Palmer et al., 1988; Clegg *et al.*, 1991), por lo que son la mejor opción para usarse en estudios intraespecíficos.

La naturaleza de los polimorfismos intraespecíficos del cpDNA está típicamente restringida a sitios de cambio y mutaciones de inserción y delección. En unos pocos casos, la variación intraespecífica ha sido adscrita a una inversión (Palmer *et al.*, 1985; Brunsfeld, *et al.*, 1992) pero se cree que estas variaciones son raras (Tsumura *et al.*, 1994).

El cpDNA de las coníferas tiene ciertas diferencias con respecto al de las angiospermas, que incluyen: la ausencia de una de dos repeticiones invertidas largas (IRs) (Lidholm *et al.*, 1988; Strauss et al., 1988; Raubeson y Jansen, 1992; Tsumura., 1993), la herencia paterna del cloroplasto en Pinaceae y Taxaceae (Neale *et al.*, 1989; Mogensen, 1996), niveles relativamente altos de variación intraespecífica (Hong *et al.*, 1993; Dong y Wagner, 1994; Tsumura *et al.*, 1994), y diferentes patrones de edición del RNA (Wakasugi *et al.*, 1996)

La variación intraespecífica del cpDNA ha sido ampliamente estudiada para muchas especies de Pinaceae. En dichos estudios se han investigado los niveles de diversidad de las tendencias geográficas y taxonómicas de la variación en el cpDNA (Wagner *et al.*, 1987; Hong *et al.*, 1993).

1.6.2 *Taxodium mucronatum*

El género *Taxodium* está circunscrito dentro de la familia Cupressaceae (Figura 4), Actualmente la familia Cupressaceae consta de 30 géneros con 133 especies. Las Cupresaceas son la única familia de coníferas con una distribución más o menos cosmopolita, y se encuentran representadas en todos los continentes tanto en el hemisferio norte como en el sur, exceptuando la Antártida. Las Cupresaceas son plantas aromáticas, resinosas siempreverdes o en algunos casos deciduas, monoicas o dioicas, leñosas, que van desde diminutos arbustos postrados hasta árboles que exceden los 100m. Tienen una corteza que puede ser de amarillenta a rojiza que se desprende y exfolia en grandes tiras o en forma cuadrangular (Farjon, 2005).

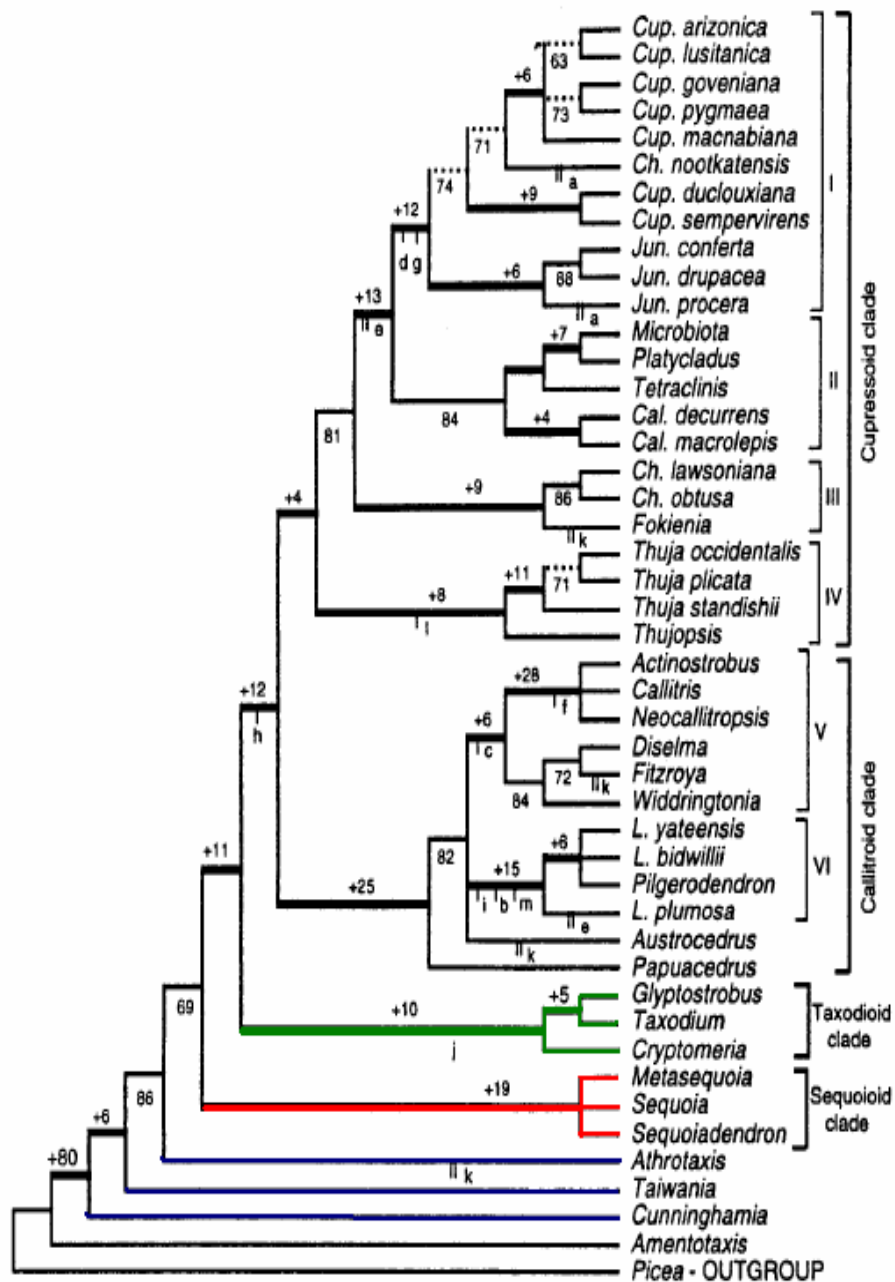


Figura 4. Consenso estricto de 48 árboles igualmente parsimoniosos de 1427 pasos encontrados a partir de una búsqueda heurística de datos del gen *matK* C 0.56; RI 0.78; RC 0.52. Las ramas gruesas recibieron al menos un soporte del 90% de bootstrap. Tomado de Gadek et al., 2000.

Los 31 géneros de la subfamilia Taxodioideae, son monotípicos y las especies que lo conforman se encuentran confinadas a las regiones templadas de Asia, Norte América donde la precipitación es alta y el clima es templado, húmedo y generalmente libre de heladas (Aulenback y le Page, 1998).

El registro fósil de las Taxodioideae indica que los representantes de esta familia tuvieron alguna vez una amplia distribución en el hemisferio Norte durante el Mesozoico Medio- Tardío 170ma (Florin, 1963). El registro fósil más confiable para esta familia se cree que es del Cretácico superior hace 70ma (Aulenback y LePage, 1998) sin embargo existen fósiles incompletos que sugieren una aparición más antigua.

El género *Taxodium* consta de dos especies restringidas a Norteamérica. *Taxodium mucronatum* (el Ahuehuete o Sabino) se distribuye desde el extremo sur de Texas (EUA) hasta el extremo occidental de Guatemala y *Taxodium distichum*, (ciprés de los pantanos), el cual se distribuye en las costas del sureste de Estados Unidos de América desde Virginia hasta Florida y Luisiana (Martínez, 1963; Little, 1971; Brown y Montz, 1986).

En México, *Taxodium. mucronatum* se localiza desde los 250 msnm en algunos sitios del estado de Nuevo León, hasta los 2,800 msnm, y se distribuye en todo el territorio mexicano, siempre y cuando exista una fuente permanente o semi-permanente de agua, a pesar de su tolerancia a periodos secos. Entre las gimnospermas, sólo la subfamilia de las Taxodioideae crece en las márgenes de ríos y manantiales en lugares templados (Carranza,1992; Villanueva *et al.*, 2003). La especie se propaga principalmente por semillas dispersadas por agua. (Martínez, 1963; Carranza, 1992). Factores externos como luz, temperatura y disponibilidad de agua son condiciones requeridas para la germinación de semillas viables (Hartmann y Kester, 1982, Suzan et al., 2007).

T. mucronatum difiere de su especie hermana *T. distichum* en cuanto a su ecología. Su habitat es estrictamente ripario sobre ríos y corrientes secundarias. Sin embargo se sabe que ha sido plantado e introducido en muchas localidades lejos de los recursos hídricos desde tiempos pre-hispánicos. A diferencia de *T. distichum* no forman neumatoforos. En México *T. mucronatum* es una especie recurrente en los bosques de galería (Farjon, 2005).



Figura 5. Población de *T. mucronatum* en el río Mezquital, Durango.

Los estudios para determinar la edad en individuos de *T. mucronatum* y en general de las poblaciones naturales de estos árboles en la República mexicana son muy escasos. En un estudio dendrológico llevado a cabo en diferentes cuencas de México se identificaron especímenes con más del milenio de vida (Villanueva *et al.*, 2007) (Tabla 1). El método que utilizaron para determinar la edad de los individuos consistió en la extracción de núcleos de crecimiento con un taladro de Pressler y la aplicación de técnicas dendrológicas estándar (Stokes y Smile, 1968) El cálculo de la edad de un espécimen se realizó con base en la cantidad de anillos presentes en la viruta extraída además de la adición de un determinado número de años para las secciones faltantes

La edad estimada total del árbol se expresa con la siguiente ecuación:

$$Eta = \sum (Ni + Nf + Na)$$

Donde:

E_{ta} = Edad total del árbol (años).

N_i = Número total de anillos en la sección de crecimiento o viruta obtenida con el Taladro Presler.

N_f = Número de anillos en la sección faltante (extrapolación y método Applequist, (1958)).

N_a = Número de años que requiere el árbol para alcanzar la altura de muestreo.

Tabla 1. Edad estimada de árboles de *T. mucronatum* en diversos sitios muestreados del centro y norte de México tomado de Villanueva *et al.*, 2007.

Nombre de sitio	Altitud (m)	Intervalo de diámetro (cm)	Intervalo de edades
Salto de los Salado, Ags	1690	80.0-300.0	100-380
Carrevalva, N.L.	1280	58.7-360.0	37-497
Río Nazas, Dgo.	1100	6.0-250.0	14-1350
Río Mezquital, Dgo.	1620	45.0-145.0	40-210
Raíces Allende, N.L.	530	27.5-200.0	59-310
Río San Juan, Santiago, N.L	1240	78.0-174.5	71-207
Puente Cabezones Linares, N.L	570	60.0-150.0	100-150
Márgenes Río Nazas, Dgo.	1100	5.6-245.7	14-1350
Márgenes Río Mezquital	1620	45.0-145.0	40-210
Atotonico, Jal.	1650	35.0-140.0	85-186
Panales, Tolimán, Qro.	1672	71.1-200.0	154-217
Moctezuma, Qro.	1672	72.0-165.0	154-196
Barranca de Amealco, Qro.	1950	70.0-210.0	250-1125
Los Peroles, Ríoverde, S.L.P.	950	69.8-210.0	166-1550
Bosque de Chapultepec, México. D.F.	2309	45.7-227.0	80-830
El Vado. Oax.	1493	60.0-230.0	100-575
Jalpa.Zac	1430	40.0-190.0	60-250
Promedio	1404,47		330,941

Suzan *et al.*, (2007) realizaron un estudio para conocer la demografía de *T. mucronatum* en diferentes poblaciones del estado de Querétaro. En este estudio se realizaron matrices de elasticidad para todos los sitios en los cuales, se encontraron valores altos para la región de estasis (S) y valores pequeños para el parámetro reproductivo (F) y de crecimiento (G) Tabla 2. En general estos resultados indican que las poblaciones consisten de árboles grandes y

viejos con una tasa de crecimiento muy lenta y un reclutamiento poblacional relativamente bajo.

Tabla 2. Estimaciones demograficas para *T. mucronatum* en poblaciones del estado de Querétaro

Population	λ	Varianza	95% limite superior	95% limite inferior	S	G	F
P1 (1999)	0.9560	0.0108	1.1593	0.7418	0.9944	0.0047	0.0008
P2 (1999)	0.9500	0.0158	1.2016	0.6988	0.9999	0.0000	0.0000
P3 (1999)	0.9200	0.0012	0.9900	0.8495	0.9999	0.0000	0.0000
P4 (1999)	0.9903	0.0110	1.199	0.7810	0.9974	0.0021	0.0004
P2 (2002)	0.9901	0.0118	1.2070	0.7712	0.9999	1.17^{-10}	1.47^{-11}
P3 (2002)	0.9900	0.0120	1.209	0.7710	0.9999	1.10^{-12}	0.0000
P4 (2002)	0.9902	0.0119	1.2090	0.7710	0.9999	1.85^{-12}	2.05^{-13}

Tomado de Suzan et al., (2007). Tasa de crecimiento finito (λ) los datos se obtuvieron utilizando una matriz de transición para los años 1999-2000 y 2002-2003, (S) contribución a la estasis, (G) crecimiento y (F) reclutamiento

1.6.3 Perfil geológico de la Meseta central de México.

Se estima que la formación de las Sierras Madre Oriental y Occidental terminó en el Eoceno Inferior (40m.a). A través de diversos fenómenos volcánicos que ocurrieron durante el Mioceno (15m.a) y el Plioceno Inferior (5m.a) es que se origina el Eje volcánico. Estas formaciones rodearon el Altiplano creando un cerco que lo aisló del drenaje oceánico, ocasionando la formación de numerosas cuencas lacustres. Entre la multitud de sierras que forman el eje volcánico, hay pequeñas cuencas rodeadas por cadenas volcánicas (López, 2003). Los ríos que actualmente se encuentran en la meseta central son los sistemas de los ríos: Lerma-Santiago, Pánuco, San Pedro Mezquital, Balsas, Ameca, el Salado, Sayula, Yuriria, Cuitzeo, Pátzcuaro Zirahuen y la cuenca de México.

Los cambios que ocurrieron en la Meseta Central a través del tiempo originaron modificaciones en la hidrografía de la misma. Dentro de este tema destaca la reconstrucción de la paleohidrografía del área propuesta por De Cserna y Román (1995). De acuerdo con ésta, durante el Mioceno la zona centro-oeste de México era drenada principalmente por tres sistemas fluviales: El Tepalcatepec-Balsas-Mezcala, el Verde-Naranja y el Armeria (Figura 6).

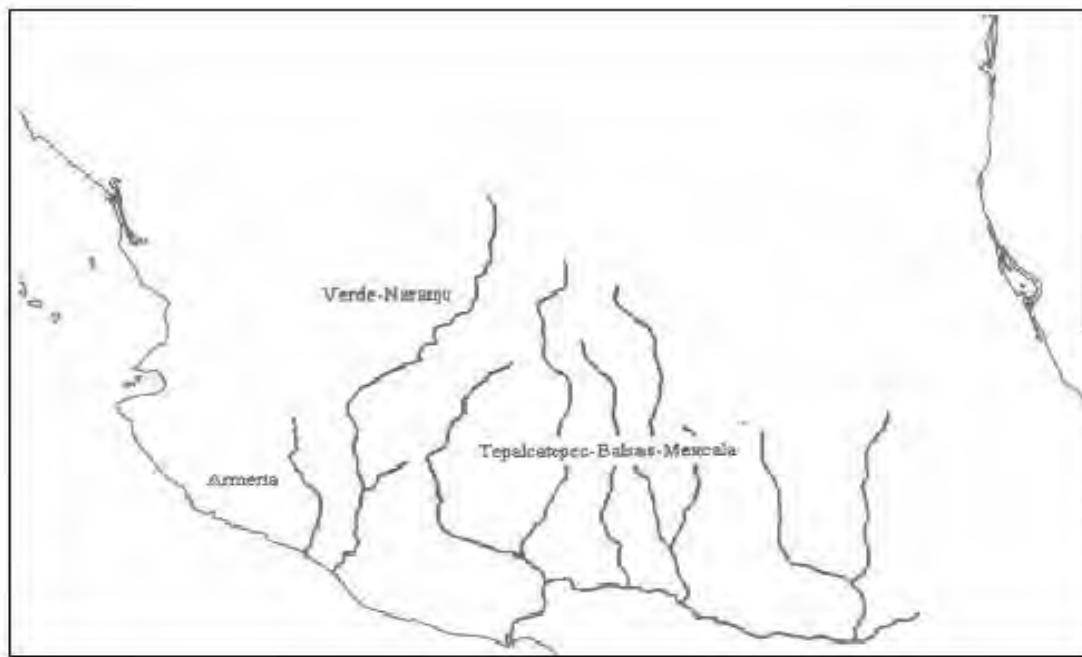


Figura 6. Reconstrucción de la hidrografía en el Mioceno Temprano- Medio mostrando Los rios Verde y Naranjo los cuales formaban un solo sistema. Tomado de Cserna y Román (1995).

Entre el Mioceno-Tardío(7 ma) Plioceno-Temprano(5 ma) la actividad volcánica en la zona provocó la división del río Verde y el nacimiento del río Grande de Santiago, al bloquear el cauce del sistema Verde-Naranjo la actividad volcánica continua en el área también provocó el bloqueo de un gran número de corrientes que fluían hacia el sur, incluyendo tributarios del antiguo Balsas, dando origen así al río Lerma. Esta nueva corriente que fluía hacia el oeste, drenaba la zona aislada por el vulcanismo y se conectaba con el río Naranjo (Figura 7). Se sabe que la cuenca ancestral del río Lerma, posiblemente así originada, contuvo una serie de lagos que se extendían en un gran cinturón lacustre (Waitz, 1943; Maldonado-Koerdellm, 1964; Smith y Miller, 1986).

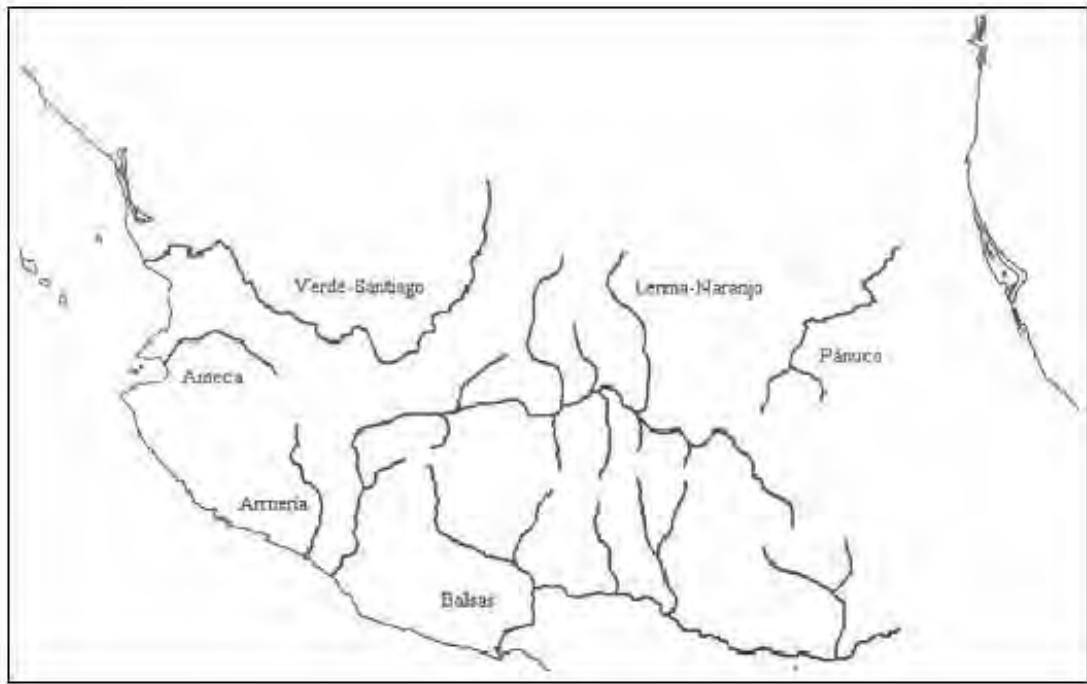


Figura 7. Reconstrucción de la hidrografía en el Mioceno-Tardío Plioceno-Temprano (De Cserna y Román, 1995).

La primera parte de la cuenca actual del río Lerma, el valle de Toluca y las llanuras del noroeste, estuvo ocupada por el extenso lago Tollocan lo mismo que la depresión de Acámbaro-San Cristóbal: Los lagos de los valles de Toluca-Ixtlahuaca, de Solís-Tepuxtepec y de Acámbaro-San Cristóbal seguramente fueron todos de origen volcánico y se formaron cuando el cauce del Lerma fue interrumpido (Waitz, 1994).

También las depresiones del Bajío, Chapala y Sayula estuvieron ocupadas por un gran lago, como propuso Waitz (1943), o por varios lagos menores y escalonados. Estos lagos probablemente tuvieron su extensión mayor durante la última etapa pluvial del Pleistoceno (West, 1964) y seguramente formaron cuerpos de agua continuos durante algunos periodos y cuerpos fragmentados durante otros. Hace aproximadamente un millón de años, el río Lerma ancestral se obstruyó creando uno de los procesos aluviales más importantes del territorio que terminó con la eventual creación de un enorme lago pluvial llamado Lago Jalisco, con un área estimada de 70 000km² (De Cserna y Román, 1995) (Figura 8).

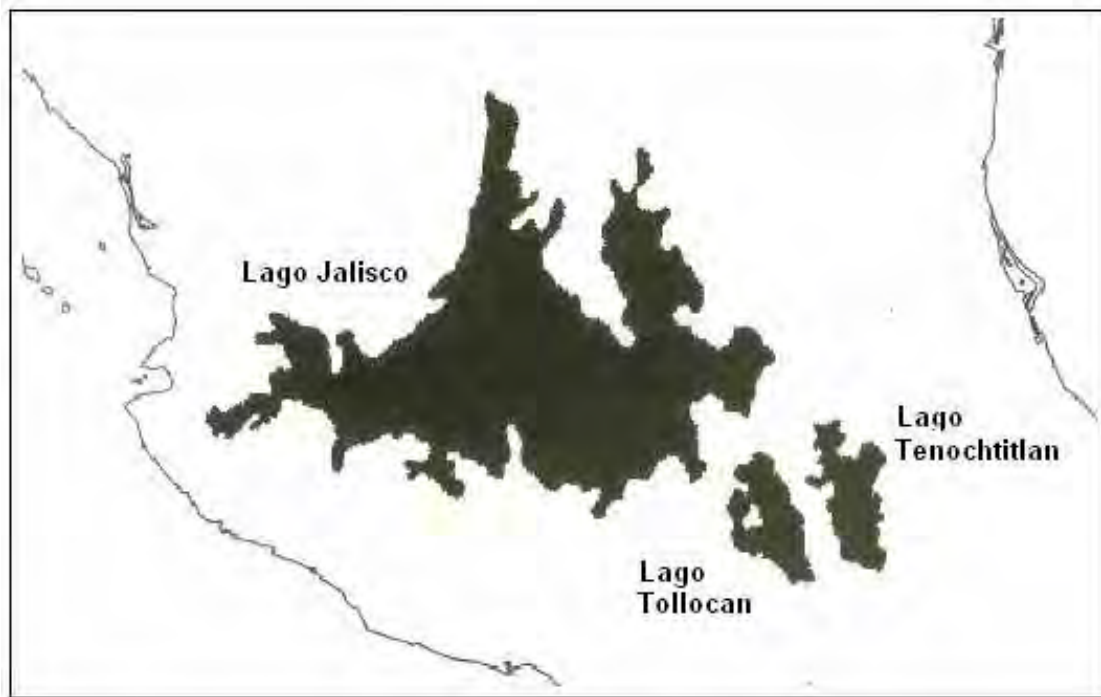


Figura 8 Reconstrucción del paleolago Jalisco durante el Pleistoceno. (De Cserna y Román, 1995).

El movimiento de ascenso hizo descender considerablemente el nivel base de los ríos de las vertientes exteriores, con lo que la pendiente de esos ríos se hizo más pronunciada y su capacidad de excavación aumentó. Al progresar el trabajo erosivo, las cuencas de los ríos se ampliaron. Al crecer las cuencas de los ríos de las vertientes exteriores, invadieron las cuencas interiores. Las aguas escurrieron hacia el cual tenía mayor capacidad erosiva, es decir, hacia las vertientes exteriores, con lo que la mayor parte de las cuencas interiores quedaron capturadas y los lagos desecados por canalización (López, 2003).

1.7 Predicciones

Debido a la estrecha asociación de *T. mucronatum* con los cuerpos de agua, la distribución espacial y la proporción de los haplotipos reflejarán la historia de las cuencas. Los cambios en la distribución de las cuencas donde se distribuye *T. mucronatum* propician también cambios en la distribución de la especie. Existe evidencia de que la Meseta Central de México es una región que ha sufrido múltiples cambios debido a la elevación del Eje Volcánico Transmexicano o TMBV (por sus siglas en inglés) (López, 2003, De Cserna y Román, 1995).

Esta formación ha actuado como una barrera y como centro de diversificación y endemismo para múltiples grupos de organismos.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los estudios realizados en torno a *T. mucronatum* se encuentran enfocados principalmente hacia el estudio taxonómico y paleontológico. Siendo esta especie la única gimnosperma en México que depende estrictamente del agua para sobrevivir y transportar sus semillas, es un referente importante para el estudio histórico de las cuencas hidrológicas.

Debido a su comportamiento demográfico, es un modelo diferente a los utilizados anteriormente basados en organismos de poca longevidad y capacidad de dispersión variable.

En general, la diversidad genética de esta especie se encuentra poco estudiada. Al ser una especie endémica de Norteamérica es importante conocer la diversidad genética de la especie ya que es posible que esta haya cambiado a causa de los cambios que han sufrido las cuencas en el pasado.

Objetivos

- Inferir si en las poblaciones de *T. mucronatum* existieron cambios en los patrones demográficos y en su estructura genética debidos a cambios en la distribución de la especie por variaciones de temperatura y procesos geológicos que afectaran las cuencas de México.
- Determinar la estructura genética de las poblaciones de *T. mucronatum* en siete cuencas de México.
- Hacer un análisis filogeográfico de las poblaciones y saber a que eventos demográficos históricos estuvieron sujetas y aproximadamente cuando ocurrieron dichos eventos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1 Colecta del material

Se colectaron muestras de hojas de 13 a 18 individuos de *Taxodium mucronatum* por localidad entre los meses de Agosto- Noviembre de 2006. Los sitios de colecta se enlistan en la Tabla 3. Las coordenadas geográficas fueron tomadas con un geoposicionador Garmin Etrex VISTA©.

Tabla 3. Sitios de colecta para *Taxodium mucronatum*. La población de Santa María del Tule fue colectada por Eduardo Flores Syoval.

Localidad	Latitud N	Longitud W	# de individuos colectados
Oaxtepec, Morelos	18° 54'23''	98° 5 8'13''	18
El Trapiche, Querétaro	21° 20'3.6''	99° 31'41.2''	18
Maravatio, Michoacán	19° 53'39.2''	100° 25'15''	18
San Antonio Matute, Jalisco	20° 33'28.1''	103° 57'12.9''	13
Amado Nervo, Durango	23° 50'35.4''	104° 11'19''	18
Viveros de Coyoacán, México D.F.	19° 20'58.3''	99° 10'47.7''	18
Santa María del Tule, Oaxaca	17° 04'47''	96° 38'09.7''	3
Total			106

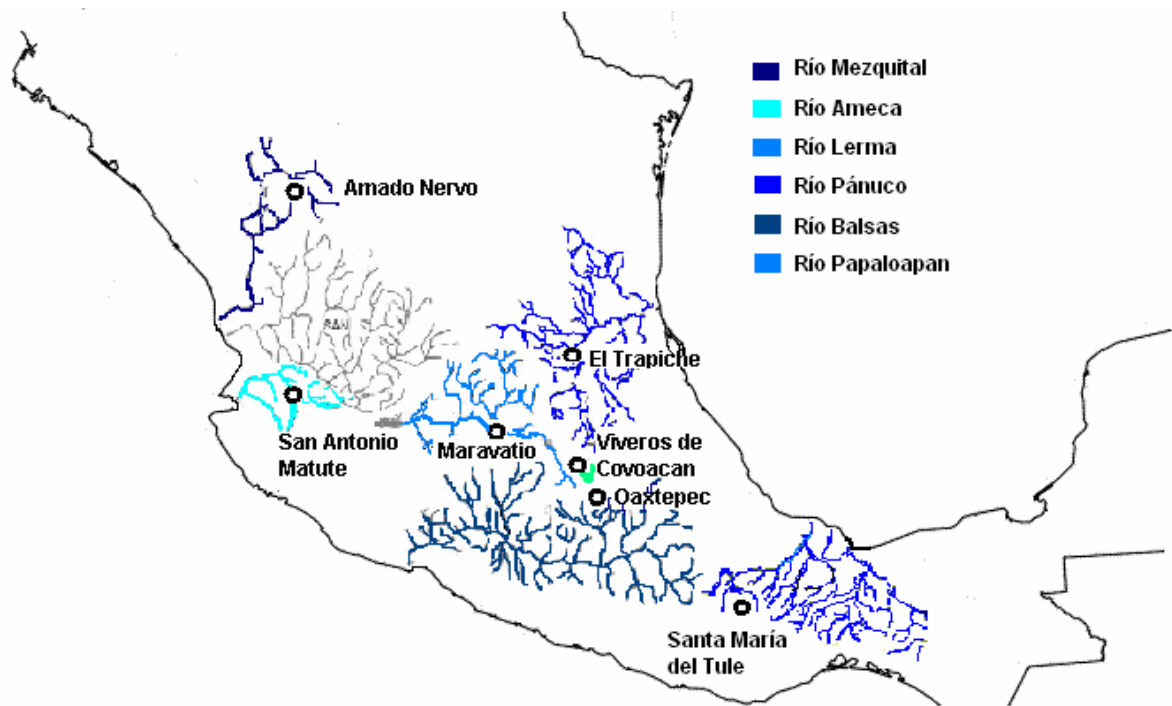


Figura 9. Sitios de colecta y ríos en los cuales se encuentran las localidades (INEGI, 2009).

Las muestras fueron guardadas en bolsas marca Ziploc © y etiquetadas con el número, nombre de la localidad y fecha de colecta. Éstas fueron congeladas a -80°C para su posterior procesamiento

3.2 Extracción de DNA

Se extrajo el DNA de 106 individuos siguiendo el protocolo de extracción CTAB (Vazquez-Lobo, 1996; (Apéndice A) y se amplificó, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) tres regiones de DNA de cloroplasto. Los marcadores utilizados fueron: psbMF2-Taxodium y trnD (Demesure, 1995), los marcadores c y d (intrón *trnL*) (Taberlet *et al.*, 1991) y el microsatélite ccmp 1 (intrón *trn K*) (Weising y Gardner, 1999), encontrándose todos en regiones no codificantes. Las condiciones para la amplificación se describen en el Apéndice B. Para las reacciones se utilizó *Taq* polimerasa (Promega Madison, Wisconsin).

El producto del PCR se corrió en geles de agarosa TBE al 1.2% y se tiñeron con bromuro de etidio al 0.1%. Los productos se enviaron para ser purificados y secuenciados a la High Throughput Genomic Unit de la Universidad de Washington Seattle.

Las secuencias se alinearon manualmente utilizando el programa BioEdit 7.0.4 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Hall, 1999).

Se realizó un análisis filogenético, buscando en la base de datos del GenBank las secuencias del espaciador *psbM-trnD* (Demesure et al. 1995), de tres especies emparentadas: *Cryptomeria japonica*, *Glyptostrobus pensilis* y *Taxodium distichum*

Se analizaron secuencias de 104 individuos. El DNA de los 2 individuos restantes no amplificó. Todas las poblaciones pertenecen a las cuencas de la meseta central excepto Santa María del Tule que pertenece al sur.

3.3 Demografía histórica

Los datos para el análisis de demografía histórica se obtuvieron mediante el programa DnaSP v 4.50.3 (Rozas *et al.* 2003), y el programa BEAST v 1.4.8. (Drummond y Rambaut, 2007) a menos de que se mencione lo contrario.

3.3.1 La distribución de frecuencias pareadas o mismatch

Se generaron dos gráficas para las diferencias pareadas o distribución *mismatch*, tomando en cuenta los valores esperados y observados todo esto, bajo el modelo de expansión poblacional.

3.3.2 Red de haplotipos

La red de haplotipos se generó utilizando el programa TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000), analizando todas las secuencias por medio de métodos de parsimonia. Primero conectando los haplotipos que difieren por un solo cambio y que estén más relacionados entre sí, siguiendo en orden ascendente de número de cambios. Las redes se generan con un 95% de confianza.

3.3.3 Pruebas de Neutralidad

Se realizaron dos pruebas de neutralidad, la *D* de Tajima (1989) y la prueba *D* de Fu y Li (1993) y se obtuvieron los valores y la significancia estadística de los mismos.

3.4 Estimadores de la diversidad genética

Los valores de diversidad haplotípica (Hd) y de la diversidad nucleotídica (π) se obtuvieron bajo los índices de Nei (1987).

3.5 Diferenciación poblacional

Cada población fue comparada con las otras seis restantes para obtener el coeficiente de estructura genética F_{ST} (Hudson *et al.*, 1992) y también se realizó la prueba estadística del vecino más cercano S_{nn} (Hudson, 2000).

3.6 Estimación de Reloj Molecular

Para obtener una estimación del reloj molecular, se obtuvo un promedio de la tasa de sustitución por sitio por año, mediante todas las posibles comparaciones pareadas entre los grupos posteriores al nodo de referencia (Apéndice D). Este promedio se dividió entre $2T$, para así obtener la tasa de sustitución por sitio por año, en donde T es el tiempo de referencia para la divergencia entre los linajes. En este caso se utilizó el registro fósil más antiguo de la subfamilia Taxodioideae que son 100ma. El error estándar fue calculado como la raíz cuadrada de la varianza promedio de todas las comparaciones de secuencias pareadas usadas (Apéndice D). (Savard *et al.*, 1994).

Otra estimación para obtener el ancestro común más reciente se realizó utilizando el programa BEAST V1.4.8 mediante inferencia bayesiana (Drummond y Rambaut, 2007).

3.7 Tamaño efectivo de la población

Se estimó el tamaño efectivo θ_s tanto global como para cada población. La tasa de sustitución utilizada por gen por generación fue $\mu=8.32 \times 10^{-8}$

3.8 Árbol filogenético

El árbol se generó utilizando el programa PAUP V4.0B10. Primero se realizó una búsqueda de árboles heurística utilizando el método de máxima verosimilitud, el árbol se enraizó con *G. penisilis* y después utilizando el árbol resultante como esqueleto se hizo otra búsqueda heurística pero utilizando el método de parsimonia, ya que es el único método que considera a los *gaps* como quinto estado.

4. RESULTADOS

Solo las secuencias obtenidas del espaciador *psbM-trnD* mostraron polimorfismos. El número de pares de bases para el espaciador *psbM-trnD* fue de entre 1155 y 1156pb, debido a una inserción en la población de Amado Nervo. Los demás marcadores resultaron ser monomórficos por lo que fueron excluidos de los análisis (Apéndice C).

4.1 Diversidad genética

Los estimados de la diversidad genética y el número de secuencias para cada población se muestran en la Tabla 4. El estimado de θ_s de todas las poblaciones es $\theta_s = 1.534$. El tamaño poblacional global es de $N_e = 2.6 \times 10^4$ (Apéndice E).

Tabla 4. Estimados para la diversidad genética y tamaño efectivo de la población para *T. mucronatum*

Población	#	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	π	θ	<i>Ne</i>
Oaxtepec, Morelos	18	1	2	0.1111	0.00010	0.00026	4.8×10^3
Amado Nervo, Durango	18	5	3	0.5686	0.00043	0.00104	2×10^4
Viveros, México	18	5	3	0.6993	0.00195	0.00128	2.5×10^4
Maravatio, Michoacan	18	6	4	0.5294	0.00153	0.00154	3.0×10^4
San Antonio Matute, Jalisco	13	0	1	0	0	0	0
El Trapiche, Querétaro	17	5	3	0.3235	0.00058	0.00133	2.5×10^4
Santa María del Tule, Oaxaca	2	0	1	0	0	0	0
Totales estimados	104	9	7	0.4617	0.000874	0.001346	2.6×10^4

#: número de secuencias; *S*: sitios segregantes; *h*: número de haplotipos

Hd: diversidad haplotípica. Los números en negritas muestran los valores más altos para cada estimado

Se estimó el tiempo a la expansión y el tamaño poblacional global (*Ne*) de toda la muestra utilizando diferentes tiempos generacionales para *T. mucronatum* desde los 15 años hasta los 350 años (Tabla 5).

Tabla 5. Estimados del tiempo a la expansión y tamaño poblacional con diferentes tiempos generacionales

Tiempo generacional (en años)	μ (por gen por generación)	Tiempo a la expansión	N_e global
15	3.57×10^{-9}	376 188	$1.4 \times 10^{+7}$
50	1.189×10^{-8}	377 763	$1.3 \times 10^{+6}$
100	2.37×10^{-8}	376 208	$3.2 \times 10^{+5}$
200	4.75×10^{-8}	376 328	$8.0 \times 10^{+4}$
300	7.13×10^{-8}	378 169	$3.6 \times 10^{+4}$
350	8.32×10^{-8}	376 414	$2.6 \times 10^{+4}$

N_e global= estimado de tamaño poblacional de toda la muestra

También se estimó el tamaño poblacional por medio del programa BEAST v 1.4.8 (Drummond y Rambaut, 2007) y los resultados se estimaron tanto con el haplotipo ancestral como sin el (Apéndice F).

4.2 Estimaciones tasa de mutación para cloroplasto de *T. mucronatum*

La tasa de mutación para el cloroplasto de *T. mucronatum* se obtuvo utilizando una matriz de distancia (Apéndice D) en la cual se estima la distancia genética entre la secuencia del espaciador *psbM-trnD* (Demesure, 1995) de *Cryptomeria japonica*, que es el grupo hermano de *Glyptostrobus* y *Taxodium*, contra todas las secuencias del mismo espaciador para los demás géneros. Este promedio se dividió entre 2 veces las generaciones que han pasado desde la aparición del género *Cryptomeria*, según el registro fósil hace 100ma (Brunsfeld *et al.*, 1994, Millar, 1977). Como resultado se obtuvo la tasa de sustitución por gen por generación que es $\mu=8.3 \times 10^{-8}$ dividiendo este resultado entre el tiempo generacional 350 años se obtuvo la tasa de sustitución de nucleótidos por sitio por año $\mu = 2.37 \times 10^{-10}$. Esta tasa coincide con tasas de mutación reportadas para el cloroplasto de *Pinus* $\mu = .22-.42 \times 10^{-9}$ (Willyard *et al*; 2006).

4.3 Distribución de la frecuencia de las diferencias pareadas (*mismatch*)

La curva de la distribución mismatch se ajusta al modelo de expansión poblacional (Figura 10). Los dos picos muestran expansiones, la mayoría de los haplotipos se encuentran separados por un paso mutacional.

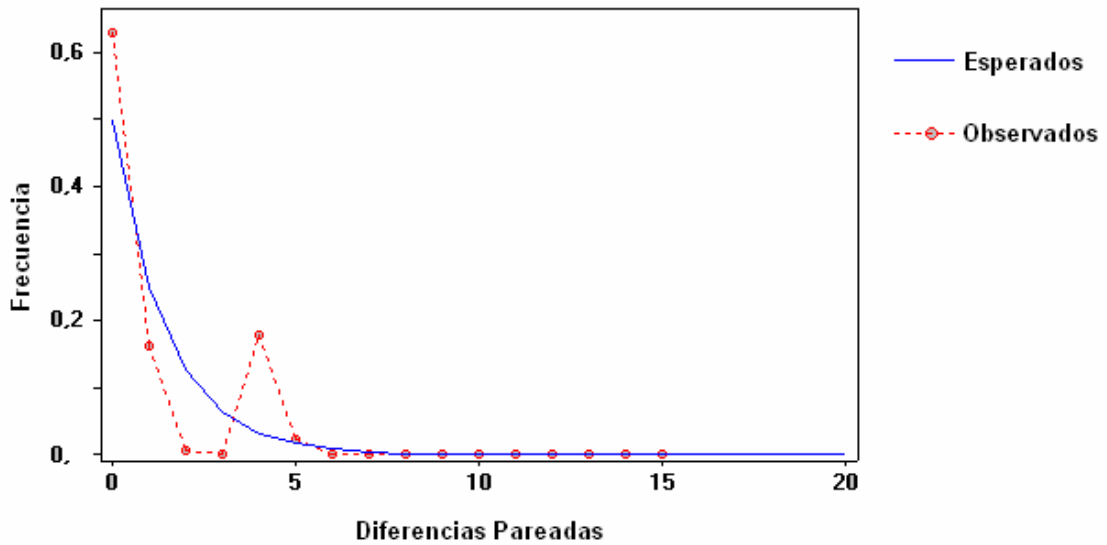


Figura 10. Distribución *mismatch* para *T. mucronatum* en cuencas de México. La curva es pronunciada debido a los pocos pasos mutacionales

El tiempo estimado a la expansión poblacional de $\tau = 0.207$ ($1/2 \mu$ generaciones) y la tasa de mutación por generación es de $\mu = 8.32 \times 10^{-8}$. La sustitución de estos valores indica cuantas generaciones han pasado desde que se dio la expansión. En este caso son $t = 1078.67$ generaciones. Si se considera que el tiempo generacional de *T. mucronatum* es de 350 años, este valor se determinó utilizando datos dendrológicos (Tabla 1), entonces han pasado 3.7×10^5 años desde que las poblaciones de *T. mucronatum* se expandieron. Con estimaciones de reloj molecular se pudo inferir que el ancestro más reciente de estas poblaciones ocurrió hace 7.3×10^6 años (Apéndice E).

4.4 Red de haplotipos

La red parece tener forma de estrella (Figura 11). El haplotipo más frecuente (I) es el que se encuentra en el centro presentándose en todas las poblaciones. El segundo haplotipo más frecuente (IV) sólo se encuentra en las poblaciones de Viveros, Maravatio, Amado Nervo y El Trapiche. La mayoría de los otros haplotipos son privados (es decir que se encuentran en una sola población) con baja frecuencia y sólo se separan del haplotipo central por un paso mutacional.

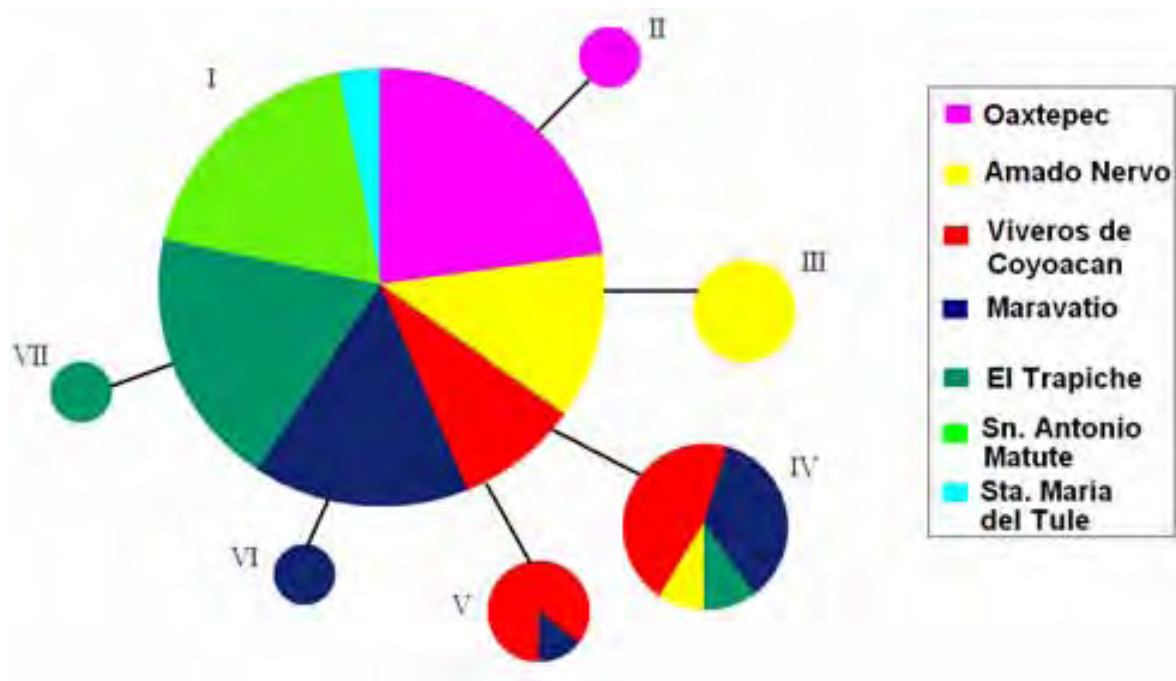


Figura 11. Red de haplotipos. Cada círculo representa un haplotipo y su tamaño representa la frecuencia del mismo.

No se encontró ninguna estructuración aparente entre las poblaciones. La distribución de los haplotipos así como su presencia en cada población se muestra en la Figura 12.

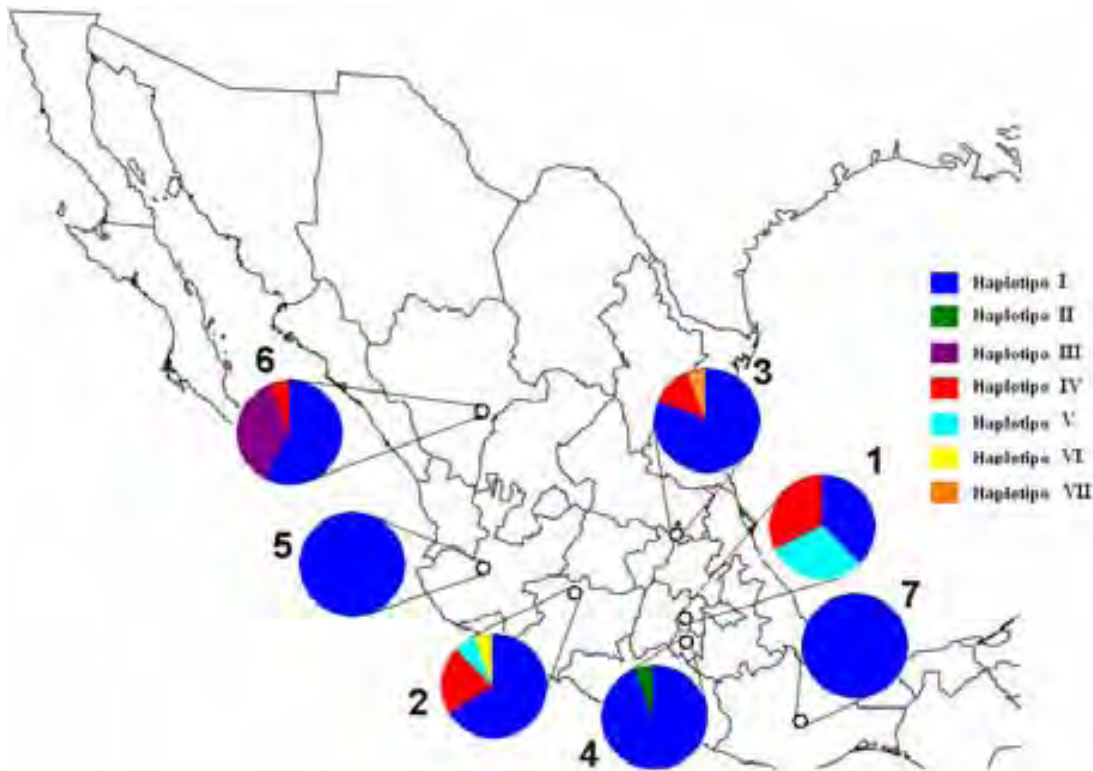


Figura 12. Mapa con la configuración haplotípica para cada población. Los números corresponden a cada población: 1 Viveros de Coyoacán, México; 2 Maravatio, Michoacán; 3 El Trapiche, Queretaro; 4 Oaxtepec, Morelos; 5 San Antonio Matute, Jalisco; 6 Amado Nervo, Durango; 7 Santa María del Tule.

4.5 Pruebas de neutralidad

La prueba de neutralidad D de Tajima $D = -1.48084$ ($P > 0.10$) no resultó ser significativa, la prueba de D de Fu y Li, resultó tener un valor significativo de $D = -2.63402$ ($P < 0.05$).

Por medio de una búsqueda en la base de datos del GenBank de secuencias consenso para el espaciador *psbM-trnD* en las especies de *Cryptomeria japonicum* (AY727096.1) *Glyptostrobus pensilis* (AY727094.1) y *Taxodium distichum* (AY727095.1) y la posterior alineación de estas con las de *T. mucronatum* (Figura 13) se pudo descubrir que el haplotipo más ancestral no es el mas frecuente sino que es el haplotipo IV que comparten las poblaciones de Viveros, Maravatio, Amado Nervo y El Trapiche.

	304pb				318pb										
<i>Taxodium mucronatum</i>	A	A	A	A	G	G	C	T	T	T	C	C	T	T	T
<i>Taxodium mucronatum*</i>	A	A	A	A	G	G	A	A	A	G	C	C	T	T	T
<i>Taxodium distichum</i>	A	A	A		G	G		A	A	G	C	C	T	T	T
<i>Glyptostrobus pensilis</i>	A	A	A	A	G	G	G	C	A	G	C	C	T	A	T
<i>Cryptomeria japonica</i>	A	A	A		G	G	A	C	A	A	C	C	T	T	T

Figura 13. Fragmento de secuencias de diferentes especies en el espaciador *psb-trnD*,

* haplotipo ancestral.

4.6 Árbol filogenético

Utilizando las secuencias arriba mencionadas y secuencias representativas de *T. mucronatum* que mostraron los haplotipos encontrados en el análisis se generó un árbol filogenético (Figura 14). La secuencia de *C. japonica* no se incluyó debido a que la secuencia contenía un *indel* de 359pb.

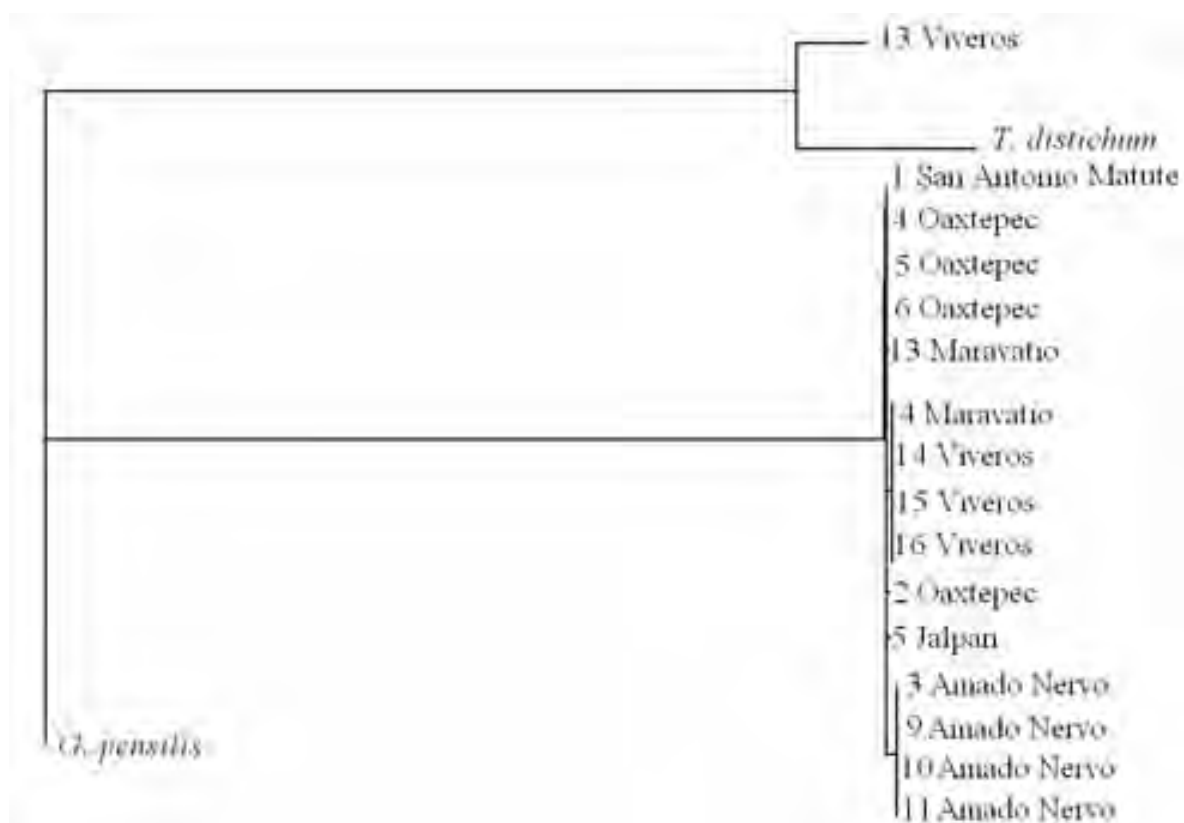


Figura 14. Árbol filogenético para las secuencias del espaciador *psbM-trnD* de *G. pensilis*, *T. distichum* y *T. mucronatum*, el árbol se generó con un 95% de confianza utilizando para Máxima verosimilitud y Parsimonia. Número de replicantes 10

4.6 Diferenciación poblacional

El valor global de $S_{nn}= 0.2084$ es significativo con un 95% de confianza. Los valores de S_{nn} entre pares de poblaciones son más altos que el global, pero solo algunos son significativos (Tabla 6). El valor global para $F_{ST}=0.1372$ y es significativo con $P<0.001$ (Tabla 6).

Tabla 6. Valores para los estimados de F_{ST} y S_{nn} para cada par de poblaciones

Poblaciones	S_{nn}	Significancia	F_{ST}	Significancia
Oaxtepec-Amado Nervo	0.486	ns	0.206	*
Oaxtepec-El Trapiche	0.518	ns	0.050	ns
Oaxtepec-Maravatio	0.551	ns	0.149	ns
Oaxtepec-Viveros	0.704	*	0.240	**
Oaxtepec-San Antonio	0.494	ns	0	ns
Matute				
Amado Nervo-El Trapiche	0.474	ns	0.105	*
Amado Nervo-Maravatio	0.507	ns	0.129	*
Amado Nervo-Viveros	0.657	*	0.193	*
Amado Nervo-San Antonio	0.494	ns	0.225	*
Matute				
El Trapiche-Maravatio	0.481	ns	-0.017	ns
El Trapiche-Viveros	0.615	*	0.074	*
El Trapiche-San Antonio	0.517	ns	0.056	ns
Matute				
Maravatio-Viveros	0.536	ns	-0.008	ns
Maravatio-San Antonio	0.547	ns	0.157	ns
Matute				
Viveros- San Antonio Matute	0.692	*	0.249	*

0.01<P<0.05 , **0.001<P<0.01 , ns no significativos, La ji^2 se obtuvo con 42° de libertad

5. DISCUSIÓN

5.1 Estimadores de la diversidad genética.

En total existen 7 haplotipos, de estos 4 son privados, uno está presente en todas las poblaciones, uno se comparte entre las poblaciones de Viveros, Maravatio, El Trapiche y Amado Nervo y el último entre las poblaciones de Viveros y Maravatio (Figura 12). La diversidad haplotípica es de ($Hd=0.4617$). El número de sitios segregantes totales es 9, por esta razón π y θ son tan bajos.

Los estimados de N_e a partir de θ_s por secuencia para cada población son alrededor del orden de 1×10^4 individuos. Es probable que, una población con bajos valores de h y π pudiera haber experimentado un cuello de botella severo y prolongado en tiempos recientes relativo al tiempo de generación de la especie. Altos valores de h y bajos de π sugieren un crecimiento rápido de la población a partir de una población ancestral con un tamaño poblacional pequeño, siempre que el tiempo sea suficiente para recuperar la variación haplotípica por medio de la mutación, pero a la vez no tan largo para la acumulación de grandes diferencias en las secuencias (Nei *et al.*, 1975).

La diversidad haplotípica no es tan alta y de hecho hay pocos haplotipos debido a la demografía propia de la especie. Hay que considerar que *T. mucronatum* es una especie riparia que sólo crece a cierta distancia de un cuerpo de agua. Desde un punto de vista demográfico, *T. mucronatum* se comporta como un árbol longevo de hábitats estables (Silvertown *et al.*, 1993). Este dato es congruente con el relativamente alto valor de contribución a la fecundidad de los individuos más viejos, así como la intensa mortalidad en semillas. Suzán *et al.* (2007) detectaron estos patrones en un estudio demográfico que realizaron en el estado de Querétaro. También se ha encontrado que *T. mucronatum* se puede considerar como una especie de crecimiento lento con un alto énfasis en la región de estasis, con posibles reclutamientos episódicos, detectado en *T. distichum* en periodos de estrés hídrico (Keely y Conner, 1999).

En un estudio realizado por Kado *et al.*, (2006) utilizando 4 diferentes marcadores nucleares el promedio de los valores de la diversidad nucleotídica (π) sobre cinco *loci* fue 0.0045 (SE 0.0015) de *C. japonica* pero 0.0035 (SE 0.0012) sobre cuatro *loci* excluyendo a *Chi 1*. El promedio sobre los mismos cuatro *loci* para *T. distichum* fue 0.0058 (SE 0.0006). El polimorfismo fue mayor en *T. distichum* aunque la diferencia no resultó ser significativa. Los

estimados de la divergencia entre las dos especies se encuentran en la Tabla 7. El promedio de la divergencia entre las dos especies fue de 0.0829 (SE 0.0198).

Tabla 7. Variación de DNA de *C. japonica* y *T. distichum*. Tomado de Kado et al., 2006.

	Loci	Longitud	<i>S</i>	π	θ	$\pi(\text{silent})$	$\theta(\text{silent})$
<i>C. japonica</i>	<i>Ferr</i>	345 (78.00)	2	0.00282	0.00123	0.0061	0.00271
	<i>HemA</i>	1047(245.16)	2	0.00006	0.0004	0.00013	0.00086
	<i>Lcyb</i>	1653(432.96)	16	0.00243	0.00205	0.00374	0.00391
	<i>Pat</i>	758 (324.66)	6	0.00208	0.00167	0.00403	0.00326
	<i>Chi</i>	1172(440.65)	15	0.00327	0.00271	0.00843	0.00672
<i>T. distichum</i>	<i>Ferr</i>	345 (77.68)	7	0.00261	0.00504	0.00726	0.01598
	<i>HemA</i>	1047(244.92)	14	0.00173	0.00332	0.00565	0.00912
	<i>Lcyb</i>	1653(433.33)	38	0.00239	0.00571	0.00564	0.01146
	<i>Pat</i>	758 (324.7)	8	0.00363	0.00262	0.00458	0.00382

Los números en paréntesis se refieren a la longitud de los sitios silenciosos

Por otro lado en *C. japonica* encontraron que aunque las poblaciones naturales muestran una mayor diferenciación entre ellas que las artificiales, si se comparan los datos de F_{ST} entre poblaciones naturales y artificiales se obtiene estimados muy bajos de F_{ST} (-0.0054). Por lo tanto la diferenciación entre poblaciones es baja. La mayoría de la diferenciación en *T. distichum* se encontró entre las poblaciones de las dos variedades de la especie.

Tabla 8. Valores de F_{ST} y valores de P para K_{ST} . Tomado de Kado et al., 2006.

Especie	Pares de poblaciones	F_{ST}	Valores de P para K_{ST}
<i>C. japonica</i>	Art-Nat ^a	-0.0054 (-0.0026)	-
	FUJ-TDS	0.0674	0.02182
	FUJ-TTY	0.1824 (0.1403)	0.00006 (0.00105)
	FUJ-YNS	0.0624	0.0137
	TDS-TTY	0.1582 (0.1034)	0.00130 (0.01582)
	TDS-YNS	0.0238	0.13994
	TTY-YNS	0.1394 (0.0896)	0.00093 (0.01267)
<i>T. distichum</i>	SMB-SD1	0.0363	0.1203

Los resultados en paréntesis se obtuvieron excluyendo a los individuos, TTY04 y TTY07

^aArt; arboles de Kado et al (2003), Nat, cuatro poblaciones naturales. Para esta comparación, K_{ST} no fueron computadas debido a que las muestras eran haploides

Eventos demográficos pasados en *T. distichum*

También encontraron un exceso de *singletons* en tres de cuatro *loci* y las pruebas *D* de Fu y Li y la *D* de Tajima resultaron ser negativos Tabla 9.

Tabla 9. Valores de las pruebas de neutralidad. Tomado de Kado et al., 2006

	Loci	<i>D</i>	Estadístico		De Fu y Li		<i>H^a</i>
			<i>D</i> *	<i>D</i>	<i>F</i> *	<i>F</i>	
<i>C. japonica</i>	<i>Ferr</i>	2.186*	0.723	0.721	1.353	1.353	-0.501
	<i>HemA</i>	-1436	-2.643*	-2.687*	-2.654*	-2.698*	0.062*
	<i>Lcyb</i>	0.35	0.741	0.767	0.716	0.739	1.62
	<i>Pat</i>	0.586	-0.637	-0.677	-0.285	0.313	-0.595
	<i>Chi</i>	0.535	0.6	0.526	0.685	0.558	0.935
<i>T. distichum</i>	<i>Ferr</i>	-1.406	-2.268	-0.96	-2.342	-1.304	-4.395*
	<i>HemA</i>	-1.576	-1.449	-1.673	-1.749	-1.671	1.496
	<i>Lcyb</i>	-2.110*	-3.181*	-3.599**	-3.339**	-3.727**	-7.512
	<i>Pat</i>	1.147	0.033	-0.009	0.437	0.424	0.786

* $P < 0.05$, ** $P < 0.02$ ^a Los valores de *H* son diferentes entre θ y π por locus.

Por otra parte en un estudio realizado por Shih-Ying et al., (2003) en dos especies del género *Cunninghamia* se encontraron bajos niveles de diferenciación poblacional, diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00176$) y haplotípica ($Hd = 0.440$) lo cual, se debe a la herencia uniparental del cpDNA. Además se encontró que las dos especies comparten el mismo haplotipo ancestral, esto puede indicar que el haplotipo tiene el mismo origen ya que no se encontró que compartieran los haplotipos derivados. Los bajos niveles de diferenciación entre poblaciones, *C. lanceolata* ($G_{ST} 0.017 N_{ST} 0.014$) y *C. konishii* ($G_{ST} 0.073 N_{ST} 0.119$) Tabla 10, responde: en primer, lugar al hecho de que la aparición de los nuevos haplotipos es muy reciente (el último glacial), en segundo lugar a que los alelos recientes tendrían una tasa de dispersión lenta debido a los tiempos de regeneración de la especie que limitan el número de generaciones a 20 desde la última glaciación. Además el género *Cunninghamia* se encuentra en bosques que consisten de árboles viejos a los cuales se les estiman edades alrededor de los 1000 años. Más

aún los ambientes con alta humedad en los que crecen limitan la dispersión de polen y semillas. Debido a que estas especies son cercanas a *T. mucronatum* y tienen una demografía y hábitat similar a la de la especie aquí estudiada es de esperarse que tengan valores similares en los mismos parámetros.

Tabla 10. Variación genética y diferenciación poblacional de *Cunninghamia konishii* y *Cunninghamia lanceolata*

Especie	Diversidad haplotípica h	Diversidad Nucleotídica θ	D de Tajima	D de Fu & Li	Gst	Nst
<i>Cunninghamia konishii</i>	0.463±0.079	0.0019±0.00067	-241.047	-374.181	0.073	0.119
<i>Cunninghamia lanceolata</i>	0.440±0.088	0.00176±0.00065	-244.968	-446.944	0.017	0.014

5.2 Distribución de frecuencia de las diferencias pareadas

La distribución muestra dos picos para este espaciador (Figura 10), el primero corresponde al haplotipo ancestral (IV) y el segundo al haplotipo más frecuente (I), esto muestra que tuvo que pasar mucho tiempo desde la aparición del haplotipo ancestral a la expansión, o bien pudo ser una sola mutación de varios nucleótidos. También por medio de esta gráfica se observa que la mayoría de los haplotipos sólo tienen diferencias de un solo paso mutacional entre pares de secuencias. Los haplotipos que surgen a partir del más común tienen una baja frecuencia debido a que su aparición es reciente. Se espera que la frecuencia de los haplotipos aumente mientras más antiguos sean (Rogers y Harpending, 1992; Avise, 2000; Joy et al., 2003).

Se puede suponer la existencia de un cuello de botella en el cual el haplotipo ancestral estaba presente, después en una expansión poblacional surgieron los nuevos haplotipos derivados del haplotipo más frecuente. Suponiendo que la tasa de mutación es la misma para todos los individuos en este espaciador en particular, el valor de τ muestra que las secuencias con el mismo número de diferencias probablemente divergieron al mismo tiempo, por lo tanto es posible utilizar a τ como una aproximación del tiempo a la expansión (Aris-Brosou y Excoffier, 1996)

El valor de $\tau = 0.207$ indica cuando es que surgieron los nuevos haplotipos, tomando en cuenta la tasa de mutación para este segmento y el valor de τ se estima que la expansión

ocurrió hace 1078.67 generaciones en las poblaciones de *T. mucronatum*. Suponiendo que el tiempo generacional de *T. mucronatum* es de 350 años, han pasado 3.7×10^5 años desde que ocurrió la expansión, durante el Pleistoceno.

Durante periodos del Pleistoceno existieron muchos lagos en el Sureste de Estados Unidos que hoy se encuentran secos o forman lagos salinos poco profundos (Feth, 1961). Así mismo existe evidencia de que el paleolago de Jalisco alcanzo su mayor área durante los periodos de alta humedad del Pleistoceno (DeCserna y Roman, 1995). El ascenso pluvial se ha utilizado para describir el tiempo cuando los lagos existieron, e implica que la precipitación fue mayor de lo que es ahora. Se cree que las condiciones de humedad durante los periodos glaciales-pluviales fueron causados por la combinación de efectos en el incremento de la precipitación y un decremento potencial en la evapo-transpiración debido a las bajas temperaturas (Hendricks, 1985).

5.3 Red de haplotipos

El análisis de los datos da como resultado una red de haplotipos que parece tener forma de estrella, A partir de esto se infiere que las poblaciones de *T. mucronatum* han crecido. En este tipo de análisis es posible observar tanto la variación de los haplotipos como su frecuencia y distribución en las poblaciones (Templeton, 2006). La red mostrada en la Figura 11 se conforma por un haplotipo central que es el más abundante y se encuentra representado en todas las poblaciones, de éste surgen otros haplotipos raros los cuales se encuentran separados del central por un paso mutacional.

Se ha propuesto que el haplotipo ancestral es aquel con una frecuencia elevada y un alto grado de conectividad en una red de haplotipos, idealmente en una posición central (Posada y Crandall, 2001). En un estudio realizado por Alavez (2008), a partir de simulaciones se mostró que sólo en ocasiones el haplotipo ancestral es también el más abundante. La tasa de mutación y el tamaño efectivo de las poblaciones influyen esta proporción en gran medida. La probabilidad de que el haplotipo ancestral sea el más abundante de la muestra está relacionada con tamaños efectivos bajos y una tasa de mutación lenta. Esto concuerda con las poblaciones de *T. mucronatum* las cuales tienen una N_e global de 2.6×10^4 y una $\mu = 8.32 \times 10^{-8}$ para el espaciador de *psbM-trnD*.

Se observa por medio de la red de haplotipos Figura 11, que los haplotipos privados se derivan del haplotipo más común (I) y no del ancestral (IV), por lo cual el haplotipo más común debió de surgir primero a partir del haplotipo ancestral (IV) por medio de una inversión de transcripción (Figura13). Con estimaciones de reloj molecular el surgimiento del haplotipo I ocurrió hace 7.3×10^6 años y a partir de éste, se formaron los otros haplotipos cuando se dio la expansión poblacional. Debido a este crecimiento en las poblaciones de *T. mucronatum* se originaron nuevas mutaciones.

En las poblaciones naturales, la gran mayoría de los haplotipos presentes en el *pool* genético existen como un conjunto de copias idénticas múltiples que se originan por la replicación del DNA. Cuando una de estas copias muta a un nuevo haplotipo, es extremadamente improbable que otras copias del haplotipo ancestral (u original) también muten o que todas las copias del haplotipo ancestral se extingan. Así que se espera que copias del haplotipo ancestral persistan en la población (Posada y Crandall, 2001).

Debido a la dinámica poblacional propia de *T. mucronatum*, el haplotipo ancestral no ha desaparecido por deriva génica, por esta razón es que todavía se encuentra con una frecuencia alta en las poblaciones del norte.

La aparición de los haplotipos más nuevos es muy reciente 3.7×10^5 años, debido a esto los alelos nuevos tendrían una tasa de dispersión lenta ya que la especie tiene tiempos largos de regeneración.

5.4 Pruebas de neutralidad

La prueba de neutralidad D de Fu y Li, mostró un valor significativo de -2.599 ($P < 0.05$) lo cual confirma la expansión de las poblaciones. Esta prueba es más sensible a la presencia de haplotipos únicos o *singletons* y debido a la poca variabilidad que presentaron las muestras, fue la prueba que se ajustó al modelo.

El valor negativo de las pruebas de neutralidad, generalmente, está asociado a la presencia de un barrido selectivo. Una explicación que se da a este fenómeno es que un locus neutral se encuentra ligado a otro que posee una ventaja selectiva, ocasionando que la θ (sitios segregantes) sea mayor al valor de π (diferencias pareadas). También el valor negativo refleja un exceso de haplotipos raros, lo cual puede ser ocasionado por crecimiento de las poblaciones. Cuando surgieron estos haplotipos hace 3.7×10^5 años la tierra se encontraba

terminando un periodo interglaciar, el clima era templado con un aumento en las precipitaciones (Savin, 1977).

El marcador molecular utilizado no es una región codificante por lo tanto se asume que es neutral. Así que el valor negativo de la prueba más bien es el resultado de un proceso demográfico en el cual la deriva génica y la mutación están en desequilibrio. Esto se debe a que la deriva génica actúa más lento en poblaciones con un tamaño efectivo grande y el efecto de la mutación es mayor (Lynch 2002, Gillespie 2004). Aunque también hay que considerar el efecto del *hitch hiking*.

El *hitch hiking* ocurre cuando ocasionalmente una mutación ventajosa, tiende a que ésta se fije dentro de una población o especie, las secuencias adyacentes ligadas son “limpiadas” de variación preexistente, tal efecto en teoría y aparentemente en la práctica es más dramático en regiones nucleares caracterizadas por una baja tasa de recombinación (Aquadro, 1992; Aquadro y Begun, 1992; Aguadé y Langley, 1994; Aquadro et al., 1994). Los árboles de genes, en principio, se obtienen mejor a través de regiones genómicas con baja recombinación, pero tales regiones a menudo cargan muy pocos marcadores polimórficos para una resolución filogenética a fina escala (Avisé, 2000). Aparte de la selección existen diferentes posibilidades para que las pruebas de neutralidad den valores negativos. La primera es que el tamaño poblacional de *T. mucronatum* haya cambiado y esto causó el incremento de la varianza en los estadísticos utilizados. En segunda un exceso tanto de *singletons* y variantes de alta frecuencia ocurre cuando la población es dividida y la tasa de migración entre poblaciones es baja (Fay y Wu, 2000; Wakeley y Aliacar, 2001).

5.5 Estimadores de la diferenciación poblacional

Los estadísticos de F_{ST} y S_{nn} mostraron valores significativos tanto entre pares de poblaciones como en el valor global.

El estadístico de F_{ST} muestra que las poblaciones del norte se encuentran diferenciadas de las del sur. Las dos poblaciones que se encuentran más diferenciadas con respecto a todas las demás son la de Viveros de Coyoacán en el DF (excepto de Maravatio) y la de Amado Nervo en Durango. La diferenciación existente entre la población de Amado Nervo y las demás probablemente indica que esta población se aisló antes y no existe flujo génico entre

esta y las demás es por eso que esta población no comparte el haplotipo (II) con ninguna de las otras.

Por otro lado el estimado global de $S_{nn} = 0.208$ mostró con una confianza de $P < 0.05$ la existencia de diferencias entre las poblaciones. Los valores de S_{nn} son una inferencia de qué tan frecuente es encontrar al vecino más cercano, en términos de parecido de secuencias, en la misma localidad geográfica (Hudson, 2000). En este estudio la mayoría de los haplotipos se encuentran en una frecuencia de 1/104.

Con los pares de poblaciones bajo el método del vecino más cercano S_{nn} se muestra con una $0.01 < P < 0.05$ que la población de Viveros se encuentra diferenciada de las otras. Ambos estadísticos mostraron que la población de Viveros y Maravatio no se encuentran diferenciadas, esto se debe a que estas dos poblaciones tienen el mayor número de secuencias con el haplotipo ancestral (IV) y comparten otro haplotipo (V), en las otras poblaciones el haplotipo ancestral solo se encontró una vez o no fue muestreado.

Esto quiere decir o que Maravatio y Viveros continúan teniendo contacto o tuvieron un contacto secundario reciente ya que comparten un haplotipo que las demás poblaciones no comparten (V). Se cree que durante el Pleistoceno Medio el lago de Tenochtitlan, tuvo comunicación por un tiempo con el Río Lerma, hasta que la magnitud de la Sierra de las Cruces lo impidió (Tamayo, 1962). Las demás poblaciones tienen muy poca diferenciación entre ellas o solo muestran haplotipos únicos de cada región. Probablemente el estadístico de S_{NV} no indicó una diferenciación con respecto a la población de Amado Nervo ya que el haplotipo III es la inserción de una base y el estadístico S_{nn} no considera a los gaps como un polimorfismo.

5.6 Tamaño efectivo de la población

Para calcular el tamaño efectivo de la población se utilizó la fórmula de $\theta_s = 2\mu Ne$ la θ_s utilizada fue por secuencia para cada población (Apéndice E). Algunas poblaciones tienen un mayor número de diferencias en las secuencias que las conforman como Viveros y Maravatio a diferencia de otras como Santa María del Tule y San Antonio Matute en las cuales no existe ninguna diferencia entre secuencias y por eso es que los valores de tamaño efectivo de la población son diferentes. Otras estimaciones del Ne se realizó utilizando el programa de

BEAST V1.4.8 (Apéndice F) en el cual los tamaños poblacionales coinciden con los obtenidos con la formula de $\theta_s = 2\mu Ne$

5.7 Expansión poblacional

Según las estimaciones realizadas, la expansión ocurrió en el Pleistoceno medio hace 3.7×10^5 años. A partir de estudios con isótopos de oxígeno, se estima que la temperatura de la Tierra estaba cambiando de un periodo interglacial hacia otra era glacial (Savin, 1977). También hay evidencia de que los índices de precipitación aumentaron y causaron que muchos lagos pluviales en Norteamérica crecieran y se desbordaran conectándose con otros lagos y cuencas. Un ejemplo es el lago Searles que tuvo desbordamientos al lago Panamint entre 440,000 y 350,000 años (Jannik *et al.*, 1991). En el caso de México existen diferentes estudios que apoyan la visión de que la Meseta Central era un área con un solo lago o un grupo de lagos (Schönhuth *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2006) muchos de los cuales probablemente estaban conectados entre si. Las inferencias para estos resultados vienen de depósitos aluviales descritos en diferentes estudios geológicos y paleontológicos (Carranza y Espinosa, 1994; Miller y Carranza, 1998). También existen algunos estudios de filogeografía que apoyan la teoría de la existencia de grandes lagos durante el Pleistoceno como el realizado por Mejía *et al.* (2007) con el parásito de peces *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda) en el cual la distribución de los haplotipos y la diversidad genética encontrada en *R. lichtenfelsi* refleja la distribución de las cuencas de la Meseta Central durante un periodo geológico reciente (Pleistoceno).

Las dinámicas cíclicas de la vegetación dependen en las variaciones cíclicas de los principales parámetros climáticos, temperatura y precipitación. Es posible distinguir principalmente cuatro fases climáticas: (a) una fase caracterizada por bajas precipitaciones y un incremento en la temperatura; (b) una fase en la cual tanto la temperatura como la precipitación son altas; (c) otra caracterizada por un alto porcentaje de humedad y bajas temperaturas y (d) finalmente una fase en la cual la temperatura y la humedad son bajas; a y b representan la fase interglacial y c y d a la fase glacial (Iversen, 1958) (Figura 14).

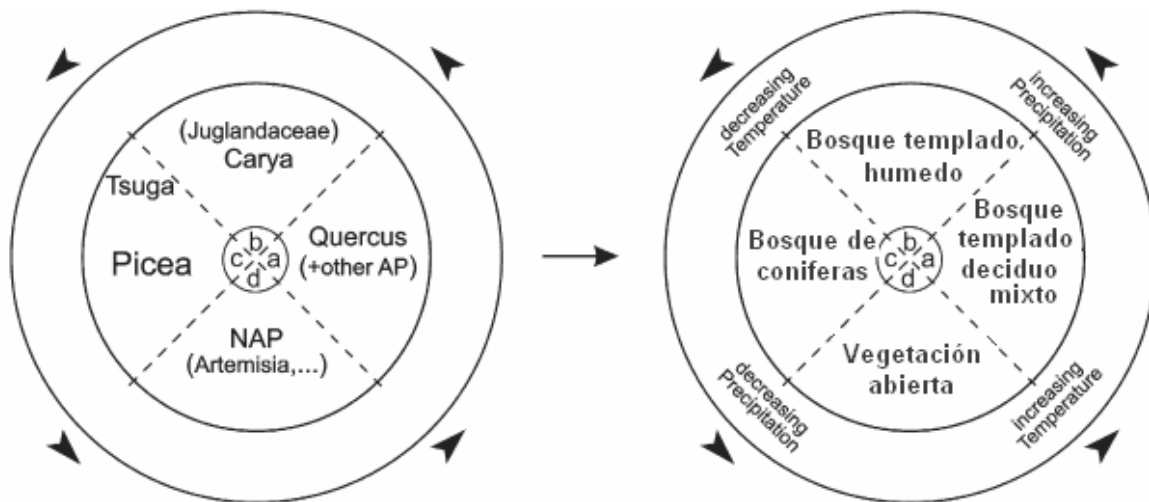


Figura 14. Representación esquemática de los ciclos teóricos de vegetación la cual, indica las cuatro fase de vegetación y las características climáticas (Iversen, 1958).

El polen tipo *Taxodium* se encuentra disperso en comunidades pantanosas durante los intervalos templados y húmedos cuando las angiospermas de la familia Juglandaceae dominaban y *Picea* mostraba valores bajos. El comportamiento de la curva de polen de *Taxodium* probablemente fue determinada por una serie de factores climáticos y ambientales (Fusco, 2007).

5.8 Causas de la poca diversidad genética en árboles longevos

El genoma neutral de especies con tiempos generacionales largos evoluciona muy lento, y las poblaciones grandes alcanzan el equilibrio a una tasa muy lenta comparada con las plantas de ciclos de vida cortos. Es por esto que los genomas de árboles longevos retienen por mucho más tiempo las consecuencias de eventos demográficos. En las especies de árboles que tienen una diferenciación entre poblaciones relativamente baja de desequilibrio de ligamiento, será más fácil detectar los efectos de la selección natural que en especies que tienen una historia y estructura más compleja (Savolainen y Pyhäjärvi, 2007).

Hamrick y Godt (1990, 1996) han reportado que especies con estas características de tiempos generacionales tan largos, muestran baja diferenciación genética, inclusive se ha reportado $F_{ST} \sim 0.05$ en *Cryptomeria japonica* utilizando aloenzimas (Tomaru et al., 1994). Por eso es que *T. mucronatum* presenta tan poca variabilidad en el cloroplasto.

Para poder confirmar que *T. mucronatum* es una especie con poca variación, sería recomendable tener una muestra más grande en otras localidades con un mayor número de individuos y también realizar el mismo tipo de estudios en la especie hermana.

6. CONCLUSIONES

La variación obtenida a partir del espaciador *psbM-trnD*, indica que la expansión pudo haber sido durante el Pleistoceno en un periodo de clima templado con alto índice de precipitación.

El haplotipo ancestral, a pesar de no ser el más frecuente, tiene aún una frecuencia elevada. El escenario que pudo haber ocurrido es que las cuencas donde se encuentran las poblaciones han sufrido varios cambios causando que las cuencas se unieran o separaran formando grandes lagos, lo cual a su vez podría ser la causa de la expansión de las poblaciones de *T. mucronatum* ya que se ha sugerido que esta especie solo presenta reclutamiento episódico en periodos de estrés hídrico (Keeland y Conner, 1999).

La distribución *mismatch* (Figura.10) presenta evidencia de la posibilidad de dos cuellos de botella, con sus respectivas expansiones. Los estimados de los tiempos antes mencionados en la discusión se sitúan en el Mioceno y el Pleistoceno. Evidencia geológica indirecta en E.U.A. y directa (polen) apoyan esta hipótesis. Sin embargo, para una mayor solidez se requieren estudios paleoclimáticos en la zona, principalmente para determinar temperatura y niveles de humedad.

El haplotipo ancestral pudo haberse originado en el Mioceno a partir de un primer cuello de botella, pero debido a que el efecto de la deriva es más lento en poblaciones con *N_e* altos y una tasa de mutación lenta, este aún se encuentra presente en la gran mayoría de las poblaciones. El haplotipo más común originado a partir del ancestral se fijó en la población por un segundo cuello de botella y a partir de este se originaron los otros haplotipos.

La expansión, posiblemente ocurrió debido a que el recambio de las poblaciones de *T. mucronatum* sólo se dan cuando los árboles “padre” mueren y dejan un claro para el surgimiento de nuevos individuos esto se da con mayor intensidad, cuando se presentan condiciones de sequías fuertes o grandes inundaciones.

6.1 Pruebas de neutralidad

A pesar de que el marcador utilizado puede considerarse como neutral y que la probabilidad de recombinación en los organelos es baja, no debe descartarse el efecto del *hitch hiking*. Por lo que el siguiente paso a seguir sería hacer pruebas de selección en los *loci* utilizados, así como compararlos con otros *loci*.

Es decir, aunque los resultados del presente estudio son bastante sólidos, presentan nuevas líneas de investigación tanto dentro del estudio de *T. mucronatum* como especie, como de su uso en el contexto del estudio de la evolución de los organismos y sus distribuciones.

6.2 Estructuración poblacional

La mayoría de los haplotipos encontrados solo se encuentran en una población y no se comparten entre poblaciones, solo las poblaciones de Maravatio y Viveros de Coyoacán comparten haplotipos debido posiblemente, a que tuvieron un contacto secundario o aun tienen contacto. Es posible que durante el Pleistoceno las poblaciones de Maravatio y Viveros de Coyoacán tuvieran un contacto durante la expansión esta puede ser la razón por la cual compartan dos haplotipos y después durante la glaciación o por el drenado de los lagos y cambios de vertientes de las cuencas las poblaciones se fragmentaron.

La población de Amado Nervo parece haberse separado antes de las otras poblaciones por lo cual es que se encuentra diferenciada de las otras.

7. LITERATURA CITADA

Aguadé, M. y C. Langley. 1994. Polymorphism and divergence in regions of low recombination in *Drosophila*. En: Non-Neutral Evolution: Theories y Molecular Data, Golding, B. (ed.) Chapman & Hall. USA. pp. 46-56.

Alavez, G. V. 2008. Evolución de microsatélites de cloroplasto en *Pinus pseudostrabus* y *Pinus montezumae*: efecto del ligamiento en la estimación de parámetros poblacionales y aplicaciones en genética de poblaciones. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 76pp

Applequist, M. B. 1958. A simple pith locator for use with off-center increment cores. Journal of Forestry 56: 141.

Aquadro, C. F. 1992. Why is the genome variable? Insights from *Drosophila*. Trends in Genetics. 8: 355-362.

Aquadro, C. F., D. J. Begun y E. C. Kindahl. 1994. Selection, recombination, and DNA polymorphism in *Drosophila*. En: Non-Neutral Evolution: Theories y Molecular Data. Chapman & Hall. USA. pp 46-56.

Avice, J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press. England. 340 pp.

Aris-Brosou, S. y L. Excoffier. 1996. The impact of population expansion y mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. Molecular Biology and Evolution 13: 494-504.

Aulenback, K. R. y D. R. Braman. 1991. A new Cretaceous conifer from northern Alaska. American Journal of Botany 42:522-528.

Aulenback, K. R. y B. A. LePage, 1998. *Taxodium wallisii* sp. nov.: first occurrence of *Taxodium* from the Upper Cretaceous. International Journal of Plant Sciences 159: 367-390.

Bensch, S. y D. Hasselquist 1999. Phylogeographic population structure of great reed warblers: an analysis of mtDNA control region sequences. Biological Journal of the Linnean Society 66: 171-185.

Brown, C. A. y G. N. Montz. 1986. Baldcypress: the tree unique, the wood eternal. Claitors Publishing Division. Baton Rouge. USA. 139 pp.

Brunsfeld, S. J., D. E. Soltis, y P. S. Soltis. 1992. Evolutionary patterns and processes in *Salix sect. Longifoliae*: evidence from chloroplast DNA. Systematic Botany 17: 239-256.

Cann, R. I., M. Stoneking y A. C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature 325: 31-36.

- Carranza, E. 1992. Taxodiaceae. J. Rzedowski y G. Calderón de Rzedowski (Comp.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro. México. 4: 1-7.
- Carranza, O. y L. Espinosa. 1994. Late Tertiary equids from the State of Hidalgo, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 11: 182-192.
- Clegg M. T., G. H., Learn y E. M. Golenberg. 1991. Molecular evolution of chloroplast DNA. Selyer R. K., A. G. Clark, y T. S. Whittam (eds) En: *Evolution at the Molecular Level*. pp 135-149.
- Clement, M., D. Posada, y K. Crandall, 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- Demesure, B., N. Sodzi, y R. J. Petit. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129–131.
- De Cserna, Z. y R. Álvarez. 1995. Quaternary drainage development in Central Mexico and the threat of an environmental disaster: A geological appraisal. *Environmental & Engineering Geoscience* 1: 29-34.
- Domínguez D. O., I. Doadrio y G. Pérez-Ponce. 2006. Historical biogeography of some river basins in central Mexico evidenced by their goodeinid freshwater fishes: a preliminary hypothesis using secondary Brooks Parsimony Analysis (BPA). *Journal of Biogeography* 33:1437–1447.
- Dong, J. y D. B. Wagner. 1994. Paternal inherited chloroplast polymorphism in *Pinus*: estimation of diversity and population subdivision, and tests of disequilibrium with a maternal inherited mitochondrial polymorphism. *Genetics* 136:1187–1194.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- Drummond A. J. y A. Rambaut. 2007. "BEAST" V1.4.8: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology* 7:214
- Drummond A. J., A. Rambaut, B. Shapiro y O. G. Pandbus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185-1192.
- Farjon, A. 2005. A monograph of Cupressaceae and Sciadopitys. Royal Botanic Gardens. Cambridge Printing. England. 643 pp

- Feth, J. H. 1961. A new map of western conterminous United States showing the maximum known or inferred extent of Pleistocene lakes. En: Short papers in the geologic y hydrologic sciences. U.S. Geological Survey Professional Paper 424-B. (U.S. Government Printing Office). USA. 110-112pp
- Florin, R. 1963. The distribution of conifer and taxa genera in time and space. *Acta Horti Bergiani* 20: 121-312.
- Fu, Y. X. y W. H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Fusco, F. 2007. Vegetation response to early Pleistocene climatic cycles in the Lamone valley (Northern Apennines, Italy). *Review of Palaeobotany & Palynology* 145:1-23.
- Futuyma, D. 2005. *Evolutionary biology*. Sinauer Associates. USA. 763 pp.
- Gadek, A. P., D. L. Alpers, M. M. Heslewood y C. G. Quinn. 2000. Relationships within Cupressaceae sensu lato: a combined morphological y molecular approach. *American Journal of Botany* 87:1044-1057.
- Gillespie, J. 2004. *Population genetics: A concise guide*. Johns Hopkins. USA. 214 pp.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hamrick, J. L., y M. J. W. Godt. 1990. Allozyme diversity in plant species. En: *Plant Population Genetics, Breeding y Genetic Resources*. Brown A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler y B. S. Weir (eds). Sinauer Associates Sunderland, USA. pp. 43–63
- Hamrick, J. L., y M. J. W. Godt. 1996 Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. England. rinyu-kyoukai, Aomori (en Japonés). 351: 1291–1298.
- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*. 66: 591-600.
- Hartl, D. y A. Clark. 1997. *Principles of Population genetics*. Sinauer Associates. USA. 652pp.
- Hartmann, H. T. y D. E. Kester. 1982. *Propagación de Plantas y Principios Básicos*. CECSA. México. 814pp.
- Hedrick, P. 2005. *Genetics of Populations*. Jones & Barlett Publishers. USA. 737pp.
- Hendricks, D. M. 1985. *Arizona soils. a centennial publication of the college of agriculture, University of Arizona*. USA. 235pp.

- Hong, Y. P., V. D. Hipkins, y S. H. Strauss. 1993. Chloroplast DNA diversity among trees, populations and species in the California closed-cone pines (*Pinus radiata*, *Pinus muricata* and *Pinus attenuata*). *Genetics* 135:1187–1196.
- Hudson, R. 2000. A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011-2014.
- Hudson, R., S. Montgomery y W. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589.
- Iversen, J. 1958. The bearing of glacial and inter glacial epochs on the formation and extinction of plant taxa. *Uppsala Universitets Årsskrift*. 6:210-215.
- Jannik, N. O., F. M. Phillips, G. I. Smith, y D. Elmore. 1991. A ³⁶Cl chronology of lacustrine sedimentation in the Pleistocene Owens River system. *Bulletin Geological Society of America* 103:1146–1159.
- Joy, D., X. Feng, J. Mu, T. Furuya, K. Chotivanich, A. Krettli, M. Ho, A. Wang, N. White, E. Suh, P. Beerli y X. Du. 2003. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science* 300:318-321.
- Kado, T., Y. Ushio, H. Yoshimaru, Y. Tsumura y H. Tachida. 2006. Contrasting patterns of DNA variation in natural populations of two related conifers. *Cryptomeria japonica* and *Taxodium distichum* (Cupressaceae sensu lato). *Genes Genetic Systematic* 81:103-113
- Keely, B. D., W.H. Conner. 1999. Natural regeneration and growth of *Taxodium distichum* (L.) Rich. in Lake Chicot, Louisiana after 44 years of flooding. *Wetlands* 19: 149-155.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura, M. 1969. The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 63:1181-1188.
- Kirchman, J. J., L. A. Whittingham y F. H. Sheldon. 2000. Relationships among Cave Swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparisons of microsatellite and cytochrome b data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 107-121
- Lecointre, G., H. Phillippe, H. L. Le, y H. LeGuyader. 1993. Species sampling has a major impact on phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 205–224
- Li, W. H. 1977. Distribution of nucleotide differences between two randomly chosen cistrons in a finite population. *Genetics* 85:331-337
- Lidholm, J., A. E. Szmidt, J. E. Hallgren, y P. Gustafsson. 1988. The chloroplast genomes of conifers lack one of the rRNA-encoding inverted repeats. *Molecular Genetics*.212:6–10.

- Little, E. L. Jr. 1979. Conifer and important hardwoods. Atlas of the United States Trees Vol. 1, USDA Forest Service. Miscellaneous publications. USA. 1146pp.
- Liu T. S. y H. J. Su. 1983. Biosystematic studies on Taiwan and numerical evaluation of the systematics of Taxodiaceae. Taiwan Museum Special Publications Ser 2: 1-113.
- López, L. R. 2003. Principales rasgos geográficos de la República Mexicana. Investigaciones Geográficas 50: 26-41.
- Lynch, M. 2002. Intron evolution as a population-genetic process. Proceedings of the National Academy of Sciences 9: 6118-6123.
- Maldonado-Koerdell, M. 1964. Geohistory and paleogeography of Middle America. En: R. Wauchope y R.C. West (eds). Handbook of Middle American Indians, Vol.I. Natural Environment and Early Cultures. University of Texas Press, Austin.USA pp 3-32.
- Martínez, M. 1963. El ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten.). En: Las pináceas mexicanas. 3a. ed., UNAM, Instituto de Biología, México pp. 161-212.
- Mejía, H. H., E. Vázquez y G. Pérez-Ponce. 2007. Phylogeography and freshwater basins in central Mexico: recent history as revealed by the fish parasite *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda). Journal of Biogeography 34: 787-801.
- Miller, W. E. y O. Carranza. 1998. Importance of Late Tertiary carnivores and equids from the Transmexican Volcanic Belt. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas 15: 161–166.
- Mogensen, H. L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. American Journal of Botany 83:383–404.
- Neale, D. B., K. A. Marshall, y R. R. Sederoff. 1989. Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens*. Proceedings of the National Academy of Science 86: 9347–9349.
- Nei, M., T. Maruyama y R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and the genetic variability in populations. Evolution 29:1-10.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. USA. 512 pp.
- Palmer, J. D, R. K. Jansen, H. J. Michaels, M. W. Chase y J. R. Manhart. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 75: 1180-1206.
- Palmer, J. D., R. A. Jorgensen y W. F. Thompson. 1985. Chloroplast DNA variation and evolution in *Pisum*: pattern of change and phylogenetic analysis. Genetics 109:195–213.

- Posada, D. y K. A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37-45
- Raubeson, L. A. y R. K. Jansen. 1992. A rare chloroplast DNA structure mutation is shared by all conifers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 20:17-24.
- Rogers, A. y H. Harpending. 1992. Population growth in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 3: 552-569.
- Rozas, J., J. Sánchez-Del Barrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497
- Savard, L., P. Li, S. Strauss, M. Chase, M. Michaud y J. Bousquet. 1994. Chloroplast and nuclear gene sequences indicate Late Pennsylvanian time for the last common ancestor of extant seed plants. *Evolution* 91: 5163-5167.
- Savin, S. M. 1977. The history of the earth's surface temperature during the past 100 million years. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 5: 319-355.
- Savolainen, O. y T. Phyhjärvi. 2007. Genomic diversity in forest trees. *Plant Biology* 10: 162-167.
- Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher y W. A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.
- Schönhuth, S., A. De Sostoa, E. Martínez y I. Doadrio. 2001. Southern Mexican minnows of the genus *Notropis* (Actinopterygii, Cyprinidae): genetic variation, phylogenetic relationships and biogeographical implications. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 359-377.
- Shin-Ying, H., L. Tsan-Piao, M. Chiu-Shun, L. Chung-Ling, C. Jeng-Der y Y. Jenq-Chuan. 2003. Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* 12: 2689-2695.
- Silvertown, J., M. Franco, I. Pisanty y A. Mendoza. 1993. Comparative plant demography relative importance of life-cycle components to the finite rate of increase in woody y herbaceous perennials. *Journal of Ecology* 81: 465-476.
- Slatkin, M. y R. R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129:555-562.
- Smith, M. L. y R. R. Miller. 1986. Mexican goodeid fishes of the genus *Characodon*, with description of new species. *American Museum of Natural History* 2851:1-14.

- Strauss, S. H., J. D. Palmer, G. T. Howe y A. H. Doerksen. 1988. Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 85:3898–3902.
- Stokes, M. A. y T. L. Smiley. 1968. *An Introduction to tree-ring dating* University of Chicago Press. USA. 73pp
- Suza'n, H. A., G. Enriquez y G. Malda. 2007. Population structure of the Mexican baldcypress (*Taxodium mucronatum* Ten.) in Queretaro, Mexico. *Forest Ecology and Management* 242: 243-249.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, y J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamayo, J. L. 1962. *Geografía general de México*, Vols.2 y 3. Instituto Mexicano de Investigaciones Económicas, México.
- Templeton, A. 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. Wiley USA. 705pp.
- Tomaru, N., Y. Tsumura y K. Ohba. 1994. Genetic variation and population differentiation in natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Plant Species Biology* 9: 191-199.
- Tsumura, Y., Y. Ogihara, T. Sasakuma, y K. Ohba. 1993. Physical map of chloroplast DNA in sugi, *Cryptomeria japonica*. *Theoretical and Applied Genetics* 86:166-172.
- Tsumura, Y., H. Taguchi, Y. Suyama y K. Ohba. 1994. Geographical cline of chloroplast DNA variation in *Abies mariesii*. *Theoretical and Applied Genetics* 89:922-926.
- Vazquez-Lobo Y. A. 1996. *Filogenia de hongos endófitos del género Pinus: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 66pp.
- Villanueva, D. J., A. Hernández, R. F. García, S. E. Cornejo, O. D. W. Stahle, M. D. Therrell y M. K. Cleavelly. 2003. Análisis estructural de un rodal de sabino (*Taxodium mucronatum* Ten.) en Los Peroles, San Luis Potosí, México. *Ciencia Forestal*. 28: 57-79.
- Villanueva, D. J., D. W. Stahle, B. H. Luckman, J. C. Paredes, M. D. Therrell, R. M. Morán y M.K. Cleavelly. 2007. Potencial dendrocronológico de *Taxodium mucronatum* Ten. y acciones para su conservación en México. *Ciencia Forestal* 32: 9-39.
- Wagner, D. B., G. R. Furnier, M. A. Saghai-Marooof, S.M. Williams, B. P. Dancik y R. W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 2097–2100.

Waitz, P. 1943. Reseña geológica de la cuenca del Lerma. Boletín de la Sociedad mexicana de Geografía y Estadística 58:123-138.

Wakeley, J. 2005. The limits of theoretical population genetics. *Genetics* 1: 1-7

Wakasugi, T., T. Hirose, M. Horihata, T. Tsudzuki, H. Kossel y M. Sugiura. 1996. Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: the pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 8766–8770.

Weising, K., y R.C. Gardner. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.

West, R. C., 1964. Surface configuration and associated geology of Middle America. En: Wauchope, R.C West (eds), *Handbook of Middle American Indians*, Vol 1: University of Texas Press Austin, USA. pp. 33-83.

Zink, R.M. y R. C. Blackwell-Rago. 2000. Species limits and recent population history in the Curve-billed Trasher. *The Condor* 102: 881-886.

8. Apéndices

Apéndice A

Protocolo Miniprep para aislamiento de DNA de plantas (Doyle, Doyle, 1987) modificado por (Vázquez-Lobo, 1996).

1. Moler en un mortero un máximo de 500mg de tejido con nitrógeno líquido.
2. Cambiar el tejido pulverizado a un nuevo mortero y agregar 1 ml de buffer CTAB2X (Tris-HCL 100mM pH8, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, CTAB 2% y bME 0.3%).
3. Recuperar en un tubo eppendorf de 1.5ml y centrifugar a 13000rpm durante 8 min. 4°C (puede ser a temperatura ambiente).
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600µl de buffer CTAB 2X. Incubar en un baño 10 min a 60°C .
5. Agregar a cada tubo 600 µl de cloroformo-octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7000 rpm durante 12 min. A 4°C (o hasta que el sobrenadante quede transparente). Una vez recuperado el sobrenadante, este paso se puede repetir agregando sólo 550 µl de cloroformo-octanol.
6. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo y precipitar DNA con 2/3 del volumen final (550µl aprox) de isopropanol frío. Incubar de 30 minutos a 24 horas a -20°C.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 10min a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
8. El pellet debe limpiarse con 500 µl de etanol 70% frío y centrifugar a 13000rpm durante 2 min. Repetir
9. Eliminar el sobrenadante, secar en campana y resuspender el pellet con 200 µl de ddH₂O estéril.

Apéndice B

Reactivos para la reacción del PCR

	1x
5xBuffer	
MgCl	5mM
dNTP	200µM
Taq	0.5U
oligos	1µM
DNA	3µl

Cada reacción se afora a 25µl con ddH₂O

Condiciones para las reacciones del PCR

Ciclo de 80°C, 5min; 35x (94°C, 1min; 54°C, 1min; 72°C, 3.5min); 72°C, 5min.

Apéndice C

Muestras secuenciadas para el intron de trn-L (c,d) (Taberlet et al., 1991).

Población	Individuos secuenciados	Muestras por población
Maravatio, Michoacán	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16	15
Oaxtepec, Morelos	1,2,3,4,	4
Amado Nervo, Durango	1,2,3,4	4
El Trapiche, Querétaro	1,2,3,4	4
Viveros, México D.F.	2,3,4	3
Total		30

Ninguna de las secuencias mostró polimorfismos

Muestras secuenciadas para el microsatélite ccmpl

Población	Individuos secuenciados	Muestras por población
Maravatio, Michoacán	1,2,3,4	4
Oaxtepec, Morelos	1,3,4,5	4
Amado Nervo, Durango	1,3,4	3
El Trapiche, Querétaro	1,2,3,4	4
Viveros, México D.F.	2,3,4	3
San Antonio Matute, Jalisco	3	1
Total		19

Ninguna de las secuencias mostró polimorfismos

Apéndice D

[1] San Antonio Matute	[9] Viveros 16	[17] <i>Taxodium d.</i>
[2] Oaxtepec 4	[10] Oaxtepec 2	[18] <i>Cryptomeria j.</i>
[3] Oaxtepec 5	[11] Jalpan 5	[19] <i>Glyptostrobus p.</i>
[4] Oaxtepec 6	[12] El Trapiche 3	
[5] Maravatio 13	[13] El Trapiche 9	
[6] Maravatio 4	[14] El Trapiche 10	
[7] Viveros 14	[15] El Trapiche 11	
[8] Viveros 15	[16] Viveros 13	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
[1]																		
[2]	0.000																	
[3]	0.000	0.000																
[4]	0.000	0.000	0.000															
[5]	0.001	0.001	0.001	0.001														
[6]	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002													
[7]	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000												
[8]	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000											
[9]	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000										
[10]	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002									
[11]	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002								
[12]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001							
[13]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000						
[14]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000					
[15]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000				
[16]	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003			
[17]	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.001		
[18]	0.047	0.047	0.047	0.047	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.047	0.049	0.047	0.047	0.047	0.047	0.046	0.046	
[19]	0.046	0.046	0.046	0.046	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.046	0.046	0.046	0.046	0.045	0.046	0.064

Figura 1. Matriz de distancia utilizando Kimura 2 parametros, la franja resaltada es la distancia de la población de Viveros contra todas las demas poblaciones de *Taxodium mucronatum*

Apéndice E

Estimaciones de tamaño efectivo de la población a partir del valor de θ_S por secuencia, estimados con el programa DnaSP.

Población	θ_S por secuencia
Oaxtepec	0.291
Amado Nervo	1.163
Viveros de Coyocan	1.454
Maravatio	1.744
San Antonio Matute	0
El Trapiche	1.479
Santa María del Tule	0

Apéndice F

Estimaciones de tamaño poblacional y crecimiento utilizando el programa BEAST v1.4.8 V

	Sin crecimiento exponencial	Con crecimiento exponencial	Con expansión
Raíz del árbol modelo(generaciones)	70,280 (18,800-126,900) <i>24,570 (3,065-52,940)</i>	49,640 (8,425-107,200) -	55,580 (16,400-104,200) <i>15,720 (1,247-36,960)</i>
Tamaño poblaiconal Ne	29,610 (7,206-53,760) <i>18,490 (3,219-38,290)</i>	38,010 (3912-92,290) -	276,900 (9,174-526,800) <i>368,000 (1,279-674,200)</i>

Los valores en negritas y en itálicas son los valores sin el haplotipo ancestral mientras que los otros incluyen al haplotipo ancestral. Todas se corrieron con 70,000,000 de generaciones. Los estimados para crecimiento exponencial sin el haplotipo ancestral usan muy poca variación y por ello los estimadores no son buenos.