



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Demografía histórica del hongo endófito
Lophodermium nitens Darker en la Sierra Madre
Occidental

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ADÁN MIRANDA PÉREZ



DIRECTOR DE TESIS:
BIÓL. RODOLFO SALAS LIZANA
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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
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:

Demografía histórica del hongo endófito *Lophodermium nitens* Darker en la Sierra Madre Occidental

realizado por **Miranda Pérez Adan** con número de cuenta 3-0202567-3 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Propietario M. en C. María Cristina Julia Pérez Reyes

Propietario Biól. Rodolfo Salas Lizana
Tutor

Suplente Dra. Erika Aguirre Planter

Suplente Biól. Lev Orlando Jardón Barbolla

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 02 de junio de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

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

1. Datos del alumno. Miranda Pérez Adan 57 12 72 63 Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Biología 302025673
2. Datos del tutor Biól. Salas Lizana Rodolfo
3. Datos del sinodal 1 Dr. Daniel Piñero Dalmau
4. Datos del sinodal 2 M. en C. María Cristina Julia Pérez Reyes
5. Datos del sinodal 3 Dra. Erika Aguirre Planter
6. Datos del sinodal 4 Biól. Lev Orlando Jardón Barbolla
7. Datos del trabajo escrito Demografía histórica del hongo endófito <i>Lophodermium nitens</i> Darker en la Sierra Madre Occidental 81p. 2009

**Para Alejandro, Isabel,
Celia, Claudia,
Toño, Alejandro Irving y Celia Ivon**

AGRADECIMIENTOS

Gracias al apoyo del proyecto SEMARNAT- CONACYT C01 – 201/ A – 1.

Gracias a las personas que lean este trabajo porque es para ustedes.

A mi tutor Rodolfo Salas, por sus contribuciones fundamentales, porque gracias a él este trabajo ha podido realizarse, porque me brindó su inagotable paciencia y me enseñó infinidad de cosas académicas y no académicas.

Al Dr. Daniel Piñero porque me dio un lugar en su laboratorio y gracias a eso conocí a personas muy valiosas que me apoyaron durante mucho tiempo.

A mis sinodales Biól. Rodolfo Salas, Dr. Daniel Piñero, Biól. Lev Jardón, M. en C. Ma. Cristina Pérez y a la Dra. Erika Aguirre por sus comentarios e interés por este trabajo.

Al Dr. David S. Gernandt, a Alejandra Vázquez-Lobo, a Ana Wegier, a Brian Urbano y a Rodolfo Salas por su invaluable ayuda en la colecta de acículas senescentes.

A la Dra. Marieta Tuena y al Biól. Gonzalo Acero por prestarme una liofilizadora para posteriormente la extraer DNA del micelio de *Lophodermium*.

A Oscar Rodríguez por su apoyo en el mantenimiento del laboratorio.

A René Cerritos y a Erika Aguirre por dejarme hacer PCR en su laboratorio, gracias por su apoyo.

Le agradezco a la Fundación Alberto y Dolores Andrade por haber contribuido a mis estudios desde muy temprana edad.

A mi familia. A mi papá que siempre comparte un pensamiento y me trata de enseñar lecciones importantes de vida. A mi mamá porque siempre me ha brindado su apoyo tanto en las decisiones acertadas como en las equivocadas. A mis hermanos Claudia, Celia, Antonio Israel y Alejandro Irving que tanto me han apoyado aunque no nos hemos correspondido en algunas ocasiones.

A mis amigos Enrique Flores (Kikín, Agent Matt Steel), Héctor U. Vera (Ganso) y a Ibon Gómez (Clay) que siempre tuvieron los brazos abiertos. A los primeros porque hemos compartido grandes momentos juntos, algunos llenos de “gallardía”. A Ibon porque juntos compartimos nuestras inquietudes, sueños y viajes.

A mis amigos de la carrera Marco, Fernánda Renné, David, Alejandro Montufar, Flor, Billy, Eduardo Macías, Mónica, Alejandro, Betzy, Mafer, Jessica, Chepe, Romano, Richard, Ángel, Elba, Estefanía y Daniel Olvera porque siempre conseguimos divertirnos dentro y fuera de clase. A Elisa Romero por nuestra inagotable amistad.

A Alicia Rugerio y a Gricel Jiménez por compartir momentos especiales e inquietudes filosóficas.

Al Dr. León P. Martínez porque siempre que le pedí un consejo me apoyó y me ayudó a aclarar ideas, además de brindarme su amistad y varios lunes en la ciencia.

A Álvaro Chaos porque gracias a su clase de sistemática decidí adentrarme más en el estudio de la evolución.

A Rodrigo Macip y Tania Hernández porque siempre me han brindado su confianza y amistad.

A Fabrizio Guerrero por enseñarme filosofía de la ciencia y a aprender sobre lo importante que son los otros puntos de vista en el pensamiento humano.

A la Dra. Guillermina Alcaraz por enseñarme conducta animal y porque me apoyó desde mis primeros estudios en la carrera de Biología.

A mis amigos del Instituto de Ecología: Fabricio Villalobos porque me tendió la mano, resolvió mis dudas y me dio consejos hasta el último momento; Alejandra Rodríguez, Celeste, Alexander, Jaime, Esmeralda, René Beamonte, Angélica y Sergio Nicasio por compartir pláticas amenas y porque realizamos algunos de nuestros sueños juntos. A Ángela porque siempre me brindó una sonrisa.

A la Dra. Ana Mendoza y a los miembros de su laboratorio por darme un lugar para terminar éste trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Alejandra Moreno Letelier por sus pláticas increíbles sobre los pinos y por resolver muchas de mis dudas platicando y en el papel; Lev, Valeria, Mariana (Marianita), Diego, Ariadna y Alicia por su amistad y por compartir expectativas científicas. A mis hermanas de laboratorio Alejandra Ortíz, Bianca y Nadia Santini por sus consejos y por su apoyo durante todo este tiempo. A Alejandra Vázquez-Lobo, Rodolfo, Brian, Ana W, y Erik por su amistad (en pocas palabras, que incluye todos esos momentos indescriptibles que pasamos juntos) y porque me ayudaron a resolver mis dudas científicas y no científicas.

A la Coordinación Nacional de Becas para la Educación Superior (CNBES) por proporcionarme una beca para concluir mis estudios.

A todas aquellas personas a las que no mencioné.

Los huecos de nuestras creencias son, pues, el lugar vital donde insertan su intervención las ideas. En ellas se trata siempre de sustituir el mundo inestable, ambiguo, de la duda, por un mundo en que la ambigüedad desaparece. ¿Cómo se logra esto? Fantaseando, inventando mundos. La idea es imaginación. Al hombre no le es dado ningún mundo ya determinado. Sólo le son dadas las penalidades y las alegrías de su vida. Orientado por ellas, tiene que inventar el mundo. La mayor porción de él la ha heredado de sus mayores y actúa en su vida como sistema de creencias firmes. Pero cada cual tiene que habérselas por su cuenta con todo lo dudoso, con todo lo que es cuestión. A este fin ensaya figuras imaginarias de mundos y de su posible conducta en ellos. Entre ellas, una le parece idealmente más firme, y a eso llama verdad. Pero conste: lo verdadero, y aun lo científicamente verdadero, no es sino un caso particular de lo fantástico. Hay fantasías exactas. Más aún: sólo puede ser exacto lo fantástico. No hay modo de entender bien al hombre si no se repara en que la matemática brota de la misma raíz que la poesía, del don imaginativo.

José Ortega y Gasset

"Crear y pensar"

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Los hongos endófitos	3
Los pinos en México	6
La Sierra Madre Occidental	8
Inferencia de eventos históricos	8
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS GENERALES	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Colectas	26
Obtención de cultivos monospóricos	26
Extracción de DNA y amplificación de <i>loci</i> nucleares	27
Inferencias de eventos históricos	28
RESULTADOS	32
Inferencias de eventos históricos	32
DISCUSIÓN	46
La variación genética indica vestigios de los procesos demográficos históricos	46
Distribución espacial de la diversidad genética	47
Delimitación de las unidades locales de apareamiento	47
El flujo génico entre subpoblaciones	49
Comparación y correlación entre los estadísticos de diferenciación poblacional	50
Grupos de subpoblaciones delimitados con <i>SAMOVA</i>	53
Crecimiento poblacional de <i>L. nitens</i> en la Sierra Madre Occidental	54
Aislamiento por distancia	57
Correspondencia entre los procesos demográficos históricos y los periodos glaciales del Pleistoceno	58
CONCLUSIONES	62
Perspectivas	63
APÉNDICES	64
REFERENCIAS	72

FIGURAS

1) Corte transversal de <i>Lophodermium nitens</i>	5
2) Características principales de <i>Pinus strobiformis</i>	7
3) Mapas con la ubicación de las siete subpoblaciones muestreadas	34
4) Distribución y frecuencia de los haplotipos por subpoblación	34
5) Correlaciones entre los estimadores de la diferenciación poblacional y entre los <i>loci</i>	38
6) Resultados gráficos del análisis de la varianza molecular	39
7) Distribución <i>mismatch</i> bajo el modelo de expansión poblacional súbita	40
8) Tiempos a la expansión estimados con τ a partir de la distribución <i>mismatch</i> comparados con los ciclos glaciales del Pleistoceno	40
9) Correlación entre la distancia geográfica y los diferentes estimadores de la distancia genética	41
10) Redes de haplotipos para cada marcador	42
11) Corroboración de las inferencias de flujo génico restringido con aislamiento por distancia del <i>NCPA</i>	44
12) <i>TMRCAs</i> estimado para el cladograma total de ambos <i>loci</i>	45

TABLAS

1) Lista de <i>primers</i> empleados	27
2) Coordenadas geográficas de cada sitio de colecta	30
3) Diversidad genética del <i>locus CHS-1</i> en cada una de las subpoblaciones muestreadas y en el total de la muestra	33
4) Diversidad genética del <i>locus ACT</i> en cada una de las subpoblaciones muestreadas y en el total de la muestra	33
5) Comparaciones pareadas de diferenciación poblacional usando tres diferentes estimadores y el estimado del flujo génico (Nm) para el <i>locus CHS-1</i>	35
6) Comparaciones pareadas de diferenciación poblacional usando tres diferentes estimadores y el estimado del flujo génico (Nm) para el <i>locus ACT</i>	36
7) Resultados <i>SAMOVA</i> para el <i>locus CHS-1</i>	37
8) Resultados <i>SAMOVA</i> para el <i>locus ACT</i>	37
9) Prueba de hipótesis de un modelo Wright-Fisher.	39
10) Inferencia biológica del <i>NCPA</i> para el <i>locus CHS-1</i>	43
11) Inferencia biológica del <i>NCPA</i> para el <i>locus ACT</i>	43

RESUMEN

En la actualidad se desconoce la mayor parte de la biodiversidad fúngica, especialmente en lo que se refiere a las comunidades de endófitos. Con ayuda de los estudios genéticos se ha descubierto la historia evolutiva de muchas especies. Este estudio se enfoca en la reconstrucción de la demografía histórica del hongo endófito *Lophodermium nitens* Darker en la Sierra Madre Occidental (SMOcc). Al mismo tiempo, se introduce el índice de biodiversidad β , de uso común en ecología para estimar la diferenciación interespecífica; como un estimador de la diferenciación genética entre subpoblaciones.

Usando como marcadores moleculares dos *loci* de DNA nuclear, *CHS-1* (298pb) y *ACT* (193pb) en una muestra de siete subpoblaciones de *L. nitens* en la SMOcc, se encontró que las subpoblaciones de *L. nitens* tienen alta diversidad haplotídica y poca diversidad nucleotídica ($Hd = 0.7470$, $\pi = 0.0054$, $\theta_W = 0.0110$ para el *locus CHS-1* y $Hd = 0.7550$, $\pi = 0.0065$, $\theta_W = 0.0219$ para *ACT*) lo que sugiere una expansión demográfica en el pasado. Por su parte, se encontraron patrones complejos de diferenciación entre subpoblaciones; existe alta diferenciación entre las poblaciones El Salto y Bolaños usando ambos *loci*, con $F_{ST} = 0.2177$ $S_{nn} = 0.8064$ y $\beta = 0.8000$ para el *locus CHS-1* y $F_{ST} = 0.6615$, $S_{nn} = 1.0$ and $\beta = 1.0$ para el *locus ACT*. El análisis comparativo de los diferentes estimadores de la diferenciación poblacional reveló una alta correlación entre F_{ST} y S_{nn} , ($r_{xy} = 0.9478$ con $P = 0.0003$) y que el índice β es más sensible que F_{ST} y S_{nn} .

La inferencia de los tiempos desde la expansión corresponde a dos diferentes periodos glaciales del Pleistoceno. El *Nested Clade Phylogeographic Analysis* (NCPA) también concluyó expansiones poblacionales, el *TMRCA* asociado con las inferencias demográficas es 710,000 años para el *locus CHS-1* y 7150,000 años para el *locus ACT*, ambos corresponden a un periodo interglacial. Asimismo, el NCPA sugiere aislamiento por distancia entre algunas subpoblaciones. La demografía histórica de *L. nitens* es similar en otras regiones biogeográficas de México como la FVTM, además de que es complementaria con otras especies de afinidad templada en la SMOcc como *Pinus strobiformis* Engelmann y *Picea chihuahuana* Martínez.

ABSTRACT

Currently, most of the fungal biodiversity is unknown, specially the communities of fungal endophytes. Recent genetical techniques allowed the discovery of the evolutionary histories of many fungal species. This study focuses in the reconstruction of the historical demography of the fungal endophyte *Lophodermium nitens* Darker in populations of the Sierra Madre Occidental. At the same time, we introduce the use of the index of biodiversity β , commonly used in ecology for interspecific differentiation; to detect genetic differentiation among subpopulations.

We amplified and sequenced two DNA nuclear *loci*, *CHS-1* (298bp) and *ACT* (193bp) from individuals sampled in seven subpopulations of *L. nitens* in the SMOcc. These markers revealed high haplotype diversity and low nucleotide diversity and population mutation rate for both *loci* ($Hd = 0.7470$, $\pi = 0.0054$, $\theta_w = 0.0110$ for the *locus CHS-1* and $Hd = 0.7550$, $\pi = 0.0065$, $\theta_w = 0.0219$ for *ACT*) which are suggestive of past population expansion. On the other hand, we found complex patterns of genetic differentiation among subpopulations. For instance, there are high levels of gene flow between most of the subpopulations but populations El Salto and Bolaños are highly differentiated using both *loci* ($F_{ST} = 0.2177$, $S_{nn} = 0.8064$ and $\beta = 0.8000$ for the *locus CHS-1* and $F_{ST} = 0.6615$, $S_{nn} = 1.0$ and $\beta = 1.0$ for the *locus ACT*). The comparison between genetic differentiation estimates showed that there is a high correlation between F_{ST} and S_{nn} , ($r_{xy} = 0.9478$ with $P = 0.0003$) and that index β is more sensible than F_{ST} and S_{nn} .

The inferred times since population expansion correspond to two different glacial periods of the Pleistocene. Nested Clade Phylogeographical Analysis also concluded population expansions, the *TMRCAs* associated with this demographic inference is 710,000 years for *CHS-1 locus* and 715,000 years for *locus ACT*, which corresponded to an interglacial period. Also, the *NCPA* suggest isolation by distance among some populations. The historical demography of *L. nitens* is similar to that observed for the same species in other biogeographical regions of Mexico, such as the Trans-Mexican Volcanic Belt. Moreover, information from this study is complementary to other species of similar habitat affinity in SMOcc, specifically *Pinus strobiformis* Engelmann and *Picea chihuahuana* Martínez.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos

La diversidad de hongos ha sido estimada en 1.5 millones de especies, considerando a las que no se conocen y apenas se han empezado a estudiar, como a las comunidades de endófitos (Hawksworth 2001, Arnold 2007). Los hongos endófitos se denominan así por desarrollar parte de su ciclo de vida dentro de las plantas sin causar un daño aparente (Arnold 2007, Finlay y Clay 2007). La mayoría de los endófitos conocidos pertenecen a la División Ascomycota y algunos a las Divisiones Basidiomycota y Zygomycota (Higgins *et al.* 2007). Por su parte, los Órdenes Helotiales y Rhystimatales, pertenecientes a la División Ascomycota, son dominantes de las comunidades de hongos endófitos en las gimnospermas (Wang *et al.* 2006, Arnold 2007).

Existen dos grandes grupos de hongos endófitos, los denominados clavicipetáceos y los no-clavicipetáceos (Arnold 2007). La principal diferencia entre ambos grupos es el modo de transmisión, pues los primeros se transmiten generalmente por vía vertical (de padres a hijos); mientras que los segundos se transmiten vía horizontal, es decir que cada nueva generación adquiere sus hongos endófitos *de novo*. Existen otras diferencias entre ambos grupos. Los hongos clavicipetáceos están circunscritos a algunos géneros de pastos donde son capaces de beneficiar a sus hospederos incrementando su tolerancia a condiciones adversas del ambiente, como la termotolerancia y tolerancia a la salinidad (Clay y Scharld 2002, Kutil 2007). Por su parte, los hongos endófitos no-clavicipetáceos se encuentran presentes en hepáticas, musgos, helechos, coníferas y angiospermas; corresponden a muy diversos linajes dentro de Ascomycota (*v.gr.* los Órdenes Helotiales, Rhytismatales y Xylariales) en la mayoría de las veces sus interacciones ecológicas no están definidas (Saikkonen *et al.* 1998), van desde los comensales y mutualistas hasta los patógenos latentes (Ortíz-García *et al.* 2003).

Se ha sugerido que la transición de patógenos a no-patógenos de muchos endófitos clavicipetáceos ocurrió posiblemente a presiones de selección natural (Clay y Scharld 2002) por medio de mutaciones puntuales (Freeman y Rodríguez 1993) y de genes que pueden transferirse desde otras especies (Friesen *et al.* 2006). Por su parte, los endófitos no-clavicipetáceos tienen interacciones muy variadas cuyo origen no siempre ha sido claro. Por ejemplo, algunos géneros de hongos endófitos de árboles (no-clavicipetáceos) tienen especies que pueden causar enfermedades como la caída de las

acículas de algunos pinos además de especies que no son patógenas (Minter 1981, Ortiz-García *et al.* 2003, Arnold 2007). Asimismo, se ha sugerido que algunos endófitos no-clavicipetáceos pueden ser útiles para limitar el daño causado por hongos parásitos ya que ocupan espacio dentro de los tejidos aéreos de árboles sanos (Deckert *et al.* 2001b), lo que representaría una forma muy particular de mutualismo. En muchos casos las relaciones filogenéticas entre hongos patógenos y endófitos es muy estrecha, de modo que es difícil establecer cuál sería la condición ancestral, además de que frecuentemente los pares patógeno-endófito comparten un hospedero en común (Sieber 2007).

No sólo las interacciones ecológicas de los endófitos no-clavicipetáceos son complejas, las comunidades que forman dentro de sus hospederos también lo son (Hawksworth 2001). Se ha encontrado que de esta complejidad en las comunidades de hongos endófitos generalmente se encuentra una especie dominante asociada preferentemente a una especie de hospedero (Arnold 2007).

El género *Lophodermium*

El género *Lophodermium* pertenece a la Familia Rhytismataceae; sus especies generalmente son endófitos dominantes en las pináceas (Johnston *et al.* 2003, Ortiz-García *et al.* 2003, Arnold 2007) aunque también se encuentran asociados a angiospermas (Cannon y Minter 1983, Johnston 2001).

Minter (1981) reconoció 16 especies de *Lophodermium* en pinos basándose únicamente en datos morfológicos. Sin embargo, los caracteres que utilizó son lo suficientemente robustos como para distinguir, en lo general, especies verdaderas. Así lo demuestran la filogenia molecular del género en donde la mayoría de las morfoespecies forman grupos monofiléticos (Ortiz-García *et al.* 2003).

En cuanto a su especificidad, se ha encontrado que hay una relación a nivel de subgénero de hospederos en los pinos (Ortiz-García *et al.* 2003). Lo anterior sugiere que la relación hospedero-hongo para este género es muy antigua; sin embargo, existen muy pocos fósiles (Jasinski y Serge 2007) como para probar esta hipótesis.

Lophodermium nitens y su micromorfología

La morfología del ascoma de *L. nitens* es de tipo apotecioide simple y unívoco. En la Figura 1 se muestra una micrografía (10X) de un corte transversal del ascoma de *L. nitens* en el que se observan los caracteres diagnósticos de la especie. Los ascomas se caracterizan por estar muy melanizados, ser subcuticulares, sin labios en la hendidura y presentar líneas de zona abundantes, también melanizadas (Darker 1967, Minter 1981). Las líneas de zona son formaciones de hifas engrosadas y melanizadas cuando ocurre el encuentro de dos individuos genéticamente diferentes. Además, en un estudio genético, Deckert y colaboradores (2002) sugieren que *L. nitens* es un hongo heterotálico, es decir, que se entrecruza durante la reproducción sexual.

El rango de hospederos para *L. nitens* está restringido al subgénero *Strobis* y la subsección *Strobi* en Norteamérica. En particular, *Pinus ayacahuite* Ehrenb. y *P. strobiformis* Engelmann son los únicos hospederos de este hongo en México.

En un estudio de las subpoblaciones de *L. nitens* en la FVTM con el marcador molecular *ACT* se encontró que éstas tuvieron alta diversidad haplotípica, poca diversidad nucleotídica, poca diferenciación entre subpoblaciones (estimada con F_{ST} y S_{nn}), los tamaños poblacionales estimados fueron altos, una red de haplotipos en forma de estrella y la distribución *mismatch* se ajustó al modelo de expansión por lo que se infiere que sus subpoblaciones crecieron durante los periodos glaciales y se contrajeron, aislándose unas de otras, durante los periodos interglaciales. Se sugiere que algunas de sus subpoblaciones tuvieron migración y/o contacto secundario durante los periodos glaciales (Santini 2007).

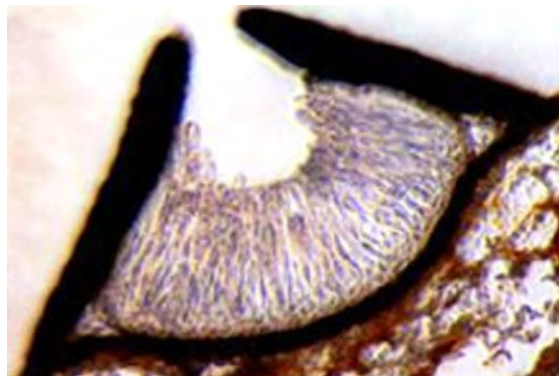


Figura 1. Corte transversal de *Lophodermium nitens* tomado de Salas-Lizana (1998).

Ciclo de vida de Lophodermium nitens

El ciclo de vida de *L. nitens* comienza con la infección de agujas de más de dos años por medio de ascosporas liberadas del ascoma cuando el ambiente es suficientemente húmedo (Deckert y Peterson 2000). Las ascosporas son hialinas, endebles, se dispersan a pocos metros. Se sugiere que *L. nitens* es capaz de penetrar al hospedero produciendo hifas que infectan a las agujas de un nuevo hospedero (Deckert *et al.* 2001). A partir de estas hifas se desarrolla un micelio intercelular de donde se forman haustorios que absorben las sustancias nutritivas. Aunque *L. nitens* comúnmente produce conidios, se piensa que éstos únicamente tienen función de gametas, pues no pueden causar infección (Osorio y Stephan 1991). Una vez en el interior del hospedero, el hongo crecerá intercelularmente de una manera muy lenta y no agresiva. Más de un individuo es capaz de colonizar una aguja en particular, de hecho se ha estimado que puede haber un individuo genéticamente diferente cada 4 mm a lo largo de la aguja (Deckert *et al.* 2002). Algunos factores como la disposición de las ramas al viento o la humedad, así como la lluvia modifican la densidad de colonización de una aguja en particular. Por ejemplo, la lluvia causa que el agua se acumule en la parte distal de las agujas, arrastrando con ella la mayoría de las esporas y provocando que esta parte presente más infecciones (Deckert y Peterson 2000, Deckert *et al.* 2001). La senescencia de las agujas provoca que el crecimiento de *L. nitens* se acelere y que se active la reproducción sexual, de tal manera que se forman apotecios en las agujas amarillas, que maduran y propagan ascosporas nuevas antes de caer junto con las agujas muertas al suelo. Se ha observado que *Lophodermium* no es un buen competidor en la hojarasca y que su actividad metabólica en este medio es nula (Müller *et al.* 2001). El ciclo de vida dura en promedio 1.5 años (Deckert *et al.* 2002).

Los pinos en México

El origen del género *Pinus* es muy antiguo, su divergencia con respecto a otros Géneros de Pinaceae se estima en alrededor de 140 millones de años (Wang *et al.* 2000) y actualmente cuenta con 111 especies reconocidas en todo el mundo (García Arévalo y González 1998). En México se encuentran 49 especies de pinos, por lo que se considera segundo centro de diversificación del género *Pinus* (Perry 1991); con regiones de alta biodiversidad dentro del país. Por ejemplo la Sierra Madre Occidental (SMOCC) que cuenta con alrededor de la quinta parte de todas las especies reconocidas en el mundo (García Arévalo y González 1998).

Las especies de pinos son el sustento de los recursos forestales en México ya que es importante la captación de agua hacia los mantos acuíferos por medio de bosques de galería, de pino y de pino-encino (García Arévalo y González 1998) al igual que los recursos económicos como la madera, papel, resinas y ornamentos (Gernandt *et al.* 2005).

***Pinus strobiformis*, el hospedero de *L. nitens* en la Sierra Madre Occidental**

La única especie hospedera de *L. nitens* en la SMOcc es *P. strobiformis*, clasificada dentro del Subgénero *Strobus* y a su vez dentro de la Sección *Quinquifoliae* (Gernandt *et al.* 2005). Su distribución va desde el suroeste de Estados Unidos hasta el norte de México. En la Figura 2 se ilustran ejemplares de *P. strobiformis*.

Los árboles de *P. strobiformis* se caracterizan por presentar alrededor de 40 m de altura cuando adultos, copa cónica y sólo abierta en sitios secos; su corteza generalmente es delgada, lisa y gris en los ejemplares juveniles, rugosa, café, y con placas rectangulares en los árboles adultos (Figura 2b). Las hojas en forma de aguja, o acículas, se encuentran agrupadas en fascículos de cinco, con un largo de seis a doce centímetros, 0.7 mm de ancho y 0.6 mm de grosor. La superficie dorsal de las acículas es verde claro, la ventral gris azulosa con estomas (Farjon y Styles 1997, García Arévalo y González 1998) (Figura 2a).

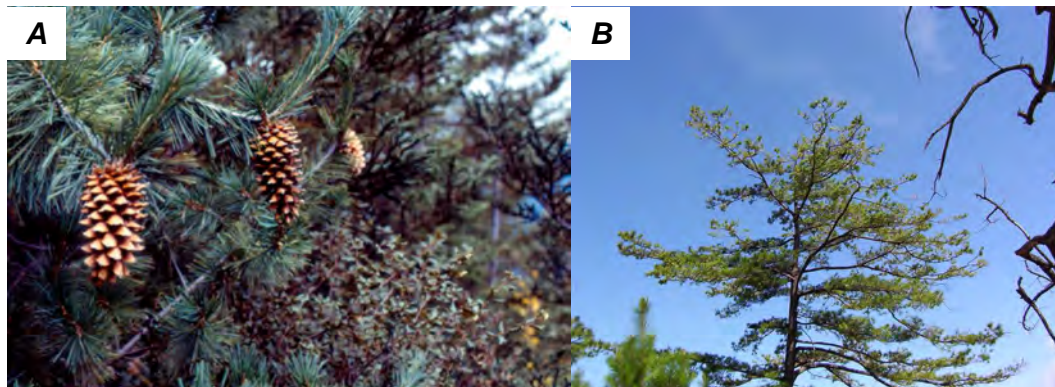


Figura 2. Características principales de *Pinus strobiformis* a) Cono y acículas y b) árbol adulto (Fotografías de A. Moreno-Letelier).

Los conos de *P. strobiformis* son colgantes, ligeramente curvados, de 10 a 24 cm de largo. Cada escama cuenta con dos semillas color café o pardo con ala rudimentaria de 1 mm de largo o sin ella. Se distribuye en cañadas húmedas y laderas sombreadas entre 2,400 a 3,200 m s.n.m en bosques de galería, de pino y de pino-

encino (Perry 1991, Farjon y Styles 1997, García Arévalo y González 1998, Moreno–Letelier y Piñero 2009) (Figura 2a).

La Sierra Madre Occidental

México está dividido en once provincias morfotectónicas (Ferrusquía-Villafranca 1998), de las cuales, la SMOcc cuenta con la mayor extensión (289,000 km²) que es aproximadamente el 14.68% del territorio nacional.

Las rocas andesíticas y basálticas son predominantes en la SMOcc porque son el resultado de dos periodos de formación diferentes, caracterizados por actividad volcánica intensa (Mc Dowell y Clabaugh 1981, Ferrari 1995). El primero fue durante el Oligoceno (31.5-28 Ma) y el segundo durante el Mioceno (23.5-20 Ma).

Los bosques de pino-encino que actualmente dominan en la SMOcc probablemente sustituyeron a bosques mixtos de coníferas. Los géneros *Abies* y *Picea*, junto con especies de afinidad templada-fría, como *P. strobiformis*, tenían una distribución geográfica más amplia durante el Mioceno. Estos cambios en la composición de la biota, así como cambios del tamaño de la población y el área de distribución de *P. strobiformis* probablemente están asociados a los ciclos glaciales del Pleistoceno (Moreno–Letelier y Piñero 2009). Actualmente las poblaciones de *P. strobiformis* se encuentran aisladas geográficamente y en la SMOcc son de mayor extensión, comparadas con las del resto de la República Mexicana (Moreno–Letelier y Piñero 2009).

Inferencia de eventos históricos

Los eventos históricos se definen como los procesos demográficos que dejaron “innovaciones” genéticas en las poblaciones del presente (Avice 2000, Epperson 2003) y es posible asociarlos a eventos históricos de la Tierra como los cambios climáticos del Pleistoceno. La comprensión de los procesos demográficos depende del adelanto y resolución en las simulaciones computacionales que incorporen diferentes modelos de crecimiento poblacional, de fragmentación y patrones de migración estocásticos y complejos (Epperson 2003).

Dentro de los eventos históricos comúnmente encontrados, el flujo génico restringido se caracteriza porque los individuos de una o más especies presentan movimientos geográficos limitados en una generación dada; las fragmentaciones se caracterizan porque una población se separó en dos o más subpoblaciones sin que estas

tuvieran algún contacto posterior por medio de flujo genético y las expansiones poblacionales se caracterizan por el incremento en número de individuos y/o su extensión a nuevas áreas geográficas (Templeton 2006).

Diversidad genética

La diversidad genética se sustenta en los conceptos de *locus* y alelo (Gillespie 2004, Hedrick 2005). Un *locus* es el lugar en el mapa de un cromosoma donde se puede encontrar un alelo. Por su parte, los alelos pueden estar en un individuo con dos copias cromosómicas o en un *locus* haploide, llamado haplotipo (Templeton 2006). Las variantes de un mismo *locus*, dadas por un nucleótido o el conjunto de ellos, son los alelos. Asimismo, los sitios polimórficos o nucleótidos diferentes entre secuencias de DNA de una muestra de individuos son el resultado de las mutaciones. Estos sitios se usan como estimadores de la variación genética, de alelos y/o haplotipos y para inferir eventos históricos (Avice *et al.* 1987, Templeton 2006). Se clasifican en *singletons* a los sitios de DNA en donde ocurrió una sustitución y que sólo se encuentran en una secuencia y sitios informativos a las sustituciones que se presentan en dos o más secuencias. Otro tipo de mutaciones son las inserciones y/o deleciones, conocidos como *indels* por su contracción en inglés (Nei y Kumar 2000).

La variación genética puede estimarse de diversas formas. Comúnmente se estima la variación de haplotipos, la variación a nivel nucleótidos y la tasa de mutación por población. De este modo, la variación de haplotipos, o diversidad haplotídica (*Hd*); en una población puede estimarse por medio de la frecuencia de sus alelos. En la ecuación 1 se puede observar que es prácticamente idéntica a la heterocigosidad en un modelo Hardy-Weinberg (Gillespie 2004):

$$Hd = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \quad (1)$$

en donde p_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo y k es el número de alelos diferentes (Nei 1987).

De igual forma, otro estimador de la variación genética en una población es la tasa de mutación por población θ_w (Watterson 1975):

$$\theta_w = 4N_e u \quad (2)$$

en donde u es la tasa de mutación por gene por generación y N_e es el tamaño efectivo poblacional (Watterson 1975). Para organismos haploides se supone $2N_e$ porque se estima sólo la mitad del tamaño efectivo poblacional (Rozas *et al.* 2003).

El tercer estimador de la variación genética más usado con datos moleculares es la variación a nivel nucleótidos o π , estimada de la siguiente manera:

$$\hat{\pi} = \sum_{i=1}^{\infty} 2p_i(1-p_i) \quad (3)$$

donde p_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo, es decir, π es la heterocigosidad o el promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de haplotipos (Nei 1987).

La comparación entre los diferentes estimados de diversidad génica es útil para explorar el equilibrio entre la deriva y la mutación, además se emplean para inferir eventos históricos en las poblaciones (Avice 2000, Excoffier *et al.* 2005).

Diferenciación poblacional y las unidades locales de apareamiento

El cambio de las frecuencias de los alelos en las poblaciones naturales está relacionado profundamente con su estructura y se emplea para distinguir las unidades locales de apareamiento (Gillespie 2004). Cuando las poblaciones no tienen flujo génico entre ellas forman elementos aislados llamados subpoblaciones o unidades locales de apareamiento (Futuyma 2005, Templeton 2006).

El aislamiento genético ocurre cuando todos los individuos que contribuyen a la siguiente generación provienen de la misma subpoblación sin una contribución de individuos de otras subpoblaciones; los apareamientos en estas subpoblaciones ocurren sin extenderse al total del área de distribución de la especie (Gillespie 2004). Asimismo, el flujo génico ocurre cuando los apareamientos se llevan a cabo entre subpoblaciones (Templeton 2006).

En subpoblaciones aisladas la deriva genética fija (y elimina) linajes al azar en cada una de ellas, en un proceso conocido como sorteo de linajes, o *lineage sorting* en inglés. Este proceso se completa en un tiempo variable que depende del tamaño efectivo de las subpoblaciones divergentes o, lo que es lo mismo, de la intensidad de la deriva genética y la mutación (Avice 2000). Así, dos o más poblaciones pueden compartir linajes (y alelos) porque no ha pasado el tiempo suficiente desde su divergencia para que se complete el sorteo de linajes (fenómeno conocido en inglés como *incomplete*

lineage-sorting); aunque también cabe la posibilidad de que compartan alelos por migración, posterior a la divergencia (Hey y Machado 2003).

F_{ST} como estimador de la diferenciación poblacional y del flujo genético

El estadístico F_{ST} , propuesto por Wright (1951) compara la frecuencia relativa de los distintos alelos en las subpoblaciones individuales con la frecuencia de éstos en el total de la muestra. La F_{ST} puede ser estimada de diferentes formas, una de ellas se basa en las probabilidades de muestrear alelos idénticos por estado por cada subdivisión geográfica comparada con el total de la muestra. En las ecuaciones 4 y 6, G_T es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar para el total de la muestra de una población sean idénticos por estado. En las especies donde el tamaño poblacional es infinito el valor de G_T es cero. De forma similar, en las ecuaciones 5 y 6, G_S es la probabilidad que dos alelos tomados al azar en una subpoblación sean idénticos por estado (Gillespie 2004):

$$G_T = p^2 + q^2 \quad (4)$$

$$G_S = \sum c_i (p_i^2 + q_i^2) \quad (5)$$

$$F_{ST} = \frac{G_S - G_T}{1 - G_T} \quad (6)$$

donde p y q son las frecuencias alélicas (en un modelo de un *locus* con dos alelos), p_i es la frecuencia del primer alelo muestreado en la *iésima* subpoblación y q_i es la frecuencia del segundo alelo muestreado en la *iésima* subpoblación en las ecuaciones 4 y 5 y c_i es la contribución de cada subpoblación a la muestra total.

Cuando el valor de F_{ST} es cero no hay diferenciación entre las subpoblaciones; cuando el valor de F_{ST} es uno, las subpoblaciones no comparten alelos, están completamente diferenciadas (Hedrick 2005).

Suponiendo que las subpoblaciones se separaron en un tiempo infinito hacia el pasado, es decir, que toda la variación compartida entre las subpoblaciones se deba únicamente a flujo genético posterior a la divergencia y no al sorteo incompleto de linajes (ver más arriba), la F_{ST} , puede ser usada para estimar el tamaño efectivo de migrantes por generación (Nm) y la tasa de migración, m (Excoffier *et al.* 2005). En la ecuación 7 se muestra la relación entre F_{ST} y Nm cuando las poblaciones están en equilibrio entre la deriva genética y la mutación (Wright 1951):

$$F_{ST} = \frac{1}{4Nm + 1} \quad (7)$$

El vecino más cercano, S_{nn} , otro estimador de diferenciación entre subpoblaciones

Una forma de estimar la diferenciación poblacional con datos de secuencias de DNA es por medio del estadístico S_{nn} “el vecino más cercano” (*Statistic of the nearest neighbor* en inglés) (Hudson 2000). Los supuestos al estimar diferenciación con este estadístico son: las secuencias tienen la misma longitud, no presentan *gaps* (eliminación o inserción de nucleótidos, *indels*), y que los individuos comparados se colectaron en dos o más subpoblaciones. S_{nn} estima el menor número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias y le denomina “vecinos” a las secuencias más parecidas. De cada secuencia se toma el número de vecinos cercanos genéticamente y se divide entre el número de vecinos cercanos por cada subpoblación. Así, S_{nn} estima el promedio de las razones de los vecinos más cercanos entre los vecinos geográficos más cercanos:

$$S_{nn} = \sum_{j=1}^n X_j / n \quad (8)$$

donde X_j es la razón de vecinos más cercanos genéticamente entre vecinos más cercanos geográficamente para cada secuencia desde j hasta n . Para este estadístico se ha desarrollado una prueba de permutaciones, para establecer la significancia de las comparaciones, que reasigna los haplotipos de forma aleatoria en las localidades. S_{nn} toma valores de cero a uno; cero significa que las secuencias más relacionadas se encuentran en localidades distintas; uno significa que las secuencias más relacionadas se encuentran siempre en la misma localidad representando alta diferenciación genética.

Entre la ecología y la genética de poblaciones: el índice β

Los conceptos de genética de poblaciones han sido empleados por ecólogos de comunidades y viceversa. Un ejemplo es el índice de Simpson (1949) que estima la diversidad específica de forma similar a la heterociguidad (ecuación uno). Por su parte, Hubell (2005) propuso una teoría análoga a la Teoría neutral de evolución molecular (Kimura 1983) para explicar los patrones de variación a nivel específico.

En el presente estudio se propone emplear el índice de diversidad β como un estimador de la diferenciación entre subpoblaciones de la misma especie y se espera que sea más efectivo que los estimadores empleados comúnmente, F_{ST} y S_{nn} , porque no es

sensible a la cantidad de variación genética en la muestra. No es la primera vez que se sugiere a este estimador de la biodiversidad para estudiar la diferenciación genética; por ejemplo, se han hecho demostraciones matemáticas sobre las semejanzas y diferencias entre β y F_{ST} (Piñero 2005).

El índice β mide el recambio de especies entre localidades, para datos genéticos se emplean las secuencias nucleotídicas como identidades equivalentes a las especies. Una de las formas más usadas para estimar β son los datos de presencia/ausencia de las diferentes especies (Koleff *et al.* 2003) expresado de la siguiente forma:

$$\beta = \frac{b+c}{a+b+c} \quad (9)$$

donde β estima el número de secuencias diferentes entre un par de subpoblaciones, b y c ; a son las secuencias que comparten las subpoblaciones comparadas, b es el número de secuencias diferentes encontradas en la primera subpoblación pero no en la segunda y c es el número de secuencias diferentes encontradas en la segunda subpoblación pero no en la primera (Krebs 1999, Gaston *et al.* 2001, Koleff *et al.* 2003).

El aislamiento por distancia y la prueba de Mantel

La prueba de Mantel (Mantel 1967) estima la correlación entre dos matrices cuadradas. Esta prueba se aplica comúnmente para demostrar si existe aislamiento por distancia entre subpoblaciones; esto quiere decir, que la variación genética está más relacionada entre subpoblaciones cercanas que entre subpoblaciones distantes como resultado del flujo génico entre subpoblaciones cercanas (Wright 1943, Hey y Machado 2003). La correlación entre las dos matrices cuadradas es:

$$r_{XY} = \frac{SP(X,Y)}{\sqrt{SS(X).SS(Y)}} \quad (10)$$

donde $\mathbf{X}=\{X_{ij}\}$ y $\mathbf{Y}=\{Y_{ij}\}$ son matrices cuadradas, en este caso son estimados de la distancia, genética o geográfica, entre pares de subpoblaciones, SP es el producto de dos matrices cuadradas y SS es la suma de cuadrados de una matriz cuadrada (Excoffier *et al.* 2005). Para este coeficiente de correlación se ha desarrollado una prueba de permutaciones para distinguir los valores aleatorios (Excoffier *et al.* 2005).

Delimitación de la estructura genética empleando SAMOVA

El nombre *SAMOVA* proviene del inglés *Spatial Analysis of Molecular Variance* (Dupanloup *et al.* 2002). Este método delimita grupos de poblaciones altamente diferenciados uno de otro suponiendo que son genética y geográficamente homogéneos. El *SAMOVA* puede ser usado con datos de haplotipos, no supone equilibrio Hardy-Weinberg, ni equilibrio de ligamiento entre los *loci* empleados.

El *SAMOVA* emplea el procedimiento de recocido o *simulated annealing* para examinar la composición de los grupos de poblaciones por medio de barreras genéticas, identificadas por líneas construidas por polígonos de Voronoi. Antes de iniciar algún análisis en este programa es necesario definir el número de grupos (k) que se quieran obtener, desde dos hasta $n-1$ poblaciones muestreadas. Por medio del recocido se selecciona un límite al azar entre poblaciones al que se le denomina barrera. Las barreras son modificadas y el valor de F_{CT} , que es la medida de diferenciación de poblaciones en diferentes grupos, es evaluado. El valor aceptado al final del algoritmo es aquel que maximiza el valor de F_{CT} (Excoffier *et al.* 2005).

Demografía histórica

La demografía histórica estudia la variación en los tamaños poblacionales, tasas de migración y eventos de divergencia entre poblaciones a lo largo de un periodo de tiempo en el pasado reciente (Hey y Machado 2003). La demografía histórica emplea generalmente datos genéticos muestreados al nivel de poblaciones o especies muy cercanamente relacionadas (Hey y Machado 2003). En general, los datos genéticos están compuestos de haplotipos, simples o multilocus (Carbone y Kohn 2001), para los cuales se supone un modelo de alelos infinito, sin recombinación intragenética y, en el caso de ser multilocus, con segregación independiente (Watterson 1975).

Los crecimientos demográficos históricos

Tajima (1989) desarrolló una prueba llamada D (ahora conocida como la D de Tajima, en su honor) que pone a prueba la hipótesis de que la mayoría de la variación genética de una población natural es neutra. Se puede entender por neutralidad dos cosas diferentes usando esta prueba. La primera acepción se refiere a la hipótesis nula de que todas las mutaciones son selectivamente neutras y sólo la deriva genética en conjunto con la mutación son las responsables de la variación observada; la hipótesis alternativa en este caso es la selección natural. La segunda acepción se refiere a un modelo nulo de poblaciones Wright-Fisher (Fisher 1930, Wright 1931) con tamaño efectivo de población constante contrastado con una hipótesis alternativa en la que las poblaciones fluctúan de tamaño, ya sea que hayan crecido o disminuido. El estadístico de Tajima compara la variación de dos estimadores no sesgados del promedio de las diferencias pareadas, π (Nei 1987) menos $\theta = 2N_e u$; la theta de Watterson (1975), estimada a partir de los sitios segregantes sobre su desviación estándar que funciona como una constante normalizadora, C :

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} i^{-1} \quad (11) \quad ; \quad a_2 = \sum_{i=1}^{n-1} i^{-2} \quad (12)$$

$$b_1 = \frac{(n+1)}{[3(n-1)]} \quad (13) \quad ; \quad b_2 = \frac{2(n^2+n+3)}{[9n(n-1)]} \quad (14)$$

$$c_1 = b_1 - \frac{1}{a_1} \quad (15) \quad ; \quad c_2 = \frac{b_2 - (n+2)}{(a_1 n) + \frac{a_2}{a_1}} \quad (16)$$

$$C = \sqrt{\left(\frac{c_1}{a_1}\right) S_n + \left[\frac{c_2}{a_1^2 + a_2}\right] S_n (S_n - 1)} \quad (17)$$

$$D = \frac{d}{\sqrt{\hat{V}(d)}} = \frac{\hat{\pi} - \hat{\theta}_w}{\sqrt{\hat{V}(d)}} = \frac{\hat{\pi} - \frac{S_n}{a_1}}{C} \quad (18)$$

donde i es el número de alelos, n el tamaño poblacional y S_n el estimado de los sitios segregantes. Además, la D de Tajima estandariza las variaciones para que se tenga una inferencia solamente con el valor y signo de D . Cuando $D = 0$, no hay diferencias entre los dos estimadores de θ y la hipótesis nula de neutralidad (sea selectiva o demográfica) no se puede refutar. Cuando $D > 0$ puede deberse a un decremento en el tamaño poblacional o selección balanceadora. Con valores de $D < 0$ hay un gran número de alelos raros en la muestra, debido a una expansión poblacional o a un periodo fuerte de selección purificadora (Gillespie 2004).

Otra prueba de neutralidad es la desarrollada por Fu (1997) basada en el modelo de sitios infinitos sin recombinación (Watterson 1975) apropiada para secuencias nucleotídicas. Fu (Fu 1997) define S' como la probabilidad de observar una muestra neutral al azar de la siguiente manera:

$$S' = \Pr(K \geq k_{obs} | \hat{\theta}_w = \hat{\pi}) \quad (19)$$

$$F_S = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right) \quad (20)$$

donde $K \geq k_{obs}$ es la probabilidad de observar una muestra neutral aleatoria con un número de alelos igual o mayor al observado con la condición de que el estimado por sitio de la tasa de mutación poblacional θ_w (Watterson 1975) sea igual al promedio de diferencias pareadas, π (Nei 1987). Posteriormente definió el estadístico F_S como el logaritmo natural del estimado de S' dividido entre su frecuencia relativa que es la razón del número de valores en un intervalo entre el número total de valores (Pagano y Gauvreau 2001).

Al igual que la prueba de Tajima (Tajima 1989), los valores positivos en la prueba de F_S de Fu (Fu 1997), pueden deberse a un decremento en el tamaño poblacional o a selección balanceadora y los valores negativos pueden deberse a una expansión poblacional o a selección purificadora. La prueba F_S de Fu tiene una gran

sensibilidad a las expansiones demográficas. La diferencia en este estadístico con respecto a la D de Tajima es que el 2% de la significancia del primero corresponde al 5% de la significancia del segundo (Excoffier *et al.* 2005).

Una forma distinta a las pruebas de neutralidad para detectar expansiones demográficas es la distribución de las diferencias nucleotídicas pareadas, o *mismatch distribution* (Rogers y Harpending 1992). La distribución *mismatch* supone un modelo de sitios infinitos (Kimura 1969) donde cada mutación origina un alelo nuevo; esta distribución representa las frecuencias relativas de las diferencias de pares de bases entre secuencias. La distribución *mismatch* depende de la probabilidad de observar diferencias entre dos secuencias, F_i^∞ :

$$F_i^\infty(\theta_1, \theta_0, \tau) = F_i(\theta_i) + \exp\left(-\tau \frac{(\theta_1 + 1)}{\theta_1}\right) \sum_{j=0}^i \frac{\tau^j}{j!} [F_{i-j}(\theta_0) - F_{i-j}(\theta_1)] \quad (21)$$

donde $\tau = 2ut$ que es la unidad de tiempo mutacional en la que difieren los pares de secuencias, el cambio en la tasa de mutación poblacional de $\theta_0 = 2N_0u$ a $\theta_1 = 2N_1u$ y las diferencias entre secuencias se denotan de i a j , cuando $i \neq j$.

La distribución *mismatch* nos permite caracterizar los episodios de crecimiento de las poblaciones porque supone que desde hace t generaciones las poblaciones pasaron de un tamaño efectivo estacionario bajo, N_0 , a un tamaño efectivo muy alto, N_1 . En este estudio se empleó el modelo de expansión súbita, o *sudden expansion*, donde la mayor parte de la variación genética se originó rápidamente ya que el modelo supone que no hay eventos coalescentes posteriores a la expansión, $\theta_1 \rightarrow \infty$ (Rogers 1995).

Una forma de probar la hipótesis nula de crecimiento poblacional súbito es por medio de la suma de las diferencias cuadradas (*SDD*) (Schneider y Excoffier 1999, Excoffier *et al.* 2005). Con un valor de $P(SDD) \leq 0.05$ se refuta la hipótesis de crecimiento poblacional súbito.

Otro modo de probar la hipótesis de crecimiento poblacional es con la rugosidad de la distribución *mismatch*; una distribución rugosa caracteriza a una población de tamaño constante, mientras que, una distribución lisa caracteriza expansión demográfica. El índice de rugosidad, o *raggedness index*, estima el número máximo de diferencias observadas entre haplotipos (d) y las frecuencias relativas observadas de las clases del *mismatch* (x_i):

$$r = \sum_{i=1}^{d+1} (x_i - x_{i-1})^2 \quad (22);$$

cuando presenta valores altos y la distribución es multimodal sugiere tamaños poblacionales invariables o subdivisión geográfica y cuando presenta valores bajos con una distribución unimodal se sugiere crecimiento poblacional súbito (Excoffier *et al.* 2005).

Filogeografía

La variación genética tiene un componente espacial y uno temporal que depende de diversos procesos demográficos acumulados a través de una gran cantidad de generaciones (Epperson 2003). La disciplina que estudia la variación espacio-temporal de las distribuciones geográficas y los procesos demográficos que influyen en los linajes genéticos dentro y entre especies relacionadas es la filogeografía (Avice 1989, 2000, Lomolino *et al.* 2006). La filogeografía emplea modelos matemáticos como el coalescente (Kingman 1982) para inferir los procesos demográficos históricos en las poblaciones (Hey y Machado 2003, Templeton 2005). Los modelos coalescentes incluyen los efectos de fuerzas evolutivas como la mutación, la migración y la deriva genética; además, por medio del ancestro común de diferentes copias de DNA permiten estimar el tiempo en el que ocurrieron eventos históricos (Templeton 2005, 2006).

Redes de haplotipos

La definición matemática empleada para una gráfica en teoría de redes es: una pareja de conjuntos $[X, A]$, donde X es un conjunto de líneas que unen todos o algunos de los vértices. Por su parte, un arco puede representarse como la pareja (i, j) , donde $i, j \in X$ son los vértices que une dicho arco. Y un circuito cerrado o ciclo es aquel donde el vértice inicial y el final coinciden. Así, una red es una gráfica conectada con ciclos (Hernández-Ayuso 2005).

Existen diferentes formas de estimar redes que describan las relaciones filogenéticas de los haplotipos; entre ellas está la red de tendido mínimo, la red de medida media, una red basada en parsimonia estadística y el reticulograma (Posada y Crandall 2001). Por su parte, Templeton y colaboradores (1992) desarrollaron un método para estimar redes de haplotipos. Estas redes ordenan a los haplotipos o alelos idénticos en nodos que están separados de otros por pasos mutacionales. Éstos pueden

ser sustituciones e *indels* en secuencias de DNA y la presencia/ausencia con datos de sitios de restricción (en desuso).

Conceptualmente, las redes de haplotipos son un acercamiento en las filogenias de las especies (Avise *et al.* 1987), sólo que no siempre son bifurcadas, pues a veces se producen relaciones reticuladas porque describen diferentes fenómenos demográficos (Posada y Crandall 2001). Los ciclos o *loops* de las redes de haplotipos se eliminan empleando los criterios propuestos por Templeton y Sing (1993) para ser empleados posteriormente en el *NCPA* (ver más abajo). El primer criterio es mantener preferentemente las conexiones a los haplotipos frecuentes que con *singletons*. El segundo criterio es que los haplotipos más conectados son elegidos sobre los menos conectados. El último criterio, no aconsejable, es que los haplotipos de la misma población o región sean conectados entre sí y no con otras poblaciones porque al hacer esto se fortalece de manera artificial la hipótesis de asociación geográfica en los haplotipos (Pfenniger y Posada 2002).

Análisis de clados anidados o Nested clade phylogeographic analysis

El análisis filogeográfico de clados anidados (*NCPA*) desarrollado por Templeton y colaboradores (1993, 1995) emplea una red de haplotipos anidada jerárquicamente por el número de pasos mutacionales, desde los haplotipos punta hacia los interiores por un paso mutacional (Templeton y Sing 1993), que nos auxilia en la inferencia de eventos históricos.

Los datos del anidamiento de la red se integran a una matriz que posteriormente es analizada con el programa *GeoDis 2.5* (Posada *et al.* 2000). El programa calcula la distancia al clado (D_c), la distancia al clado anidado (D_n), y la distancia interior punta ($I - T$) para clados interiores y para puntas respectivamente. La distancia al clado, D_c , evalúa cuán geográficamente dispersos están los individuos que portan los haplotipos de un clado. Esta distancia se calcula con el promedio de las distancias geográficas para todos los haplotipos del clado ponderado por las frecuencias de los haplotipos del clado en cada subpoblación y la distancia al clado anidado. Por su parte, la distancia al clado anidado, D_n , estima cuán geográficamente distribuido está un haplotipo (en el nivel más bajo del anidamiento) o clado (en los subsecuentes niveles) con respecto al nivel de anidamiento posterior. Finalmente, la distancia interior-punta, $I - T$, indica cuán dispersos están los clados puntas comparados con los interiores (Posada *et al.* 2000, Templeton *et al.* 1995, Templeton 1998, 2006).

GeoDis 2.5 detecta asociaciones geográficas por medio de un análisis de permutaciones donde se pone a prueba la hipótesis nula de no asociación geográfica entre los haplotipos de los clados y las subpoblaciones. Las asociaciones geográficas significativas se interpretan con la clave de inferencia (*Geodis inference key*, Diciembre 15 2008), empleando los valores de asociación significativa de D_c , D_n , e $I - T$ para clados interiores y puntas respectivamente. La clave de inferencia está basada en los supuestos de que los haplotipos más viejos tienen una distribución geográfica más amplia, se localizan en el interior de la red y tienen un mayor número de haplotipos derivados conectados, en comparación a todos los haplotipos de la red.

Algunas de las inferencias posibles con el método de Templeton son flujo genético restringido con aislamiento por distancia, fragmentación y expansión del área de distribución. El flujo génico restringido con aislamiento por distancia se caracteriza por presentar valores de D_c y D_n que tienden a incrementarse con el nivel de anidamiento. Por su parte, la fragmentación se caracteriza porque el valor de D_n puede ser pequeño comparado con el valor de D_c en niveles altos de anidamiento, ya que los clados de niveles más altos pueden no presentar superposición espacial o no ser completa. Finalmente, una expansión del área de distribución se identifica porque algunas puntas o clados jóvenes pueden tener D_n significativamente altas y D_c significativamente pequeñas (Templeton 2006).

Las redes de haplotipos de diferentes *loci* pueden detectar eventos históricos equivalentes, es decir, la misma inferencia en el mismo nivel de anidamiento (Templeton 2005). Cuando esto ocurre, es posible estimar el tiempo al ancestro común más reciente (*TMRCA*, por sus siglas en inglés) del clado de cada *locus* donde se hizo la inferencia equivalente y la varianza asociada a cada *TMRCA* que nos da un tiempo al cual asociar el evento inferido (Edwards y Beerli 2000, Templeton 2006). El tiempo al ancestro común más reciente (T en la ecuación 23) y su varianza asociada (ecuación 24) se estiman de la siguiente manera:

$$T = \frac{\theta(1+k)}{2u(1+n\theta)} \quad (23)$$

$$\sigma^2 = \frac{\theta^2(1+k)}{4u^2(1+n\theta^2)} = \frac{T^2}{1+k} \quad (24)$$

donde k es el promedio del número de diferencias nucleotídicas entre haplotipos (Tajima 1983), u es la tasa de mutación por nucleótido por generación, n es el número de nucleótidos muestreados y θ_w es la tasa de mutación por población (Watterson 1975).

Una vez que se obtuvieron los *TMRCAs* y las varianzas asociadas, se puede hacer una prueba de máxima verosimilitud para saber si los diferentes *loci* empleados infieren el mismo evento. La prueba de máxima verosimilitud G o *cross validation* (ecuación 25) emplea el *TMRCA* acumulado de los clados con inferencias equivalentes (ecuación 26) de la siguiente forma:

$$G = -2 \sum_{i=1}^j (1 + k_i) \left(1 - \frac{t_i}{\hat{T}} + \ln t_i - \ln \hat{T}\right) \quad (25)$$

$$\hat{T} = \frac{\sum_{i=1}^j t_i (1 + k_i)}{\sum_{i=1}^j (1 + k_i)} \quad (26)$$

donde k_i es el promedio del número de diferencias nucleotídicas entre haplotipos de un mismo *locus* por cada clado con inferencias equivalentes (Tajima 1983) y t_i es el *TMRCA* de cada clado con inferencias equivalentes (Templeton 2004, 2006). G prueba la hipótesis nula de que los j *loci* examinados detectan el mismo tiempo coalescente acumulado; esta prueba se distribuye como una χ^2 con $j-1$ grados de libertad (Templeton 2004, 2005, 2006).

En los intervalos con el 95% de confianza, aproximadamente 95 de las muestras aleatorias de una población cubren el verdadero valor del parámetro buscado y 5 no lo hacen, en el caso de la *cross validation* el parámetro es el *TMRCA* acumulado de los clados con inferencias equivalentes (ecuación 25). Los intervalos de confianza (ecuación 28) emplean la media y la varianza del *TMRCA* acumulado de los clados con inferencias equivalentes (ecuación 27):

$$\sigma(\hat{T}) = \text{Var}(\hat{T}) = \frac{\sum_{i=1}^j (1 + k_i)^2 \text{Var}(t_i)}{\left(\sum_{i=1}^j (1 + k_i)\right)^2} = \frac{\sum_{i=1}^j (1 + k_i) t_i^2}{\left(\sum_{i=1}^j (1 + k_i)\right)^2} \quad (27)$$

$$\bar{x} \pm 1.96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (28)$$

donde k_i es el promedio del número de diferencias nucleotídicas entre haplotipos de cada *locus* por cada clado con inferencias equivalentes (Tajima 1983) y t_i es el *TMRC*A de cada clado con inferencias equivalentes (Templeton 2004, 2006). Los intervalos de confianza se estiman porque es muy difícil conocer el verdadero valor del parámetro donde se pretende que esté el tiempo coalescente acumulado de un evento histórico (Edwards y Beerli 2000).

Efectos de los ciclos glaciales sobre las poblaciones naturales

Los procesos demográficos de las poblaciones de muchas especies fueron influenciados, principalmente, por los cambios climáticos del Plesitoceno ya que las placas tectónicas se mantuvieron relativamente estables (Lomolino et al. 2006). Asimismo, los ciclos orbitales están relacionados con los cambios climáticos de la Tierra, ciclos glaciales–interglaciales, ya que los primeros tienen efectos en la cantidad de radiación solar que incide sobre la Tierra (Hewitt 2000). Los cambios climáticos en la Tierra se describen con análisis de sedimentos de ambientes marinos donde se obtienen isótopos de nitrógeno y de oxígeno. En los periodos cálidos el oxígeno se encuentra más disuelto que el nitrógeno en esos ambientes y ocurre lo contrario en los periodos glaciales (Galbraith et al. 2004, Gibbard y Kolfshoten 2004).

Los ciclos glaciales-interglaciales tuvieron diferentes consecuencias en distintos organismos; por ejemplo, muchas de las poblaciones de mamíferos en el mundo se extinguieron a causa de los periodos glaciales (Lomolino et al. 2006). Por su parte, las poblaciones del reptil *Heteronotia binoei* se expandieron durante los periodos glaciales en las regiones desérticas del norte de Australia porque las condiciones de lluvia y humedad aumentaron (Strasburg et al. 2007). Asimismo, las poblaciones de *Rana cascadae* del sur de Oregon y norte de California se separaron durante el último periodo glacial (Monsen y Blouin 2003).

De los pocos estudios de filogeografía que se han reportado para hongos se encontró que las poblaciones de *Amanita muscaria*, distribuida en diferentes regiones biogeográficas del mundo, se aislaron durante los periodos glaciales y sus poblaciones crecieron durante los interglaciales del Pleistoceno en diferentes localidades de Estados Unidos con respecto a una en México (Tlaxcala) (Geml et al. 2008). Conjuntamente, los bosques de pino y de pino-encino en México redujeron su tamaño y su área de distribución durante los periodos interglaciales, restringiendo su distribución a las partes

altas de las montañas; mientras que, en los periodos glaciales aumentaron su tamaño y área de distribución (Jaramillo-Correa *et al.* 2006, Moreno-Letelier y Piñero 2009).

Específicamente en la SMOcc, *Picea chihuahuana* decreció en su tamaño poblacional durante el Holoceno, en un periodo interglacial (Jaramillo-Correa *et al.* 2006). Asimismo, la población de *P. strobiformis* en la SMOcc creció durante los periodos glaciales (Moreno-Letelier y Piñero 2009).

Por su parte, las subpoblaciones de *L. nitens* en la FVTM con el marcador molecular *ACT* tuvieron alta diversidad haplotípica, poca diversidad nucleotídica, poca diferenciación entre subpoblaciones (estimada con F_{ST} y S_{nn}), los tamaños poblacionales estimados fueron altos, se encontró una red de haplotipos en forma de estrella y la distribución *mismatch* se ajustó al modelo de expansión por lo que se infiere que sus subpoblaciones crecieron durante los periodos glaciales y se contrajeron, aislándose unas de otras, durante los periodos interglaciales. Se sugiere que algunas de sus subpoblaciones tuvieron migración y/o contacto secundario durante los periodos glaciales (Santini 2007).

HIPÓTESIS

- Los patrones de variación genética en las poblaciones de *L. nitens* de la SMOcc son consecuencia de los procesos demográficos históricos y del aislamiento geográfico.
- Existe diferenciación genética entre las poblaciones de *L. nitens* en la SMOcc como consecuencia de su baja dispersión.
- El estimador de la diversidad β puede reflejar con mayor eficiencia la diferenciación genética en comparación con otros estimadores.
- La demografía histórica debe coincidir con la reportada en especies simpátricas para ésta área de estudio (*Pinus strobiformis* y *Picea chihuahuana*).
- Los procesos demográficos históricos deben corresponder con los cambios climáticos del Pleistoceno.

OBJETIVOS GENERALES

1. Inferir los procesos demográficos históricos que dieron origen a la variación genética observada y a la diferenciación de las subpoblaciones de *L. nitens* en la SMOcc.
2. Comparar los procesos demográficos históricos inferidos con los estudios previos en esta zona y con los patrones de cambio climático del Pleistoceno.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir la variación genética de las subpoblaciones de *L. nitens* en la SMOcc.
2. Estimar la diferenciación genética entre las poblaciones de *L. nitens*.
3. Comparar la sensibilidad de los estimadores de la diferenciación poblacional.
4. Estimar la correlación entre los estimadores de la diferenciación poblacional.
5. Inferir procesos demográficos históricos mediante:
 - a) Estadísticos de resumen y
 - b) análisis filogeográfico de clados anidados (*NCPA*).

Estimar el tiempo en que ocurrieron los procesos demográficos inferidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colectas

Las colectas fueron planeadas para cubrir gran parte de la distribución del hongo en la SMOcc. Se colectaron ascomas unidos a acículas senescentes de *P. strobiformis* en siete subpoblaciones: Arareko, Basihuare y Geogochic en Chihuahua, Puente Chaparra, Buenos Aires y El Salto en Durango, y Bolaños en Jalisco. Las colectas se realizaron entre octubre y diciembre del 2006. Las coordenadas geográficas de los sitios de colecta fueron obtenidas con un GPS Gramin Etrex VISTA.

Los ascomas fueron almacenados en bolsas de papel estraza, rotuladas por localidad y día de colecta. Las bolsas rotuladas fueron mantenidas en hielo durante el trayecto hasta el laboratorio y una vez allí se procesaron lo más pronto posible.

Obtención de cultivos monospóricos

Los ascomas de *L. nitens* fueron identificados y diferenciados de otras especies y géneros de endófitos bajo el microscopio estereoscópico siguiendo la clave especializada de Minter (1981). Los ascomas de *L. nitens* fueron separados de otros seccionando la acícula donde estaban presentes. Posteriormente se colocaron en el reverso de la tapa de cajas Petri con la ayuda de cinta adhesiva doble cara quedando el himenio expuesto hacia el medio de cultivo de extracto de levadura (SIGMA Y-3502) y agar (BD Bioxon Agar bacteriológico) (agar 12 g/L, extracto de levadura 5.7 g/L). Algunos ascomas expulsaron ascosporas en un periodo de tiempo de 24 a 48 horas de incubación. Las ascosporas dispersadas en el medio de cultivo fueron aisladas con agujas hipodérmicas para insulina y sembradas para obtener cultivos monospóricos en medio de cultivo de jugo de verduras (V8), agar y extracto de levadura (agar 12 g/L; extracto de levadura 5.7 g/L; jugo V8 28.6 ml/L). Las cajas Petri fueron rotuladas con el nombre de la localidad, el número de la acícula, el ascoma y la espora aislada; las cajas se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad. Se hicieron subcultivos de los micelios obtenidos con el fin de prolongar la fase de crecimiento logarítmica y así obtener suficiente micelio para la extracción de DNA. El tiempo de crecimiento de los cultivos fue aproximadamente de dos a tres meses.

Extracción de DNA y amplificación de *loci* nucleares

La extracción de DNA se realizó siguiendo el método de Xu y colaboradores (1994) modificado por Vázquez-Lobo (1996) (Apéndice 1). Una vez extraído el DNA, se amplificaron dos fragmentos de DNA nuclear usando la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*). El primer fragmento es un *locus* con dos intrones y un exón de 21 pb del gen de la actina (*ACT*) de 193pb como tamaño total; el segundo es un exón de la quitina sintasa 1 de 298 pb (*CHS-1*). Los *primers* (Tabla 1) y condiciones de *PCR* para amplificar los marcadores antes mencionados se obtuvieron de Carbone y Kohn (1999).

Tabla 1. Lista de *primers* empleados, correspondientes a cada *locus* y su tamaño esperado (Carbone y Kohn 1999).

<i>Locus</i>	<i>Primer</i>	Secuencia 5' – 3'	Tamaño (pb)
<i>CHS-1</i>	CHS - 79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	300
<i>CHS-1</i>	CHS - 354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	0.0215 300
<i>ACT</i>	ACT - 512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGT	200
<i>ACT</i>	ACT - 783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	200

La concentración de los reactivos en cada reacción de *PCR* en un total de 20 μ L por reacción es: 1X de Buffer de *PCR* (Promega, Madison, WI USA) con 1% de DMSO, 2mM de $MgCl_2$ (Cloruro de Magnesio), 200 μ M de dNTPs, 0.5 μ M de cebador o *primer forward*, 0.5 μ M de cebador o *primer reverse* y 0.5 U de la enzima polimerasa *GoTaq* (Promega, Madison, WI USA) y 0.5 ng de DNA genómico. Los *primers* cambiaron según se amplificó el *locus ACT* o el *locus CHS-1*.

Las condiciones de amplificación del programa empleado para el *locus ACT* en el termociclador 2720 *Applied BioSystems* son: ocho minutos de desnaturalización a 95°C, 34 ciclos de amplificación con un periodo de desnaturalización de treinta segundos a 95 °C, un periodo de alineamiento de treinta segundos a 58 °C, treinta segundos de extensión a 72 °C, un a fase final de extensión de cinco minutos a 72 °C y finalmente un tiempo indefinido a 4 °C. La única diferencia con el programa de amplificación del *locus CHS-1* es la temperatura de alineamiento que es de 61 °C.

Los productos de *PCR* se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio al 0.1%, en una cámara de electroforesis con TBE al 0.1% a 100 volts durante treinta minutos, visualizado con luz ultravioleta, cuantificado mediante la comparación de intensidad de banda con un marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Una vez que se confirmó un solo producto del tamaño

deseado, los fragmentos fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones en *University of Washington High-Throughput Genomics Unit Dept. of Genome Sciences, USA* (<http://uwhtseq.finchlab.com/Finch/>). Todos los electrofenogramas de las secuencias fueron examinados antes de ser utilizados en los posteriores análisis. Las secuencias se alinearon manualmente con el programa BioEdit 7.0.4 (disponible en internet: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Las secuencias de DNA para cada marcador con los sitios polimórficos se encuentran en los apéndices 4 y 5.

Inferencias de eventos históricos

Diversidad genética

Se calculó el número de haplotipos y sitios polimórficos y se estimó la diversidad haplotídica (Hd) (Nei 1987), la theta de Waterson (1975), θ_w y la heterocigosis esperada o el promedio de las diferencias pareadas, π (Nei 1987). Todos los cálculos y estimaciones se hicieron con el programa DNAsp v. 4.5 (Rozas *et al.* 2003). Los valores totales de los estimados de las diversidades genéticas fueron comparados. Por último se calcularon las frecuencias alélicas para cada subpoblación.

Diferenciación poblacional y flujo genético

Se estimaron F_{ST} y Nm con la muestra ordenada en subpoblaciones definidas por el lugar de colecta empleando el programa Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.* 2005), usando 10,000 permutaciones para estimar su significancia. De la misma forma fue estimado S_{mn} por cada par de subpoblaciones empleando el programa DNAsp 4.5 con 10,000 permutaciones para estimar su significancia (Rozas *et al.* 2003).

El estadístico β fue estimado con un *script* escrito en el lenguaje de programación *Perl 5.10.0* (<http://dev.perl.org/perl5/news/2007/perl-5.10.0.html>), con la ayuda de V. D. Ortega-Del Vecchyo. El *script* (Apéndice 6) utiliza la ecuación 9, descrita en la introducción (*Entre la ecología y la genética de poblaciones: el índice β*) para calcular β (Krebs 1999, Gaston *et al.* 2001, Koleff *et al.* 2003) y funciona de la manera siguiente: primero, identifica todos los haplotipos diferentes de cada subpoblación por medio de banderas (*flags*), posteriormente suma los haplotipos diferentes de dos subpoblaciones y elimina la intersección de haplotipos compartidos entre ellas; finalmente divide este resultado entre la suma de los haplotipos de las subpoblaciones tomadas. El resultado de cada comparación pareada se imprimió en un

archivo de salida llamado “beta”. El cálculo de β se realizó para todos los pares de subpoblaciones.

La sensibilidad de los valores de F_{ST} , S_{nn} y β fue comparada dentro de un *locus* y entre *loci*. Asimismo, se realizaron y compararon pruebas de Mantel (Mantel 1967) entre los valores de F_{ST} , S_{nn} y β por cada *locus* con el programa Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.* 2005), usando 10,000 permutaciones para estimar su significancia.

El programa SAMOVA (Dupanloup *et al.* 2002) fue empleado para definir subpoblaciones genéticamente homogéneas. Se hicieron corridas independientes de este programa por *locus* para $k = 2, 3 \dots 6$ grupos con 100 estados iniciales para cada corrida. Cada una de las corridas permutó subpoblaciones entre grupos 10,000 veces para estimar la significancia del valor maximizado de F_{CT} considerado como la mejor agrupación de subpoblaciones.

Demografía histórica

La hipótesis nula de evolución neutral en poblaciones de tamaño constante (Fisher 1930, Wright 1931) se puso a prueba por medio de las pruebas D de Tajima (1989) y F_S de Fu (1997) para la muestra total en ambos *loci* estimadas con el programa Arlequín 3.1, con 10,000 permutaciones para estimar su significancia (Excoffier *et al.* 2005).

Se realizó una distribución *mismatch* (Rogers y Harpending 1992) para la muestra total de cada *locus*; se estimó el índice de rugosidad (r) y el parámetro τ para estimar el tiempo desde la expansión con la ecuación $t = \tau / 2u$, donde t es el tiempo desde que ocurrió la expansión, τ es la unidad de tiempo mutacional en la que difieren los pares de secuencias, sus unidades son $1/2u$ y u es la tasa de mutación por gen por generación. A fin de transformar t en años y no en generaciones, se utilizó un tiempo generacional de 1.5 años, reportado anteriormente para *L. nitens* (Deckert *et al.* 2002). Para la distribución *mismatch* se probó la hipótesis nula de expansión súbita con la suma de diferencias cuadradas (SDD) y con el índice de rugosidad se probó la hipótesis nula de crecimiento poblacional con un bootstrap de 10,000 permutaciones cada una para estimar su significancia con el programa Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

Se realizaron pruebas de Mantel (1967) para probar la hipótesis de aislamiento por distancia. Para obtener las distancias geográficas se utilizaron las coordenadas obtenidas en campo (Tabla 2) usando una calculadora de distancias geográficas (disponible en internet: <http://jan.ucc.nau.edu/~cvm/latlongdist.html>). Cada matriz de

distancia genética, F_{ST} (Excoffier *et al.* 2005), S_{nn} (Rozas *et al.* 2003) y β (Ortega-Del Vecchyo y Miranda 2008), se comparó contra las distancias geográficas en una prueba de Mantel por *locus* con el programa Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.* 2005), con 10,000 permutaciones para estimar su significancia.

Tabla 2. Coordenadas geográficas de cada sitio de colecta, correspondiente a cada subpoblación.

Sitios de colecta	Latitud	Longitud	Altitud (m s.n.m.)
Arareko	27°41'N	107°35'W	2371
Basihuare	27°30'N	107°29'W	2122
Geogochic	27°24'N	107°29'W	1852
Puente Chaparra	25°01'N	105°43'W	2477
Buenos Aires	23°42'N	105°43'W	2708
El Salto	23°46'N	105°22'W	2604
Bolaños	22°07'N	103°52'W	2690

Filogeografía

Se construyeron redes de haplotipos para cada *locus* con el algoritmo de parsimonia estadística implementado en el programa *TCS* 1.21 (Clement *et al.* 2000). Las conexiones de las redes de haplotipos fueron estimadas con 95% de soluciones aceptables. Los ciclos o *loops* de las redes de haplotipos fueron eliminados con base en los criterios propuestos por Templeton y Sing (1993).

El anidamiento de clados para el *NCPA* fue realizado para cada red siguiendo las reglas de Templeton (Templeton *et al.* 1995, Templeton 2006). Las distancias al clado D_c , al clado anidado D_n y entre interiores y puntas *I-T* fueron estimadas con el programa *GeoDis* 2.5 (Posada *et al.* 2000) con 10,000 permutaciones para establecer su significancia. Los resultados fueron interpretados con la clave de inferencia (*Geodis inference key* December 15 2008).

Se hizo la corroboración propuesta por Templeton (Templeton 2002, 2004, 2006); para ello se estimó el tiempo al ancestro común más reciente (*TMRCA*) para los clados en los que se obtuvieron inferencias significativas así como el *TMRCA* acumulado usando ambos *loci* usando los valores estimados de θ_w y k (el promedio de las diferencias nucleotídicas) y la tasa de mutación para cada *locus* previamente reportada (Salas-Lizana *et al.* datos no publicados). Asimismo, se estimaron los intervalos de confianza superiores e inferiores al 95% del tiempo coalescente acumulado de la corroboración o *cross validation* (Templeton 2006).

RESULTADOS

Inferencias de eventos históricos

Diversidad genética

En total, se amplificaron y secuenciaron 68 fragmentos para el *locus ACT* y 76 para el *locus CHS-1* en siete subpoblaciones de la SMOcc. En el *locus ACT* se encontraron dos *indels* en secuencias de la subpoblación Puente Chaparra; uno es una delección del nucleótido citosina en el sitio 82 encontrado en dos secuencias y el otro es una inserción del nucleótido citosina en el sitio 156 encontrado solamente en una secuencia (Apéndice 5). Se secuenciaron diez individuos en promedio para cada subpoblación. Las excepciones son Basihuare, con cinco para el *locus CHS-1* y cuatro para el *locus ACT*; y Puente Chaparra con 17 para el *locus CHS-1* y 16 para el *locus ACT* (Apéndices 2 y 3). Las secuencias fueron depositadas en GenBank con los siguientes números de acceso: FJ040987-FJ041054 (*ACT*) y FJ156762-FJ156889 (*CHS-1*).

En el *locus CHS-1* se tiene un haplotipo diferente por cada mutación en promedio, con excepción de dos subpoblaciones. La primera es El Salto que tuvo seis sitios polimórficos y sólo cuatro haplotipos. La segunda es Bolaños en el *locus ACT* se tiene en promedio un haplotipo diferente por cada mutación con excepción de Bolaños donde se encontraron cuatro sitios polimórficos y sólo tres haplotipos (Apéndices 4 y 5). Estos resultados no se ajustan al modelo de mutación de sitios infinitos (método y resultados no mostrados).

La diversidad haplotípica (H_d) es alta (> 0.7) para la muestra total de los dos marcadores. Es alta en casi todas las subpoblaciones del *locus CHS-1*, mientras que, para el *locus ACT* es muy alta en todas las subpoblaciones, con excepción de El Salto y Bolaños (Tablas 3 y 4).

La diversidad genética medida por π presentó valores altos en ambos *loci*, aunque es más alta para *ACT* (Tablas 3 y 4).

La diversidad genética medida con el parámetro θ_w fue baja (< 0.01), para ambos *loci*, como la encontrada en la FVTM en el caso del *locus ACT* para todas las subpoblaciones (Santini 2007). Para el *locus ACT* todas las subpoblaciones presentan

valores bajos de variación, con excepción de Puente Chaparra y Buenos Aires (> 0.008) (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Diversidad genética del *locus CHS-1* en cada una de las subpoblaciones muestreadas y en el total de la muestra.

Subpoblación	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	π	θ_w
Arareko	13	3	4	0.6154	0.0024	0.0032
Basihuare	5	3	3	0.7000	0.0040	0.0048
Geogochic	10	3	4	0.6444	0.0025	0.0036
Puente Chaparra	17	8	8	0.7721	0.0044	0.0079
Buenos Aires	12	4	5	0.7879	0.0039	0.0044
El Salto	9	6	4	0.7500	0.0084	0.0074
Bolaños	10	3	4	0.7111	0.0034	0.0036
Total	76	16	16	0.7470	0.0054	0.0110

* *n*, número de individuos secuenciados; *S*, sitios polimorfos; *h*, número de haplotipos; *Hd*, diversidad haplotídica; π , el promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de bases y θ_w , la tasa de mutación por población.

Tabla 4. Diversidad genética del *locus ACT* en cada una de las subpoblaciones muestreadas y en el total de la muestra.

Subpoblación	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	π	θ_w
Arareko	12	4	5	0.7270	0.0051	0.0069
Basihuare	4	2	2	0.5000	0.0052	0.0057
Geogochic	9	4	5	0.8060	0.0072	0.0077
Puente Chaparra	16	6	6	0.7170	0.0059	0.0095
Buenos Aires	9	5	5	0.8610	0.0090	0.0092
El Salto	7	1	2	0.2860	0.0015	0.0021
Bolaños	10	4	3	0.3780	0.0042	0.0074
Total	68	20	20	0.7550	0.0065	0.0219

* *n*, número de individuos secuenciados; *S*, sitios polimórficos; *h*, número de haplotipos; *Hd*, diversidad haplotídica; π , el promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de bases y θ_w , la tasa de mutación por población.

Diferenciación poblacional

En la Figura 3 se muestra ubicación geográfica de las subpoblaciones y en la Figura 4 la distribución espacial y la frecuencia de los haplotipos para los dos *loci*. En el caso del *locus CHS-1* todas las subpoblaciones comparten un haplotipo como mínimo. En contraste, la subpoblación El Salto exhibe dos haplotipos únicos en alta frecuencia. Por su parte, en el *locus ACT* se pueden distinguir dos haplotipos en alta frecuencia distribuidos en casi todas las subpoblaciones exceptuando las subpoblaciones El Salto y Bolaños; éstas son las únicas que no comparten ningún haplotipo entre sí (Apéndices 2 y 3).

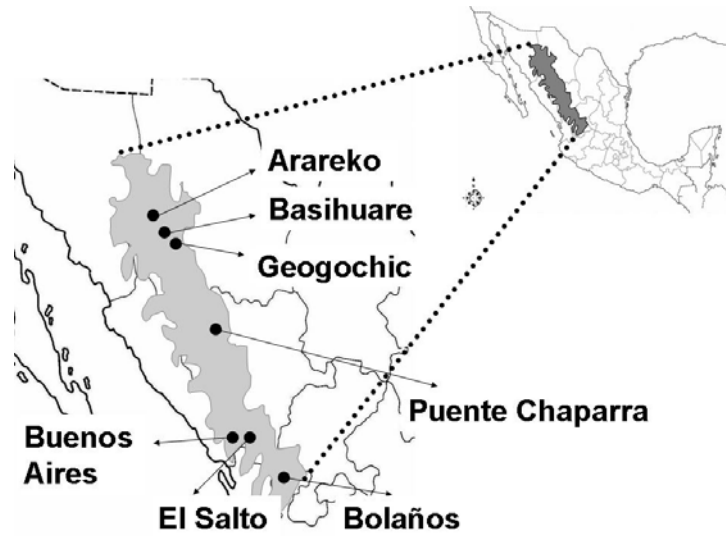


Figura 3. Mapas con la ubicación de las siete subpoblaciones muestreadas en esta tesis: Arareko, Basihuare y Geogochic en Chihuahua, Puente Chaparra, Buenos Aires y El Salto en Durango y Bolaños en Jalisco. Las líneas punteadas representan la zona ampliada del mapa pequeño (esquina superior derecha).

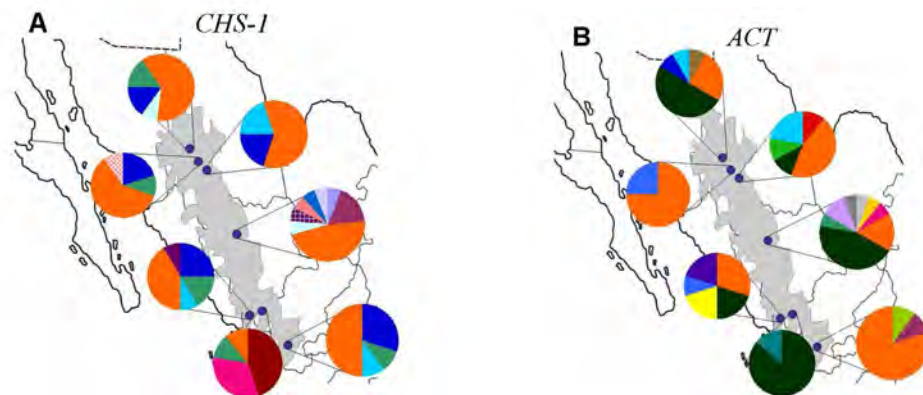


Figura 4. Distribución y frecuencia de los haplotipos por subpoblación A) *locus CHS-1*, B) *locus ACT*. Cada color representa un haplotipo diferente.

En las Tablas 5 y 6 se muestran los valores de las comparaciones de los estimadores de la diferenciación poblacional y el estimado del flujo génico entre subpoblaciones para los *loci CHS-1* y *ACT*, respectivamente. En las comparaciones de F_{ST} para el *locus CHS-1* es posible observar valores altos y significativos entre El Salto y las demás subpoblaciones ($0.001 < P < 0.01$). Para el *locus ACT* los valores de diferenciación fueron de altos a muy altos entre El Salto y Bolaños con respecto a las demás subpoblaciones ($P < 0.001$). Los valores más altos se presentaron en la comparación entre El Salto y Bolaños no importando el *locus* analizado.

Tabla 5. Comparaciones pareadas de diferenciación poblacional usando tres diferentes estimadores y el estimado del flujo génico (Nm) para el *locus CHS-1*.

Comparación	F_{ST}	Nm	P	S_{nn}	P	β
A-Bh	0.0893	inf	§	0.5556	§	0.5000
A-G	0.0771	inf	§	0.4601	§	0.5000
A-PC	0.0211	inf	§	0.4604	§	0.7778
A-BA	0.0319	inf	§	0.4665	§	0.6000
A-ES	0.2593	0.3395	**	0.8271	**	0.8000
A-B	0.0501	inf	§	0.4783	§	0.5000
Bh-G	0.1169	inf	§	0.4889	§	0.5000
Bh-PC	0.0323	inf	§	0.5835	§	0.7778
Bh-BA	0.0946	inf	§	0.4726	§	0.2500
Bh-ES	0.2192	0.5228	**	0.7286	*	0.8000
Bh-B	0.1386	inf	§	0.4333	§	0.0000
G-PC	0.0091	inf	§	0.4691	*	0.7778
G-BA	0.0495	inf	§	0.4528	§	0.6000
G-ES	0.2453	0.3765	**	0.8041	**	0.8000
G-B	0.0758	inf	§	0.4500	§	0.5000
PC-BA	0.0301	inf	§	0.4667	§	0.8000
PC-ES	0.1957	0.4228	**	0.8171	***	0.9000
PC-B	0.0283	inf	§	0.4768	§	0.7778
BA-ES	0.1767	0.4020	**	0.8122	***	0.8333
BA-B	0.0842	inf	§	0.4063	§	0.2500
ES-B	0.2177	0.4019	*	0.8064	***	0.8000

* Las abreviaturas de las subpoblaciones son A–Arareko, B–Bolaños, BA–Buenos Aires, Bh–Basihuare, ES–El Salto, G–Geogochic, PC–Puente Chaparra. Los valores de significancia de P son ***, $P < 0.001$; **, $0.001 < P < 0.01$; *, $0.01 < P < 0.05$; §, no significativo, $P > 0.05$.

La mayoría de los valores de β para *CHS-1* fueron altos (entre 0.6 y 0.8). Las subpoblaciones más diferenciadas fueron Puente Chaparra y El Salto para los dos marcadores. Para el *locus ACT* la mayoría de los valores de diferenciación fueron muy altos (> 0.8). Las subpoblaciones más diferenciadas fueron Puente Chaparra, El Salto y Bolaños (Tablas 5 y 6).

El flujo génico, medido con Nm , resultó infinito para aquellos pares de subpoblaciones donde F_{ST} no fue significativamente diferente de cero para ambos *loci*. Los valores de Nm diferentes de infinito en el *locus CHS-1* son de 0.33 hasta 0.52 migrantes efectivos por generación (Tabla 5). Para el *locus ACT* los valores de Nm fueron mayores a 3.73 en general, e incluso infinitos, para los valores de F_{ST} que no fueron significativamente diferentes de cero y desde 0.25 hasta 2.25 migrantes efectivos por generación para los que fueron significativamente diferentes de cero. La mayoría de los valores no fueron diferentes de cero para los dos *loci* (Tabla 6). Los valores de diferenciación para el *locus CHS-1* en las comparaciones de S_{nn} fueron muy altos y significativos para la subpoblación El Salto con respecto a las demás ($P < 0.001$). Los

valores de S_{nn} para el *locus ACT* presentaron las mismas comparaciones significativas, en su mayoría, con F_{ST} valores de altos a muy altos ($0.001 < P < 0.01$). Las comparaciones pareadas de diferenciación poblacional que presentaron el valor más alto y resultaron altamente significativas ($P < 0.001$) fueron El Salto y Bolaños para el *locus ACT* (Tablas 5 y 6).

Tabla 6. Comparaciones pareadas de diferenciación poblacional usando tres diferentes estimadores y el estimado del flujo génico (Nm) para el *locus ACT*.

Comparación	F_{ST}	Nm	P	S_{nn}	P	β
A-Bh	0.2083	1.9000	§	0.6813	§	0.8333
A-G	0.0612	7.6721	§	0.5238	§	0.5714
A-PC	0.0260	inf	§	0.4710	§	0.8182
A-BA	0.0357	13.5042	§	0.5153	§	0.7500
A-ES	0.0820	5.6000	§	0.5766	§	0.8333
A-B	0.3001	1.1660	**	0.7240	**	0.8571
Bh-G	0.0130	inf	§	0.5545	§	0.8333
Bh-PC	0.1647	2.5357	§	0.7071	§	0.8889
Bh-BA	0.0739	6.2626	§	0.6462	§	0.8333
Bh-ES	0.6345	0.2880	**	0.9091	**	1.0000
Bh-B	0.0763	inf	§	0.5662	§	0.7500
G-PC	0.0574	8.2133	§	0.6327	*	0.8182
G-BA	0.0094	52.5409	§	0.4947	§	0.7500
G-ES	0.3754	0.8318	**	0.8125	**	0.8333
G-B	0.0872	5.2364	§	0.5955	*	0.8571
PC-BA	0.0174	28.2332	§	0.5893	§	0.8182
PC-ES	0.1181	3.7320	§	0.6168	§	0.8889
PC-B	0.2572	1.4439	**	0.6993	**	0.9000
BA-ES	0.2738	1.3263	**	0.6868	*	0.8333
BA-B	0.1813	2.2580	**	0.7187	**	0.8571
ES-B	0.6615	0.2559	***	1.0000	***	1.0000

* Las abreviaturas de las subpoblaciones son A–Arareko, B–Bolaños, BA–Buenos Aires, Bh–Basihuare, ES–El Salto, G–Geogochic, PC–Puente Chaparra. Los valores de significancia de P son ***, $P < 0.001$; **, $0.001 < P < 0.01$; *, $0.01 < P < 0.05$; §, no significativo, $P > 0.05$.

La sensibilidad de un estadístico de diferenciación poblacional es mayor que la de otro si su capacidad de distinguir a dos subpoblaciones que evolucionaron independientemente también es mayor. De esta forma, la sensibilidad de los resultados de los estadísticos de diferenciación para el *locus CHS-1* y para el *locus ACT* fue más alta para el estimador β , en la mayoría de los casos (Tablas 5 y 6).

La correlación, r_{xy} , entre β y F_{ST} para el *locus CHS-1* fue muy baja y no significativa ($P = 0.1369$); en contraste, r_{xy} entre β y F_{ST} para el *locus ACT* mostró un valor medio y significativo (Figura 5). La correlación entre S_{nn} y β mostró valores altos y significativos para ambos *loci* (Figura 5). Por último, en la correlación entre F_{ST} y S_{nn} se encontró un valor medio y

no significativo para el *locus CHS-1*, mientras que para el *locus ACT* se encontró la correlación más alta y significativa entre estimadores de la diferenciación poblacional (Figura 5).

Con el fin de encontrar grupos genéticamente homogéneos se empleó el programa SAMOVA (Dupanloup *et al.* 2002). Este programa selecciona la mejor agrupación basándose en el valor máximo de diferenciación entre los grupos de subpoblaciones evaluadas. El valor maximizado de F_{CT} para el *locus CHS-1* fue $F_{CT} = 0.55535$ y $P = 0.0264$ para tres grupos donde el grupo 1 está compuesto por las subpoblaciones Arareko, Geogochic, Puente Chaparra, Buenos Aires y Bolaños, el grupo 2 está compuesto por Basihuare y el grupo 3 por El Salto (Figura 6 y Tabla 7). Para el *locus ACT* el valor maximizado de $F_{CT} = 0.21936$ con una $P = 0.0000$ para dos grupos, donde el grupo 1 está compuesto por la subpoblaciones Arareko, Basihuare, Geogochic, Puente Chaparra, Buenos Aires y El Salto; mientras que el grupo 2 únicamente consiste de la subpoblación Bolaños (Figura 6 y Tabla 8).

Tabla 7. Resultados SAMOVA para el *locus CHS-1*.

<i>k</i>	F_{CT}	<i>P</i>	A	Bh	G	PC	BA	ES	B
2	0.6605	0.1369	1	1	1	1	1	2	1
3	0.5554	0.0215	1	2	1	1	1	3	1
4	0.4403	0.0254	1	2	3	1	1	4	1
5	0.3710	0.08410	2	1	3	4	1	5	1
6	0.3587	0.04106	1	2	2	3	4	5	6

* Número de grupos (k)

* Las abreviaturas de las subpoblaciones son A–Arareko, B–Bolaños, BA–Buenos Aires, Bh–Basihuare, ES–El Salto, G–Geogochic, PC–Puente Chaparra.

Tabla 8. Resultados SAMOVA para el *locus ACT*.

<i>k</i>	F_{CT}	<i>P</i>	A	Bh	G	PC	BA	ES	B
2	0.2194	0.0000	1	1	1	1	1	1	2
3	0.1837	0.0000	1	2	1	1	1	1	3
4	0.1704	0.0000	1	2	1	1	3	4	2
5	0.1673	0.0000	1	2	3	1	4	5	2
6	0.1602	0.0596	1	2	2	3	4	5	6

* Número de grupos (k)

* Las abreviaturas de las subpoblaciones son A–Arareko, B–Bolaños, BA–Buenos Aires, Bh–Basihuare, ES–El Salto, G–Geogochic, PC–Puente Chaparra.

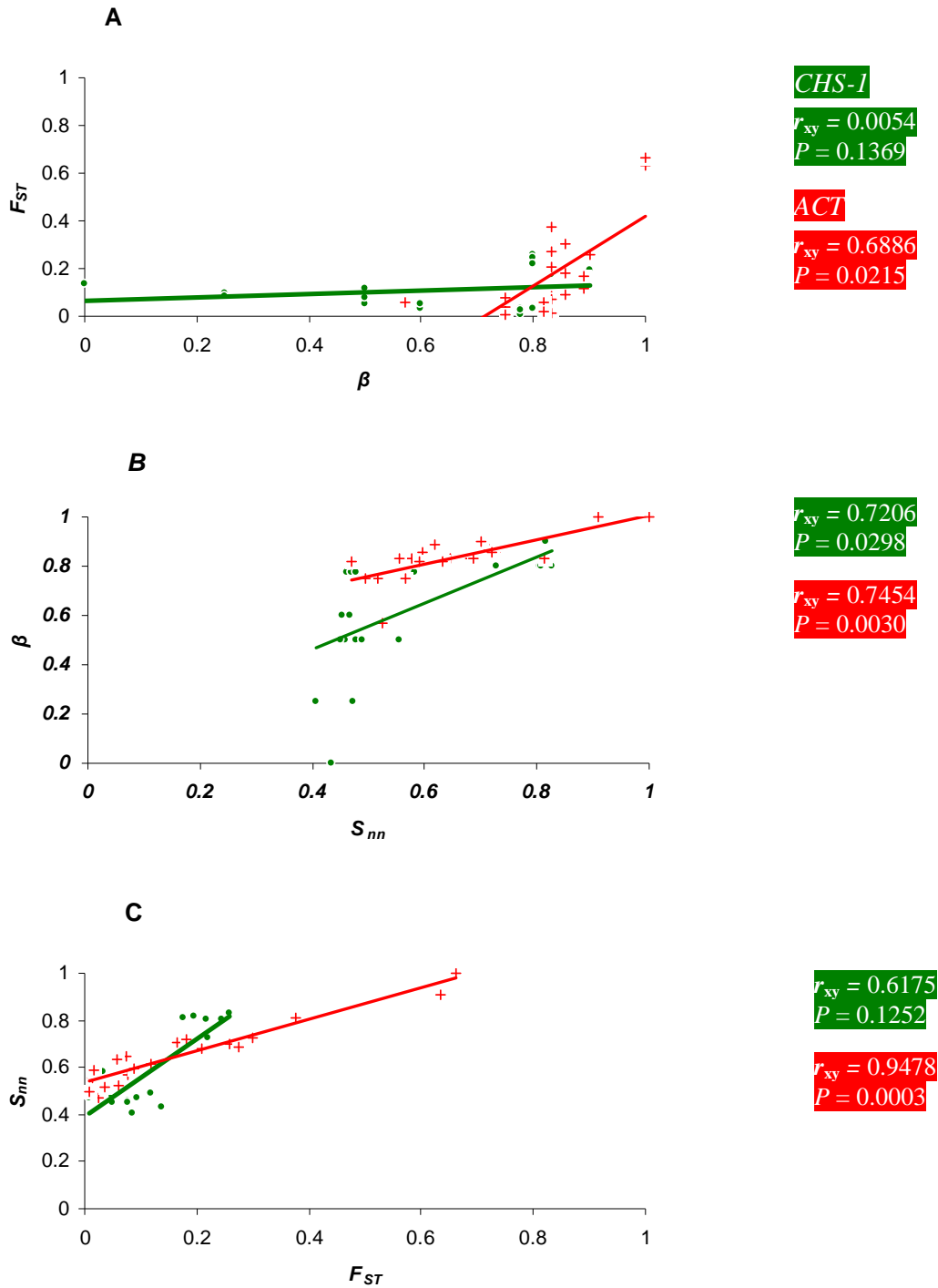


Figura 5. Correlaciones entre los estimadores de la diferenciación poblacional y entre los loci *CHS-1* (círculos verdes) y *ACT* (cruces rojas) A) correlación entre β y F_{ST} , B) correlación entre S_{nn} y β , C) correlación entre F_{ST} y S_{nn} . A la derecha de cada gráfica se encuentra el valor de la prueba de Mantel de cada correlación por marcador molecular.

Demografía histórica

Los resultados de las pruebas del modelo Wright-Fisher produjeron valores negativos y significativamente diferentes de cero excepto en el caso del *locus CHS-1* para la muestra total donde el valor de la prueba D de Tajima produjo un valor marginalmente significativo ($P = 0.057$) (Tabla 9).

Tabla 9. Prueba de hipótesis de un modelo Wright-Fisher.

	D de Tajima	P	F_S de Fu	P
<i>CHS-1</i>	-1.4709	0.0570	-8.5339	0.0010
<i>ACT</i>	-2.1324	0.0000	-17.971	0.0000

* Los resultados se encuentran por *locus* por cada estimador de la neutralidad: D de Tajima y F_S de Fu.

La distribución *mismatch* es unimodal para el total de la muestra en ambos *loci* (Figura 7). Los resultados de la suma de cuadrados para ambos *loci* no rechazan la hipótesis nula de crecimiento poblacional súbito mientras que los resultados del índice de rugosidad no rechazan la hipótesis nula de crecimiento poblacional en ambos *loci* (Figura 7). Una vez que se estableció que la distribución *mismatch* se apega a un modelo de expansión súbita se hizo un estimado del tiempo desde la ocurrencia de ésta usando $\tau = 2ut$ y un tiempo generacional de 1.5 años, reportado por Deckert y colaboradores (2002) para *L. nitens*. El tiempo desde la expansión para el *locus CHS-1* es de 462,120 años y de 549,540 años para el *locus ACT*. Ambos estimados corresponden a dos diferentes periodos glaciales del Pleistoceno. Además de los estimados de los intervalos de confianza donde solamente el intervalo inferior al 95% de la *CHS-1* no correspondió con un periodo glacial (Figura 8).

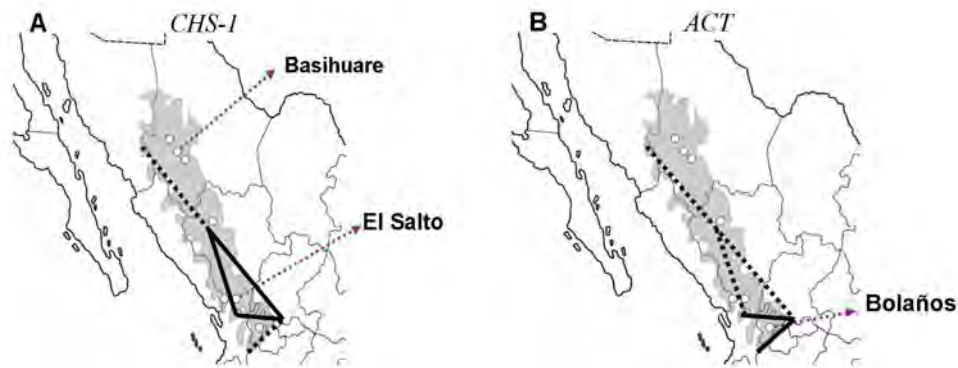


Figura 6. Resultados gráficos del análisis de la varianza molecular SAMOVA. Todas las líneas representan barreras genéticas construidas con polígonos de Voronoi. Las líneas punteadas son barreras genéticas débiles, las líneas gruesas son barreras genéticas que maximizan la diferenciación genética. Los grupos de poblaciones maximizados se muestran con una línea punteada rosa y el nombre A) *locus CHS-1*, B) *locus ACT*.

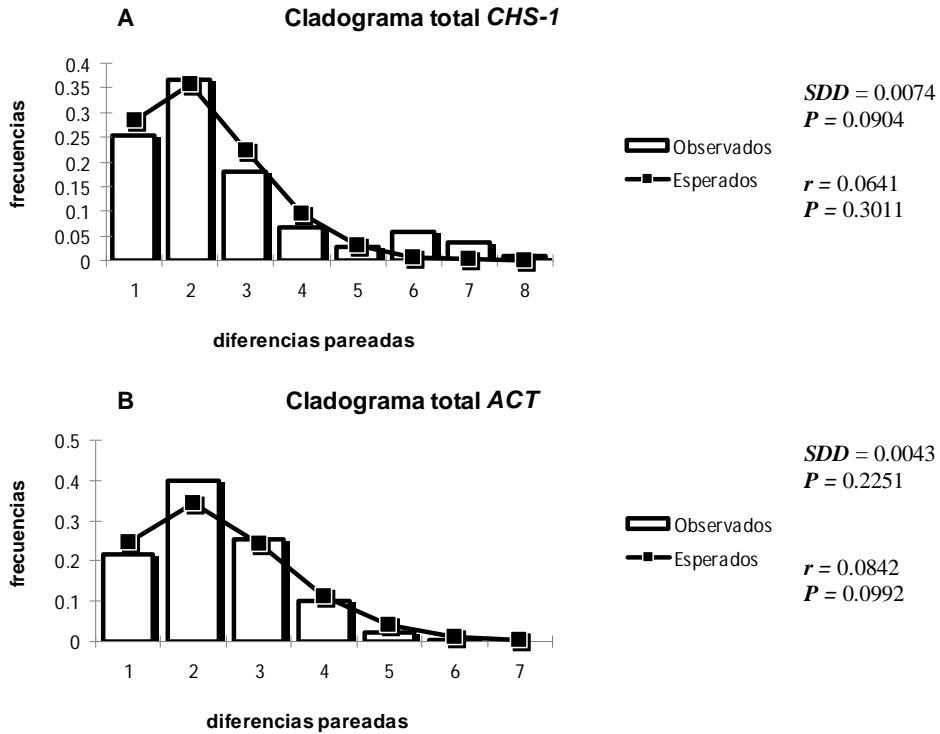


Figura 7. Distribución *mismatch* bajo el modelo de expansión poblacional súbita A) muestra total del locus *CHS-1*, B) muestra total del locus *ACT*. A la derecha de cada gráfica se encuentra el valor de la suma de cuadrados (*SDD*) y el índice de rugosidad (*r*) por marcador molecular.

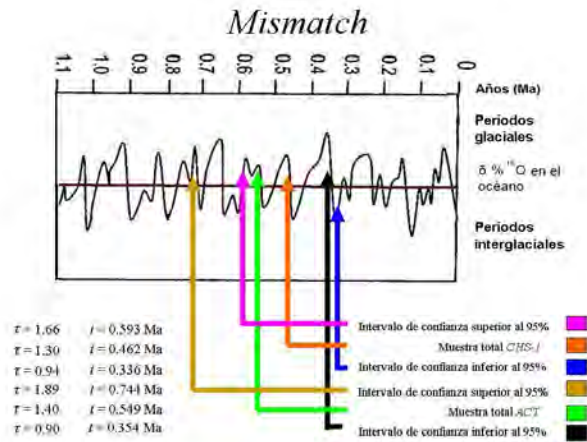


Figura 8. Tiempos a la expansión estimados con τ a partir de la distribución *mismatch* comparados con los ciclos glaciales del Pleistoceno inferidos con isótopos de oxígeno en el medio marino (Gibbard y Kolfschoten 2004, modificado de Moreno-Letelier 2009).

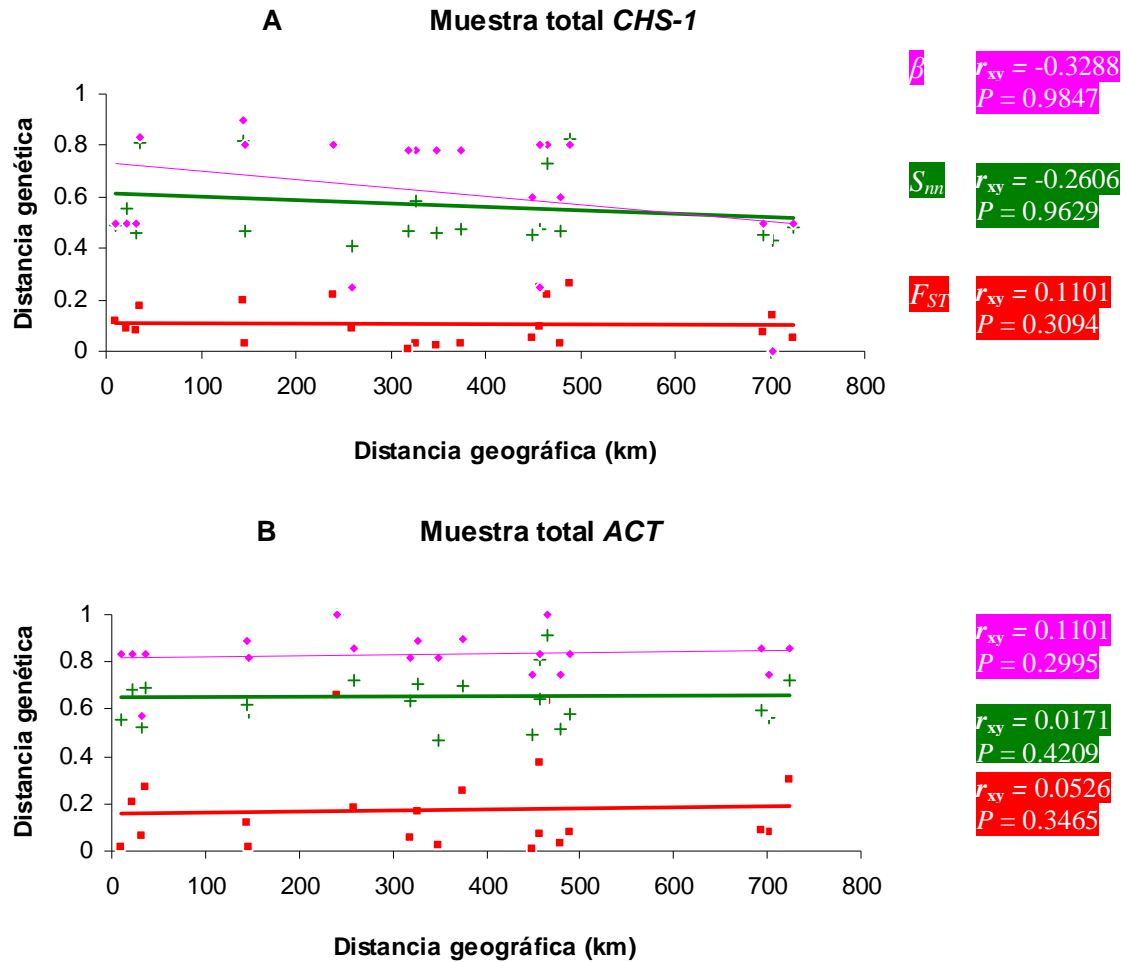


Figura 9. Correlación entre la distancia geográfica y diferentes estimadores de la distancia genética usando la prueba de Mantel A) muestra total *locus CHS-1*, B) muestra total *locus ACT*. A la derecha de cada gráfica se encuentra el valor de la prueba de Mantel de cada correlación por marcador molecular.

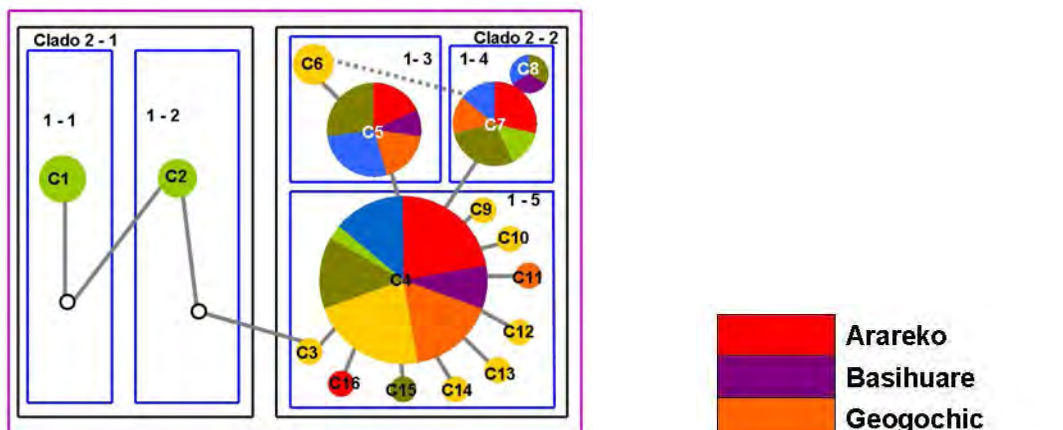
En los resultados de la prueba de Mantel (1967) para probar la hipótesis de aislamiento por distancia no se observa alguna correlación entre las distancias geográficas y las diferentes distancias genéticas empleadas para toda la muestra en ambos *loci* (Figura 9).

Filogeografía

En la Figura 10 se muestran las redes de haplotipos para cada *locus* con sus respectivos anidamientos. Las frecuencias por haplotipo se pueden consultar en los Apéndices 2 y 3. La red de haplotipos del *locus CHS-1* tiene forma de estrella porque tiene un haplotipo central en alta frecuencia que se distribuye en todas las subpoblaciones y conectados a éste existe

una gran cantidad de haplotipos punta en baja frecuencia de las subpoblaciones. Los haplotipos punta se distribuyen en las subpoblaciones Arareko, Geogochic, Puente Chaparra y Buenos Aires, pero no se comparten entre ellas. Asimismo, dos haplotipos en frecuencia moderada encontrados en todas las subpoblaciones, excepto Puente Chaparra, están conectados al haplotipo más frecuente. Además, la red de haplotipos de *CHS-1* tiene un clado de nivel dos compuesto por dos haplotipos de El Salto y uno de Puente Chaparra, ambos en baja frecuencia. Todos los haplotipos de este clado anidado están conectados entre sí por haplotipos no muestreados.

A) Cladograma total *CHS-1*



B) Cladograma total *ACT*

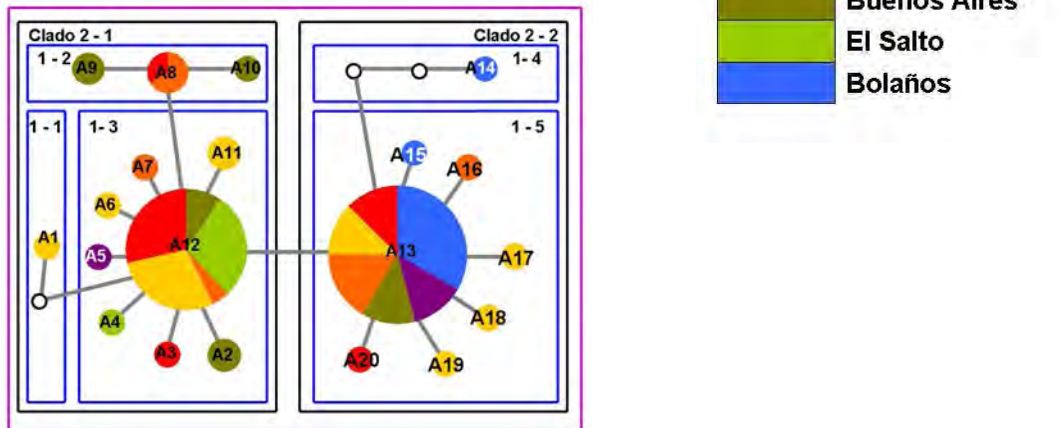


Figura 10. Redes de haplotipos para cada marcador A) *locus CHS-1*, B) *locus ACT*. El tamaño de los círculos representa la proporción de individuos para la muestra total; cada color representa una subpoblación diferente; los arcos representan un paso mutacional y los círculos sin relleno representan haplotipos no muestreados. La línea punteada representa una conexión alternativa entre haplotipos (ver texto).

Por su parte, la red de haplotipos del *locus ACT* tiene dos clados conectados entre sí con forma de estrella: el clado 2-1 y el clado 2-2 (Figura 10). En el clado 2-1 el haplotipo más frecuente se distribuye en casi todas las subpoblaciones, excepto en Basihuare y Bolaños; los haplotipos punta conectados al central se distribuyen en todas las subpoblaciones excepto Bolaños, pero no se comparten entre subpoblaciones. En el clado 2-2 el haplotipo más frecuente se distribuye en todas las subpoblaciones excepto El Salto, los haplotipos punta se distribuyen en Arareko, Geogochic, Puente Chaparra y Bolaños y tampoco se comparten entre subpoblaciones.

Las redes de haplotipos generadas para cada *locus* tienen similitudes entre sí. Ambas presentan dos niveles de anidamiento con dos linajes cada una. El linaje del clado 2-1 se caracteriza por tener haplotipos de la subpoblación El Salto; asimismo, en el clado 2-2 se encuentran todos los haplotipos de la subpoblación Bolaños. Las dos redes de haplotipos tienen forma de estrella donde las puntas generalmente se conectan al haplotipo más común por un paso mutacional.

Los resultados del programa *GeoDis 2.5* fueron interpretados por medio de la clave de inferencia para cada *locus* por separado. La inferencia de expansión continua del área de distribución se presentó para ambos *loci* en el cladograma total (Tablas 10y 11). De la misma forma, la inferencia de flujo genético restringido con aislamiento por distancia se presentó en el clado 1-3 para ambos *loci* (Tablas 10y 11), que se corroboró con una prueba de Mantel (Figura 11).

Tabla 10. Inferencia biológica del *NCPA* para el cladograma del *locus CHS-1*.

Clados anidados	χ^2	<i>P</i>	Cadena de inferencia	Inferencia
Clado 1-3	14.0000	0.012	2-3-4	FGRAD
Cladograma total	49.4906	0.000	2-11-12-13	ECAD

* *P* es la probabilidad de obtener un valor de χ^2 más grande o igual al valor observado permutando 10,000 veces con una prueba de contingencia. Las inferencias fueron obtenidas con la clave de inferencia de diciembre de 2008.

* Abreviaturas: FGRAD=Flujo genético restringido con aislamiento por distancia, ECAD=Expansión continua del área de distribución.

Tabla 11. Inferencia biológica del *NCPA* para el cladograma del *locus ACT*.

Clados anidados	χ^2	<i>P</i>	Cadena de inferencia	Inferencia
Clado 1-3	71.1224	0.002	2-3-4	FGRAD
Cladograma total	21.6839	0.000	2-11-12-13	ECAD

* *P* es la probabilidad de obtener un valor de χ^2 más grande o igual al valor observado permutando 10,000 veces con una prueba de contingencia. Las inferencias fueron obtenidas con la clave de inferencia de diciembre de 2008.

* Abreviaturas: FGRAD=Flujo genético restringido con aislamiento por distancia, ECAD=Expansión continua del área de distribución.

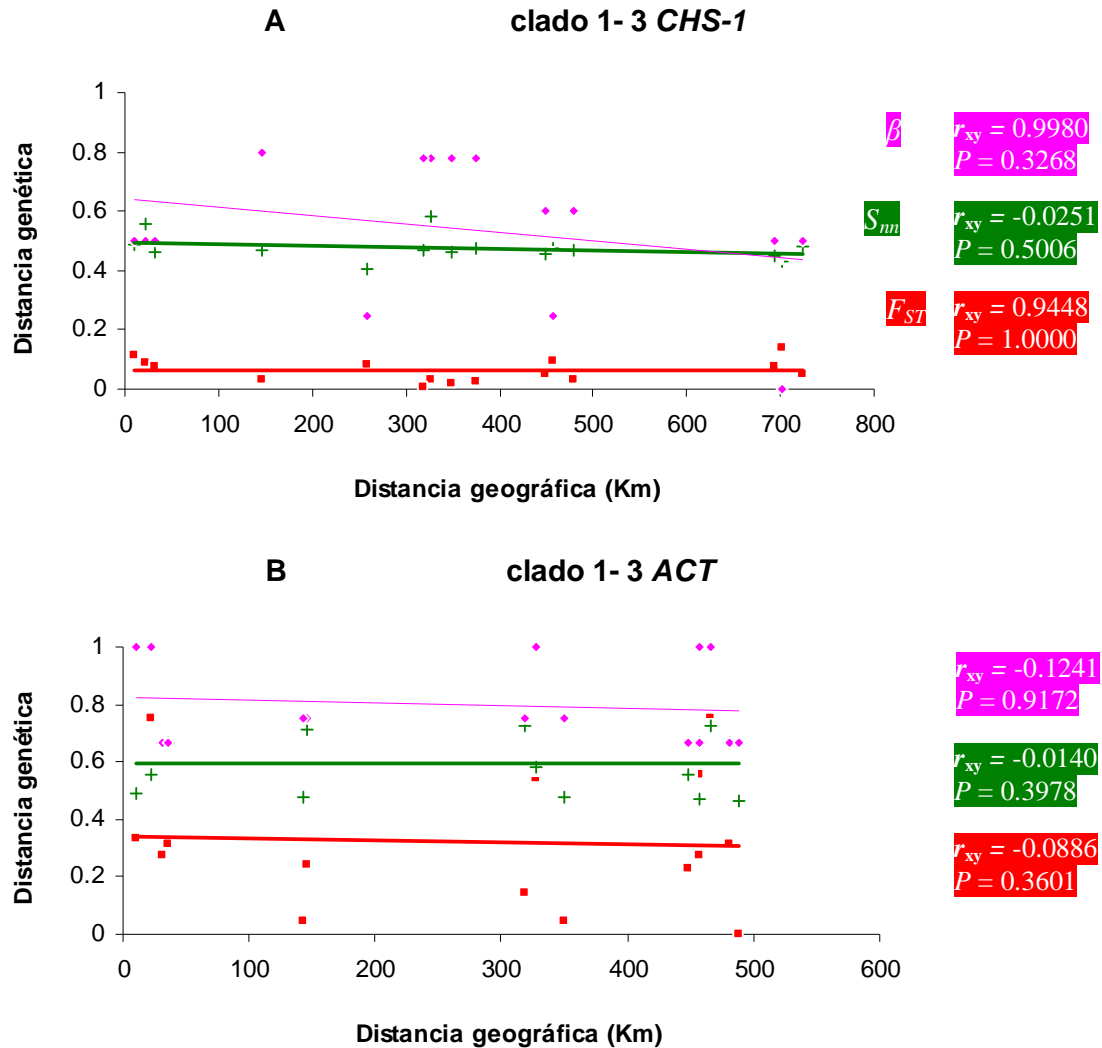


Figura 11. Corroboración de las inferencias de flujo génico restringido con aislamiento por distancia del *NCPA* usando la prueba de Mantel con cada estimador de la diferenciación genética A) *locus CHS-1*, B) *locus ACT*. A la derecha de cada gráfica se encuentra el valor de la prueba de Mantel de cada correlación por marcador molecular.

El tiempo al ancestro común más reciente (*TMRCA*) estimado con el método propuesto por Templeton (Templeton 2002, 2004, 2006) se utiliza como una fecha de datación de los eventos inferidos. El *TMRCA* de la muestra total para el *locus CHS-1* es de 710,000 años y de 715,000 años para el *locus ACT*, los cuales corresponden al mismo periodo interglacial del Pleistoceno. Para saber si las inferencias compartidas entre *loci* corresponden al mismo evento, se realizó la corroboración, o *cross validation* (Templeton 2002, 2004, 2006) que presentó un valor de $G = 0.00405$, $g.l. = 1$, y $P = 0.743$; por lo que

no se refutó la hipótesis nula de que las muestras totales estiman el mismo tiempo coalescente acumulado de 7.13×10^5 años, correspondiente al periodo interglacial detectado para ambos *locus* para el cladograma total. El intervalo de confianza al 95% superior fue de 736,000 años y el inferior fue de 689,000 años; ambos corresponden a diferentes periodos glaciales del Pleistoceno (Figura 12).

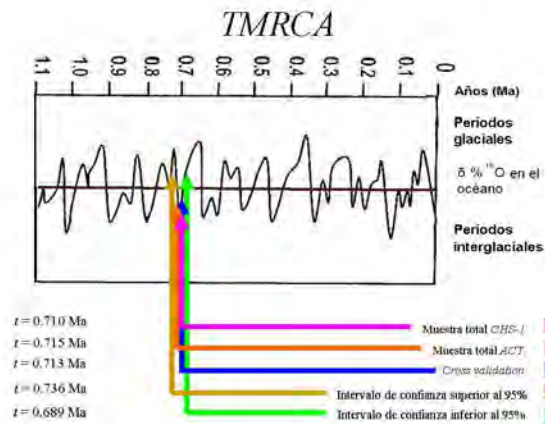


Figura 12. TMRCA estimado para el cladograma total de ambos *loci*, la *cross validation* y los intervalos de confianza de la *cross validation*. Los ciclos glaciales del Pleistoceno inferidos con isótopos de oxígeno en el medio marino (Gibbard y Kolfschoten 2004, modificado de Moreno-Letelier 2009).

DISCUSIÓN

La variación genética indica vestigios de los procesos demográficos históricos

En las subpoblaciones de *L. nitens* de la SMOcc se encontró una alta variación haplotídica para los dos *loci* empleados (para *CHS-1* $Hd = 0.743$, para *ACT* $Hd = 0.743$); por el contrario la variación nucleotídica es escasa (para *CHS-1* $\pi = 0.0054$, para *ACT* $\pi = 0.0065$; para *CHS-1* $\theta_w = 0.0110$, para *ACT* $\theta_w = 0.0219$) (Tablas 3 y 4). Se empleó la comparación entre Hd y π (Avice 2000), F_S de Fu (1997) y la D de Tajima (1989), además de diferentes métodos, entre ellos el *NCPA* (Templeton 1995) y la distribución *mismatch* (Rogers y Harpending 1992), para inferir los eventos demográficos históricos, entre ellos los crecimientos poblacionales, que sugieren una complejidad demográfica en estas subpoblaciones.

La diversidad de *L. nitens* en la SMOcc es similar a la que encontró Santini (2007) para el marcador *ACT*: $Hd = 0.743$, $\pi = 0.007$ y $\theta_w = 0.038$ para la FVTM. En ese estudio se encontró un crecimiento poblacional reciente, estimado con una prueba de *mismatch* y corroborado con métodos similares empleados en el presente estudio. Los tamaños efectivos poblacionales también son parecidos entre la SMOcc y la FVTM. Esto sugiere que las poblaciones de *L. nitens* tuvieron procesos demográficos similares en diferentes regiones biogeográficas de México.

La diversidad encontrada en la SMOcc es comparable con la encontrada por Deckert y colaboradores (2002) porque ambas son altas, aunque en el presente estudio se emplearon secuencias de DNA y en el segundo RAPD. Deckert sugiere que el alto número de individuos genéticamente diferentes, uno en promedio cada 4mm en las acículas de *P. strobus*; se debe a que *L. nitens* es heterotático.

Tanto *L. nitens* como *Amanita muscaria* presentan hospederos afines, que difieren porque son resultado de la historia de vida de cada especie; en ambos hongos su demografía histórica indica una relación con los cambios climáticos del Pleistoceno. En *A. muscaria* se han encontrado valores bajos de variación nucleotídica en genes nucleares, al igual que en *L. nitens*. Por ejemplo, en el gen de la β -tubulina $\pi = 0.0087$, 0.0089 y 0.0073 y en el *EF1- α* $\pi = 0.0128$, 0.0060 y 0.0033 en diferentes bosques de coníferas de Norteamérica de afinidad templada (Geml *et al.* 2008).

Existen pocos estudios de demografía histórica en hongos y ninguno en hongos endófitos. No obstante, es notable que en diferentes bosques de afinidad templada de

Norteamérica se ha encontrado una diversidad muy alta de especies de hongos endófitos (Ganley *et al.* 2004). La alta diversidad no sólo se encuentra en el nivel interespecífico, sino que también se encuentra en el nivel intraspecífico. Esto sugiere que los hongos endófitos, que comparten historias de vida parecidas, tienen una diversidad genética alta y, por lo tanto, hacer estudios para estos hongos sería importante para comparar sus patrones filogeográficos y así reconstruir la historia biológica de regiones para las que ésta es poco conocida, como es el caso de México.

Distribución espacial de la diversidad genética

Las subpoblaciones de la SMOcc comparten un haplotipo en frecuencia alta para el marcador *CHS-1*, mientras que en El Salto ese mismo haplotipo se encuentra en frecuencia baja. Para el marcador *ACT* las subpoblaciones comparten dos haplotipos en frecuencia alta, con excepción de El Salto y Bolaños (Figura 4). Esto sugiere que la mayoría de las subpoblaciones de la SMOcc permanecieron en contacto durante su historia. Otra opción es que el contacto fue antiguo y las mutaciones acumuladas en los marcadores no son suficientes para diferenciar poblaciones.

Delimitación de las unidades locales de apareamiento

La mayoría de las comparaciones pareadas estimadas con F_{ST} y S_{nn} , para ambos marcadores moleculares, no refutan la hipótesis nula de no diferenciación entre subpoblaciones. Sin embargo, en el caso de *CHS-1* la subpoblación de El Salto está altamente diferenciada con respecto a todas las subpoblaciones; los estimados de F_{ST} están entre 0.17 y 0.25, mientras que los estimados de S_{nn} están entre 0.80 y 0.82. Para *ACT* los estimados de diferenciación altos a muy altos (siguiendo la nomenclatura de Wright 1978) refutan la hipótesis nula de no diferenciación poblacional entre las subpoblaciones de Bolaños y El Salto con respecto a todas las demás subpoblaciones; en este caso, los valores de F_{ST} están entre 0.18 y 0.66 y los estimados de S_{nn} están entre 0.72 y 1.00.

Las comparaciones pareadas entre subpoblaciones utilizando β , el estimador de la biodiversidad, no tienen integrada una prueba de permutaciones para refutar la hipótesis nula de no diferenciación entre subpoblaciones, así que solamente comparamos los valores estimados de β con respecto a las otras dos pruebas de diferenciación poblacional (F_{ST} y S_{nn}). Los valores de diferenciación estimados con β son altos para ambos marcadores (para *CHS-1* entre 0.77 a 0.9, para *ACT* entre 0.75 y

1.0). Estos resultados indican que las subpoblaciones de *L. nitens* en la SMOcc se mantuvieron unidas y divergieron recientemente durante los periodos interglaciares (ver más abajo) o tuvieron uno o más contactos secundarios. Asimismo, la distribución geográfica de los haplotipos junto con los otros resultados de diferenciación poblacional sugieren que las subpoblaciones Bolaños y El Salto no tuvieron contacto entre ellas. Por otra parte, los valores comparados de F_{ST} y S_{nn} mostraron patrones similares de aumento o disminución de valores en la discriminación de subpoblaciones, dando los mismos resultados para cada marcador, lo que sugiere una correlación entre estos estimadores (Tablas 5 y 6). Los valores encontrados con β son más altos que los encontrados con F_{ST} y S_{nn} ; además de diferenciar a El Salto y Bolaños diferenciaron a Puente Chaparra; esto sugiere una menor correlación entre β con los otros dos estimadores.

En comparación, las subpoblaciones de la FVTM mostraron estimados de F_{ST} bajos que no refutaron la hipótesis nula de no diferenciación (Santini 2007). Asimismo, pocos de los estimados de S_{nn} para esta misma región refutaron la hipótesis nula de no diferenciación entre subpoblaciones. Esto se debe a que en la FVTM los bosques se mantuvieron en contacto por más tiempo por medio de migración o tuvieron contacto reciente con otras regiones biogeográficas.

De forma similar a lo encontrado en las subpoblaciones de *L. nitens* en la SMOcc, las subpoblaciones de su único hospedero en esta región biogeográfica, *P. strobiformis*, no forman unidades locales de apareamiento porque en ellas no se encontró subdivisión poblacional (Moreno-Letelier y Piñero 2009). Esto sugiere que las subpoblaciones estuvieron en contacto por medio de migración entre subpoblaciones durante el Pleistoceno.

Por otro lado, en un estudio de *Picea chihuahuana* en la SMOcc, Jaramillo-Correa y colaboradores (2006) compararon microsatélites de *mtDNA* y de *cpDNA* para estudiar la filogeografía de este organismo. Estos autores encontraron mayor diferenciación con los marcadores de mitocondria que con los de cloroplasto y sugieren que las diferencias se deben a la capacidad de dispersión del polen (*cpDNA*) con respecto a las semillas (*mtDNA*); lo que resultaría en una mayor diferenciación por parte de la semilla, la de menor dispersión, con respecto al polen, el de mayor dispersión. Otra interpretación de sus resultados es posible si tomamos en cuenta que la diversidad genética del *mtDNA* es menor que la de *cpDNA*. La deriva genética actuaría más fuertemente en el marcador menos diverso, lo que causaría que la diferenciación entre

subpoblaciones se alcanzara más rápido que en el marcador con mayor diversidad. Entonces, los patrones observados en *P. chihuanana* podrían no ser el resultado de aislamiento (al menos por parte de las semillas) entre subpoblaciones sino al efecto diferencial de la deriva genética entre marcadores. De forma similar a lo encontrado en *P. chihuahuana*, en *L. nitens* de la SMOcc el marcador genético de menor diversidad genética (*CHS-1*) mostró mayor diferenciación entre subpoblaciones que el otro marcador, con mayor diversidad genética. Como en este caso ambos marcadores son nucleares, no se pueden argumentar diferencias en la capacidad de dispersión, sino diferencias en los efectos de la deriva genética sobre marcadores con diferentes cantidades de variación. Asimismo, tanto en las subpoblaciones de *L. nitens* como en las de *P. chihuahuana* no se encontró aislamiento por distancia, lo que refuerza la idea de que en *P. chihuahuana*, los patrones observados no se deben a la dispersión diferencial entre semillas y polen. Otra posibilidad es que el flujo génico entre subpoblaciones no se ajuste al modelo de aislamiento por distancia y como se vio si existe diferenciación entre ellas.

El flujo génico entre subpoblaciones

El 50% de los estimados de flujo génico en comparaciones pareadas (Nm) mostró valores altos ($Nm > 1$), lo que sugiere que la migración entre subpoblaciones ha sido una fuerza evolutiva muy importante. La alta migración entre subpoblaciones parece contradictoria con la característica dispersión limitada de *L. nitens*, ya que sus esporas son endebles (Deckert *et al.* 2002, Santini 2007), pero podría estar relacionada con los crecimientos poblacionales durante los periodos glaciales del Pleistoceno porque, como consecuencia de las expansiones poblacionales, podría haber contacto entre subpoblaciones antiguamente aisladas durante los periodos interglaciales, permitiendo el flujo génico entre ellas (Moreno-Letelier y Piñero 2009). Otra posibilidad es que parte del flujo génico haya sido confundido con sorteo incompleto de linajes (Avice 2000; ver más abajo). El contacto entre subpoblaciones debido a expansiones es la explicación preferente para los eventos de migración detectados de *P. strobiformis* (Moreno-Letelier y Piñero 2009), lo que propició una pérdida de diferenciación genética dentro de la SMOcc, así como en otras regiones biogeográficas.

Se ha encontrado que la diferenciación genética de las subpoblaciones de distintos hongos es comúnmente el resultado de una migración limitada entre ellas (Rydholm *et al.* 2006, Grubisha *et al.* 2007, Geml *et al.* 2008). Un ejemplo es el hongo

ectomicorrícico *Rhizopogon occidentalis* (una pseudotrufa), que se asocia a diferentes organismos de los géneros *Pinus* y *Pseudotsuga*, en el cual se encontró alta estructura genética ($F_{ST} = 0.258$) entre sus poblaciones que están ubicadas en diferentes islas del océano Pacífico con cortas distancias entre ellas (Grubisha 2007). Los autores sugieren que la alta diferenciación entre islas se debe a que *R. occidentalis* presenta una dispersión limitada mediada por pequeños roedores y, en menor frecuencia, por mamíferos grandes (Ashkannejhad & Horton 2006). Otros ejemplos incluyen *A. muscaria* (Geml *et al.* 2008) y *Aspergillus fumigatus* (Rydholm *et al.* 2006).

De forma similar a lo encontrado en *P. chihuahuana*, las subpoblaciones de *L. nitens* en la SMOcc mostraron alta migración. Esto sugiere que la migración de diferentes organismos de afinidad templada en la SMOcc fue alta; por otra parte, sus subpoblaciones tuvieron extensiones más amplias, lo que seguramente facilitó el contacto recurrente, mediado por expansiones, entre ellas.

Comparación y correlación entre los estadísticos de diferenciación poblacional

Las ideas de la genética de poblaciones han sido tomadas para aplicarlas en problemas ecológicos y viceversa, por ejemplo Hubbell (2005) tomó los fundamentos de la teoría neutral de la evolución molecular (Kimura 1983) para describir la diversidad al nivel de comunidades. Por su parte, una de las propuestas del presente estudio es tomar los fundamentos teóricos de la ecología de comunidades para estimar la diferenciación a nivel de poblaciones con datos genéticos con el fin de obtener un estimador de la diferenciación más sensible a la variación que los estimadores empleados comúnmente (F_{ST} y S_{nn}). Esto no quiere decir que si un observador encuentra gran diversidad al nivel de comunidades, ésta deba corresponder con una variación genética en la misma magnitud, de lo que se trata es de aprovechar la analogía que existe entre métodos que buscan cuantificar qué tan diferentes son los organismos de dos regiones geográficas. Así, los diferentes haplotipos pueden verse como unidades similares a las especies y estimar el recambio entre diferentes regiones geográficas. Después de todo, como afirma John H. Gillespie (2004): “De la naturaleza de la variación a nivel molecular destaca que la variación entre individuos es similar a la encontrada entre especies”.

Tomando en cuenta los fundamentos teóricos anteriores se observó que entre los estimados de F_{ST} y β en donde no se encontró una relación directa porque los valores son contrastantes. Empleando la prueba de Mantel tampoco se halló una correlación alta entre estos estimadores (Figura 5), la más alta fue en el *locus* *ACT* donde $r_{xy} = 0.6886$ y

$P = 0.0057$. Esto es consecuencia de las diferencias intrínsecas de cada estimador para detectar diferenciación poblacional. F_{ST} se basa en comparaciones de la heterocigosidad, que a su vez están influenciadas por las diferencias en frecuencia de los haplotipos entre las subpoblaciones; mientras que β emplea datos de ausencia y presencia, por lo que es insensible a las diferencias en la frecuencia de los haplotipos entre subpoblaciones. Así, si un haplotipo se encuentra en frecuencia alta en todas las subpoblaciones, aunque haya muchos otros haplotipos diferentes en pequeñas proporciones, F_{ST} tendería a subestimar la diferenciación, mientras que β lograría diferenciar poblaciones en estas mismas condiciones. En el caso en que los haplotipos se distribuyeran homogéneamente entre las subpoblaciones, con aproximadamente la misma frecuencia, se esperaría que ambos estimadores dieran resultado similares.

Una consecuencia de las diferencias en el poder de resolución entre F_{ST} y β es notoria cuando se comparan los valores de diferenciación estimados para diferentes marcadores. Con F_{ST} , la mayor diferenciación se encuentra en el marcador que tiene menor diversidad de haplotipos, mientras que con β , ésta es mayor en el marcador con más haplotipos; lo anterior se debe a que β es muy sensible a las diferencias entre subpoblaciones, dadas por la gran cantidad de haplotipos diferentes, pero en baja frecuencia, que existe entre subpoblaciones usando *ACT*, mientras que F_{ST} está sesgado por los pocos haplotipos que están presentes en alta frecuencia en casi todas las subpoblaciones. Un argumento equivalente sirve para explicar las diferencias entre estimadores para *CHS-1*; al haber menos haplotipos (y, por lo tanto, menos haplotipos exclusivos entre subpoblaciones), el poder de β se reduce, mientras que F_{ST} se incrementa por la presencia de haplotipos en frecuencias intermedias que tienen distribuciones geográficas más o menos restringidas (Tablas 5 y 6).

Los estimadores S_{nn} y β presentan una alta sensibilidad para detectar diferenciación poblacional (Tablas 5 y 6). Las comparaciones pareadas de S_{nn} y β fueron sometidas a una prueba de Mantel y los valores de estas correlaciones fueron medios (Figura 5 y Tabla 6) (*locus CHS-1* $r_{xy} = 0.7206$ y $P = 0.0298$ y *locus ACT* $r_{xy} = 0.7454$ y $P = 0.0030$). La correlación entre estos estimadores aumentó al emplear el marcador molecular con mayor variación genética (*ACT*); lo que es de esperarse, pues conforme aumenta la diversidad genética también aumentan las sustituciones, las diferencias entre secuencias y las diferencias entre subpoblaciones. S_{nn} se sustenta en comparar la frecuencia con que ocurre una cierta categoría de sustituciones (por ejemplo, la

frecuencia con que ocurren sustituciones de dos nucleótidos) entre los haplotipos de cada una de las subpoblaciones comparada con la frecuencia de las mismas categorías en la muestra total. Por su parte, β emplea la presencia y ausencia de los haplotipos en cada subpoblación. En consecuencia, las sensibilidades de estos estimadores son semejantes, porque ponderan la diversidad local antes de compararla con la diversidad global. Cabe notar que al igual que F_{ST} , S_{nn} presenta generalmente valores altos de diferenciación cuando hay una menor cantidad de variación (Tabla 5); sin embargo, los valores arrojados por S_{nn} son significativos en una mayor proporción que los de F_{ST} . Por su parte β presenta valores más altos de diferenciación que S_{nn} cuando se emplea un marcador molecular con mayor variación genética aunque lamentablemente una comparación similar a la anterior no es posible porque no existe a la fecha un estadístico para conocer la significancia de los estimados de β .

La sensibilidad de S_{nn} y β es similar y depende de las diferencias nucleotídicas en la muestra. En el caso de S_{nn} al aumentar la frecuencia del número de diferencias aumenta su resolución y ésta disminuye con la variación genética. Este patrón es similar al de β con la diferencia de que al aumentar la diversidad genética y disminuir frecuencia de los haplotipos tiene mayor resolución. Por otra parte, S_{nn} está diseñado para emplearse únicamente con sustituciones de nucleótidos, siendo incapaz de utilizar la información contenida en otro tipo de mutaciones, como las inversiones y las inserciones-deleciones; que el estimador β sí puede tomar en cuenta, ya que depende de la cantidad de haplotipos diferentes sin importar cómo sean definidos.

Las comparaciones entre F_{ST} y S_{nn} indican que ambos aumentan proporcionalmente; esto sugiere que los estimadores se encuentran relacionados fuertemente. Para probar esta hipótesis se realizó una prueba de Mantel y no se encontró una correlación ($r_{xy} = 0.6175$ y $P = 0.1252$) con *CHS-1*, el marcador molecular que presentó menor variación, mientras que al emplear *ACT*, el marcador molecular con mayor variación, se encontró una correlación muy alta ($r_{xy} = 0.9478$ y $P = 0.0003$) (Figura 5); esto indica que con el aumento en la variación genética aumenta la relación entre estos estimadores de la diferenciación. Por otra parte, a pesar de las diferencias conceptuales, la alta correlación entre F_{ST} y S_{nn} para el *locus ACT* puede ser consecuencia de que ambas medidas de diferenciación poblacional se basan en mayor o menor proporción en las frecuencias de los haplotipos. A pesar de la correlación entre ambos estimadores, S_{nn} presentó mayor diferenciación que F_{ST} , en ambos casos, y la

hipótesis nula de no diferenciación se refutó en más ocasiones, lo que sugiere que es un mejor estimador de la diferenciación.

El índice de biodiversidad β estima de forma distinta la diferenciación poblacional que F_{ST} y S_{nn} ; esto implica que las subpoblaciones en las que no se encontró diferenciación realmente la tengan y sea alta. Una de las posibilidades es que tanto F_{ST} como S_{nn} tienen bases teóricas la aparición y fijación de los haplotipos y estiman la diferenciación dependiendo del tiempo de la aparición de los haplotipos. Esto implica que β sólo puede estimar la diferenciación actual y nos dice muy poco como aparecieron los haplotipos de los organismos.

Grupos de subpoblaciones delimitados con SAMOVA

Los grupos de subpoblaciones delimitados empleando *SAMOVA* son diferentes entre marcadores (Figura 6); con *CHS-1* el programa segregó a las poblaciones Basihuare en el norte y El Salto en el sur del resto, mientras que con *ACT* sólo segregó a Bolaños (Tablas 7 y 8). Este resultado no es tan sorprendente porque *SAMOVA* se basa en estimados de F_{ST} (y F_{CT}) que de por sí ya son heterogéneos entre marcadores, lo que se ve reflejado en las poblaciones que segrega para cada caso. Además, el programa arrojó diferentes agrupaciones significativamente iguales ($P = 0.000$) (Tabla 8) aún con valores de F_{CT} diferentes, lo que hace dudar sobre la verosimilitud de sus conclusiones y por lo tanto la interpretación que podría hacerse es ambigua. Posiblemente se deba a que las agrupaciones posibles no son significativamente diferentes ya que el exceso de haplotipos en frecuencia baja no permite diferenciarlas. Asimismo, algunas de las agrupaciones que hace (por ejemplo, aislar la población Basihuare de las otras) no corresponden con ningún resultado de los estimadores de diferenciación.

Los resultados de *SAMOVA* reportados para otros organismos con las mismas afinidades que *L. nitens* también fueron difíciles de interpretar. En *P. strobiformis* se encontró un solo grupo homogéneo en la SMOcc (Moreno-Letelier y Piñero 2009) lo que puede deberse a que el análisis de *SAMOVA* se realizó para un número más grande de regiones biogeográficas lo suficientemente diferentes entre sí como para que no se detectaran diferencias a menor escala. Por su parte, en *P. chihuahuana*, un estudio más enfocado en la SMOcc, el análisis de *SAMOVA* usando *cpDNA* segregó dos subpoblaciones norteñas en Chihuahua que, a decir de los autores, pudieron formar un continuo entre ellas, aislado del otro continuo que formarían el resto de las subpoblaciones (Jaramillo-Correa *et al.* 2006). Ambos estudios, junto con el de *L. nitens*

nos sugieren que esta región es un continuo en el que abunda la variación genética debida a eventos demográficos históricos como el crecimiento poblacional y que la subdivisión poblacional fue muy poca entre ellas, diferenciándose subpoblaciones específicas para cada organismo.

Crecimiento poblacional de *L. nitens* en la Sierra Madre Occidental

Se encontró crecimiento poblacional en las subpoblaciones de *L. nitens* en la SMOcc por medio de diferentes métodos. Uno de ellos son los estimadores de la neutralidad que nos indican si la muestra que analizamos es compatible con la evolución por mutación y deriva genética en poblaciones de tamaño constante (Fisher 1930, Kimura 1983, Wright 1931) en contraste con algún tipo de selección o con cambios históricos en el tamaño de las poblaciones. Estas pruebas, la D de Tajima (1989) y la F_S de Fu (1997) se basan en las comparaciones entre π y θ_w . En las subpoblaciones de *L. nitens* de la SMOcc los valores de θ_w fueron más altos que los de π por un orden de magnitud (Tablas 3 y 4), esto indica que hay un número alto de *singletons* en la muestra. En el caso del *locus CHS-1* la prueba D de Tajima para la muestra total no fue significativamente diferente de cero, esto sugiere que su polimorfismo es compatible con la evolución neutral en poblaciones de tamaño constante (Fisher 1930, Wright 1931). Por otra parte, para la muestra total del *locus ACT* la prueba D de Tajima y para la muestra total de los dos *loci* las pruebas F_S de Fu fueron negativas y se refutó la hipótesis nula de compatibilidad con una muestra neutral, esto indica que las dos muestras no están en equilibrio deriva-mutación porque hay una mayor cantidad de *singletons* que de haplotipos compartidos, este resultado es compatible con una expansión poblacional (Tajima 1989, Fu 1997) o con un periodo fuerte de selección purificadora porque existe un exceso de polimorfismo en baja frecuencia (Tabla 9). La interpretación de selección natural se descartó porque los patrones negativos y significativamente diferentes de cero se encontraron en los *loci* no ligados *CHS-1* y *ACT*. Esto no es posible explicarlo por medio de selección natural ya que ésta actúa de forma particular en el genoma, no muestra patrones generalizados (Hedrick 2005).

La sensibilidad de la prueba D de Tajima (1989) para detectar crecimientos poblacionales históricos es menor que la prueba F_S de Fu (1997) porque necesita una mayor cantidad de datos, mientras que la prueba F_S de Fu compara la probabilidad de observar una muestra neutral al azar con un número de datos similar o más pequeño que el observado. Como consecuencia, el marcador con la menor variación genética (*CHS-*

I) no fue compatible con la hipótesis de expansión poblacional al emplearse la *D* de Tajima; por su parte, al emplearse la F_S de Fu se detectó una expansión poblacional sin importar el marcador empleado.

La comparación de *Hd* y π para ambos *loci* usando toda la muestra (Tablas 3 y 4) fue visual ya que no se cuenta con un estadístico que las compare, como la *D* de Tajima o la F_S de Fu. Para ambos marcadores los valores de *Hd* son altos y los valores de π son bajos; lo que sugiere una expansión poblacional a partir de una población con un tamaño efectivo poblacional bajo (Avice 2000).

Otra forma de probar la hipótesis de expansión poblacional es con la distribución *mismatch* (Rogers y Harpending 1992); que grafica la distribución de frecuencias de las diferencias nucleotídicas y la compara con la distribución de probabilidad de datos simulados bajo el modelo de expansión súbita (Rogers 1995). En general, los valores de significancia de la suma de las diferencias cuadradas *P* (*SDD*) no rechazan la hipótesis nula de crecimiento súbito y del índice de rugosidad (*r*) la hipótesis nula de crecimiento poblacional (Schneider y Excoffier 1999, Excoffier *et al.* 2005; Figura 7 y Tabla 10). Los tiempos desde la expansión se estimaron a partir de τ , empleando la ecuación $t = \tau / 2u$, donde *t* es el tiempo en generaciones desde que ocurrió la expansión. Con el fin de obtener *t* en años se empleó el tiempo generacional de 1.5 años, reportado anteriormente para *L. nitens* (Deckert *et al.* 2002) y una tasa de mutación estimada comparando el número de sustituciones entre diferentes especies de *Lophodermium* y el tiempo en que divergieron (Salas-Lizana *et al.* datos no publicados). Los resultados del tiempo desde la expansión coinciden con periodos glaciales, lo que sugiere que los bosques de su hospedero, *P. strobiformis*, aumentaron su área de distribución y con ellos, las poblaciones de *L. nitens*.

Las redes de haplotipos (Figura 10) para los dos *loci* presentaron una topología con forma de estrella que sugiere expansión poblacional (Avice 2000). Las redes de haplotipos con forma de estrella se emplean para probar la hipótesis de crecimiento poblacional (Beaumont 1999, Fu 1997); esto significa que las poblaciones pasaron por un periodo de expansión reciente y que las ramas internas son cortas con pocas mutaciones acumuladas, no hay eventos de coalescencia posteriores a la expansión, lo que indica que fue acelerada la acumulación de variación genética (Slatkin y Hudson 1991, Fu 1997, Schneider y Excoffier 1999). Nuestras redes de haplotipos presentan

uno o dos haplotipos centrales en frecuencia alta distribuidos en todas las subpoblaciones y una gran cantidad de haplotipos punta en todas las subpoblaciones.

El análisis formal de las redes de haplotipos, realizado con el *NCPA* infirió expansión continua del área de distribución para el cladograma total en ambos *loci*. Esta inferencia está sustentada con los resultados de los estadísticos de resumen. Las dos redes son evidencia del mismo evento histórico, que es congruente con la distribución *mismatch*, pero cada prueba mostró tiempos a la expansión diferentes (Figuras 8 y 12, Tablas 10 y 11). La diferencia entre los estimadores del tiempo a la expansión será discutida posteriormente.

Por otro lado, comparando las redes de cada *locus*, encontramos que existen semejanzas y diferencias. En ambas, las puntas se conectan al haplotipo más común por un paso mutacional y presentan dos niveles de anidamiento con dos linajes; estos linajes se caracterizan porque entre ellos divergen las subpoblaciones El Salto y Bolaños, lo que sugiere que estas dos subpoblaciones no comparten una historia demográfica cercana. La diferencia más notoria entre las redes es que en el caso del *locus ACT* hay dos haplotipos de alta frecuencia, en contraste con *CHSI* que sólo presenta uno. Las diferencias en la topología de las redes de haplotipos indican que la variación genética fue eliminada al azar. La diferencia entre la topología de las redes también depende de la cantidad de variación de los dos marcadores moleculares. En el de mayor variación molecular (*ACT*) puede que no se haya eliminado la variación rápidamente o que se origine mucha variación en poco tiempo. Al contrario, en el marcador molecular de menor variación (*CHS-I*) la variación es muy poca que no hubo el tiempo suficiente para que los demás haplotipos aumentaran su frecuencia o que la deriva genética fue tan fuerte que eliminó la variación rápidamente. En ambos casos se encontró el mismo evento histórico con el mismo *TMRCA* para la inferencia del cladograma total, lo que elimina la posibilidad de que haya sido un patrón influido por selección (Templeton 2008).

Aislamiento por distancia

No se encontró aislamiento por distancia en la SMOcc al realizarse pruebas de Mantel (Figura 9) porque es probable que durante el aumento del área de distribución de *L. nitens* hubiera altos niveles de migración entre subpoblaciones adyacentes, como ha sido reportado para las poblaciones de la FVTM (Santini 2007) y *P. strobiformis* en la SMOcc (Moreno-Letelier y Piñero 2009). Una consecuencia del apareamiento entre las

subpoblaciones adyacentes es que se comparten polimorfismo entre la mayoría ellas porque se homogenizaron genéticamente (Jaramillo-Correa *et al.* 2006, Moreno-Letelier y Piñero 2009).

Cabe notar que el flujo genético puede confundirse con sorteo incompleto de linajes (Avice 2000). En el caso de *L. nitens*, la migración es poco probable entre subpoblaciones separadas por una distancia geográfica muy grande; un ejemplo es el par de subpoblaciones Arareko y Puente Chaparra que están separadas por una distancia de 350 Km; lo que sugiere que la variación genética que éstas comparten puede deberse a que el polimorfismo ya estaba presente en una población ancestral (Bulgin *et al.* 2003).

Por su parte, el *NCPA* infirió aislamiento por distancia y flujo genético restringido para el clado 1-3 de ambos marcadores (Tablas 10 y 11), aunque la prueba de Mantel no mostró correlación entre la distancia genética y la geográfica (Figura 11). Biológicamente, el flujo genético restringido es muy probable debido a la dispersión limitada de *L. nitens* y la prueba de Mantel (Mantel 1967) no realiza una comparación detallada entre pares de subpoblaciones para conocer si algunas están más relacionadas con otras (Epperson 2003). Por lo tanto, quizá existe aislamiento por distancia entre algunas subpoblaciones pero no entre otras. El flujo genético histórico entre algunas subpoblaciones debió borrar los vestigios del aislamiento por distancia.

En especies que comparten el área de distribución en la SMOcc con *L. nitens* tampoco se encontró aislamiento por distancia usando la prueba de Mantel. Las subpoblaciones de *P. strobiformis* están poco diferenciadas entre sí y formaron un conjunto homogéneo (Moreno-Letelier y Piñero 2009). Por su parte en las subpoblaciones de *P. chihuahuana* se encontraron patrones diferentes entre marcadores, para microsatélites de mitocondria se encontró una subdivisión norte-sur que no fue detectada con marcadores del mismo tipo pero de cloroplasto; en ninguno de los dos casos detectó aislamiento por distancia (Jaramillo-Correa *et al.* 2006). Los resultados en conjunto de los tres organismos (*Picea*, *Pinus* y *Lophodermium*) sugieren que la expansión de los bosques de afinidad templada en la SMOcc homogenizó la variación genética entre algunas de las subpoblaciones, presumiblemente las más cercanas entre sí, y que las subpoblaciones altamente diferenciadas para cada especie son el resultado de una historia particular que depende de las capacidades de dispersión, la tolerancia a ciertos ambientes y, metodológicamente hablando, de los marcadores y de los análisis empleados.

Correspondencia entre los procesos demográficos históricos y los periodos glaciales del Pleistoceno

Los procesos demográficos de diferentes biotas durante el Pleistoceno estuvieron influidos mayormente por las oscilaciones climáticas ya que las placas tectónicas durante este periodo no repercutieron en los procesos demográficos porque se mantuvieron relativamente estables (Lomolino *et al.* 2006). Asimismo, la distribución de los pinos fue influida por los cambios climáticos del Pleistoceno; algunos de sus fósiles fueron encontrados en la SMOcc en sedimentos que pudieron corresponder a periodos glaciales, los cuales beneficiaron la expansión de sus poblaciones (Bradbury 1997, Metcalfe 2006) y, como consecuencia, la expansión de las poblaciones de sus huéspedes, incluyendo a *Lophodermium*.

Es necesario comparar el tiempo de ocurrencia de los eventos históricos con los registros históricos de cambio climático para encontrar una posible causa-efecto. En este caso se compararon el tiempo desde la expansión estimado de las distribuciones *mismatch* y el *TMRCA* de los cladogramas totales, donde el *NCPA* infirió expansión poblacional (Figuras 8 y 12) con los principales ciclos glaciales del Pleistoceno (Gibbard y Kolfshoten 2004).

El tiempo a la expansión estimado con τ ($t = \tau / 2u$) de la muestra total para el *locus CHS-1* coincide con un periodo glacial, estimado en 462,000 años (Gibbard y Kolfshoten 2004). En el caso del *locus ACT* el tiempo desde la expansión estimado con τ coincide con un periodo glacial hace 549,000 años (Gibbard y Kolfshoten 2004) (Figura 11). Que también coincide con la expansión poblacional de *L. nitens* en la FVTM con el *locus ACT* (Santini 2007). Por su parte, Templeton (2002) recomienda corroborar, por medio de la *cross validation*, las inferencias de los niveles altos de anidamiento porque el tiempo de los eventos recientes es oscurecido por un error estocástico asociado al proceso coalescente. El tiempo coalescente de la muestra total para el *locus CHS-1* es de 710, 000 años y 715, 000 años para el *locus ACT*. Se realizó la corroboración, o *cross validation* y no se refutó la hipótesis nula de que las muestras totales estiman el mismo tiempo coalescente acumulado de 713, 000 años, estos tres estimados coinciden con el mismo periodo interglacial. El intervalo de confianza al 95% superior fue de 736, 000 años y el inferior fue de 689, 000 años, estos dos estimados coinciden con dos diferentes periodos glaciales del Pleistoceno (Figura 12).

El tiempo desde la expansión estimado por medio de τ depende de los supuestos del modelo de crecimiento súbito donde el tamaño efectivo poblacional inicial debe ser cercano a cero, lo que en la realidad es muy difícil que suceda. Por otra parte, el estimado del tiempo desde la expansión depende de la frecuencia de las diferencias de la muestra que es a su vez está afectada por la estocasticidad del proceso mutacional y la deriva genética. Asimismo, estimar el *TMRCA* puede ser mejor porque en una red con forma de estrella el momento en que surgió la mayoría de la variación genética es muy cercano al momento de la expansión demográfica. Por esta razón se encontró que ambos marcadores moleculares infieren el mismo evento histórico con un tiempo a la expansión similar (Templeton 2005, 2006).

Al mismo tiempo se estimaron los intervalos de confianza superior e inferior al 95% para encontrar un intervalo en el cual se encuentre el *TMRCA* acumulado de la *cross validation*, al igual que en el estudio de la lagartija *Ameiva chrysolema* (Gilford y Larson 2008). El estimado del *TMRCA* sobrestima el tiempo de expansión porque estima el momento en el que surgió la variación genética pero no el crecimiento poblacional (Edwards y Beerli 2000), aunque ambos son muy cercanos. Por otra parte, el estimado empleado no tiene incorporado un modelo de expansión; por estos motivos el estimado del *TMRCA* acumulado no coincidió con un periodo glacial.

Los datos de diferentes marcadores moleculares junto con el estimado de la *cross validation* eliminó la posibilidad de que las diferencias entre las distribuciones y/o las frecuencias de los haplotipos sean resultado de selección porque al emplear más de un *locus* que corrobore una interpretación histórica ésta se vuelve más robusta (Templeton 2008). Esto quiere decir que al tener resultados similares entre un marcador al que no se encontró influencia de la selección y otro del que se tienen dudas lo más probable es que sus patrones no se deban a selección natural.

La *cross validation* se ha reportado en pocas ocasiones (Knowles 2008). Por ejemplo: Templeton (2002) usó la *cross validation* y encontró tres expansiones poblacionales en humanos. Para la lagartija *Ameiva chrysolema* en la República Dominicana se encontró una expansión corroborada por la *cross validation* con tres *loci* no ligados (Gilford y Larson 2008). Para elefantes se encontró una fragmentación sustentada por cinco *loci* no ligados (Templeton 2009). Lo que hace que este estudio sea precursor en filogeografía de hongos, ya que hasta el momento no se ha reportado ninguno para estos organismos.

De los pocos estudios de demografía histórica en hongos se encuentra el de *A. muscaria* donde los procesos demográficos ocurrieron de manera contraria a los de *L. nitens* porque sus poblaciones en Norteamérica divergieron por múltiples fragmentaciones y aislamientos geográficos durante los periodos glaciales del Pleistoceno y crecieron durante los periodos interglaciales (Geml *et al.* 2008). Para las subpoblaciones de *L. nitens* en la FVTM (Santini 2007) se encontró que la variación genética, la diferenciación y el crecimiento poblacional durante los periodos glaciales fueron similares a los encontrados en la SMOcc aunque son regiones biogeográficas distintas en la República Mexicana. Además se sugiere que las subpoblaciones de la FVTM tuvieron contacto durante los periodos de crecimiento poblacional.

Por último, cabe resaltar que se estimaron dos diferentes tiempos desde la expansión con τ para *P. strobiformis* en la SMOcc. Uno de ellos hace 41,068 años con un tiempo generacional de 15 años y la otra de 273,792 años con un tiempo generacional de 100 años, ambas coinciden con periodos glaciales, lo que sugiere que los periodos fríos favorecieron el aumento en sus tamaños poblacionales (Moreno-Letelier 2009), al igual que los de sus hospederos. En *P. strobiformis* no se han amplificado marcadores moleculares nucleares; éstos abarcan tiempos coalescentes más profundos que el *mtDNA* o el *cpDNA* (Templeton 2005) y no es posible hacer una comparación más precisa con *L. nitens*. Así, las historias encontradas para *L. nitens* y *P. strobiformis* sugieren una complementariedad porque ambas colonizaron nuevas áreas de distribución en los periodos glaciales con flujo genético entre subpoblacionales y durante los periodos interglaciales sus subpoblaciones se aislaron entre sí (Moreno-Letelier y Piñero 2009).

CONCLUSIONES

La diversidad genética en las poblaciones de *L. nitens* de la SMOcc es alta para los dos *loci* estudiados. Asimismo, encontramos que sus subpoblaciones están altamente diferenciadas, sobre todo Puente Chaparra, El Salto y Bolaños. Existe una aparente contradicción entre las subpoblaciones diferenciadas por cada marcador molecular, lo que indica que la eliminación de la variación se debe al azar. Las subpoblaciones comparten muchos alelos a pesar de estar diferenciadas, lo que sugiere que la variación genética compartida puede deberse a flujo genético y/o a tiempos de divergencia muy cortos entre ellas.

Las diferencias en la sensibilidad de los estimadores de la diferenciación poblacional se deben a contrastes conceptuales. Los resultados más importantes son que el estimador β detectó diferenciación con mayor resolución que los otros estimadores (F_{ST} y S_{nn}), al menos en el caso particular de nuestro conjunto de datos. Además, β aumenta su resolución al incrementarse la cantidad de variación. Por su parte, los estimadores F_{ST} y S_{nn} presentaron una correlación muy alta porque al aumentar la cantidad de variación genética sus estimaciones, basadas de una u otra forma en las frecuencias de haplotipos, convergen. Aunque se encontró una alta correlación entre S_{nn} y F_{ST} , el primero presentó mayor sensibilidad que el segundo, lo que sugiere que es un mejor estimador de la diferenciación, a pesar de éstos hay resultados en los que el resultado es opuesto (Hernández 2009).

Los resultados del programa *SAMOVA* tienen poca credibilidad porque forma agrupaciones diferentes con significancias iguales y diferentes valores de F_{CT} (Tabla 8); además, en nuestro caso diferenció a la subpoblación Basihuare, lo que no corresponde con los resultados de ninguno de los otros estimadores de diferenciación.

Se detectó crecimiento poblacional en las subpoblaciones de *L. nitens* en la SMOcc por medio de diferentes métodos. El crecimiento de su área de distribución aumentó la migración entre subpoblaciones. El *NCPA* sugiere que hay aislamiento por distancia entre algunas subpoblaciones aunque la prueba de Mantel sugiere que no existe aislamiento por distancia entre el total de las subpoblaciones ni para el clado anidado donde el *NCPA* lo detectó.

Los tiempos desde la expansión estimados con τ coinciden con periodos glaciales del Pleistoceno pero su estimación es inconsistente con un mismo periodo de

expansión ya que depende de las diferencias en la fijación al azar de los haplotipos para cada marcador molecular. Los tiempos desde la expansión estimados con el *TMRC*A no coinciden con un periodo glacial porque se estimó el *TMRC*A de los marcadores moleculares y no el tiempo coalescente desde la expansión, lo que produjo una sobrestimación que probablemente sea corregida con un modelo de expansión poblacional.

La demografía histórica de *L. nitens* es similar en diferentes regiones biogeográficas del país, como la FVTM (Santini 2007). En ambas regiones las poblaciones de *L. nitens* aumentaron su tamaño y área de distribución poblacional durante los periodos glaciales. El aumento en su área de distribución está relacionado con eventos de migración entre subpoblaciones y, por su parte, la divergencia entre subpoblaciones y su contracción, ocurrida durante los periodos interglaciales, limitó el flujo genético entre subpoblaciones debido a la baja dispersión de este hongo.

Las poblaciones *L. nitens* y *P. strobiformis* tienen demografías históricas complementarias porque en las dos se encontró flujo genético entre subpoblacionales al colonizar nuevas áreas de distribución en los periodos glaciales, además de que sus subpoblaciones se aislaron entre sí durante los periodos interglaciales (Moreno-Letelier y Piñero 2009). Este resultado complementa también las inferencias para especies simpátricas, como *P. chihuahuana* (Jaramillo-Correa 2006), lo que indica que las inferencias basadas en hongos endófitos pueden extrapolarse a estudios de filogeografía comparada.

Perspectivas

Es indispensable amplificar una mayor cantidad de marcadores moleculares para reconstruir con mayor claridad la demografía de *L. nitens* en la SMOcc y en el país.

Por otra parte es importante hacer estimaciones de los tamaños efectivos, los crecimientos poblacionales y la divergencia entre subpoblaciones con modelos probabilísticos más especializados como *BEAST* (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (Drummond y Rambaut 2007) o *IMa* (*Isolation-Migration analytical*) (Hey y Nielsen 2007), ya que incorporan modelos que estiman el *TMRC*A con modelos de evolución de poblaciones más complejos.

Por último, sería importante hacer simulaciones de marcadores moleculares con diferentes cantidades de variación genética para probar las hipótesis de que el

estadístico β es más sensible sin importar la cantidad de variación, ya que no estima las frecuencias de los haplotipos en la muestra. Además, es importante probar que las correlaciones entre los estimadores de la diferenciación poblacional aumentan y tienden a ser lineales con marcadores con una mayor cantidad de variación genética.

Apéndice 1.

Extracción de DNA de hongos (Xu *et al.* 1994, modificado por Vázquez-Lobo 1996).

Todas las centrifugaciones se realizan a 4°C.

1. Tomar alrededor de 1g de micelio fúngico con la menor cantidad de agar posible y colocarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Liofilizar el micelio alrededor de seis o siete horas, hasta que el tejido se rompa con sólo agitar el tubo.
3. Fragmentar en partículas finas el micelio liofilizado dentro del tubo hasta reducirlo a polvo.
4. Agregar a cada tubo de 600 a 800 µL de buffer CTAB 1x (1% CTAB, 0.7M NaCl, 50mM Tris HCl pH 8). Debe quedar una mezcla coloidal homogénea.
5. En la campana de extracción de gases, agregar 0.6 µL de β-mercaptoetanol a cada tubo. Incubarlos durante 30 minutos, las tapas de los tubos deben permanecer abiertas.
6. Adicionar a cada tubo 600 µL de cloroformo-octanol (24:1) y agitar hasta homogeneizar.
7. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y precipitar el DNA con un volumen igual al recuperado de 2-propanol (Isopropanol) helado. Agitar por inversión cada tubo.
8. Dejar toda la noche en refrigeración.
9. Centrifugar a 9,000 rpm por cinco minutos. Lavar el botón (*pellet*) eliminando el sobrenadante y agregando un mL de etanol al 70% frío.
10. Centrifugar a 7,000 rpm durante cinco minutos y eliminar el sobrenadante.
11. Secar el botón dejando los tubos abiertos en la campana de flujo laminar durante 25 minutos, aproximadamente. Resuspender el botón con 100 – 200 µL de dH₂O.

Apéndice 2

Lista de haplotipos y su frecuencia absoluta mostrados en la red del *locus CHS-1* (Figura 9).

Subpoblación	Haplotipo	Frecuencia	
Arareko	C5	2	
	C7	2	
	C4	8	
	C16	1	
Basihuare	C5	1	
	C8	1	
	C4	3	
Geogochic	C5	2	
	C7	1	
	C4	6	
	C11	1	
Puente Chaparra	C3	1	
	C6	3	
	C4	8	
	C9	1	
	C10	1	
	C12	1	
	C13	1	
	C14	1	
	Buenos Aires	C5	3
		C7	2
C8		1	
C4		5	
C15		1	
El Salto	C1	4	
	C2	3	
	C7	1	
	C4	1	
Bolaños	C5	3	
	C7	1	
	C8	1	
	C4	5	

Apéndice 3

Lista de haplotipos y su frecuencia absoluta mostrados en la red del *locus ACT* (Figura 9).

Subpoblación	Haplotipo	Frecuencia
Arareko	A20	1
	A13	3
	A12	6
	A3	1
	A8	1
Basihuare	A13	3
	A5	1
Geogochic	A16	1
	A13	4
	A12	1
	A3	1
	A8	2
Puente Chaparra	A17	1
	A18	1
	A19	1
	A13	3
	A12	6
	A6	1
	A11	2
	A1	1
Buenos Aires	A13	3
	A12	2
	A2	2
	A9	1
	A10	2
El Salto	A12	6
	A4	1
Bolaños	A14	1
	A15	1
	A13	8

Apéndice 4

Sitios polimórficos del *locus CHS-1*. Los números corresponden a la posición del sitio polimórfico; los asteriscos representan identidad de estado con respecto a la secuencia de referencia.

h/S	39	57	81	84	85	105	120	126	138	144	147	187	192	195	224	237
C1	A	G	T	T	C	C	C	G	A	C	G	T	C	A	A	A
C2	*	*	C	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*
C3	*	*	C	C	*	*	*	A	*	*	*	*	*	G	*	*
C4	T	*	C	C	*	*	*	A	*	*	*	*	*	G	*	*
C5	T	*	C	C	*	*	*	A	*	*	*	A	*	G	*	*
C6	T	*	C	C	*	T	*	A	*	*	*	A	*	G	*	*
C7	T	*	C	C	*	T	*	A	*	*	*	*	*	G	*	*
C8	T	A	C	C	*	T	*	A	*	*	*	*	*	G	*	*
C9	T	*	C	C	*	*	*	A	G	*	*	*	*	G	*	*
C10	T	*	C	C	*	*	*	A	*	*	A	*	*	G	*	*
C11	T	*	C	C	*	*	A	A	*	*	*	*	*	G	*	*
C12	T	*	C	C	*	*	*	A	*	T	*	*	*	G	T	*
C13	T	*	C	C	*	*	*	A	*	*	*	*	*	G	T	*
C14	T	*	C	C	*	*	*	A	*	*	*	*	T	G	*	*
C15	T	*	C	C	T	*	*	A	*	*	*	*	*	G	*	*
C16	T	*	C	C	*	*	*	A	*	*	*	*	*	G	*	G

Apéndice 6.

Script del estadístico β programado en Perl 5.10.0.

```
open (SIE, "sierral.phy") or
die "No puedo abrir el
archivo";
$banderaA=0;
$banderaBh=0;
$banderaG=0;
$banderaPC=0;
$banderaBA=0;
$banderaES=0;
$banderaB=0;
@secA=();
@secBh=();
@secG=();
@secPC=();
@secBA=();
@secES=();
@secB=();
$contadorA=0;
$contadorBh=0;
$contadorG=0;
$contadorBA=0;
$contadorES=0;
$contadorB=0;
while (<SIE>){
if (/^A_/){
$banderaA=1;
}
elseif(/^Bh_/){
$banderaBh=1;
}
elseif(/^G_/){
$banderaG=1;
}
elseif(/^PC_/){
$banderaPC=1;
}
elseif(/^BA_/){
$banderaBA=1;
}
elseif(/^ES_/){
$banderaES=1;
}
elseif(/^B_/){
$banderaB=1;
}
elseif ($banderaA ==1){
#print $_;
$cadena= uc($_);
chomp ($cadena);
if ((grep(/$cadena/,@secA)) ==
NULL){
push (@secA, $cadena);
print "CHEUX1";
$contadorA++;
}
}
}
$banderaA=0;
elseif ($banderaBh ==1){
#print $_;
$cadena= uc($_);
chomp ($cadena);
if ((grep(/$cadena/,@secBh)) ==
NULL){
push (@secBh, $cadena);
print "CHEUX2";
$contadorBh++;
}
}
$banderaBh=0;
elseif ($banderaG ==1){
#print $_;
$cadena= uc($_);
chomp ($cadena);
if ((grep(/$cadena/,@secG)) ==
NULL){
push (@secG, $cadena);
print "CHEUX3";
$contadorG++;
}
}
$banderaG=0;
elseif ($banderaPC ==1){
#print $_;
$cadena= uc($_);
chomp ($cadena);
if ((grep(/$cadena/,@secPC)) ==
NULL){
push (@secPC, $cadena);
print "CHEUX4";
$contadorPC++;
}
}
$banderaPC=0;
elseif ($banderaBA ==1){
#print $_;
$cadena= uc($_);
chomp ($cadena);
if ((grep(/$cadena/,@secBA)) ==
NULL){
push (@secBA, $cadena);
print "CHEUX5";
$contadorBA++;
}
}
$banderaBA=0;
elseif ($banderaES ==1){
#print $_;
$cadena= uc($_);
chomp ($cadena);
if ((grep(/$cadena/,@secES)) ==
NULL){
push (@secES, $cadena);
print "CHEUX6";
$contadorES++;
}
}
$banderaES=0;
elseif ($banderaB ==1){
#print $_;
$cadena= uc($_);
chomp ($cadena);
if ((grep(/$cadena/,@secB)) ==
NULL){
push (@secB, $cadena);
print "CHEUX7";
$contadorB++;
}
}
$banderaB=0;
}
close (SIE);
print "$contadorA $contadorBh
$contadorG
$contadorBA
$contadorES
$contadorB\n";
open (BETA, ">beta.txt") or die
"no puedo escribir";
print BETA "Poblacion1
Poblacion2
Beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secA){
foreach $j (@secBh){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorA - $interseccion) +
($contadorBh - $interseccion);
$beta = (($contadorA -
$interseccion) + ($contadorBh -
$interseccion))/ $N;
print BETA "A Bh
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secA){
foreach $j (@secG){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorA - $interseccion) +
($contadorG - $interseccion);
$beta = (($contadorA -
$interseccion) + ($contadorG -
$interseccion))/ $N;
print BETA "A G
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secA){
foreach $j (@secPC){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorA - $interseccion) +
($contadorPC - $interseccion);
$beta = (($contadorA -
$interseccion) + ($contadorPC -
$interseccion))/ $N;
print BETA "A PC
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secA){
foreach $j (@secBA){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorA - $interseccion) +
($contadorBA - $interseccion);
$beta = (($contadorA -
$interseccion) + ($contadorBA -
$interseccion))/ $N;
print BETA "A BA
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secA){
foreach $j (@secES){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorA - $interseccion) +
($contadorES - $interseccion);
$beta = (($contadorA -
$interseccion) + ($contadorES -
$interseccion))/ $N;
print BETA "A ES
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secA){
foreach $j (@secB){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorA - $interseccion) +
($contadorB - $interseccion);
$beta = (($contadorA -
$interseccion) + ($contadorB -
$interseccion))/ $N;
print BETA "A B
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secBh){
foreach $j (@secG){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorBh - $interseccion) +
($contadorG - $interseccion);
$beta = (($contadorBh -
$interseccion) + ($contadorG -
$interseccion))/ $N;
print BETA "Bh G
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secBh){
foreach $j (@secPC){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorBh - $interseccion) +
($contadorPC - $interseccion);
$beta = (($contadorBh -
$interseccion) + ($contadorPC -
$interseccion))/ $N;
print BETA "Bh PC
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secBh){
foreach $j (@secBA){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorBh - $interseccion) +
($contadorBA - $interseccion);
$beta = (($contadorBh -
$interseccion) + ($contadorBA -
$interseccion))/ $N;
print BETA "Bh BA
$beta\n";
$interseccion = 0;
foreach $i (@secBh){
foreach $j (@secES){
if ($i eq $j){$interseccion++;}
}
}
$N = $interseccion +
($contadorBh - $interseccion) +
($contadorES - $interseccion);
$beta = (($contadorBh -
$interseccion) + ($contadorES -
$interseccion))/ $N;
print BETA "Bh ES
$beta\n";
}
```


REFERENCIAS

- Arnold E, 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21, 51–66.
- Ashkannejhad S, Horton TR, 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytologist*, 169, 345–354.
- Avise JC, 1989. Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43, 1192-1208.
- Avise JC, 2000. *Phylogeography*. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC, 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial-DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review Ecology and Systematics*, 18, 489–522.
- Beaumont MA, 1999. Detecting Population Expansion and Decline Using Microsatellites. *Genetics*, 153, 2013–2029.
- Bradbury JP, 1997. Sources of glacial moisture in Mesoamerica. *Quaternary International*, 43/44, 97–110.
- Bulgin NL, Gibbs HL, Vickery P, Baker AJ, 2003. Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). *Molecular Ecology*, 12, 831–844.
- Cannon PF, Minter DW. 1983. The nomenclatural history and typification of *Hypoderma* and *Lophodermium*. *Taxon*, 32, 572–583.
- Carbone I, Kohn LM, 1999. A method for designing primer sets for speciation studies for filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 91, 553-556.
- Carbone I, Kohn LM, 2001. A microbial population-species interface: nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. *Molecular Ecology*, 10, 947–964.

- Clay K, Scharld, C, 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, 160, S99–S127.
- Clement M, Posada D, Crandall KA, 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1660.
- Darker GD, 1967. A revision on the genera of the Hypodermataceae. *Canadian Journal of Botany*, 45, 1399–1444.
- Deckert RJ, Peterson L, 2000. Distribution of foliar fungal endophytes of *Pinus strobus* between and within host trees. *Canadian Journal of Forestry Resources*, 30, 1436–1442.
- Deckert RJ, Melville LH, Peterson L, 2001. Structural features of a *Lophodermium* sp. endophyte during the cryptic life-cycle phase in the foliage of *Pinus strobus* L. *Mycological Research*, 105, 991–997.
- Deckert RJ, Melville LH, Peterson RL, 2001b. Epistomatal chambers in the needles of *Pinus strobus* L. (eastern white pine) function as microhabitat for specialized fungi. *International Journal of Plant Sciences*. 162, 181-189.
- Deckert RJ, Hsiang T, Peterson RL, 2002. Genetic relationships of endophytic *Lophodermium nitens* isolates from needles of *Pinus strobus* L. *Mycological Research*, 106, 305–313.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L, 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571-2581.
- Drummond AJ, Rambaut A, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Edwards SV, Beerli P, 2000. Perspective: Gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54, 6, 2000, 1839–1854.
- Epperson BK, 2003. *Geographical Genetics*. Princeton University Press: Princeton and Oxford, USA, 356pp.

- Excoffier LG, Laval, Schneider S, 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Farjon A, Styles BT, 1997. *Flora Neotropica: Pinus (Pinaceae)*. New York Botanical Garden, New York, EUA. 293pp.
- Ferrari L, 1995. Miocene shearing along the northern boundary of the Jalisco block and the opening of the southern Gulf of California. *Geology*, 23, 8; 751–754.
- Ferrusquía-Villafranca I, 1998. Geología de México: una sinopsis. En: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J, Compiladores. *Diversidad Biológica de México. Orígenes y Distribución*. Instituto de Biología, UNAM, 4-24pp.
- Finlay RD, Clay K, 2007. Fungal endophytes in forests, woody plants and grassland systems: diversity, functional ecology and evolution. *Fungal Biology Reviews*, 21, 49-50.
- Fisher RA, 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon.
- Freeman S, Rodriguez RJ. 1993. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260:75–78.
- Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu Z, Meinhardt S, Ling H, Faris JD, Rasmussen JB, Solomon PS, McDonald BA, Oliver RP, 2006. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*, 8, 953-956.
- Fu YX, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-925.
- Futuyma D, 2005. *Evolution*, Sinauer Associates Inc. USA, 603.
- Galbraith ED, Kienast M, Pedersen T, Calvert S, 2004. Glacial-interglacial modulation of the marine nitrogen cycle by high-latitude O₂ supply to the global thermocline. *Paleoceanography*, 19, PA4007.
- Ganley RJ, Brunfeldt SJ, Newcombe G, 2004. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101, 10107–10112.

- García Arévalo A, González M, 1998. *Las Pináceas de Durango*. Instituto de Ecología A.C., 179 pp.
- Gaston K, Rodrigues A, Rensburg B, Koleff P, Chown S, 2001. Complementary representation and zones of ecological transition. *Ecology letters*, 4, 4-9.
- Geml J, Tulloss R, Laursen G, Sazanova N, Taylor D, 2008. Evidence for strong inter- and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 694–701.
- Gernandt DS, Geada-López G, Ortiz-García S, Liston A, 2005. Phylogeny and classification of Pinus. *Taxon*, 54, 29–42.
- Gibbard P, van Kolfschoten T, 2004. The Pleistocene and Holocene epochs. En: Gradstein F, Ogg J, Smith A. (Eds.) *A geologic time scale*, Cambridge University Press, Cambridge, p. 441-452.
- Gifford ME, Larson A, 2008. *In situ* genetic differentiation in a Hispaniolan lizard (*Ameiva chrysolema*): a multilocus perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 277–291.
- Gillespie JH, 2004. *Population Genetics. A concise guide*. The John Hopkins University Press, Baltimore, 214pp.
- Grubisha LC, Bergemann SE, Bruns TD, 2007. Host islands within the California Northern Channel Islands create fine-scale genetic structure in two sympatric species of the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon*. *Molecular Ecology*, 16, 1811–1822.
- Hawksworth DL, 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 12: 1422, 1432.
- Hedrick PW, 2005. *Genetics of Populations*. Jones & Bartlett Publishers, Massachussets, 737pp.
- Hernández Ayuso MC, 2005. *Introducción a la teoría de redes*. Sociedad Matemática Mexicana, 2° Ed. Textos Nivel Medio. 12.

- Hernández MS, 2009. Variación genética de *Taxodium mucronatum* en las cuencas de México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Hey J, Machado C, 2003. The study of structured populations-a new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*, 4, 535-543.
- Hey J, Nielsen R, 2007. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *PNAS*, 8, 2785–2790.
- Hewitt G, 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913.
- Higgins L, Arnold E, Miadlikowska J, Sarvate SD, Lutzoni F, 2007. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42, 543–555.
- Hubbell SP, 2005. Neutral theory in community ecology and the hypothesis of functional equivalence. *Functional Ecology*, 19, 166-172.
- Hudson R, 2000. A new statistic for Detecting Genetic Differentiation. *Genetics*, 155, 2011-2014.
- Jaramillo-Correa JP, Beaulieu J, Ledig FT, Bousquet J, 2006. Decoupled mitochondrial and chloroplast DNA population structure reveals Holocene collapse and population isolation in a threatened Mexican-endemic conifer. *Molecular Ecology*, 15, 2787–2800.
- Jasinski JP, Serge P, 2007. Holocene occurrence of *Lophodermium piceae*, a black spruce needle endophyte and possible paleoindicator of boreal forest health. *Quaternary Research*, 67, 50–56.
- Johnston PR, 2001. Monograph of the monocotyledon-inhabiting species of *Lophodermium*. *Mycological Papers*, 176, 1–239.
- Johnston PR, Park D, Dick MA, Ortiz-García S, Gernandt DS, 2003. Identifying pine-inhabiting *Lophodermium* species using PCR-RFLP. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 33, 10–24.
- Kimura M, 1969. The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. *Genetics*, 1: 893–903.

- Kimura M, 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kingman JF, 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications* 13, 235-248.
- Knowles LL, 2008. Why does a method that fails continue to be used? *Evolution*, 62, 2713–2717.
- Koleff P, Gaston K, Lennon J, 2003. Measuring beta diversity for presence–absence data. *Journal of Animal Ecology*, 72, 367–382.
- Krebs CJ, 1999. *Ecological Methodology*. Addison-Wesley, California, 654pp.
- Kutil B, Greenwald C, Liu G, Spiering M, Schardl C, Wilkinson H, 2007. Comparison of loline alkaloid gene clusters across fungal endophytes: Predicting the co-regulatory sequence motifs and the evolutionary history. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 1002–1010.
- Lomolino M, Riddle BR, Brown JH, 2006. *Biogeography*. Sinauer Associates, Inc, USA, Third edition, 845pp.
- Mantel N, 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer research*, 27, 209-220.
- Mc Dowell F, Clabaugh S, 1981. The igneous History of the Sierra Madre Occidental and its Relation to the Tectonic Evolution of Western Mexico. *Universidad Nacional Autónoma de México, Revista del Instituto de Geología*, 5, 195–206.
- Metcalfe SE, 2006. Late Quaternary environments of the northern deserts and central transvolcanic belt of Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93, 258–273.
- Minter DW, 1981. Lophodermium on pines. *Mycological Papers*, 147, 1-71.
- Monsen K, Blouin MS, 2003. Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear–mitochondrial discordance. *Molecular Ecology*, 12, 3275–3286.
- Moreno-Letelier A, 2009. Estructura filogeográfica de *Pinus strobiformis* y su relación con los cambios climáticos durante el Pleistoceno. Tesis de Doctorado. Posgrado en

Ciencias Biomédicas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Moreno-Letelier A, Piñero D, 2009. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography*, 36, 121–131.
- Müller MM, Valjakka R, Suokko A, Hantula J, 2001. Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Molecular Ecology* 10, 1801-1810.
- Nei M, 1987. Molecular Evolutionary Genetics. *Columbia University Press*, New York, 512pp.
- Nei M, Kumar S, 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, NY, 333pp.
- Ortíz-García S, Gernandt DS, Stone JK, Johnston PR, Chapela IH, Salas-Lizana R, Alvarez-Buylla ER, 2003. Phylogenetics of *Lophodermium* from pine. *Mycologia*, 95, 846–859.
- Osorio M, Stephan BR, 1991. Morphological studies of *Lophodermium piceae* (Fuckel) v. Hoehnel on Norway spruce needles. *European Journal of Forest Pathology*, 21, 389-403.
- Pagano M, Gauvreau K, 2001. *Fundamentos de Bioestadística*. Thomson Learning, Segunda edición. México, pp 13.
- Perry JP, 1991. The pines of Mexico and Central America. *Timber Press*, Portland.
- Piñero D, 2005. Similitudes y diferencias entre los conceptos y patrones de diversidad beta y diferenciación genética: Aplicaciones en los bosques mexicanos de coníferas. En: Halffter G, Soberón J, Koleff P, Melic A. *Sobre Diversidad Biológica: El Significado de las Diversidades Alfa, Beta y Gamma*. m3m: Monografías Tercer Milenio, Zaragoza, España, IV, 54- 61pp.

- Posada D, Crandall KA, Templeton AR, 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9, 487–488.
- Posada D, Crandall KA, 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 37–45.
- Pfenniger M, Posada D, 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (*Helicellinae*, *Stylommatophora*): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution*, 56, 1776–1788.
- Rogers A, Harpending H, 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552–568.
- Rogers A, 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49, 608-615.
- Rozas J, Sánchez-Del Barrio JC, Messeguer X, Rozas R, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.
- Rydholm C, Szakacs G, Lutzoni F, 2006. Low genetic variation and no detectable population structure in *Aspergillus fumigatus* compared to closely related *Neosartorya* species. *Eucaryotic Cell*, 650-657.
- Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth S, 2004. Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9, 275–280.
- Salas-Lizana R, 1998. La inferencia filogenética como una aproximación a la historia natural del género de hongos edófitos *Lophodermium* Chev. (Ascomycota) en dos especies mexicanas de pinos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, México.
- Santini N, 2007. Expansión demográfica histórica del hongo endófito *Lophodermium nitens* revelada por un intrón de actina. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Schneider S, Excoffier L, 1999. Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics* 152, 1079–1089.
- Sieber TN, 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* 21, 75-89.
- Simpson EH, 1949, Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.
- Slatkin M, Hudson RR, 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics*, 129, 555-562.
- Strasburg JL, Kearney M, Moritz C, Templeton AR, 2007. Combining Phylogeography with Distribution Modeling: Multiple Pleistocene Range Expansions in a Parthenogenetic Gecko from the Australian Arid Zone. *PLoS ONE*, 8, e760.
- Tajima F, 1983. Evolutionary relationship of a DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437-460.
- Tajima F, 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF, 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132, 619–633.
- Templeton AR, Sing CF, 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134, 659–669.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA, 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140, 767–782.
- Templeton AR, 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7, 381–397.
- Templeton AR, 2002. Out of Africa again and again. *Nature*, 416, 45–51.

- Templeton AR, 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13, 789–809.
- Templeton AR, 2005. Haplotype trees and modern human origins. *Year book of physical anthropology*, 48, 33-59.
- Templeton AR, 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. Wiley, New Jersey, 705pp.
- Templeton AR, 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology*, 17, 1877–1880.
- Templeton AR, 2009. Statistical hypothesis testing in intraspecific phylogeography: nested clade phylogeographical analysis vs. approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology*, 18, 319–331.
- Vázquez-Lobo A, 1996. Filogenia de Hongos Endófitos del género *Pinus* L.: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, México.
- Wang X, Tank DC, Sang T, 2000. Phylogeny and Divergence Times in Pinaceae: Evidence from Three Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 773–781.
- Wang Z, Binder M, Schoch C, Johnston P, Spatafora J, Hibbett D, 2006. Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 295–312.
- Waterson GA, 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 59, 133-144.
- Wright S, 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, 97-159.
- Wright S, 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28, 114–138.
- Wright S, 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.
- Xu J, Yoell J, Anderson J, 1994. An efficient protocol for isolating DNA from higher fungi. *Trends in Genetics*. 10, 226-227.